



UNIVERSIDAD DE ORIENTE  
NÚCLEO DE SUCRE  
ESCUELA DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

ESTUDIO QUÍMICO Y BIOACTIVIDAD DE LAS ESPONJAS MARINAS  
(PORIFERA: DEMOSPONGIAE) MÁS COMUNES DE ISLA LARGA Y  
MANGLE QUEMAO, BAHÍA DE MOCHIMA. ESTADO SUCRE, VENEZUELA  
(Modalidad: Investigación)

RAÚL DEL VALLE CEDEÑO RAMOS

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA  
OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO EN QUÍMICA

CUMANÁ, 2010

ESTUDIO QUÍMICO Y BIOACTIVIDAD DE LAS ESPONJAS MARINAS  
(PORIFERA: DEMOSPONGIAE) MÁS COMUNES DE ISLA LARGA Y MANGLE  
QUEMAO, BAHÍA DE MOCHIMA. ESTADO SUCRE, VENEZUELA

APROBADO POR:



---

Haydelba D'Armas, Ph.D.  
Asesora



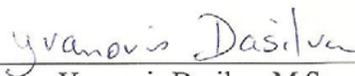
---

Maria Amaro, M.Sc.  
Co-Asesora



---

Hernando Herrera, M.Sc.  
Jurado Principal



---

Yvanovis Dasilva, M.Sc.  
Jurado Principal

## INDICE GENERAL

DEDICATORIA .....	i
AGRADECIMIENTOS .....	ii
LISTA DE TABLAS .....	iii
LISTA DE FIGURAS .....	vi
RESUMEN.....	x
INTRODUCCIÓN .....	1
METODOLOGÍA .....	15
a. Recolección de las muestras.....	15
b. Obtención de los extractos de las esponjas .....	16
c. Pruebas químicas preliminares .....	17
c.1 Alcaloides.....	17
c.2 Saponinas .....	17
c.3 Glicósidos cardiotónicos .....	17
c.4 Glicósidos cianogénicos.....	17
c.5 Esteroles insaturados y triterpenos pentacíclicos .....	18
c.6 Taninos y polifenoles .....	18
c.7 Antraquinonas .....	18
c.8 Metilencetonas .....	19
d. Evaluación de la bioactividad .....	19
d.1 Actividad antibacteriana .....	19
d.2 Actividad antifúngica .....	20
d.3 Actividad letal en <i>Artemia salina</i> .....	21
e. Fraccionamiento cromatográfico de los extractos.....	22
e.1 Cromatografía de columna (CC).....	22
e.2 Cromatografía de capa fina (CCF) y capa fina preparativa (CCFP).....	22
f. Caracterización estructural .....	23

f.1 Infrarrojo (IR) .....	23
f.2 Resonancia magnética nuclear (RMN) .....	24
f.3 Cromatografía de gases-Espectrometría de masas (CG-EM) .....	25
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	28
a. Obtención de las fracciones solubles en acetato de etilo.....	28
b. Pruebas químicas preliminares.....	29
c. Pruebas de actividad biológica .....	31
c.1 Actividad antibacteriana.....	31
c.2 Actividad antifúngica .....	34
c.3 Actividad letal en <i>Artemia salina</i> .....	36
d. Fraccionamiento cromatográfico .....	38
d.1 Cromatografía de la fracción soluble en acetato de etilo (AcOEt) de <i>Aaptos pernucleata</i> .....	38
d.1.1 Actividad letal en Artemia salina de las subfracciones $\alpha$ A, $\alpha$ E, $\alpha$ F, $\alpha$ I, $\alpha$ K, y $\alpha$ M de la esponja <i>Aaptos pernucleata</i> .....	39
d.1.2 Cromatografía de la subfracción $\alpha$ A .....	41
d.1.3 Cromatografía de la subfracción $\alpha$ C .....	45
d.1.4 Cromatografía de la subfracción $\alpha$ D .....	52
d.1.5 Cromatografía de la subfracción $\alpha$ E.....	70
d.1.6 Cromatografía de la subfracción $\alpha$ F.....	78
d.1.7 Cromatografía de la subfracción $\alpha$ I.....	80
d.2 Cromatografía de la fracción soluble en acetato de etilo (FAE) de <i>Aplysina lacunosa</i> .....	81
d.2.1 Actividad antibacteriana de las subfracciones $\beta$ E, $\beta$ G, $\beta$ I, y $\beta$ L .....	84
d.2.2 Cromatografía de la subfracción $\beta$ A .....	85
d.2.3 Cromatografía de la subfracción $\beta$ B .....	85
d.2.4 Cromatografía de la subfracción $\beta$ B <sub>4</sub> .....	96
d.3 Cromatografía de la subfracción $\beta$ E.....	96
d.3.1 Cromatografía de la subfracción $\beta$ E <sub>1</sub> .....	97

d.4 Cromatografía de la subfracción $\beta G$ .....	98
d.4.1 Cromatografía de la subfracción $\beta G_2$ .....	99
d.5 Cromatografía de la subfracción $\beta I$ .....	106
d.5.1 Cromatografía de la subfracciones $\beta I_4$ y $\beta I_6$ .....	107
CONCLUSIONES .....	110
ABREVIATURAS .....	112
BIBLIOGRAFÍA .....	113
HOJA DE METADATOS .....	119

## **DEDICATORIA**

A:

La Santísima Trinidad, Dios uno y trino, por ser la fuerza que me guía y conforta mi alma.

Mis padres, Raúl Cedeño y Marlenys Ramos, por darme la vida y apoyo incondicional.

Mis hermanos, Rodolfo, Robert, Reison, Carlos, Reinaldo y Loren, espero seguir siendo un ejemplo para ellos.

Mi abuela, Delmira Cedeño, por ser una segunda madre, amiga y siempre apoyarme.

Mi abuela, Irma López, espero que desde el cielo estés orgullosa de mí.

## AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a muchas personas que fueron parte de esta etapa de mi vida, que me ayudaron y me brindaron una mano amiga. A Dios, por permitirme seguir adelante con fuerza y salud en todos los momentos de mi vida, que por medio del Espíritu Santo me ha dado el don de la inteligencia para cumplir esta meta. Nunca me cansaré de amarte y alabarte. La Universidad De Oriente y al Departamento de Química por brindarme la educación y formación profesional, que me permitió realizar este trabajo de investigación. Mis asesoras, la Dra. Haydelba D' Armas, no tengo palabras con que agradecerle todo el apoyo que me ha brindado, gracias por su amistad y por haberme recibido como un hijo más en su laboratorio, y a la Prof. María Elena Amaro M.Sc., por siempre animarme a seguir adelante, por todo el cariño y la disposición, no tengo como pagarle todo lo que ha hecho por mí. Que Dios las bendiga y les de mucha salud. Loli, Daisy, Alexis y la señora Matilde por haberme abierto las puertas de sus casas, los primeros años de mi formación profesional, les estaré eternamente agradecido. Mis amigas, María Fernanda, Adriana, Leidis, Adelser, Mary, Brimar y Mónica, a las cuales aprecio mucho por ser personas que han estado en los momentos buenos y malos que he pasado lejos de mi hogar. Mis amigos y compañeros de clases, Gabriela, Marlin, Rosanny, Berenice, Yoli, Jesly, Jesusmarit, Rafael, Luis Fernando, Natiana, Adrian, Ana Karina, Detsibel, Enrique, Jesús Fernando, Joel, Julinet, Miguel, Jose Salazar y Freddy. Mis compañeros de laboratorio, Alexis, Marilín, Victoria, Nirosequi, Adriana, Jean Paul, Fátima, Carmen, Yetsi, Laurens. Los profesores, Maj Britt Mostue, Gustavo Liendo, Ernesto Bastardo, Hernando Herrera, Luisa Rojas, Yarima Alfonzo, Blanca Rojas, Francisco López, Euclides Velazco, entre otros, sus conocimientos fueron la base de mi formación profesional. Los técnicos Simón, Roseline, Lirismar, Moraima, Hernán, Luis y Yoselin, por todas sus orientaciones en los laboratorios. La Profa. Noris del IUT-Cumaná, por su colaboración en la realización de los espectros de IR. La Profa. Rosa Martínez, por su ayuda en la realización de las pruebas antimicrobianas. Y a todas aquellas personas que se me escapan, igualmente gracias a todos.

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Cepas bacterianas pertenecientes a la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC). .....	19
Tabla 2. Cepas de hongos pertenecientes a la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC). .....	21
Tabla 3. Porcentajes de rendimientos húmedos y secos de las fracciones solubles en acetato de etilo (FAE) de las esponjas marinas colectadas en la Bahía de Mochima. 28	
Tabla 4. Análisis químico preliminar de las fracciones solubles en acetato de etilo de las especies estudiadas. ....	29
Tabla 5. Actividad antibacteriana de las fracciones solubles en acetato de etilo (FAE) de las especies estudiadas. ....	32
Tabla 6. Actividad antifúngica de las fracciones solubles en acetato de etilo (FAE) de las especies estudiadas. ....	35
Tabla 7. Actividad letal ( $\mu\text{g/ml}$ ) contra <i>Artemia salina</i> , de las fracciones solubles en acetato de etilo de las esponjas.....	36
Tabla 8. Fraccionamiento cromatográfico de la FAE de <i>Aaptos pernucleata</i> . ....	38
Tabla 9. Subfracciones obtenidas de la CC de la FAE de <i>A. pernucleata</i> . ....	39
Tabla 10. Actividad letal ( $\mu\text{g/ml}$ ) contra <i>A. salina</i> , de algunas de las fracciones de la esponja <i>A. pernucleata</i> . ....	40
Tabla 11. Asignaciones de desplazamientos químicos de protones ( $\delta_{\text{H}}$ ) de algunas señales de RMN $^1\text{H}$ del compuesto $\alpha\text{C}_1$ .....	46
Tabla 12. Desplazamientos químicos de $\text{C}^{13}$ de la subfracción $\alpha\text{C}_1$ y el colestanol. .	51
Tabla 13. Subfracciones obtenidas de la microcolumna cromatográfica de la subfracción $\alpha\text{D}$ . ....	52
Tabla 14. Asignaciones de desplazamientos químicos ( $\delta_{\text{H}}$ ) de algunas señales seleccionadas de RMN $^1\text{H}$ del compuesto $\alpha\text{D}_3$ . ....	59

Tabla 15. Datos seleccionados de RMN $^1\text{H}$ , RMN $^{13}\text{C}$ , HMQC y HMBC del compuesto $\alpha\text{D}_3$ .	64
Tabla 16. Asignaciones de desplazamientos químicos ( $\delta_{\text{H}}$ ) de algunas señales de RMN $^1\text{H}$ del compuesto $\alpha\text{E}_1$ .	71
Tabla 17. Comparación de los $\delta_{\text{C}}$ (ppm) de los compuestos $\alpha\text{C}_1$ y $\alpha\text{E}_1$ .	78
Tabla 18. Fraccionamiento cromatográfico de la subfracción $\alpha\text{F}$ .	79
Tabla 19. Subfracciones obtenidas de la separación cromatográfica de la subfracción $\alpha\text{F}$ .	80
Tabla 20. Subfracciones obtenida de la CCFP de la subfracción $\alpha\text{F}_2$ .	80
Tabla 21. Subfracciones obtenidas del tratamiento de lavado realizado a subfracción $\alpha\text{I}$ .	81
Tabla 22. Fraccionamiento cromatográfico de la FAE de <i>Aplysina lacunosa</i> .	82
Tabla 23. Subfracciones obtenidas de la separación cromatográfica FAE de <i>A. lacunosa</i> .	83
Tabla 24. Actividad antibacteriana de las subfracciones $\beta\text{E}$ , $\beta\text{G}$ , $\beta\text{I}$ y $\beta\text{L}$ , provenientes de la FAE de la esponja <i>A. lacunosa</i> .	84
Tabla 25. Fraccionamiento cromatográfico de la subfracción $\beta\text{B}$ .	86
Tabla 26. Subfracciones obtenidas de la separación cromatográfica de la subfracción $\beta\text{B}$ .	86
Tabla 27. Asignaciones de desplazamientos químicos ( $\delta_{\text{H}}$ ) de algunas señales seleccionadas de RMN $^1\text{H}$ del compuesto $\beta\text{B}_{2.1}$ .	89
Tabla 28. Desplazamientos químicos del RMN de $^{13}\text{C}$ del compuesto $\beta\text{B}_{2.1}$ .	94
Tabla 29. Fraccionamiento cromatográfico de la subfracción $\beta\text{E}$ .	97
Tabla 30. Subfracciones obtenidas de la separación cromatográfica de la subfracción $\beta\text{E}$ .	97
Tabla 31. Subfracciones obtenidas de la CCFP de la subfracción $\beta\text{E}_1$ .	98
Tabla 32. Fraccionamiento cromatográfico de la subfracción $\beta\text{G}$ .	99
Tabla 33. Subfracciones obtenidas de la separación cromatográfica de la subfracción $\beta\text{G}$ .	99

Tabla 34. Fraccionamiento cromatográfico de la subfracción $\beta G_2$ .....	100
Tabla 35. Subfracciones obtenidas de la separación cromatográfica de la subfracción $\beta G_2$ . .....	100
Tabla 36. Subfracciones obtenidas de la CCFP de la subfracción $\beta G_{2,1}$ .....	101
Tabla 37. Asignación de desplazamientos químicos ( $\delta_H$ ) de algunas señales de RMN $^1H$ de la subfracción $\beta G_{2,1,2}$ .....	102
Tabla 38. Asignación de desplazamientos químicos ( $\delta_c$ ) de algunas señales de RMN $^{13}C$ de la subfracción $\beta G_{2,1,2}$ .....	104
Tabla 39. Fraccionamiento cromatográfico de la subfracción $\beta I$ .....	107
Tabla 40. Subfracciones obtenidas de la separación cromatográfica de la subfracción $\beta I$ . .....	107

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del colestan-3 $\beta$ -ol. ....	5
Figura 2. Estructuras del (a) 24 $\epsilon$ -27-nor-24-metil-5 $\alpha$ -colestan-3 $\beta$ -ol, (b) 24 $\epsilon$ -24-metil-5 $\alpha$ -colestan-3 $\beta$ -ol, (c) 23 $\epsilon$ -24 $\epsilon$ -23,24-dimetil-5 $\alpha$ -colestan-3 $\beta$ -ol y (d) 24 $\epsilon$ - -24-etil-5 $\alpha$ -colestan-3 $\beta$ -ol.....	6
Figura 3. Estructuras de algunos esteroides polihidroxilados aislados de <i>Dysidea etheria</i> . ....	6
Figura 4. Bioconversión de los alcaloides isoxazolina, arephobina-2 (a), aplisinamicina-1 (b) e isofistularina-3 (c), a aeroplisinina-1 (d), y la dienona (e), de la esponja <i>Aplysina aerophoba</i> . ....	8
Figura 5. Estructura de la 11-oxoaerotionina.....	9
Figura 6. Estructuras de la (a) bisdesmetilaaptamina y (b) bisdesmetilaaptamina-9- <i>O</i> -sulfato.....	10
Figura 7. Estructuras de la (a) 3-(feniletilamino)metoxiaaptamina y (b) 3-(isopentilamino)metoxiaaptamina.....	11
Figura 8. Estructura del cinachyramino. ....	12
Figura 9. Estructura de la 2- <i>N</i> -acetilglucosamina- $\alpha$ - <i>O</i> -threonina.....	12
Figura 10. Estructura de la pyrinodemina A. ....	12
Figura 11. Estructura de la halitoxina. ....	13
Figura 12. Esponjas colectadas en la Bahía de Mochima. ....	15
Figura 13. Representación esquemática de la obtención del extracto hidroalcohólico y las fracciones solubles en acetato de etilo para cada una de las especies. ....	16
Figura 14. Representación esquemática del ensayo antibacteriano. ....	20
Figura 15. Representación esquemática del ensayo antifúngico.....	21
Figura 16. Conectividades directas entre C-H, de las cuales se obtendrían señales en el espectro HMQC. ....	25

Figura 17. Conectividades indirectas entre C-H, de las cuales se obtendrían señales en el espectro HMBC (n=2 y n=3).....	25
Figura 18. Esquema de fraccionamiento de la fracción soluble en acetato de etilo de la esponja <i>A. pernucleata</i> .....	40
Figura 19. Cromatograma de gases de la subfracción $\alpha A$ .....	41
Figura 20. Espectro de masas del éster metílico del ácido 12-metiltridecanoico. ....	42
Figura 21. Espectro de masas del éster metílico del ácido 14-metilhexadecanoico. ..	43
Figura 22. Espectro de masas del éster metílico del ácido 7,10-octadecadienoico.....	44
Figura 23. Espectro de masas del éster metílico del ácido pentadecanoico.....	44
Figura 24. Espectro de RMN $^1H$ del compuesto $\alpha C_1$ .....	46
Figura 25. Ampliación de la región alifática del espectro de RMN $^1H$ del compuesto $\alpha C_1$ .....	47
Figura 26. Espectro de RMN $^{13}C$ del compuesto $\alpha C_1$ .....	48
Figura 27. Ampliación I del espectro de RMN $^{13}C$ del compuesto $\alpha C_1$ . ....	48
Figura 28. Ampliación II del espectro de RMN $^{13}C$ del compuesto $\alpha C_1$ .....	49
Figura 29. Espectro DEPT-135 del compuesto $\alpha C_1$ .....	50
Figura 30. Estructura del colestanol.....	51
Figura 31. Cromatograma de gases de la subfracción $\alpha D_2$ . ....	53
Figura 32. Espectro de masas del colesterol. ....	54
Figura 33. Espectro de masas del colestanol.....	55
Figura 34. Espectro de masas del ergost-22-en-3-ol.....	56
Figura 35. Espectro de masas del ergostanol. ....	57
Figura 36. Espectro IR del compuesto $\alpha D_3$ .....	58
Figura 37. Espectro RMN $^1H$ del compuesto $\alpha D_3$ . ....	59
Figura 38. Ampliación del espectro RMN $^1H$ del compuesto $\alpha D_3$ . ....	60
Figura 39. Ampliación de la zona a campo alto del espectro RMN $^1H$ . ....	60
Figura 40. Espectro RMN $^{13}C$ del compuesto del $\alpha D_3$ . ....	61
Figura 41. Ampliación general del espectro RMN $^{13}C$ .....	62
Figura 42. Ampliación a campo bajo del espectro RMN $^{13}C$ . ....	62

Figura 43. Ampliación a campo bajo del espectro RMN $^{13}\text{C}$ .	62
Figura 44. Espectro DEPT 135 del compuesto $\alpha\text{D}_3$ .	63
Figura 45. Ampliación del espectro DEPT-135 del compuesto $\alpha\text{D}_3$ .	63
Figura 46. Espectro HMQC del compuesto $\alpha\text{D}_3$ .	65
Figura 47. Ampliación I del espectro HMQC del compuesto $\alpha\text{D}_3$ .	66
Figura 48. Ampliación II del espectro HMQC del compuesto $\alpha\text{D}_3$ .	66
Figura 49. Ampliación III del espectro HMQC del compuesto $\alpha\text{D}_3$ .	67
Figura 50. Espectro HMBC del compuesto $\alpha\text{D}_3$ .	67
Figura 51. Ampliación I del espectro HMBC del compuesto $\alpha\text{D}_3$ .	68
Figura 52. Ampliación II del espectro HMBC del compuesto $\alpha\text{D}_3$ .	68
Figura 53. Estructura parcial I del compuesto $\alpha\text{D}_3$ mostrando las correlaciones HMBC.	69
Figura 54. Estructura parcial II del compuesto $\alpha\text{D}_3$ mostrando las correlaciones HMBC.	69
Figura 55. Estructura propuesta para el compuesto $\alpha\text{D}_3$ .	70
Figura 56. Espectro de RMN $^1\text{H}$ del compuesto $\alpha\text{E}_1$ .	72
Figura 57. Ampliación del espectro de RMN $^1\text{H}$ del compuesto $\alpha\text{E}_1$ .	72
Figura 58. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ del compuesto $\alpha\text{E}_1$ .	73
Figura 59. Ampliación I del espectro de RMN $^{13}\text{C}$ del compuesto $\alpha\text{E}_1$ .	74
Figura 60. Ampliación II del espectro de RMN $^{13}\text{C}$ del compuesto $\alpha\text{E}_1$ .	74
Figura 61. Ampliación III del espectro de RMN $^{13}\text{C}$ del compuesto $\alpha\text{E}_1$ .	75
Figura 62. Espectro DEPT-135 del compuesto $\alpha\text{E}_1$ .	76
Figura 63. Ampliación del espectro DEPT-135 del compuesto $\alpha\text{E}_1$ .	76
Figura 64. Esquema de fraccionamiento de la fracción soluble en acetato de etilo de la esponja <i>A. lacunosa</i> .	83
Figura 65. Espectro IR del compuesto $\beta\text{B}_{2,1}$ .	88
Figura 66. Espectro de RMN $^1\text{H}$ del compuesto $\beta\text{B}_2$ .	89
Figura 67. Ampliación I del espectro de RMN $^1\text{H}$ del compuesto $\beta\text{B}_{2,1}$ .	90
Figura 68. Ampliación II del espectro de RMN $^1\text{H}$ del compuesto $\beta\text{B}_{2,1}$ .	90

Figura 69. Espectro RMN $^{13}\text{C}$ del compuesto $\beta\text{B}_{2,1}$ .....	91
Figura 70. Ampliación I del espectro RMN $^{13}\text{C}$ del compuesto $\beta\text{B}_{2,1}$ .....	92
Figura 71. Ampliación II del espectro RMN $^{13}\text{C}$ del compuesto $\beta\text{B}_{2,1}$ .....	92
Figura 72. Ampliación III del espectro RMN $^{13}\text{C}$ del compuesto $\beta\text{B}_{2,1}$ .....	93
Figura 73. Espectro DEPT del compuesto $\beta\text{B}_{2,1}$ .....	93
Figura 74. Ampliación del DEPT-135 del compuesto $\beta\text{B}_{2,1}$ .....	94
Figura 75. Estructuras más abundantes de los triterpenos, oleanano (a), ursano (b) y lupano (c). .....	96
Figura 76. Espectro RMN $^1\text{H}$ de la subfracción $\beta\text{G}_{2,1,2}$ .....	103
Figura 77. Ampliación del espectro RMN $^1\text{H}$ de la subfracción $\beta\text{G}_{2,1,2}$ .....	103
Figura 78. Espectro RMN $^{13}\text{C}$ de la subfracción $\beta\text{G}_{2,1,2}$ .....	104
Figura 79. Ampliación del espectro RMN $^{13}\text{C}$ de la subfracción $\beta\text{G}_{2,1,2}$ .....	105
Figura 80. Posible núcleo estructural del compuesto de la subfracción $\beta\text{G}_{2,1,2}$ .....	105
Figura 81. Espectro IR de la subfracción $\beta\text{I}_{4,2}$ .....	109
Figura 82. Espectro IR de la subfracción $\beta\text{I}_{6,2}$ .....	109

## RESUMEN

La evaluación química preliminar y el estudio de las propiedades antibacterianas, antifúngicas y letales de las fracciones solubles en acetato de etilo de las esponjas *Aplysina lacunosa*, *A. fulva*, *Cliona varians*, *Cinachyrella kuekenthali*, *Amphimedon viridis* y *Aaptos pernucleata*, recolectadas en la Bahía de Mochima, estado Sucre, evidenciaron la posible presencia alcaloides, esteroides, triterpenos, metilcetonas y taninos con potencial actividad biológica. Las fracciones solubles en acetato de etilo de las esponjas *Aaptos pernucleata*, *A. fulva* y *A. lacunosa*, fueron las únicas que mostraron actividad antibacteriana en contra de *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli*, siendo *A. lacunosa* la que presentó los mayores halos de inhibición. La actividad antifúngica no fue significativa, solo la esponja *Aaptos pernucleata* presentó actividad leve contra *Candida albicans*. La actividad letal en *Artemia salina*, con mayor importancia la mostraron las esponjas *C. kuekenthali*, *Amphimedon viridis* y *Aaptos pernucleata*, con valores de  $CL_{50}$  de 4,10; 1,13 y  $<0,01$   $\mu\text{g/ml}$  respectivamente. Los resultados del estudio de la letalidad de las subfracciones  $\alpha A$ ,  $\alpha E$ ,  $\alpha F$  y  $\alpha I$ , obtenidas mediante el fraccionamiento cromatográfico convencional, provenientes de la esponja *Aaptos pernucleata* demostraron la presencia de varios compuestos con potencial letal en esta esponja; lográndose identificar mediante CG-EM algunos constituyentes, como los ésteres metílicos de los ácidos 12-metiltridecanoico, 14-metilhexadecanoico, 7,10-octadecadienoico y pentacosanoico, y los esteroides: colesterol, colestanol, ergost-22-en-3-ol, y ergostanol. También, se logró aislar y caracterizar por RMN, dos esteroisómeros del colestanol, y un análogo 9-metil del colestanol. La actividad antibacteriana mostrada por las subfracciones del  $\beta E$ ,  $\beta G$ ,  $\beta I$ , y  $\beta L$ , provenientes de la esponja *A. lacunosa*, contra las bacterias *S. aureus*, *Salmonella* sp, *L. monocytogenes* y *E. coli*, evidenció la presencia de metabolitos con potencial actividad bactericida; lográndose aislar un constituyente alcaloidal con núcleo piridínico y dos grupos ésteres como sustituyentes. Además, de la subfracción  $\beta B$  se aisló un triterpeno pentacíclico  $C_{32}$ , derivado del lupano. Considerando los resultados obtenidos, se puede inferir que los metabolitos identificados en las especies *A. lacunosa* y *Aaptos pernucleata*, posiblemente son los causantes de la bioactividad observada.

Palabras o Frases Claves: bioactividad, esponjas marinas, productos naturales.

## INTRODUCCIÓN

La química de los productos naturales se basa en el estudio de los metabolitos secundarios, que son una manifestación de la individualidad del organismo que los contiene, es decir, su distribución es relativamente restringida en la naturaleza que, en algunos casos, se limita a especies o subespecies únicas (1,2).

Es posible que algunos de estos metabolitos no sean esenciales para el organismo que los produce, pero en general deben tener algún significado biológico ya que son biosintetizados y biodegradados, por lo que se presume que deben poseer alguna función, probablemente, específica. Se ha propuesto que estos compuestos están relacionados con la interacción con otros organismos (función ecológica, no fisiológica), como metabolitos de defensa frente al ataque de depredadores, o que son la respuesta a condiciones ambientales de estrés (1,3).

Es por esto que muchos autores han considerado a la naturaleza como una fuente inagotable de compuestos activos que, desde un punto de vista farmacológico, se vienen utilizando con gran efectividad para combatir numerosas enfermedades. La búsqueda de nuevos medicamentos con estructuras novedosas, para fines terapéuticos, se ha incrementado considerablemente en los últimos años. La existencia de enfermedades para las cuales no existen medicamentos efectivos, la resistencia de los agentes patógenos y los avances instrumentales, han propiciado la identificación de un número cada vez mayor de compuestos bioactivos (4). Éstos, se definen como aquellos compuestos que causan efectos sobre los organismos vivos, entre los cuales se incluyen sustancias con valor terapéutico, como antibióticos, antitumorales, antivirales, entre otros; así mismo incluyen sustancias citotóxicas, insecticidas, sustancias repelentes y atrayentes (5).

Tradicionalmente, las plantas y microorganismos de origen terrestre (desde el descubrimiento de las penicilinas), fueron las primeras fuentes en las que el ser humano dispuso de nuevos medicamentos para cura de enfermedades, y desde hace unas décadas los productos naturales de origen marino han tomado mucha importancia; específicamente, a partir del año 1973 cuando se publicó la obra “Química de los productos naturales marinos”, la cual unió firmemente la Química Orgánica formal con las Ciencias Marinas. Su contenido reveló la riqueza de la biota marina y empezó a mostrar su enorme potencial como fuente de compuestos químicos de estructuras desconocidas hasta ese momento. De esta manera, el mar empezó a convertirse exitosamente en la nueva fuente de productos naturales con novedosas funcionalizaciones y bioactividades (2,6).

En ningún lugar de la tierra existe una biodiversidad biológica tan grande como en los océanos. Los organismos que en ellos viven constituyen cerca del 2% de la materia orgánica presente en los mares. Hoy en día existe una gran biblioteca de productos de origen marino que se están investigando clínicamente y la mayoría de ellos son procedentes del trópico (7).

Hasta la fecha, los investigadores han aislado más de 70 000 productos naturales marinos, de los cuales un 25% corresponden a las algas, 18% a los celenterados, 24% provenientes de tunicados, moluscos, equinodermos y briozoos. En este marcador, las esponjas llevan la delantera con 33% (8).

Es probable que la química defensiva desarrollada por muchos organismos primitivos, puede ser remplazada en organismos más avanzados, por defensas físicas o por la habilidad o destreza de desplazarse (correr, nadar en dirección contraria y refugiarse). Los organismos sésiles e invertebrados de cuerpo blando que carecen de defensas físicas son los primeros candidatos a tomar en consideración en la búsqueda de metabolitos bioactivos (9).

Los poríferos o esponjas son los organismos pluricelulares vivientes más antiguos, teniendo su aparición 550 millones de años atrás en el periodo Precámbrico de la era Paleozoica. Son considerados animales primitivos, que habitan tanto en agua dulce como marina, obteniendo su alimento a partir de la filtración, atrapando partículas orgánicas y fitoplancton que se encuentran suspendidos en el agua (9,10).

Existen tres clases de esponjas, Demospongiae, Calcarea y Hexactinellida, de las cuales las Demospongiae son las más abundantes, de mayor tamaño, de colores más intensos y habitan en agua poco profundas; mientras que las Calcarea (aguas someras) y las Hexactinellida (aguas profundas) son pequeñas y de colores claros (11). Al carecer de protección mecánica estos organismos sésiles y de cuerpo blando desarrollan estrategias químicas para sobrevivir (10).

Hasta la fecha, las esponjas se encuentran entre las mejores fuentes de nuevos compuestos con la mayor ocurrencia de potencial de los productos farmacéuticos; estos invertebrados producen moléculas con una variedad de actividades, por ejemplo, antibacteriana, anticoagulante, antimicóticas, antiinflamatorias, antipalúdicas, entre otros (12).

Actualmente, varios compuestos naturales de las esponjas han superado la fase preclínica. Sin embargo, la naturaleza hace difícil la síntesis de la mayoría de los sintetizados análogos de los compuestos naturales sometidos a pruebas clínicas. De hecho, ningún fármaco directamente de origen marino se ha hecho para el sector comercial todavía (12).

La búsqueda de metabolitos bioactivos de esponja beneficia no sólo las ciencias farmacéuticas y la industria; taxonomistas de esponja y sistemáticos, también se benefician a partir de datos del nuevo compuesto para el descubrimiento de nuevos géneros y especies de esponjas (12).

Los distintos productos naturales, también pueden ser empleados como caracteres filogenéticos para ayudar a resolver numerosos problemas de clasificación de esponja. Las dificultades que se presentan en la taxonomía de esponjas, son debido a sus características primitivas resultando en la falta de claros marcadores morfológicos, necesarios para una reconstrucción filogenética robusta. Los metabolitos secundarios han sido sugeridos como una alternativa a los caracteres morfológicos, ya que aumentan en número año a año y la complejidad estructural de las moléculas promete una gran fuente de nuevas especies. La presencia (o ausencia) en particular de compuestos o familia de los compuestos entre los taxones de diferentes esponjas, puede indicar una mayor relación filogenética. Los productos naturales han sido también discutidos con vistas a una solución o para elevar el nivel inferior de identificación taxonómica (12).

Las esponjas son la mayor fuente de esteroides con estructuras inusuales en el ambiente marino, lo que puede comprobarse con los 250 esteroides polares descubiertos hasta el año 2002; adicionalmente se identificaron 80 esteroides en esponjas, entre los años 2003 y 2008. Los esteroides “inusuales” difieren estructuralmente de los esteroides “comunes” (que tienen núcleos  $3\beta$ -hidroxi- $\Delta^5$ o  $\Delta^0$ -colestano y cadenas laterales  $C_8$ - $C_{10}$ ), por presentar una o ambas de las siguientes características: cadenas laterales con tamaños entre  $C_0$  y  $C_{12}$  que han perdido o ganado átomos de carbono en posiciones diferentes a  $C_{24}$ , y núcleos y/o cadenas laterales con oxigenación múltiple (13).

Las esponjas marinas se caracterizan por su gran plasticidad morfológica y, por lo tanto, resulta complicada la diferenciación entre ciertas especies, géneros e incluso familias. Para resolver este problema, se han realizado estudios quimiotaxonómicos en esponjas basados en la composición de sus esteroides totales, tanto “comunes” como “inusuales”. La importancia de los esteroides de esponjas no radica únicamente en el campo de la taxonomía, también existen informes que demuestran la utilidad de

estos compuestos como agentes antimicóticos, citotóxicos, anticolonizadores y anticancerígenos (13).

Dentro de algunos reportes de esteroides en esponjas marinas está el colestan-3 $\beta$ -ol (Figura 1) identificado por EM y RMN, el cual fue aislado de *Aaptos* sp recolectada en la Isla de Perhentian, Malasia (14).

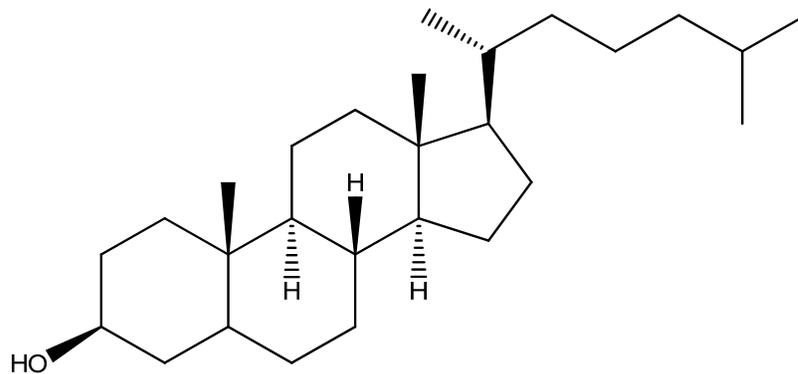


Figura 1. Estructura del colestan-3 $\beta$ -ol.

En la esponja marina *Suberites aurantiaca*, recolectada en la Bahía de Cispatá, Colombia, se identificaron catorce compuestos esteroidales mediante EM; los cuales presentaron como núcleo esteroideal mayoritario  $\Delta^0$ , dentro de los que se encuentran el 24 $\epsilon$ -27-nor-24-metil-5 $\alpha$ -colestan-3 $\beta$ -ol, 24 $\epsilon$ -24-metil-5 $\alpha$ -colestan-3 $\beta$ -ol, 23 $\epsilon$ -24 $\epsilon$ -23,24-dimetil-5 $\alpha$ -colestan-3 $\beta$ -ol, 24 $\epsilon$ -24-etil-5 $\alpha$ -colestan-3 $\beta$ , entre otros (Figura 2) (15).

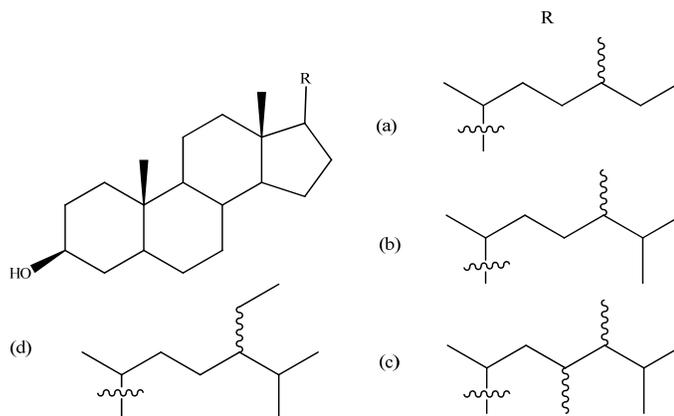


Figura 2. Estructuras del (a) 24 $\epsilon$ -27-nor-24-metil-5 $\alpha$ -colestan-3 $\beta$ -ol, (b) 24 $\epsilon$ -24-metil-5 $\alpha$ -colestan-3 $\beta$ -ol, (c) 23 $\epsilon$ -24 $\epsilon$ -23,24-dimetil-5 $\alpha$ -colestan-3 $\beta$ -ol y (d) 24 $\epsilon$ -24-etil-5 $\alpha$ -colestan-3 $\beta$ -ol.

Muchos investigadores se han enfocado en el aislamiento de compuestos esteroidales polihidroxiados, como los ocho nuevos esteroides (Figura 3) aislados de la esponja *Dysidea etheria*, recolectada en las Bermudas (16).

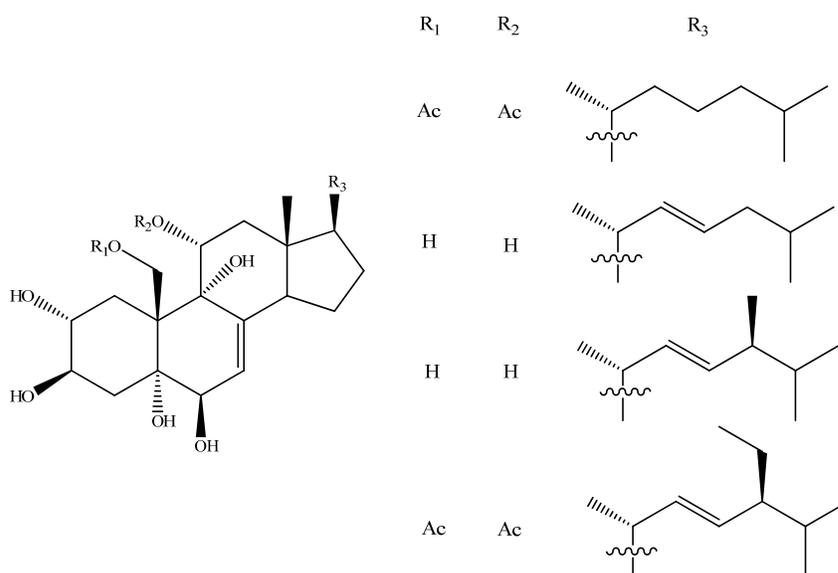


Figura 3. Estructuras de algunos esteroides polihidroxiados aislados de *Dysidea etheria*.

Cabe destacar, que el primer invertebrado marino al cual se le confirmó la producción de metabolitos secundarios como defensa química, fue la esponja *Aplysina aerophoba*, realizándose un estudio de la relación entre la perturbación de la esponja con el desarrollo de su actividad biológica. Descubriéndose una rápida interconversión enzimática de los alcaloides de isoxazolininas a toxinas potentes, como la areoplanina y la dienona (Figura 4), produciéndose éstas sobre las heridas del tejido blando de la esponja, induciendo una pronunciada disminución del interés sobre la esponja, de organismos del medio donde ésta se desarrolla, como peces, bacterias, moluscos y crustáceos (17).

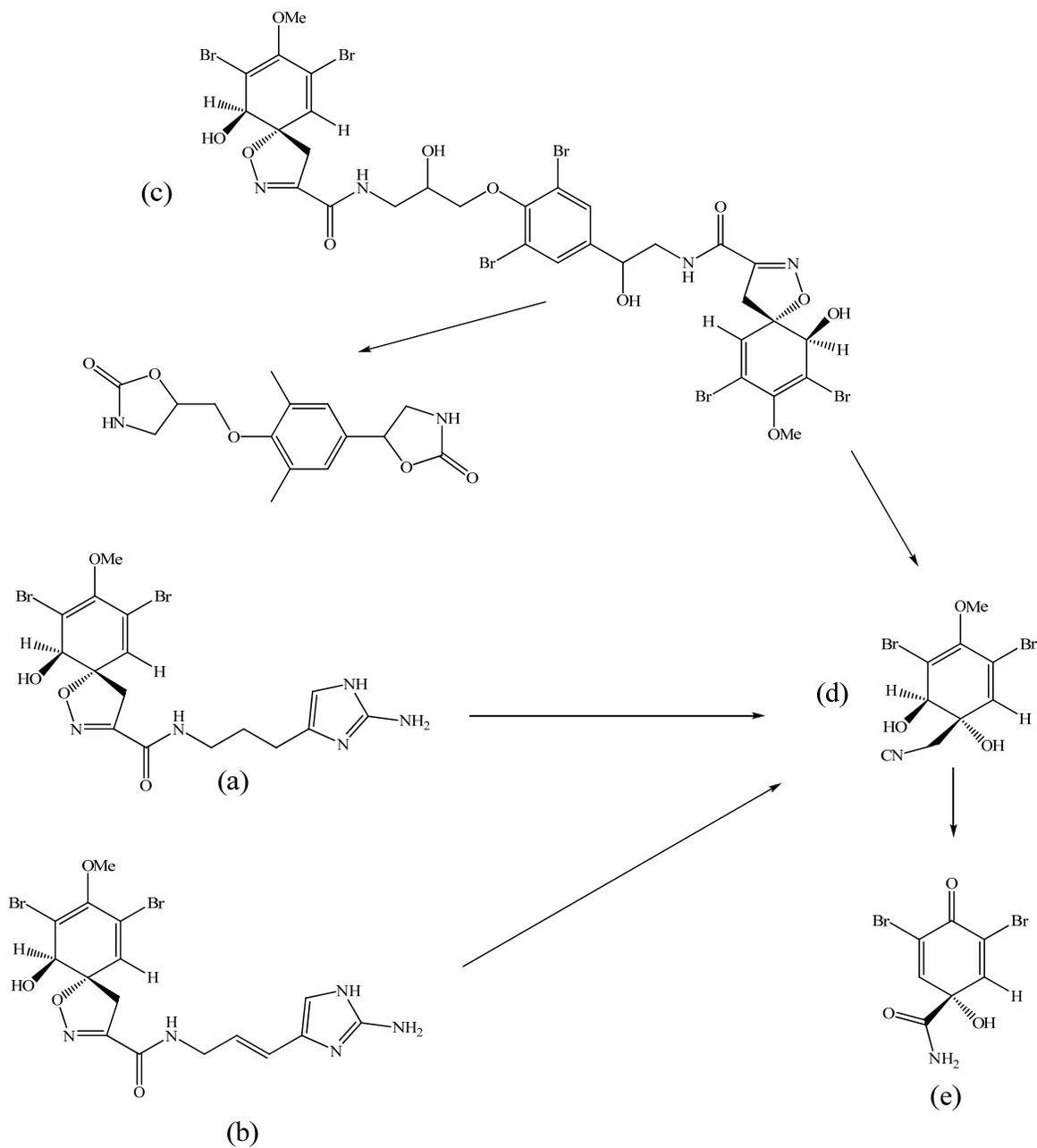


Figura 4. Bioconversión de los alcaloides isoxazolina, arephobina-2 (a), aplisinamicina-1 (b) e isofistularina-3 (c), a aeroplisinina-1 (d), y la dienona (e), de la esponja *Aplysina aerophoba*.

En la actualidad, se ha reportado un significativo número de nuevos compuestos orgánicos provenientes de esponjas marinas colectados en muchas regiones del mundo.

En tal sentido, se puede mencionar el aislamiento e identificación a partir de *Aplysina lacunosa*, colectada en las costas de Puerto Rico, de un alcaloide tipo bromotirosina 11-oxoaerotionina, el cual exhibe citotoxicidad *in vitro* contra líneas celulares de cáncer de colon humano (HCT 116) con un rango limitado de concentración de 0,01-0,1  $\mu\text{g/ml}$ , su estructura (Figura 5) fue elucidada usando experimentos de RMN bidimensional de alta resolución (18). Igualmente, se ha reportado una actividad antibacteriana fuerte de los extractos acuosos de esta esponja, colectada en el Morro de Tigüitigüe, Santa Fe, estado Sucre, Venezuela, inhibiendo el crecimiento de *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* y *Salmonella enteritidis* (19).

Estudios más recientes de esponjas del género *Aplysina*, basados sobre un acercamiento quimiotaxonómico han demostrado que este orden Verongida produce una diversidad de alcaloides bromados como fue el estudio realizado a la esponja *Aplysina fulva* colectada en las costas de Brasil (20).

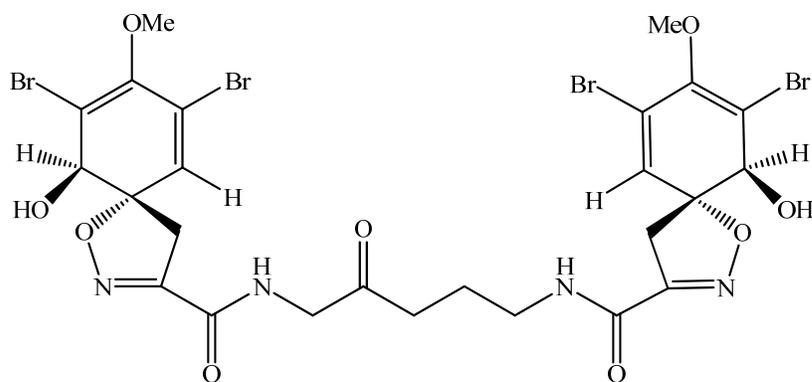


Figura 5. Estructura de la 11-oxoaerotionina.

De la esponja *Cliona varians*, se ha reportado el aislamiento de lectinas CLV con una considerable actividad proinflamatoria, usando el modelo *in vivo* de migración de leucocitos, para el estudio inflamatorio de peritonitis en ratones (21). En un estudio de caracterización de ácidos grasos para esta esponja, se han logrado identificar 17 ácidos grasos con cadenas hidrocarbonadas de C<sub>12</sub> a C<sub>28</sub>, que incluyen cadenas lineales saturadas, cadenas ramificadas saturadas, cadenas insaturadas y monohidroxiesteros (22).

Por otro lado, han sido aislados dos alcaloides (Figura 6); bisdesmetilaaptamina, el cual es un precursor de la biosíntesis propuesta de las aptaminas, y bisdesmetilaaptamina-9-*O*-sulfato, a partir de la esponja *Aaptos* sp. colectada en las costas de Indonesia. Siendo éste el primer reporte de una aptamina sulfatada (23).

De otra esponja del mismo género, *Aaptos aaptos*, fueron identificados dos nuevos alcaloides: 3-(feniletilamino)metoxiaaptamina y 3-(isopentilamino)metoxiaaptamina (Figura 7), presentando éstos una fuerte actividad citotóxica (24).

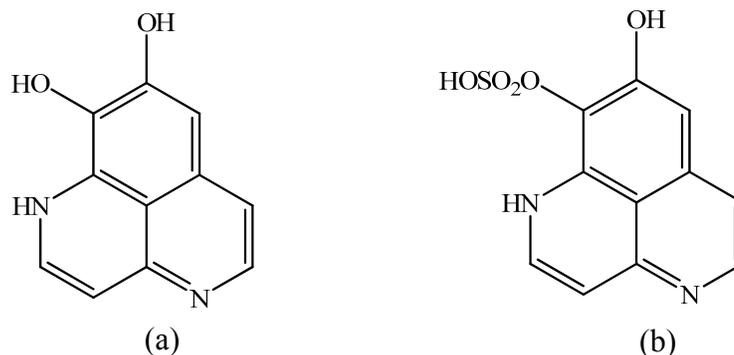


Figura 6. Estructuras de la (a) bisdesmetilaaptamina y (b) bisdesmetilaaptamina-9-*O*-sulfato.

De la esponja *Cinachyrella* sp. colectada en Okinawan, se aisló el alcaloide cinachyramino (Figura 8), con actividad citotóxica contra células de HeLa S<sub>3</sub> con un CL<sub>50</sub> de 6,8 µg/ml, cuya estructura fue determinada por análisis espectroscópicos (RMN) y espectrométrico (EM) (25). En este sentido, también se ha reportado una gran variedad fosfolípidos presentes en la esponja *Cinachyrella kuekenthali* (26). El compuesto activo más relevante aislado del género *Cinachyrella*, ha sido el cinachyrolido A, un macrólido altamente citotóxico contra células de leucemia murina L1210 con una CI<sub>50</sub> <0,6 ng/ml. Específicamente de *Cinachyrella kuekenthali*, se ha reportado el aislamiento y caracterización estructural del aminoácido no natural, 2-*N*-acetilglucosamina- $\alpha$ -*O*-threonina (27) (Figura 9)

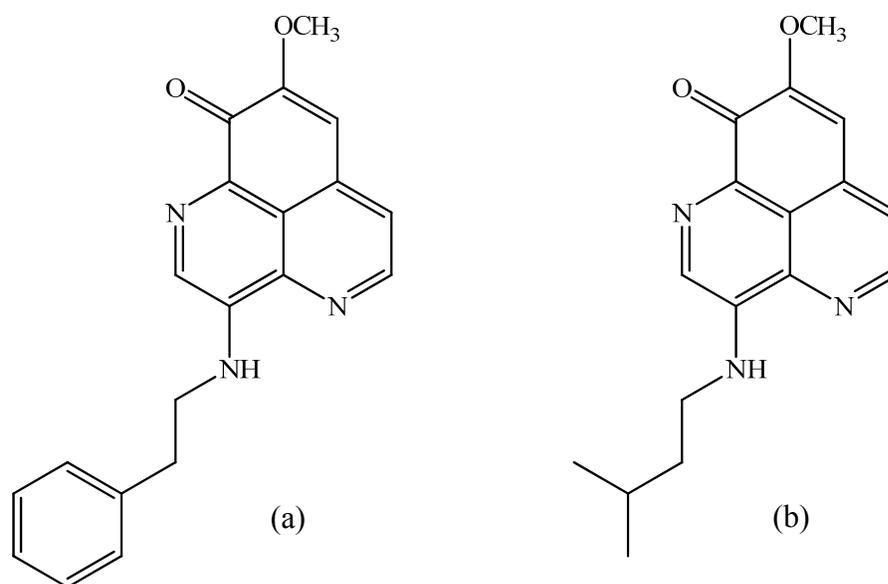


Figura 7. Estructuras de la (a) 3-(feniletilamino)metoxiaaptamina y (b) 3-(isopentilamino)metoxiaaptamina.

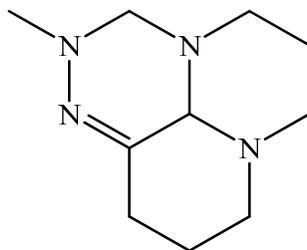


Figura 8. Estructura del cinachyramino.

Además, un alcaloide piridímico citotóxico, pyrinodemina A (Figura 10) único en su clase fue aislado de la esponja *Amphimedon* sp. (28). En el extracto butanólico de la esponja *Amphimedon viridis*, se encontró una potente actividad hemolítica y antimicótica, lográndose aislar una halitoxina compleja (Figura 11) con propiedades neurotóxicas; el extracto metanólico se caracterizó por tener una potente actividad antibacteriana (29).

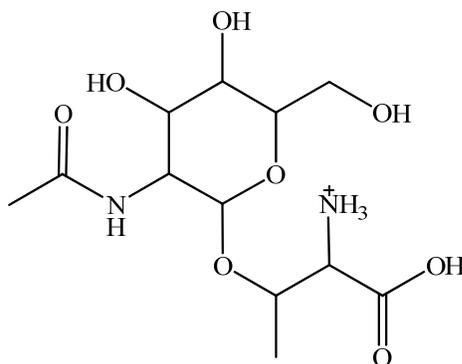


Figura 9. Estructura de la 2-*N*-acetilglucosamina- $\alpha$ -*O*-threonina.

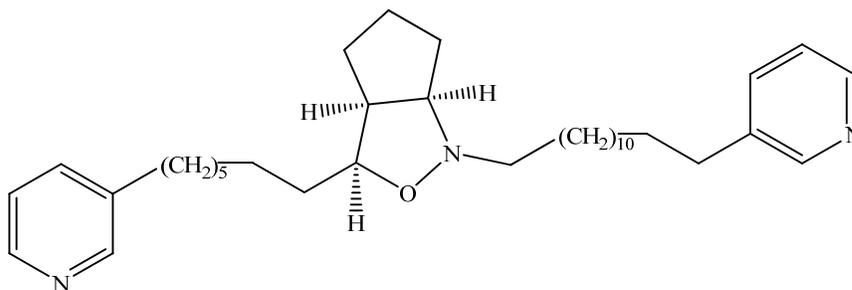


Figura 10. Estructura de la pyrinodemina A.

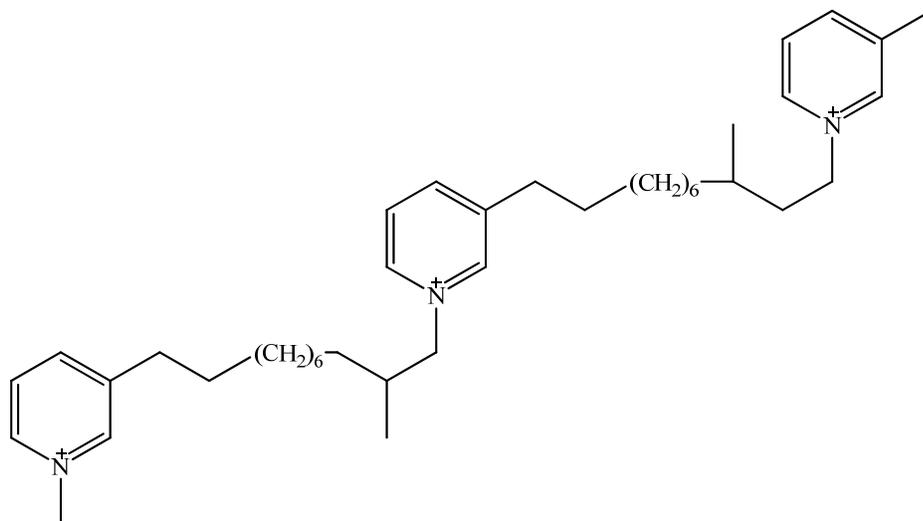


Figura 11. Estructura de la halitoxina.

Los productos naturales son una alternativa en la búsqueda de sustancias con estructuras novedosas con gran potencial biomédico, por lo que esta área de investigación está desarrollándose cada vez más con el fin de encontrar y descubrir nuevas sustancias, estructuralmente únicas, como fuentes importantes de tratamientos terapéuticos capaces de subsanar las dolencias que aqueja a gran parte de la humanidad, sobre todo por la reaparición de nuevas enfermedades hasta ahora difíciles de exterminar, aún con tratamiento profiláctico y de sostén. Dado que en Venezuela las investigaciones en productos naturales marinos en invertebrados son escasas, es importante continuar la exploración e investigación, que lleve además a un censo del potencial de biodiversidad química del país dada las riquezas marinas que se tienen a lo largo de las costas venezolanas.

Por todo lo antes expuesto, se consideró de interés desarrollar el presente estudio, y además, dado que está demostrado que la actividad biológica y composición química de los organismos varía según el hábitat, corrientes marinas, disponibilidad de alimentos, entre otros. Por lo cual, se evaluó la presencia de los

metabolitos secundarios y su posible bioactividad en las esponjas *Aplysina lacunosa*, *Aplysina fulva*, *Cliona varians*, *Cinachyrella kuekenthali*, *Amphimedon viridis* y *Aaptos pernucleata* provenientes de Isla Larga y Mangle Quemao, Bahía de Mochima, estado Sucre, para así tener un conocimiento más profundo de la química de estas esponjas que se encuentran en costas sucrenses y del potencial que puedan tener sus constituyentes en el campo de la biomedicina.

## METODOLOGÍA

### a. Recolección de las muestras

Se colectaron ejemplares de las esponjas marinas *Aplysina lacunosa*, *Aplysina fulva*, *Cliona varians*, *Cinachyrella kuekenthali*, *Amphimedon viridis* y *Aaptos pernucleata* en dos localidades de la Bahía de Mochima, Isla Larga (10° 21' 05'' Lat. N y 64° 21' 05'' Long. W) y Mangle Quemao (10° 22' 28'' Lat. N y 64° 20' 53'' Long. W), ubicadas en la costa norte de Venezuela, a unos 30 km de la ciudad de Cumaná, estado Sucre, y la identificación se realizó en el Laboratorio de Bioactivos Marinos del Departamento de Biología Marina del Instituto Oceanográfico de Venezuela.



*Cliona varians*



*Aplysina fulva*



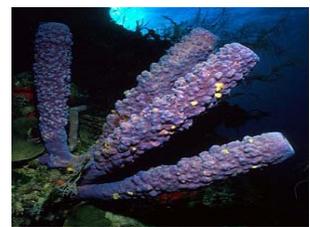
*Cinachyrella kuekenthali*



*Aaptos pernucleata*



*Amphimedon viridis*



*Aplysina lacunosa*

Figura 12. Esponjas colectadas en la Bahía de Mochima.

## b. Obtención de los extractos de las esponjas

Las esponjas frescas se cortaron en trozos pequeños para eliminar la fauna endobiótica visible que podía habitar en estos organismos, se dejaron suspendidas en agua de mar bifiltrada cambiando el agua en intervalos de una hora en dos ocasiones, luego las mismas se dejaron escurrir durante un tiempo prudencial para eliminar la mayor cantidad de agua. Se colocaron en un envase con metanol durante 48 horas, se filtraron y el residuo se reextrajo sucesivamente. Los filtrados combinados fueron evaporados y concentrados a presión reducida para la obtención del extracto metanol/agua. Posteriormente, este extracto se particionó con agua y se extrajo con acetato de etilo; la fase orgánica se separó y fue secada con sulfato de sodio anhidro y concentrada a presión reducida, obteniéndose la fracción soluble en acetato de etilo (FAE).

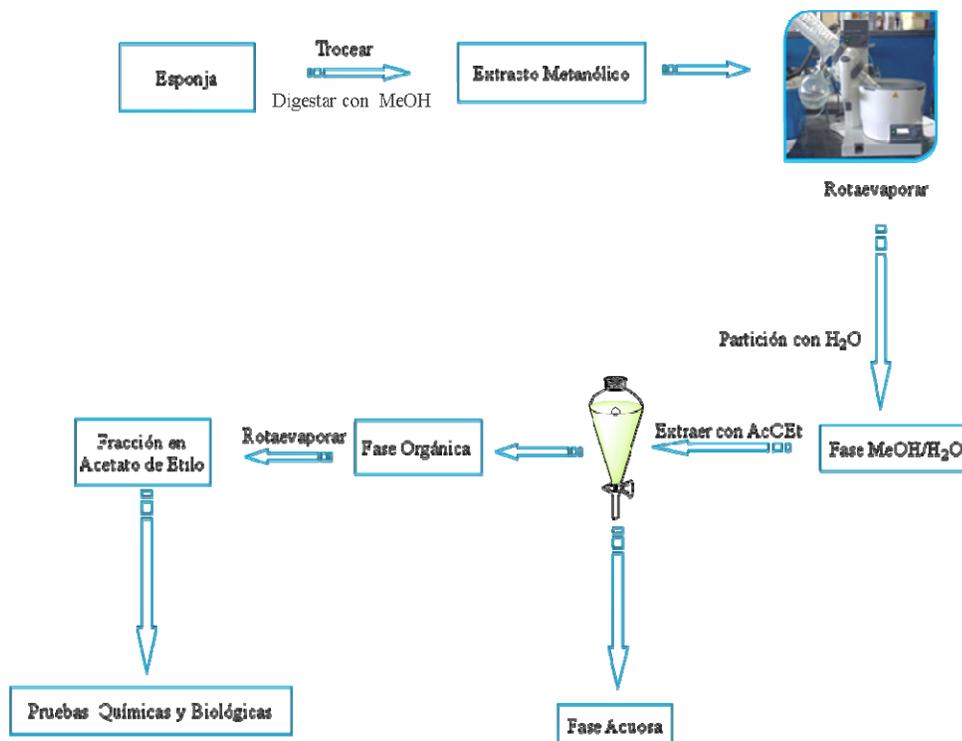


Figura 13. Representación esquemática de la obtención del extracto hidroalcohólico y las fracciones solubles en acetato de etilo para cada una de las especies.

## **c. Pruebas químicas preliminares**

La determinación de las diferentes familias químicas se realizó siguiendo la metodología (6,30) descrita a continuación:

### c.1 Alcaloides

La muestra se trató con HCl (10%) y fue extraída con cloroformo. La fase acuosa se alcalinizó con  $\text{NH}_4\text{OH}$  (10%) y fue particionada nuevamente con cloroformo, las tres fases se analizaron con el reactivo de Dragendorff, lo que permitió detectar la presencia de alcaloides débilmente básicos, básicos y sales cuaternarias de amonio en las fases obtenidas, considerándose positiva si la solución se torna rojo intenso.

### c.2 Saponinas

Una parte de la muestra se disolvió en agua destilada, luego se agitó vigorosamente durante unos minutos. La formación de una espuma estable por 30 minutos, es indicativo de la presencia de saponinas.

### c.3 Glicósidos cardiotónicos

A una porción del extracto crudo se le agregó una gotas de una mezcla recién preparada de ácido 3,5-dinitrobenzoico (2%) e KOH (0,5 mol/l), la aparición de coloraciones azules o violetas es indicativo la presencia de estos compuestos.

### c.4 Glicósidos cianogénicos

Se colocó una porción de la muestra en un tubo de ensayo, se le añadió unas gotas de cloroformo, se tapó el tubo con papel de filtro impregnado de una solución al 1% de ácido pícrico en carbonato de sodio al 10% y se calentó a 50°C. Se considera positivo la presencia de estos compuestos si hay una coloración roja sobre el papel de filtro.

#### c.5 Esteroles insaturados y triterpenos pentacíclicos

Una porción de la muestra se hidrolizó con HCl (10%), el hidrolizado se concentró y se extrajo con cloroformo. A la fase orgánica se le agregó unas gotas del reactivo de Liebermann-Bürchard. La aparición de una coloración verde a los tres minutos de la reacción indica la presencia de esteroles insaturados por el contrario la formación de una coloración roja o naranjada indica la existencia de triterpenos pentacíclicos.

#### c.6 Taninos y polifenoles

Una parte del extracto total fue evaporado a sequedad, retomado en agua y filtrado para ser agregadas unas gotas de cloruro de hierro (III). Los compuestos fenólicos se detectan por la coloración parda que producen en presencia de una solución de cloruro de hierro (III). Por otra parte, fue tratado el crudo con una solución al 1% de gelatina en NaCl al 1%, si se produce una precipitación, indica la presencia de taninos.

#### c.7 Antraquinonas

Una parte del extracto fue llevado a sequedad, se extrajo con KOH (0,5 mol/l), se filtró, se acidificó con ácido acético y se agitó con benceno. Si la capa orgánica toma una coloración roja al alcalinizarla con hidróxido de amonio, hay antraquinonas presentes.

### c.8 Metilencetonas

Una parte del extracto crudo se disolvió en agua destilada, fue filtrado y tratado con el reactivo de Baljet, la producción de una coloración roja indica de la presencia de metilencetonas.

### **d. Evaluación de la bioactividad**

A continuación se describe brevemente la metodología usada en los bioensayos:

#### d.1 Actividad antibacteriana

Para este bioensayo, se realizó la técnica de difusión en agar, llamada antibiograma, la cual consistió en impregnar discos estériles de papel de filtro Whatman N° 3 de 5 mm de diámetro con 10 µl de una solución de 40 mg/ml del extracto o fracción a probar y colocarlos en una placa contentiva de agar Müller-Hinton, previamente inoculada con una suspensión bacteriana de concentración conocida ( $10^8$  células/ml). Posteriormente, se preincubaron a 5°C por 12 h, y seguidamente se incubaron a 37°C por 24 h. La acción antibacteriana se midió tomando el diámetro (mm) del crecimiento bacteriano alrededor del disco (31). Para la interpretación de los resultados respecto a la actividad antimicrobiana de las fracciones, se utilizó la metodología de cruces, donde se establece las categorías interpretativas para los diámetros de la zona de inhibición (32).

Tabla 1. Cepas bacterianas pertenientes a la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC).

Bacterias	Origen	Coloración de Gram
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	+
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 16245	+
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 11126	-
<i>Salmonella</i> sp.	ATCC 14028	-

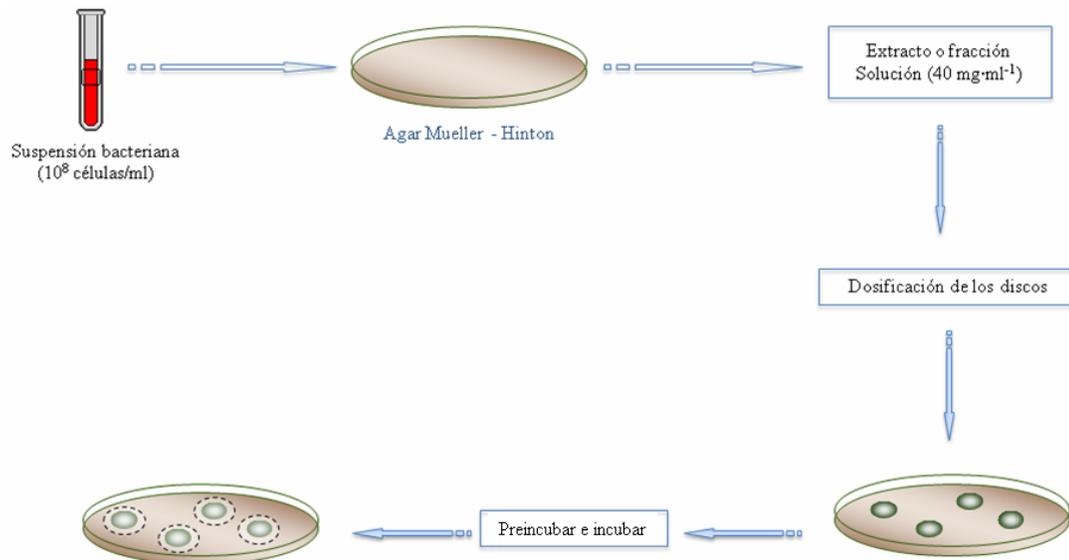


Figura 14. Representación esquemática del ensayo antibacteriano.

## d.2 Actividad antifúngica

Este método consistió en incubar cepas de hongos en tubos, a temperatura ambiente por una semana. Transcurrido este tiempo, se le agregaron aproximadamente 10 ml de agua destilada estéril a cada tubo para remover las esporas y se filtraron sobre gasas estériles, para obtener la solución esporangial. Utilizando hisopos estériles, se colocó la solución obtenida sobre las cápsulas de Petri, previamente preparadas con el agar papa dextrosa (PDA). Seguidamente, se realizó la técnica del antibiograma, colocando los discos de papel Whatman N° 3 de 5 mm de diámetro impregnados previamente con aproximadamente 10  $\mu\text{l}$  de la muestra de concentración 40mg/ml y se incubaron por 48 horas a temperatura ambiente. La actividad antimicótica se detectó al medir el diámetro (mm) del halo de inhibición que se observaron alrededor del disco (33).

Tabla 2. Cepas de hongos pertenecientes a la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC).

Hongos	Origen	Clasificación
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	Patógeno
<i>Aspergillus niger</i>	ATCC 11432	Fitopatógeno
<i>Penicillium crustobum</i>	ATCC 23542	Fitopatógeno
<i>Curularia sp.</i>	ATCC 3426	Fitopatógeno

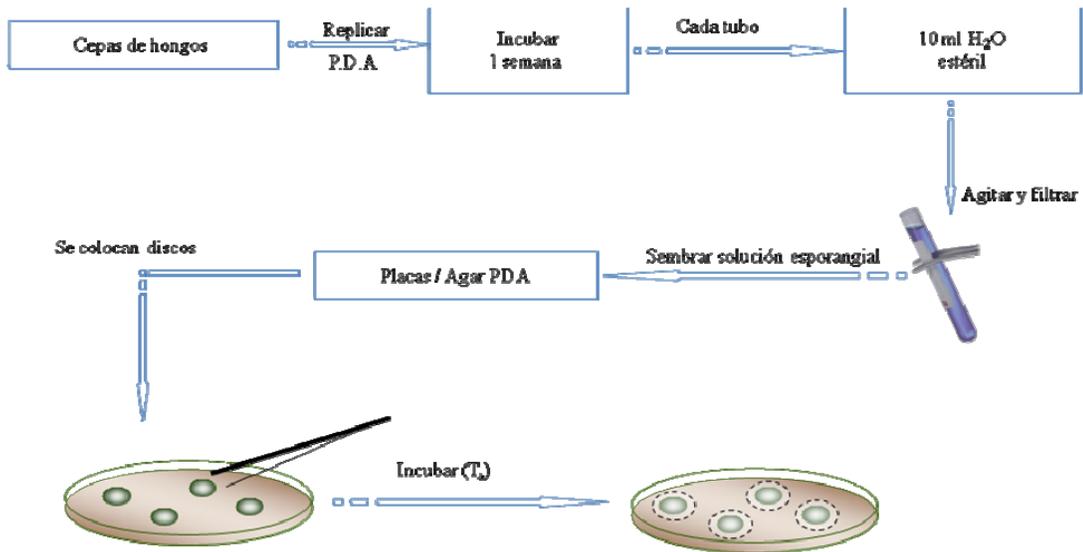


Figura 15. Representación esquemática del ensayo antifúngico.

### d.3 Actividad letal en *Artemia salina*

La actividad letal contra larvas del crustáceo *A. salina*, del extracto crudo, fracciones y/o metabolitos separados de las esponjas fue evaluada mediante la realización de un bioensayo, en el cual se preparó una solución de 10 000 µg/ml del extracto o fracción a probar, en una mezcla H<sub>2</sub>O/DMSO según la solubilidad de éstos y, a partir de ésta, se prepararon soluciones de 1 000; 100; 10; 1; 0,1; 0,01 µg/ml, mediante diluciones sucesivas con agua de mar bifiltrada en viales que contenían entre 10 y 15 nauplios de *A. salina* eclosionados con 24 horas de anticipación. Por cada concentración, se realizaron cuatro réplicas y un control con igual número de réplicas. La cuantificación de la mortalidad de los nauplios se llevó a

cabo pasadas las 24 y 48 horas analizadas, usando diversos métodos estadísticos diseñados para determinar la concentración letal media ( $CL_{50}$ ) (34,35).

#### **e. Fraccionamiento cromatográfico de los extractos**

La separación y aislamiento de los metabolitos secundarios, solubles en acetato de etilo, provenientes de las esponjas marinas más bioactivas se realizó mediante el fraccionamiento de las fracciones y subfracciones obtenidas, usando las siguientes técnicas cromatográficas:

##### e.1 Cromatografía de columna (CC)

Para cada una de las esponjas fraccionadas, la separación de los componentes o metabolitos se realizó en una columna cromatográfica de dimensiones acorde con la masa del extracto o fracción, la cual fue empaquetada con sílica gel 35-70 mesh, como fase estacionaria, a una proporción 1:30 (g extracto: g sílica), y diversos solventes o mezclas de solventes de polaridad creciente, como fase móvil.

##### e.2 Cromatografía de capa fina (CCF) y capa fina preparativa (CCFP)

La técnica de CCFP fue empleada con fines cualitativos, para la combinación de las fracciones provenientes de la cromatografía en columna (CC). Para ello, se utilizaron placas de vidrio (20x20 cm<sup>2</sup>) recubiertas con sílica gel 10-40  $\mu$ m con un espesor de 0,5 mm como fase estacionaria, y como fase móvil, el solvente o mezcla de solventes con el cual se eluyeron las subfracciones al momento de fluirle extracto de la columna cromatográfica. Luego tomaron los  $R_f$  de las subfracciones utilizándose como una solución de molibdato de amonio al 10% en ácido sulfúrico o luz ultravioleta de onda corta como agentes reveladores, y aquellas que mostraron un comportamiento similar, según sus  $R_f$ , se combinaron en una sola subfracción.

La CCFP se utilizó para aislar y purificar los compuestos provenientes de las subfracciones obtenidas. Esta técnica es semejante a la CCF, con la diferencia de que el espesor de la sílica gel en la placa, fue de 1 mm. Para ello la fracción o subfracción, se disolvió en 2 ml de un solvente adecuado y se colocó de manera uniforme, con una pipeta Pasteur, en el origen; se procedió al desarrollo de la cromatografía, empleando como fase móvil el solvente o mezcla de solventes que proporcionó mayor separación en la CCF. Posteriormente, se observaron en un cámara con luz UV y se procedió a tomar lo  $R_f$  de los componentes, para luego desprender la sílica de las placas y de esta forma aislar la zona correspondiente al compuesto en cuestión. Seguidamente, la sílica se colocó en un *beaker* y se le agregó metanol, para asegurar la extracción total del componente de la sílica gel, procediendo a filtrar la solución y evaporando el solvente para obtener así el componente.

## **f. Caracterización estructural**

Para la elucidación de las estructuras moleculares de los componentes aislados, se utilizaron técnicas espectroscópicas y espectrométricas, tales como:

### f.1 Infrarrojo (IR)

El análisis de este tipo de espectro, ofrece información sobre los grupos funcionales presentes en la estructura de los compuestos aislados. Esto es gracias de los estados vibracionales y rotacionales de los enlaces presentes en una molécula, tomando en cuenta el cambio del momento dipolar de los enlaces y la diferencia de las masas de los átomos que forman este sistema, lo cual permite observar absorción por parte de las moléculas en la región del infrarrojo ( $4\ 000\text{-}200\ \text{cm}^{-1}$ ) y por ende la obtención de las bandas que se observan en los espectros IR. Basándose en esto, se colocaron los compuestos aislados en pastillas de KBr o disueltos en  $\text{CHCl}_3$ , en placas de KCl, y se analizaron en un espectrofotómetro de FTIR 16 PC marca Perkin

Elmer, con 24 barridos a resolución de  $2 \text{ cm}^{-1}$ . Estos espectros se realizaron en el Instituto Universitario de Tecnología-Cumaná (IUTC).

## f.2 Resonancia magnética nuclear (RMN)

La RMN es uno de los métodos más utilizados en el área de los productos naturales, cuyos espectros ofrecen evidencias bastante explícitas sobre las posiciones, entornos químicos y características de los núcleos que conforman una molécula dada, de manera que, permite obtener información más acertada de la estructura del compuesto en estudio. Este hecho la convierte en una de las técnicas más poderosas para la determinación de estructuras moleculares, teniendo como fundamento del estudio de las propiedades magnéticas de los núcleos atómicos específicos de las moléculas.

Los análisis de las subfracciones y compuestos obtenidos se realizaron en dos equipos de RMN, uno marca Jeol de 400 MHz y otro modelo Bruker de 400 MHz, de la Universidad Simón Bolívar (USB) y el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), respectivamente. Las muestras fueron disueltas en solventes deuterados ( $\text{CDCl}_3$  y  $\text{CD}_3\text{OD}$ ), según la solubilidad de las muestras, y se colocaron en un tubo de resonancia, para luego ser introducidas en el equipo de RMN, obteniéndose los espectros RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ . Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) obtenidos en los espectros, se reportaron en ppm en relación a un estándar interno de tetrametilsilano (TMS).

Se empleó el experimento de RMN: Distortionless Enhancement Through Polarization Transfer (DEPT), ya que los espectros DEPT-135 son muy útiles para asignar señales de  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}$ . En el caso del DEPT-135 los picos del  $\text{CH}$  y  $\text{CH}_3$  son observados hacia arriba y los del  $\text{CH}_2$  invertidos. Adicionalmente se realizaron experimentos bidimensionales de RMN, como los que se describen a continuación:

Del espectro RMN-HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence) se obtienen las conectividades directas entre carbonos e hidrógenos, así del espectro de la figura 16 se obtendrían señales para la interrelación entre  $C_a-H_a$ ,  $C_b-H_b$ ,  $C_c-H_c$  y  $C_d-H_d$ , respectivamente.

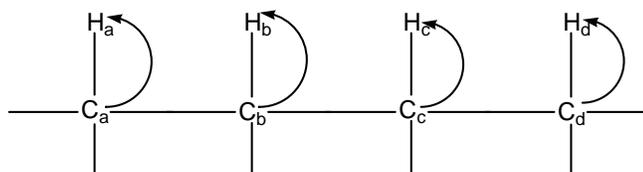


Figura 16. Conectividades directas entre C-H, de las cuales se obtendrían señales en el espectro HMQC.

Del espectro RMN-HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Connectivity) se obtienen las conectividades entre carbonos e hidrógenos distanciados por  $n$ - enlaces, donde  $n= 2$  ó  $3$ . Del espectro de la figura 17.a, se obtendrían señales para las conectividades a dos enlaces entre  $C_a-H_b$ ,  $C_b-H_a$ ,  $C_b-H_c$ ,  $C_c-H_b$ ,  $C_c-H_d$  y  $C_d-H_c$ , entre otras. Del espectro de la figura 17.b, se obtendrían señales para las conectividades a tres enlaces entre  $C_a-H_c$ , y  $C_b-H_d$ , entre otras.

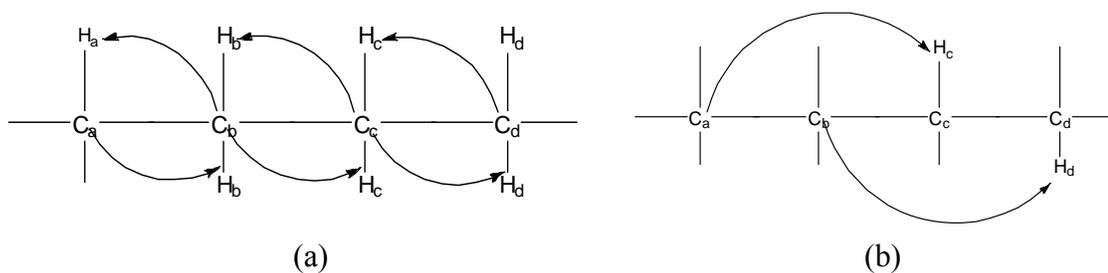


Figura 17. Conectividades indirectas entre C-H, de las cuales se obtendrían señales en el espectro HMBC ( $n=2$  y  $n=3$ ).

### f.3 Cromatografía de gases-Espectrometría de masas (CG-EM)

Generalmente, la cromatografía de gases es ampliamente usada en combinación con la espectrometría de masas, siendo este el método más simple para la separación e identificación de compuestos orgánicos que se encuentran en mezclas complejas. La fragmentación de la molécula, da la ventaja para la ubicación de ciertos grupos funcionales en entornos químicos específicos de la misma. Siendo, la destrucción de la muestra, la única desventaja apreciable para esta técnica. La masa total de cada fragmento, es observado en el espectro de masas como un pico, por ende, el análisis consiste en primer lugar, en relacionar los picos principales y en interpretarlos simultáneamente; teniendo en cuenta que el espectro exhibirá un pico menos abundante correspondiente al ión molecular del compuesto, el cual da información sobre la masa molar del mismo. La manera de obtener finalmente la elucidación estructural del compuesto, es la comparación con el espectro de un compuesto conocido a través de bases de datos que ayudan a la confirmación y el patrón de fragmentación.

Para el análisis de algunas de las muestras se usó un cromatógrafo de gases marca Varian modelo Saturn 2000, con una fuente de ionización por impacto electrónico y un detector de trampa de iones del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Las muestras se inyectaron en una columna CP-SIL-8CB-MS de 30 m x 0,25 D.I. y helio como gas de arrastre, a una rapidez de 1ml por minuto. La temperatura del inyector fue de 280°C, la temperatura inicial del horno fue de 100°C con una rapidez de calentamiento de 5°C por minuto, hasta llegar a la temperatura final de 295°C. Posteriormente, la identificación de los compuestos se realizó por la comparación computarizada con las librerías WILEY y NIST. Las muestras analizadas en la Universidad Simón Bolívar (USB), se inyectaron en un cromatógrafo de gases marca Hewlett-Packard (HP) modelo 5890, serie II, con fuente de ionización por impacto electrónico (IE) de 70 eV, equipado con una columna de 25 m x 0,18 D.I x 0,18 mm de espesor. La temperatura inicial (Ti) del horno fue de 70°C con una rampa de 10°C por minuto hasta llegar a 300 °C

(Tf). El cromatógrafo de gases está acoplado con un espectrómetro de masas marca Hewlett-Packard (HP) modelo 5971 A. La identificación de los componentes se realizó por comparación computarizada con librerías Wiley 138 L y 275 L.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Seis esponjas de la Bahía de Mochima fueron analizadas, realizándose un estudio de la bioactividad, de la fracción soluble en acetato de etilo (FAE), mediante la actividad antibacteriana, antifúngica y letalidad en *Artemia salina*; procediéndose a la identificación y caracterización de los metabolitos de las especies que resultaron más bioactivas, cuyos resultados se presentan a continuación:

### a. Obtención de las fracciones solubles en acetato de etilo

Los resultados obtenidos de las FAE se pueden apreciar en la tabla 3, donde se observan los porcentajes de rendimientos de extracción con respecto a los especímenes húmedos y secos, pudiéndose notar que las especies del género *Aplysina*, presentaron los rendimientos de extracción más altos en los dos casos (húmedos y secos) y la esponja *C. varians* mostró el rendimiento más bajo con respecto a las demás esponjas.

Tabla 3. Porcentajes de rendimientos húmedos y secos de las fracciones solubles en acetato de etilo (FAE) de las esponjas marinas colectadas en la Bahía de Mochima.

Esponja	M <sub>H</sub> (g)	M <sub>S</sub> (g)	M <sub>FAE</sub> (g)	R <sub>H</sub> (%)	R <sub>S</sub> (%)
<i>C. kuenkenthali</i>	245,8	41,0	1,1625	0,47	2,84
<i>C. varians</i>	728,1	121,5	0,6694	0,09	0,55
<i>A. pernucleata</i>	505,3	93,2	1,8121	0,36	1,94
<i>A. viridis</i>	179,1	23,9	0,9768	0,54	4,09
<i>A. fulva</i>	357,5	34,5	2,5629	0,72	7,42
<i>A. lacunosa</i>	551,6	92,1	3,8641	0,70	4,19

M<sub>H</sub>: masa de la esponja húmeda. ; M<sub>S</sub> : masa de la esponja seca.

M<sub>FAE</sub>: masa de la fracción en acetato de etilo.

R<sub>H</sub>: rendimiento con respecto a la masa húmeda.

R<sub>S</sub>: rendimiento con respecto a la masa seca.

## b. Pruebas químicas preliminares

Las pruebas químicas preliminares revelaron la posible presencia y ausencia de familias de metabolitos secundarios, en las fracciones solubles de cada esponja, lo que proporcionó una información importante, que ayudó a seleccionar los tratamientos cromatográficos y estrategias de separación más eficientes, que permitieron aislar algunos de los constituyentes químicos de las esponjas estudiadas.

Los metabolitos detectados en las fracciones dieron positivos para una serie de pruebas basadas en reacciones químicas de clasificación de grupos funcionales, tales como: alcaloides (al ser tratado una porción de la fracción con el reactivo de Dragendorff se observó un coloración naranja rojiza), taninos (al agregar unas gotas de una solución de gelatina al 1% en cloruro de sodio al 1% se formó un precipitado blanco), metilencetona (al agregar unas gotas de una mezcla 1:1 de una solución de ácido pícrico al 1% y NaOH al 10% se formó una coloración roja), esteroides y triterpenos (al agregar unas gotas del reactivo de Liebermann-Burchard, se observó una coloración azul-verdosa y/o violeta, respectivamente).

Tabla 4. Análisis químico preliminar de las fracciones solubles en acetato de etilo de las especies estudiadas.

Familias de metabolitos	<i>C. varians</i>	<i>A. lacunosa</i>	<i>A. fulva</i>	<i>A. pennuleata</i>	<i>C. kuekentalli</i>	<i>A. viridis</i>	%EMF
Alcaloides	+	+	+	+	+	+	100
Taninos	+	+	+	-	-	-	50
Metilencetonas	+	+	+	-	-	-	50
Esteroides insaturados	+	-	+	+	+	+	83,33
Triterpenos pentacíclicos	-	+	+	+	-	+	66,66
Antraquinonas	-	-	-	-	-	-	0
Polifenoles	-	-	-	-	-	-	0
Saponinas	-	-	-	-	-	-	0
Glicósidos cianogénicos	-	-	-	-	-	-	0
Glicósidos cardiotónicos	-	-	-	-	-	-	0
%MPE	40	40	50	30	20	30	

+ : Detectado - : No detectado

%EMF: porcentaje de fracciones con metabolitos pertenecientes a la misma familia química.

%MPE: porcentajes de metabolitos presentes para cada extracto.

Las familias de metabolitos detectados pueden observarse en la tabla 4, donde se puede apreciar que la mayor presencia de familias metabolitos secundarios la mostró *A. fulva*, con un porcentaje de 50%, y la esponja *C. kuekentalli* exhibió el menor porcentaje con 20%. Además, se detectaron alcaloides en todas las especies estudiadas, lo cual es consistente con los trabajos reportados en la literatura, donde se han aislado una variedad de alcaloides tipo bromotirosina en esponjas del género *Aplysina*, aaptaminas en el género *Aptos*, cinachyramino en el género *Cinachyrella*, halitoxina en *A. viridis*, y siendo la primera vez que se reporta la presencia general de alcaloides en esponjas del género *Cliona* (18-29). La abundancia de alcaloides en esponjas marinas puede deberse a las altas concentraciones de nitritos y nitratos disueltos en los océanos, incorporándolos a su metabolismo mediante la filtración del agua de mar, a través del ciclo del nitrógeno.

Los esteroides y triterpenos mostraron una abundancia importante en las esponjas estudiadas, lo cual está en concordancia con muchos estudios donde han sido reportados; coincidiendo que estos están relacionados con la formación de la membrana plasmática de las células de las esponjas, la cual está constituida por lípidos, donde los compuestos de origen terpenoidal tienen una significativa participación (36).

Las esponjas del género *Aplysina* presentaron taninos y metilencetonas, el cual es el primer reporte de la detección de estos tipos de metabolitos en este género; considerando que estas familias de metabolitos según la literatura consultada, se han caracterizado por poseer actividades biológicas significativas como actividad antitumoral, antimicrobiana, fototóxica, entre otras, es posible que estos metabolitos estén asociados a algún mecanismo de defensa (2).

Las pruebas para polifenoles, antraquinonas, saponinas, glicósidos cianogénicos y glicósidos cardiotónicos resultaron negativas, pero esto no significa que estas

esponjas no posean estas familias de compuestos químicos, sino, puede darse el caso, de que los mismos estén en concentraciones muy bajas en las fracciones solubles, por lo cual no dan resultados positivos al ser tratados con los reactivos específicos para cada familia química. También, los glicósidos que pudieran estar presentes en estos organismos, es lógico que se encuentren en la fase acuosa originada durante la partición con el acetato de etilo, la cual no fue estudiada.

En el mismo orden de ideas, es consecuente afirmar que las posibles saponinas y polifenoles presentes en estas especies estarían en la fase acuosa, debido a estudios que demuestran sus presencias en el extracto acuoso de la esponja *Aplysina lacunosa*, el cual resultó positivo en saponinas (mostró efecto hemolítico) y polifenoles (19).

### **c. Pruebas de actividad biológica**

Los bioensayos realizados fueron determinantes para la selección de las especies a las cuales se les realizaron los fraccionamientos cromatográficos por las técnicas cromatográficas convencionales, permitiendo llevar a cabo un estudio biodirigido de los constituyentes químicos de las especies bioactivas seleccionadas para tal fin.

Entre las pruebas realizadas se encuentran las siguientes:

#### **c.1 Actividad antibacteriana**

La actividad antibacteriana es uno de los bioensayos más significativos en el estudio farmacológico, debido al continuo crecimiento de la resistencia de las bacterias frente a los antibióticos comunes, lo cual ha resultado en un problema para el tratamiento de enfermedades infecciosas. Es por esto, que los científicos han dirigido sus investigaciones hacia la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos.

Como se observa en la tabla 5, la esponja que presentó mayor actividad antibacteriana en contra de las bacterias ensayadas fue *A. lacunosa*, la cual mostró actividad bactericida contra el 75% de los microorganismos ensayados, seguida por *A. fulva* y *Aptos pernucleata* con un 50% y 25%, respectivamente.

También es de interés mencionar que la FAE de la esponja *A. lacunosa* presentó una actividad bactericida fuerte contra *Listeria monocytogenes*, y moderada contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*; es decir, mostró actividad frente bacterias Gram (+) como Gram (-); este hecho puede ser atribuido a la presencia de más de un constituyente activo en esta esponja, entre los cuales se encontrarían, posiblemente, los bromometabolitos con actividad antibacteriana significativa que han sido reportados en esponjas de este género por otros autores. Además, se puede inferir que la presencia de los taninos y metilencetonas, detectados solamente en estas esponjas, pudiesen estar asociados a la actividad antibacteriana observada (37).

Tabla 5. Actividad antibacteriana de las fracciones solubles en acetato de etilo (FAE) de las especies estudiadas.

Microorganismos	<i>C. varians</i>	<i>A. lacunosa</i>	<i>A. pernucleata</i>	<i>A. fulva</i>	<i>C. kuekentali</i>	<i>A. viridis</i>	% EAM
Bacterias :							
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	++	-	++	-	-	33,33
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	+++	+	-	-	-	33,33
<i>Escherichia coli</i>	-	++	-	+	-	-	33,33
<i>Salmonella sp.</i>	-	-	-	-	-	-	0
%MSE	0	75,00	25,00	50,00	0	0	

+++ : Actividad fuerte (diámetro superior a 18 mm), ++ : Actividad moderada (diámetro entre 15-18 mm), + : Actividad leve (diámetro entre 11-14 mm), - : no hay actividad, %MSE: porcentaje de microorganismos sensibles a cada extracto, %EAM: porcentaje de extractos activos contra un mismo microorganismo. Estudio realizado con una concentración de 40 mg/ml.

Un estudio del extracto acuoso de la esponja *A. lacunosa*, recolectada en el Morro de Tigüitigüe, Santa Fe, estado Sucre, mostró actividad contra *Escherichia coli*, pero no inhibió el crecimiento de las cepas *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* (19). Sin embargo, en este estudio la FAE fue capaz de inhibir el crecimiento de estas tres bacterias, por lo cual se puede decir, que los extractos orgánicos de esta esponja poseen un rango mayor de actividad antibacteriana; esta presunción puede confirmarse debido a que un estudio del extracto clorofórmico de *A. lacunosa*, colectada en la bahía de Santa Marta (Colombia), presentó actividad contra las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Salmonella* sp (38).

Tomando en cuenta que el extracto clorofórmico de la esponja colectada en Colombia, presentó actividad contra *Salmonella* sp y la FAE de *A. lacunosa* de este estudio no mostró actividad contra esta cepa bacteriana, se puede afirmar que esto pudiera deberse a un efecto antagónico producido por metabolitos más polares extraídos con AcOEt, el cual suprime el efecto del compuesto que produce la inhibición de esta bacteria; aseveración hecha, debido a que al realizar el fraccionamiento cromatográfico de la FAE (Tabla 24), algunas de las subfracciones obtenidas presentaron actividad antibacteriana contra este microorganismo.

Las FAE de las esponjas *Amphimedon viridis* y *C. kuekentali*, no presentaron actividad contra ninguna de las bacterias ensayadas, pero existen reportes de actividad antibacteriana de *A. viridis* recolectada en la bahía de Cispatá (Colombia) y *C. kuekentali* recolectada en la Isla de Coche (Venezuela), las cuales presentaron actividad contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. El hecho de que las esponjas en este estudio no mostraron bioactividad, puede deberse a la diferencia en los sitios de recolección con relación a las reportadas en la literatura. Estos hábitats están sujetos a la disponibilidad de alimentos y los depredadores de cada ambiente marino, debido a que se ha demostrado que estos factores pueden influir en la producción de varios tipos de metabolitos. Tomando en cuenta lo antes dicho,

posiblemente estas esponjas en la Bahía de Mochima no tienen que enfrentarse con algunos depredadores, a los cuales están sometidas estas mismas especies en la Bahía de Cispatá y la Isla de Coche, por lo cual no tienen la necesidad de producir estos compuestos que muestran tener actividad contra estas bacterias (39,40).

Muchos antibióticos son más efectivos contra las bacterias Gram (+), debido a que las células de las bacterias Gram (-) poseen una doble membrana celular que las recubre, por lo cual dicha envoltura dificulta el paso de ciertas sustancias al interior de las células, incluyendo los antibióticos. Sin embargo, los resultados de este estudio mostraron que ambos grupos de bacterias resultaron ser inhibidas por la fracción soluble en acetato de etilo de *A. lacunosa* y *A. fulva*, lo cual es consecuente con los resultados reportados sobre el extracto acuoso de *A. aerophoba*, el cual fue capaz de inhibir tanto bacterias Gram (+) como Gram (-) (41,42).

Estos son resultados importantes, considerando que las cepas de *S. aureus* poseen gran facilidad para mutar e incorporar genes de resistencia frente a los antibióticos tradicionales, potenciando a estas esponjas como una nueva fuente de compuestos con actividad antibacteriana (43).

### c.2 Actividad antifúngica

El estudio antimicótico tiene gran importancia, tanto en la farmacología como en la industria alimenticia, debido a la proliferación de hongos, por el tiempo de almacenamiento de los alimentos, y la resistencia que ofrecen éstos a los antimicóticos, complicándose así el tratamiento de enfermedades infecciosas producidas por las esporas de los hongos (41).

Como se observa en la tabla 6, las especies analizadas no presentaron actividad antifúngica frente a las cepas de hongos ensayadas, a excepción de *Aaptos pernuclata* donde solo el 25% de los hongos fueron sensibles a este extracto, mostrando una halo de inhibición leve frente a la cepa de *Candida albicans*. Posiblemente esta actividad se deba a la presencia de triterpenos y alcaloides, debido a que es sabido según

referencias consultadas, que éstos son capaces de actuar sobre colonias de bacterias y hongos hasta producir el fenecimiento de las mismas (44,45), lo cual permite decir que esta especie posiblemente posee metabolitos con potencial antimicótico.

Cabe resaltar la sensibilidad de *C. albicans* frente la FAE de *A. pernucleata*, ya que para el tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por este hongo los principales inconvenientes se deben a la escasez de antimicóticos. Esto obedece a la tendencia tóxica de los antimicóticos comerciales para los humanos, debido a la similitud que conservan los hongos con las células eucariotas (43).

La FAE de la esponja *C. kuekentali*, no mostró actividad antifúngica en contra de ninguna de las cepas de hongos ensayadas, estando en concordancia con los resultados expuestos en un estudio de los extractos orgánicos de *C. kuekentali* recolectada en Santa Marta (Colombia) (43); sin embargo, un estudio anterior a este, sobre el extracto acuoso de *C. kuekentali* colectada en la Isla de Coche, mostró actividad contra *Candida albicans* y *Penicillium crustobum*, por lo cual se puede decir que, posiblemente los extractos acuosos de las esponjas analizadas sean más prometedores para la actividad antimicótica (39).

Tabla 6. Actividad antifúngica de las fracciones solubles en acetato de etilo (FAE) de las especies estudiadas.

Microorganismos	<i>C. varians</i>	<i>A. lacunosa</i>	<i>A. pernucleata</i>	<i>A. fulva</i>	<i>C. kuekentali</i>	<i>A. viridis</i>	% EAM
Hongos :							
<i>Candida albicans</i>	-	-	+	-	-	-	16,66
<i>Aspergillus niger</i>	-	-	-	-	-	-	0
<i>Penicillium crustobum</i>	-	-	-	-	-	-	0
<i>Curularia sp.</i>	-	-	-	-	-	-	0
%MSE	0	0	25,00	0	0	0	

+++ : Actividad fuerte (diámetro superior a 18 mm), ++ : Actividad moderada (diámetro entre 15-18 mm), + : Actividad leve (diámetro entre 11-14 mm), - : no hay actividad, %MSE: porcentaje de microorganismos sensibles a cada extracto, %EAM: porcentaje de extractos activos contra un mismo microorganismo. Estudio realizado con una concentración de 40 mg/ml.

En estudios previos, se ha propuesto que la actividad antimicótica de algunas esponjas marinas, puede ser parte de un mecanismo químico de defensa para evitar el asentamiento de larvas y de otros organismos, con el fin de prevenir la epibiosis. Estos organismos epibióticos podrían interferir y disminuir la eficiencia en el proceso de filtración de la esponja, evitando el desarrollo desde los primeros estadios celulares (46, 47).

### c.3 Actividad letal en *Artemia salina*

Dentro de los bioensayos de gran utilidad en el campo de los productos naturales y ecotoxicología, se encuentra el de toxicidad aguda o concentración letal media (CL<sub>50</sub>) en *Artemia salina*, debido a que se determinó que existe una correlación positiva entre la mortalidad de las larvas de *A. salina* y la citotoxicidad frente a las células 9KB (carcinoma nasofaríngeo humano) y 3PS (leucemia) por lo cual este ensayo puede ser utilizado para detectar compuestos antitumorales y pesticidas (2,48).

Tabla 7. Actividad letal (µg/ml) contra *Artemia salina*, de las fracciones solubles en acetato de etilo de las esponjas.

Esponjas	CL <sub>50</sub> (24 h)	CL <sub>50</sub> (48 h)	Método
<i>A. lacunosa</i>	743,45	694,78	Probit
<i>A. fulva</i>	287,24	264,30	Binomial
<i>C. varians</i>	102,35	74,28	Binomial
<i>C. kuekentali</i>	52,37	4,10	Probit
<i>A. viridis</i>	24,56	1,13	Moving Average
<i>A. pernucleata</i>	1,54	<0,01	Binomial

En la tabla 7 se muestran las CL<sub>50</sub> de las FAE de las esponjas analizadas, siendo las esponjas del género *Aplysina* las que presentaron los mayores valores de CL<sub>50</sub>, por lo que se puede decir que las fracciones de estas especies fueron las menos letales; sin embargo, esto no quiere decir que estas esponjas no poseen metabolitos con

posible actividad letal, sino que las larvas de *A. salina* no respondieron al efecto de los metabolitos secundarios detectados en estas especies. Los estudios están en conformidad por lo reportado en la literatura para la esponja *Aplysina fistularis*, donde se obtuvo un  $CL_{50}$  de 816,57  $\mu\text{g/ml}$  (49), permitiendo decir que las esponjas de este género poseen una actividad citolítica baja. Existen otros bioensayos confiables con los cuales se puede medir la letalidad, utilizándose otros tipos de crustáceos.

Sin embargo la letalidad de las demás esponjas fueron relevantes, en especial las esponjas *C. kuekentali*, *Amphimedon viridis* y *Aaptos pernucleata*, las cuales presentaron una  $CL_{50}$  de 4,10; 1,13 y menor a 0,01  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente, lo cual evidencia la presencia de compuestos con actividad citolítica en estas esponjas. Posiblemente, este efecto letal se deba a los alcaloides reportados en *C. kuekentali*, *A. viridis* y en el género *Aaptos*, con actividad citotóxica (19-29), pero también estas esponjas presentaron esteroides y triterpenos, los cuales, pueden ser responsables en parte del efecto observado; evidenciando la posible habilidad de estas especies para producir la muerte de células cancerígenas en cultivos de tejidos y otros usos farmacológicos (2,48).

La letalidad de la FAE de *C. kuekentali* es apreciable y coinciden con el estudio de la letalidad del extracto acuoso de *C. kuekentali* colectada en la Isla de Coche, el cual mostró un  $CL_{50}$  de 31, 74  $\mu\text{g/ml}$ , evidenciándose que esta esponja es capaz de producir metabolitos con potencial antitumoral (39).

La toxicidad observada en estas esponjas puede obedecer a mecanismos de defensa que podría utilizar este organismo en contra de depredadores, asegurando así la preservación de su especie.

#### d. Fraccionamiento cromatográfico

Debido a que las esponjas *A. lacunosa* y *A. pernucleata* presentaron la mejor actividad antibacteriana y  $CL_{50}$ , respectivamente, se decidió realizar un fraccionamiento cromatográfico biodirigido a estas dos esponjas, con el objetivo de aislar en lo posible los constituyentes químicos responsables de la bioactividad de éstas.

##### d.1 Cromatografía de la fracción soluble en acetato de etilo (AcOEt) de *Aaptos pernucleata*

La fracción soluble en acetato de etilo de *A. pernucleata* fue fraccionado por cromatografía de columna (CC) sobre sílica gel 35-70 mesh (0,2 - 0,5 mm), en una columna de 1,5 cm de diámetro y 42 cm de alto, para lo cual se empleó una relación 1:30 (g de muestra: g sílica gel), 1,3125 g de la fracción y 39,3750 g de sílica gel. Se utilizaron mezclas de polaridad creciente de éter de petróleo (EP)- $CH_2Cl_2$ ,  $CH_2Cl_2$ ,  $CH_2Cl_2$  - AcOEt, AcOEt, AcOEt - MeOH como eluyentes, finalizándose con MeOH al 100%. Se obtuvieron 71 eluatos, los cuales fueron recogidos en erlenmeyers de 50 ml contentivos de 25 ml cada uno (Tabla 8), los cuales fueron agrupados en 13 fracciones (Tabla 9), tomando en cuenta su comportamiento en la cromatografía de capa fina (CCF) por comparación de sus  $R_f$ . Empleándose luz ultravioleta de longitud de onda corta (100-280 nm) y una solución ácida de molibdato de amonio, como agentes reveladores.

Tabla 8. Fraccionamiento cromatográfico de la FAE de *Aaptos pernucleata*.

Eluatos	Eluyentes	Porcentaje (%) V/V
1 – 3	EP– $CH_2Cl_2$	60-40
4 – 10	EP– $CH_2Cl_2$	40-60
11 – 14	EP– $CH_2Cl_2$	20-80
15 – 21	$CH_2Cl_2$	100
22 – 30	$CH_2Cl_2$ - AcOEt	60-40
31 – 40	$CH_2Cl_2$ - AcOEt	40-60
41 – 49	AcOEt	100
50 – 55	AcOEt - MeOH	60-40
56 – 57	AcOEt - MeOH	20-80
58– 71	MeOH	100

Se decidió estudiar las fracciones  $\alpha$ C,  $\alpha$ D,  $\alpha$ E, debido a que presentaron manchas definidas y con  $R_f$  no muy cercanos. Por otro lado, las demás fracciones que fueron tomadas en cuenta como objeto de estudio, siguiendo el criterio de bioactividad como se muestra en la tabla 11 (sección d.1.2), aun así éstas mostraban ser mezclas de compuestos con  $R_f$  muy próximos, lo que dificultó su separación. Se recuperó una masa total de 1,036 g la cual representó el 78,9% del material cromatografiado.

Tabla 9. Subfracciones obtenidas de la CC de la FAE de *A. pernucleata*.

Subfracciones	Eluatos	Masa (mg)
$\alpha$ A	1–3	108,7
$\alpha$ B	4 – 11	20,2
$\alpha$ C	12 – 13	22,6
$\alpha$ D	14	28,1
$\alpha$ E	15 – 17	52,4
$\alpha$ F	18 – 26	143,2
$\alpha$ G	27 – 34	37,4
$\alpha$ H	35 – 42	7,8
$\alpha$ I	43 – 46	56,1
$\alpha$ J	47 – 50	7,0
$\alpha$ K	51 – 55	119,2
$\alpha$ L	56 – 57	27,5
$\alpha$ M	58 – 71	405,8

*d.1.1 Actividad letal en Artemia salina de las subfracciones  $\alpha$ A,  $\alpha$ E,  $\alpha$ F,  $\alpha$ I,  $\alpha$ K, y  $\alpha$ M de la esponja Aaptos pernucleata*

Debido a que la esponja *A. pernucleata* presentó la  $CL_{50}$  más baja, (Tabla 6) se realizó el fraccionamiento de la FAE de ésta. De las 13 subfracciones obtenidas, fueron seleccionadas seis que poseían mayor masa, para realizarles el ensayo de letalidad con *A. salina*. En la tabla 11 se encuentran los valores de  $CL_{50}$  arrojados por cada subfracción, donde se observa que las fracciones más polares K y M no poseen

letalidad, y que el resto de las subfracciones menos polares y de polaridad intermedia de estas esponjas, poseen varios constituyentes con letalidad muy significativa, en especial los que se encuentran en las subfracciones  $\alpha F$  y  $\alpha I$ .

Tabla 10. Actividad letal ( $\mu\text{g/ml}$ ) contra *A. salina*, de algunas de las fracciones de la esponja *A. pernucleata*.

Fracción	CL <sub>50</sub> (24 h)	CL <sub>50</sub> (48 h)	Método
$\alpha A$	15,76	1,25	Binomial
$\alpha E$	5,65	1,63	Probit
$\alpha F$	2,24	<0,01	Binomial
$\alpha I$	8,24	0,29	Moving Average
$\alpha K$	787,65	395,18	Probit
$\alpha M$	7215,45	7215,45	Moving Average

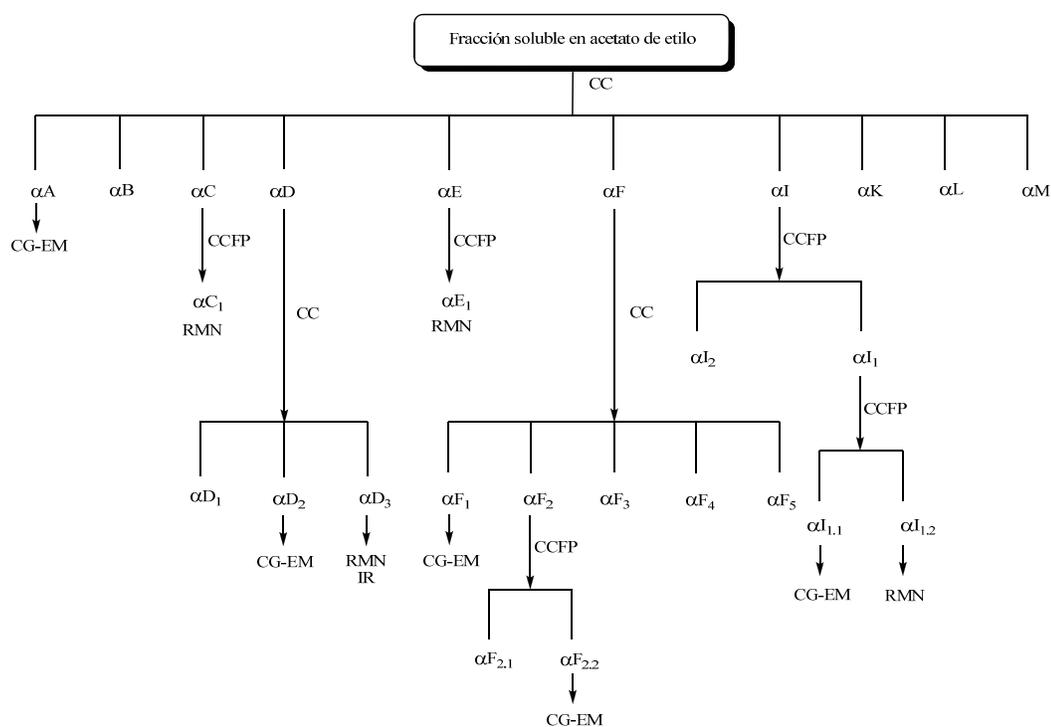


Figura 18. Esquema de fraccionamiento de la fracción soluble en acetato de etilo de la esponja *A. pernucleata*.

La letalidad de las subfracciones  $\alpha F$  y  $\alpha I$  podría deberse a la presencia de aaptaminas, las cuales han sido reportados en esponjas del género *Aaptos*, caracterizándose por poseer una fuerte actividad citotóxica y antiviral (24, 50).

#### *d.1.2 Cromatografía de la subfracción $\alpha A$*

Debido a que esta subfracción presentó una letalidad alta ( $CL_{50} = 1,25 \mu g/ml$ ), se decidió aislar los componentes de ésta, causantes de la bioactividad observada. Sin embargo, al realizar el revelado de la CCF se observó que no presentaba separación con ninguna mezcla de solventes, lo que evidenciaba que  $\alpha A$  estaba formada por una mezcla compleja de compuestos. Esta subfracción se presentó como un líquido casi incoloro, soluble en éter de petróleo, cloroformo y acetato de etilo. Analizando las características del líquido en cuestión, se le realizó un estudio de los componentes por cromatografía de gases acoplado a un detector de masas (CG-EM).

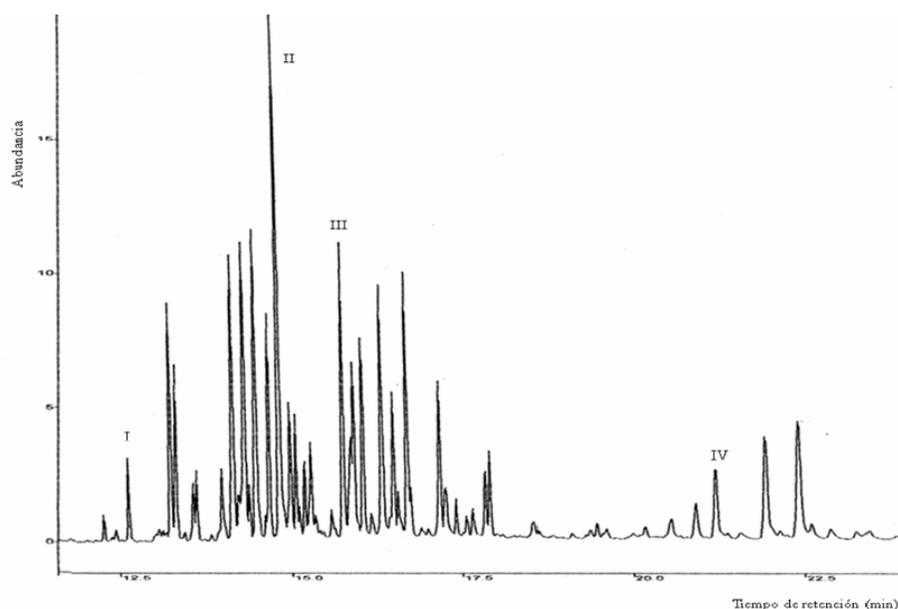


Figura 19. Cromatograma de gases de la subfracción  $\alpha A$ .

La cromatografía de gases de esta subfracción  $\alpha A$ , evidenció la presencia de una mezcla de ésteres de ácidos grasos saturados, insaturados, lineales y ramificados, de los cuales se logró identificar algunos que se encontraban en mayor proporción, tales como el éster metílico del ácido 12-metiltridecanoico, éster metílico del ácido 14-metilhexadecanoico, éster metílico del ácido 7,10-octadecanoico, éster metílico del ácido pentacosanoico.

El espectro de masas del compuesto I la subfracción  $\alpha A$ , el éster metílico del ácido 12-metiltridecanoico (TR= 12,6 minutos) (Figura 20), desplegó un ión molecular a  $m/z$  242 [ $M^+$ ], y los fragmentos correspondientes a los picos de los iones mas abundantes a  $m/z$  227, 199, 185, 171, 157, 143,129, 74 (pico base) y 41. En la figura B1 (Apéndice B) se muestra el patrón de fragmentación correspondiente a este compuesto.

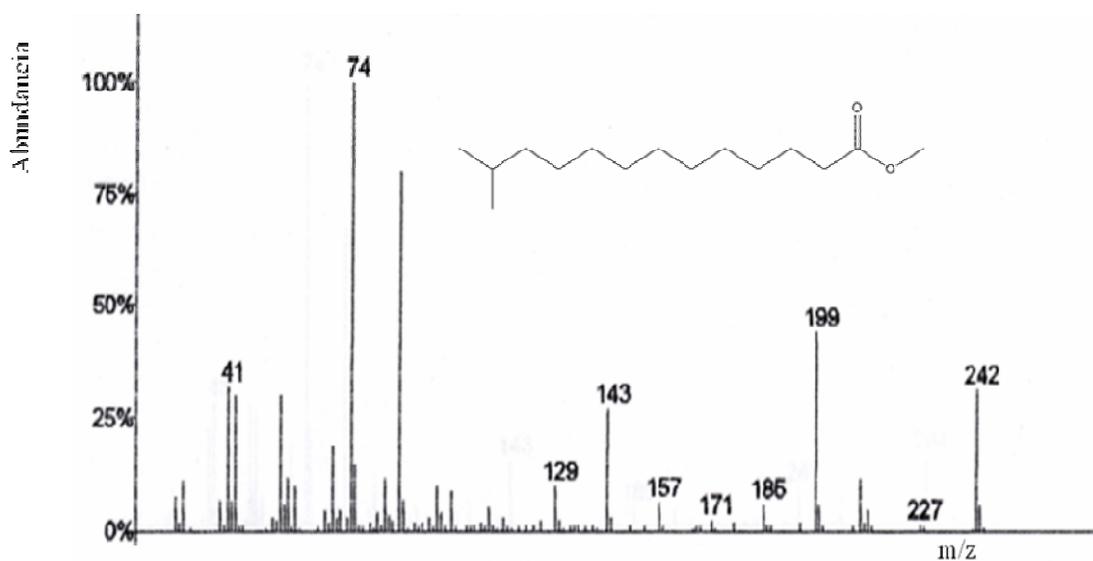


Figura 20. Espectro de masas del éster metílico del ácido 12-metiltridecanoico.

El espectro de masas del constituyente II de la subfracción  $\alpha A$ , el éster metílico del ácido 14-metilhexadecanoico (TR= 14,8 minutos) (Figura 21), exhibió un ión

molecular a  $m/z$  284 [ $M^+$ ], y los fragmentos correspondientes a los picos de los iones más abundantes a  $m/z$  241, 185, 143, 74 (pico base) y 43. En la figura B2 (Apéndice B) se muestra el patrón de fragmentación correspondiente a este compuesto.

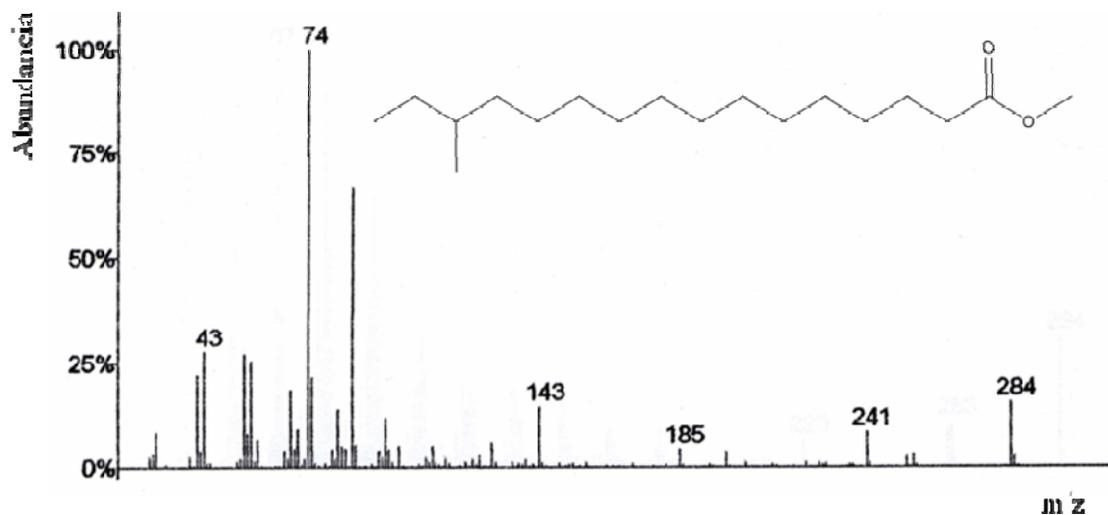


Figura 21. Espectro de masas del éster metílico del ácido 14-metilhexadecanoico.

El espectro de masas del compuesto III de la subfracción  $\alpha A$ , el éster metílico del ácido 7,10-octadecanoico (TR= 15,7 minutos) (Figura 22), desplegó un ión molecular a  $m/z$  294 [ $M^+$ ], y los fragmentos correspondientes a los picos de los iones más abundantes a  $m/z$  263, 220, 67 (pico base) y 41. En la figura B3 (Apéndice B) se muestra el patrón de fragmentación correspondiente a este compuesto.

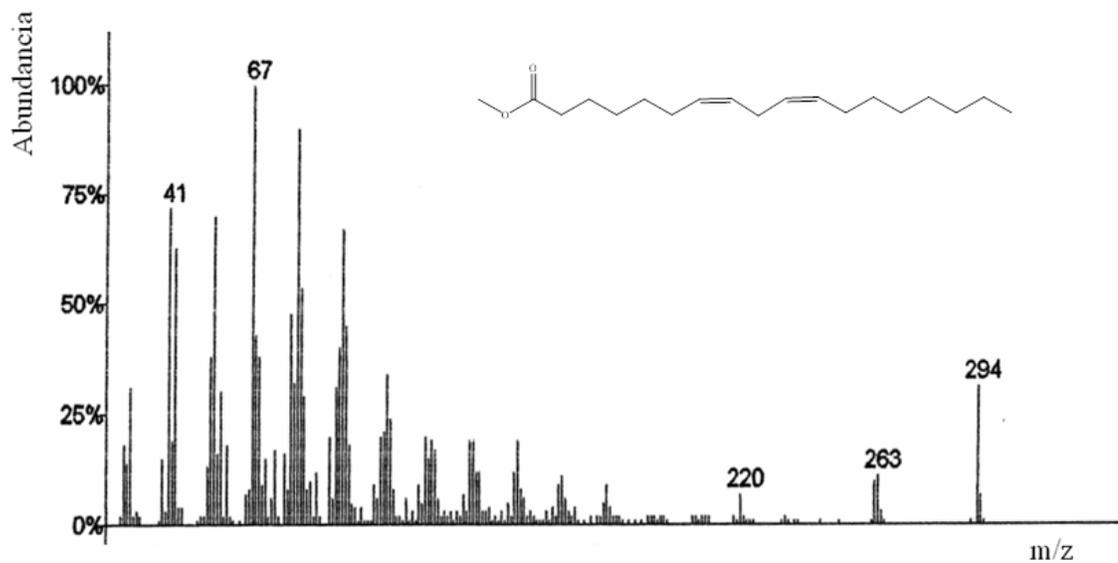


Figura 22. Espectro de masas del éster metílico del ácido 7,10-octadecadienoico.

El espectro de masas del éster metílico del ácido pentacosanoico de la subfracción  $\alpha$ A, (TR= 20,8 minutos) (Figura 23), mostró un ión molecular a m/z 396  $[M^+]$ , y los fragmentos correspondientes a los picos de los iones mas abundantes a m/z 353, 297, 255, 185, 143 y 43 (pico base). En la figura B4 (Apéndice B) se muestra el patrón de fragmentación correspondiente a este compuesto.

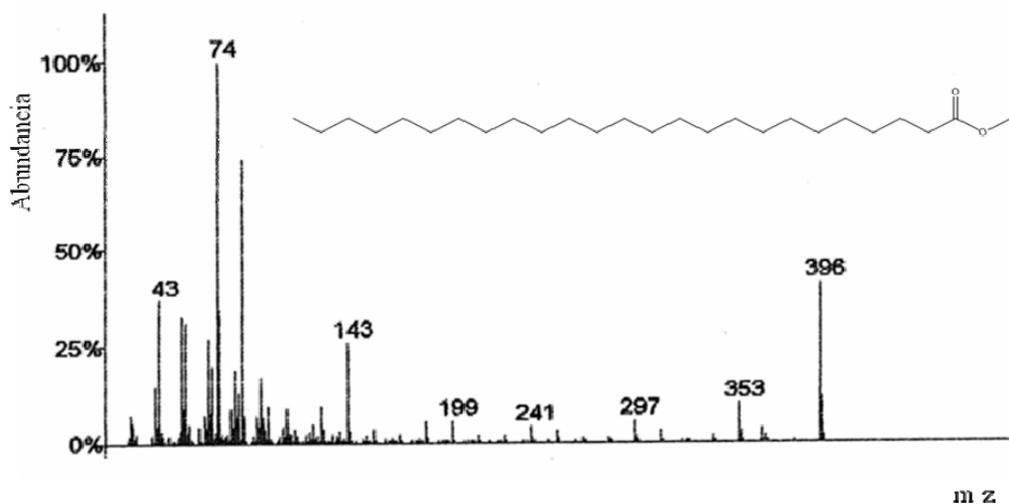


Figura 23. Espectro de masas del éster metílico del ácido pentadecanoico.

Es común encontrar en las esponjas marinas, ácidos grasos ligados a distintas clases de lípidos, como por ejemplo fosfolípidos, glicolípidos, glicéridos, esteroides o en forma libre, demostrando la presencia de ácidos demospóngicos (longitudes de cadena superiores a C<sub>24</sub> y generalmente con un patrón de insaturación *cis* C<sub>5</sub> y *cis* C<sub>9</sub>); ácidos grasos con cadena impar y ácidos con un patrón de insaturación C<sub>6</sub> y C<sub>11</sub>, están muy poco difundido en la naturaleza, además de la presencia de ácidos poliinsaturados y ramificados (51). Es posible pensar que los ésteres encontrados en esta esponja sean derivados de ácidos con estas características, como es el caso del éster metílico del ácido pentacosanoico (impar y mayor C<sub>24</sub>) y el éster metílico del ácido 12-metiltridecanoico (impar), pudiéndose atribuir, además, la letalidad de la subfracción  $\alpha$ A en *A. salina*, a la mezcla de los esteres metílicos de ácidos saturados, insaturados, lineales y ramificados presentes en dicha subfracción.

#### *d.1.3 Cromatografía de la subfracción $\alpha$ C*

Esta fracción presentó una muy buena separación en la CCF, por lo cual se procedió a separar por CCFP utilizando una placa vidrio de 20x20 cm<sup>2</sup>, recubierta con un espesor de 1 mm de sílica gel 10-40  $\mu$ m, colocándose 21,5 mg de la muestra en la placa y como solventes se empleó una mezcla de EP-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1:4 V/V y se reveló con una solución ácida de molibdato de amonio. Se evidenció la presencia de una sola mancha; arrancándose la franja de la sílica que poseía este compuesto, obteniéndose un sólido blanco con una masa de 6,9 mg y un R<sub>f</sub> de 0,48, el cual fue nombrado  $\alpha$ C<sub>1</sub> y cuya recuperación representa el 32,09% del material cromatografiado.

A esta subfracción se le realizó espectroscopia RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C, y DEPT-135, observándose en los espectros, que la misma poseía desplazamientos químicos similares a los que presentan los compuestos esteroidales. La tabla 11 muestra las asignaciones correspondientes a las señales más importantes seleccionadas, para este tipo de metabolito.

Tabla 11. Asignaciones de desplazamientos químicos de protones ( $\delta_H$ ) de algunas señales de RMN  $^1H$  del compuesto  $\alpha C_1$ .

Posición	Multiplicidad	$\delta_H$ (ppm) <sup>a</sup>	Asignación
18	singlete ( <i>s</i> )	0,63	C- <u>CH</u> <sub>3</sub>
19	singlete ( <i>s</i> )	0,78	C- <u>CH</u> <sub>3</sub>
26	doblete ( <i>d</i> )	0,84	CH- <u>CH</u> <sub>3</sub>
27	doblete ( <i>d</i> )	0,85	CH- <u>CH</u> <sub>3</sub>
21	doblete ( <i>d</i> )	0,89	CH- <u>CH</u> <sub>3</sub>
3	multiplete ( <i>m</i> )	3,60	HO- <u>CH</u>
3	singlete ( <i>s</i> )	3,65	<u>HO</u> -CH

<sup>a</sup>: Datos obtenidos a 400 MHz en CDCl<sub>3</sub>.

En el espectro RMN  $^1H$  de la subfracción  $\alpha C_1$  se observan dos señales a campo bajo, una que integra para un protón hidroxílico a  $\delta_H$  3,65, y otra a  $\delta_H$  3,60 como un multiplete, el cual integra para un protón, asignado a un hidrógeno que se encuentra enlazado a un carbono que esta unido a un átomo de oxígeno (H-C-O). A campo alto, el espectro de RMN  $^1H$  desplegó cinco señales asignadas a grupos metilos, de los cuales tres aparecieron como dobletes a  $\delta_H$  0,84;  $\delta_H$  0,85 y  $\delta_H$  0,89; y dos como singletes a  $\delta_H$  0,63 y  $\delta_H$  0,78 (Figuras 24 y 25) (Tabla 11).

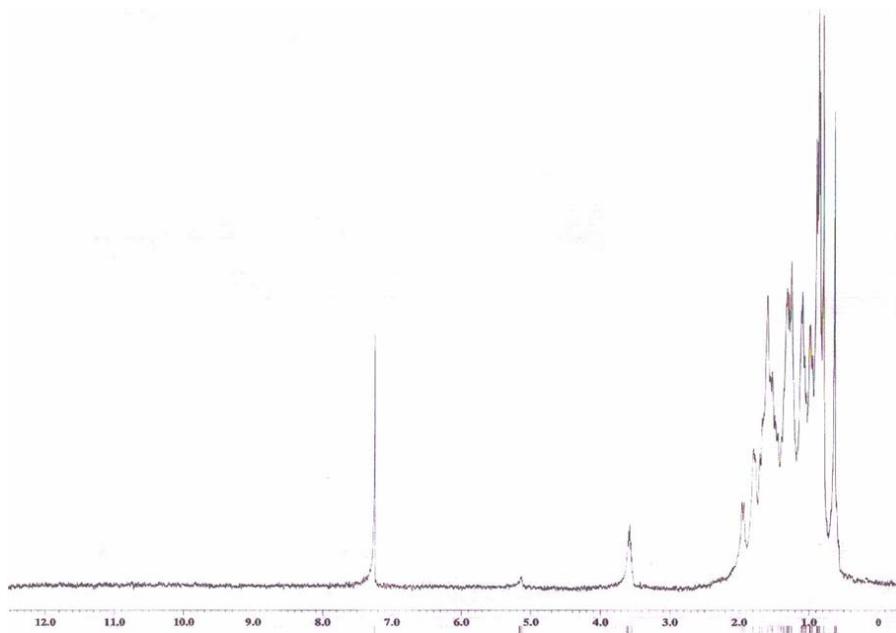


Figura 24. Espectro de RMN  $^1H$  del compuesto  $\alpha C_1$ .

El espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de este compuesto mostró 27 desplazamientos químicos bien definidos, lo que indica que este compuesto posee 27 átomos de carbono, por otra parte la zona olefínica no mostró señales, lo cual es acorde con lo observado en el RMN  $^1\text{H}$ ; es decir, que el compuesto no presenta dobles enlace en su estructura. A campo bajo, se destaca una señal a  $\delta_{\text{C}}$  71,46 asignable a un carbono oxigenado. El resto de las señales que se observan corresponden a los desplazamientos de los carbonos alifáticos (Figuras 26-28). A campo más alto, se observan cinco señales a  $\delta_{\text{C}}$  12,14;  $\delta_{\text{C}}$  12,30;  $\delta_{\text{C}}$  18,73;  $\delta_{\text{C}}$  22,62 y  $\delta_{\text{C}}$  22,88 correspondientes a carbonos metílicos (Tabla 12).

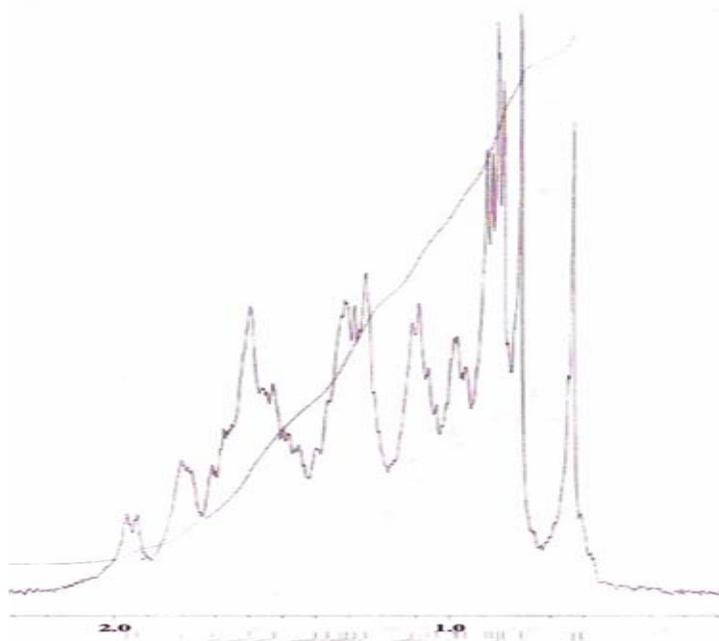


Figura 25. Ampliación de la región alifática del espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto  $\alpha\text{C}_1$ .

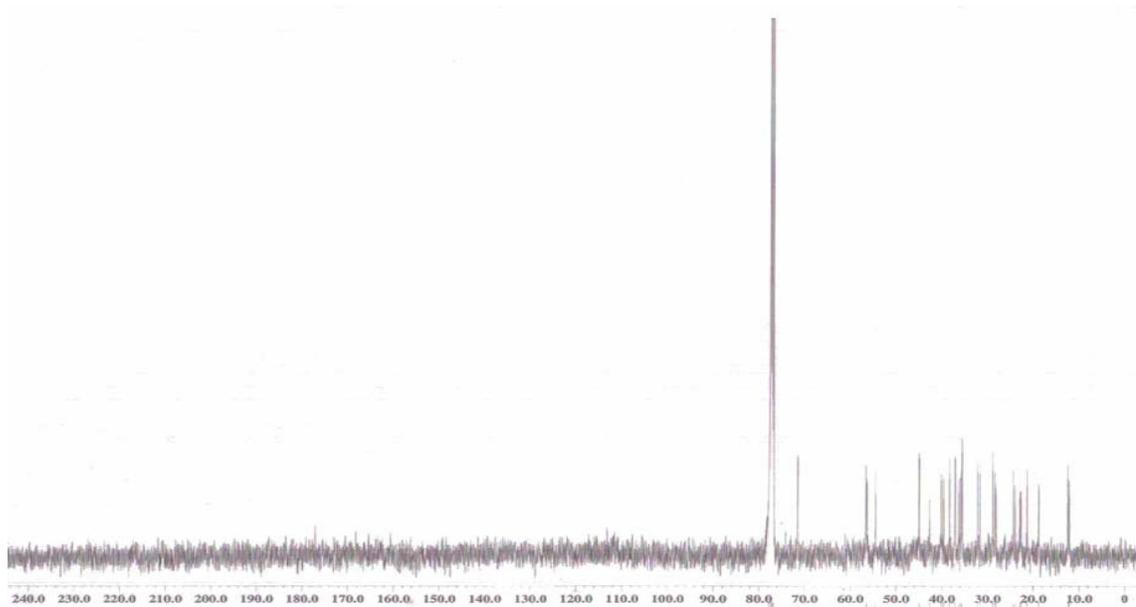


Figura 26. Espectro de RMN <sup>13</sup>C del compuesto  $\alpha C_1$ .

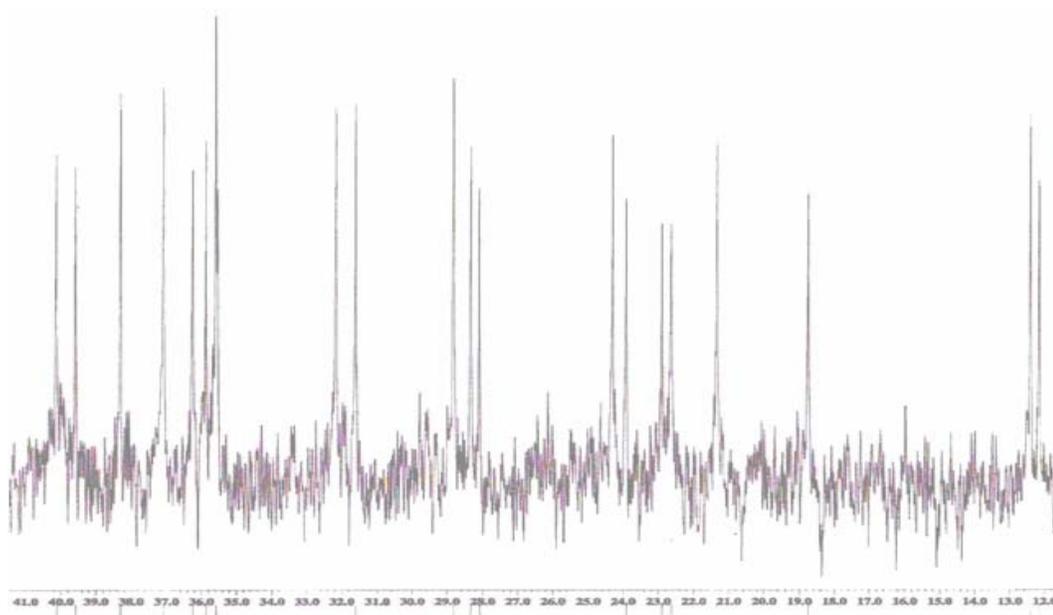


Figura 27. Ampliación I del espectro de RMN <sup>13</sup>C del compuesto  $\alpha C_1$ .

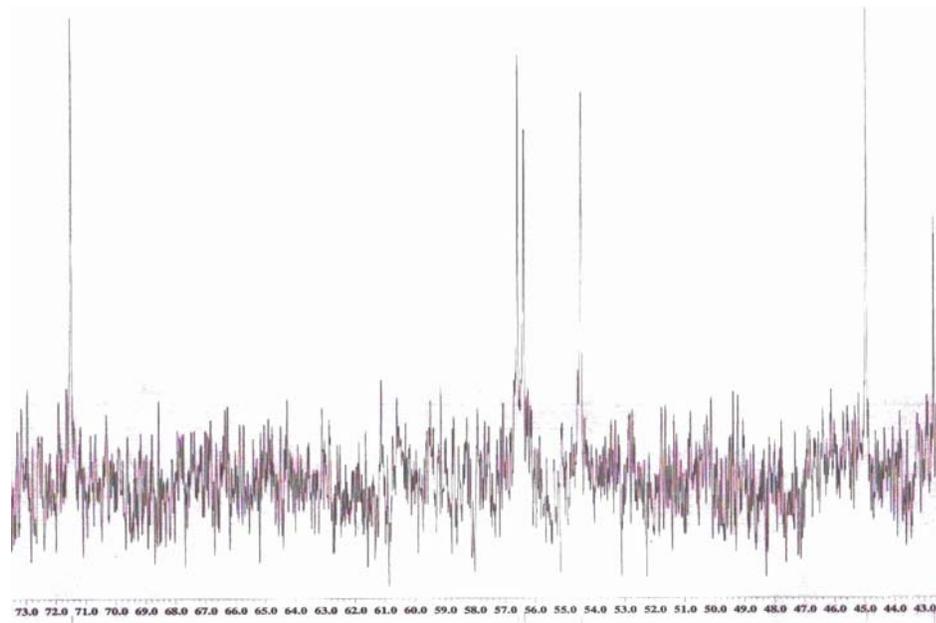


Figura 28. Ampliación II del espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto  $\alpha\text{C}_1$ .

Las señales mostradas por espectro DEPT-135 (Figura 29), ayudaron a identificar los tipos de carbonos presentes en la estructura; como por ejemplo, se pudo constatar la presencia de 5 carbonos metílicos en el compuesto, los cuales concordaban con los cinco desplazamientos químicos observados a campo alto para protones alifáticos observadas en el RMN  $^1\text{H}$ , además, de la presencia de doce carbonos metilénicos acordes con un núcleo esteroidal saturado y cadena lateral saturada, proporcionando, en general, información acerca de los carbonos metílicos, metilénicos y metínicos presentes en el compuesto.

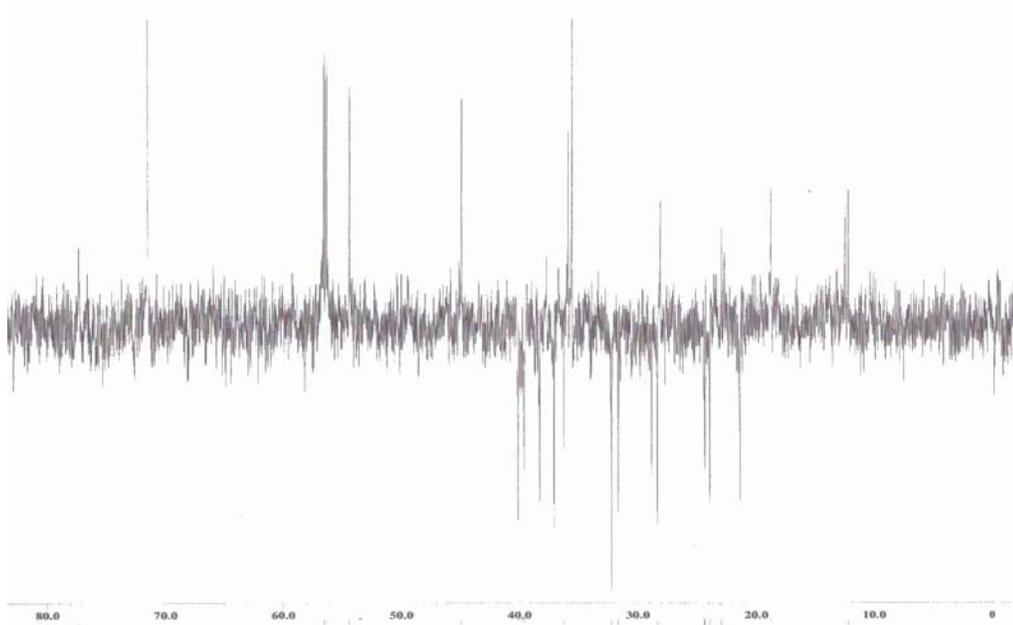


Figura 29. Espectro DEPT-135 del compuesto  $\alpha C_1$ .

Debido a que a esta fracción no se le realizaron los experimentos bidimensionales de RMN no se pudo realizar una mejor asignación de los hidrógenos metínicos y metilénicos a sus carbonos correspondientes, por lo cual se utilizó el programa Predictor del ChemBioDraw Ultra 2008 para proponer una posible estructura, junto con el análisis combinado de los datos espectrales obtenidos de los RMN y DEPT-135, obteniéndose que el compuesto en cuestión presentó desplazamientos químicos de  $^{13}\text{C}$  idénticos a los del colestanol (Tabla 12). En consecuencia se puede decir que la subfracción  $\alpha C_1$  es el colestanol (Figura 30).

Tomado en cuenta que no hay reportes de estudios químicos ni biológicos para la esponja *Aaptos pernucleata*, este estudio representa un aporte importante para la química de productos naturales de esta especie.

Tabla 12. Desplazamientos químicos de  $C^{13}$  de la subfracción  $\alpha C_1$  y el colestanol.

Posición	Fracción $\alpha C_1$ , $\delta_C$ (ppm) <sup>a</sup>	Colestanol, $\delta_C$ (ppm) <sup>b</sup>
1	38,29	35,6
2	31,60	30,9
3	71,46	71,4
4	37,07	37,1
5	44,93	39,9
6	28,81	28,9
7	32,16	32,0
8	35,58	35,6
9	54,43	54,3
10	35,58	35,5
11	21,32	20,7
12	40,11	40,2
13	42,67	42,7
14	56,57	56,6
15	23,89	24,2
16	28,32	28,3
17	56,35	56,3
18	12,14	13,5
19	12,39	13,6
20	35,86	35,8
21	18,73	19,4
22	36,24	36,1
23	24,29	24,6
24	39,58	39,9
25	28,08	28,1
26	22,62	23,2
27	22,88	23,2

<sup>a</sup>: Datos obtenidos a 100 MHz en  $CDCl_3$ .

<sup>b</sup>: Datos obtenidos mediante el modelado con el programa Predictor del ChemBioDraw Ultra 2008.

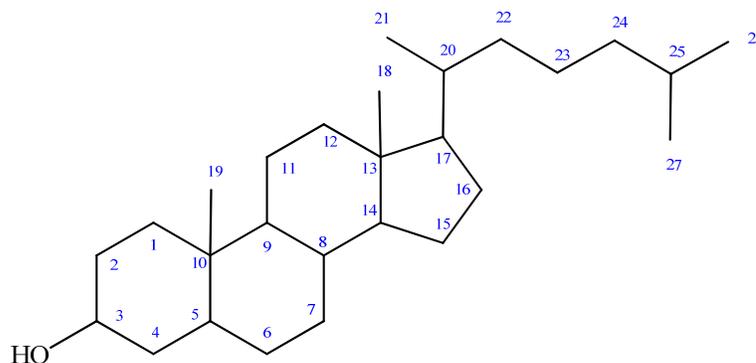


Figura 30. Estructura del colestanol.

#### *d.1.4 Cromatografía de la subfracción $\alpha D$*

Esta subfracción se obtuvo como un sólido blanco con una masa de 28,1 mg y presentaba algunas trazas de impurezas de un líquido amarillo; tomando en cuenta esto, se decidió purificarlo con una microcolumna en una pipeta Pasteur con sílica gel 35-70 mesh y una mezcla de EP-  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (20-80 V/V). De esta separación se obtuvieron 6 eluatos contentivos de 5 ml, y se les realizó la CCF, resultando agrupados en 3 subfracciones, por su comportamiento en la misma, la cual mostró que la subfracción  $\alpha D_1$  contenía, en su mayoría, las impurezas del líquido; la subfracción  $\alpha D_2$  era un sólido blanco, observándose una estela mediana lo que refleja la mezcla de varios compuestos, y la subfracción  $\alpha D_3$  era un sólido blanco que presentó una sola mancha muy definida, evidenciando la presencia de un solo compuesto.

Se recuperó una masa total de 20,8 mg, lo cual representa el 74,02% del material cromatografiado.

Debido a lo antes expuesto, se decidió realizar a la subfracción  $\alpha D_2$  un análisis por CG-EM, el cual evidenció la presencia de una mezcla de esteroides como colesterol, colestanol, ergost-22-en-3-ol, y ergostanol.

Tabla 13. Subfracciones obtenidas de la microcolumna cromatográfica de la subfracción  $\alpha D$ .

Subfracciones	Eluatos	Masa (mg)
$\alpha D_1$	1-2	2,6
$\alpha D_2$	3-4	8,6
$\alpha D_3$	5-6	9,6

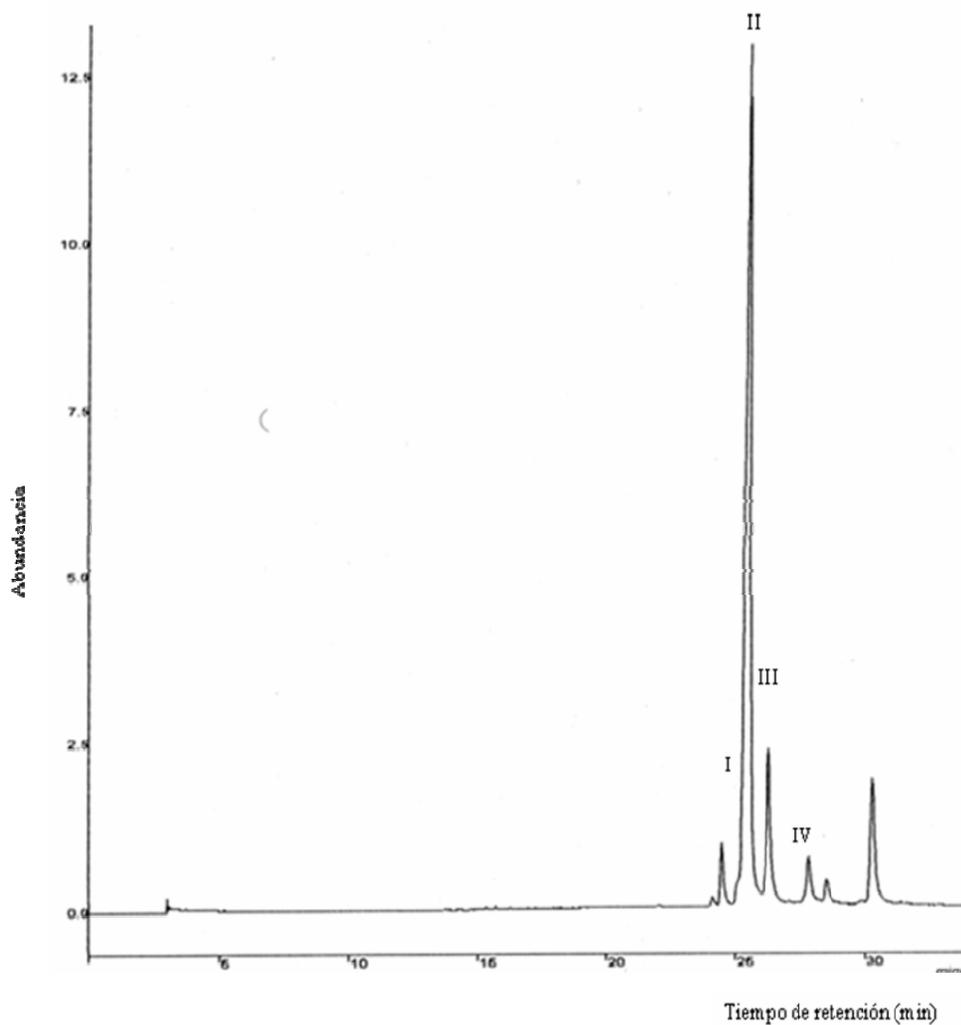


Figura 31. Cromatograma de gases de la subfracción  $\alpha D_2$ .

El espectro de masas del constituyente I de la subfracción  $\alpha D_2$ , se identificó como el colesterol (TR= 24,5 minutos) (Figura 32), ya que desplegó un ión molecular a  $m/z$  386 [ $M^+$ ], y los fragmentos correspondientes a los picos de los iones más abundantes a  $m/z$  368, 275, 213, 145, 81 (pico base) y 43. En la figura C1 (Apéndice C) se muestra el patrón de fragmentación correspondiente a este compuesto.

El colesterol está ampliamente distribuido en los tejidos de los animales, especialmente en el nervioso, células suprarrenales, yema de huevo y es el principal

constituyente de los cálculos biliares. Éste es metabolizado a coprostanol en el tracto digestivo y se elimina con las heces, además es el precursor de los demás esteroides fisiológicamente importantes. Ha sido reportado en una variedad de géneros de esponjas marinas, entre los cuales se tienen: *Damiriana*, *Agelas*, *Hymeniacion*, *Petrosia*, *Cerachalina*, *Pseudaxinella*, *Callyspongia*, *Gelliodes*, *Psammaphysilla*, *Jaspis*, *Gelliodes*, *Dysidea*, *Terpios*, *Axinella*, *Asteropus*, *Xestospongia*, *Blemna* y *Cliona* (2, 36).

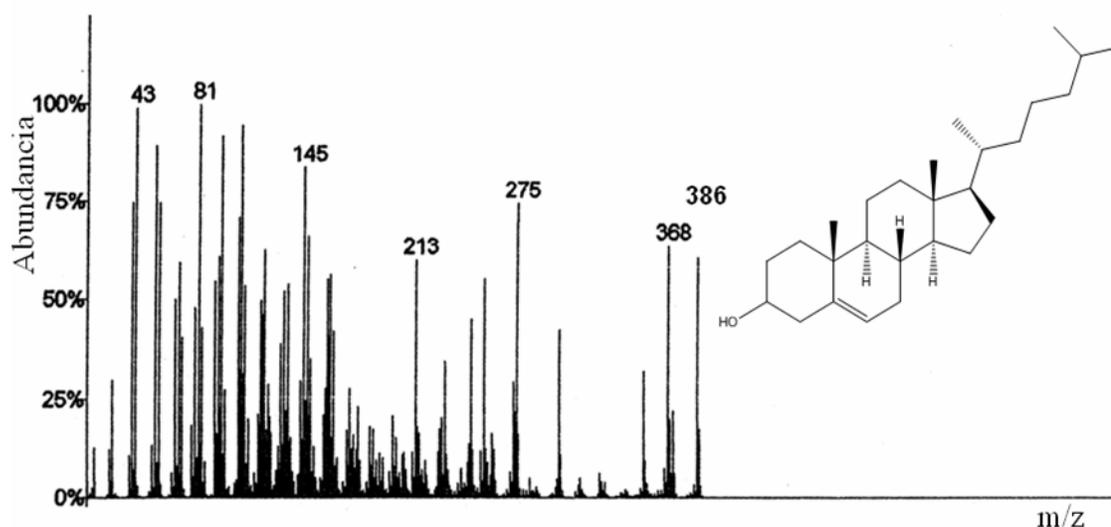


Figura 32. Espectro de masas del colesterol.

El espectro de masas del constituyente II de la subfracción  $\alpha D_2$ , fue identificado como el colestanol, (TR= 25,3 minutos) (Figura 33), mostró un ión molecular a m/z 388 [ $M^+$ ] y los fragmentos correspondientes a los picos de los iones más abundantes a m/z 368, 373, 353, 233, 215 (pico base), 165 y 81. En la figura C2 (Apéndice C) se muestra el patrón de fragmentación correspondiente a este compuesto, el cual confirmó la estructura del mismo. Este compuesto ha sido identificado en las esponjas del género *Dysidea*, *Psammaphysilla*, *Gelliodes*, *Petrosia*, *Agelas*, *Terpios*,

*Hymeniacion* y *Aptos*, estando este último género en concordancia con lo reportado en este trabajo (36).

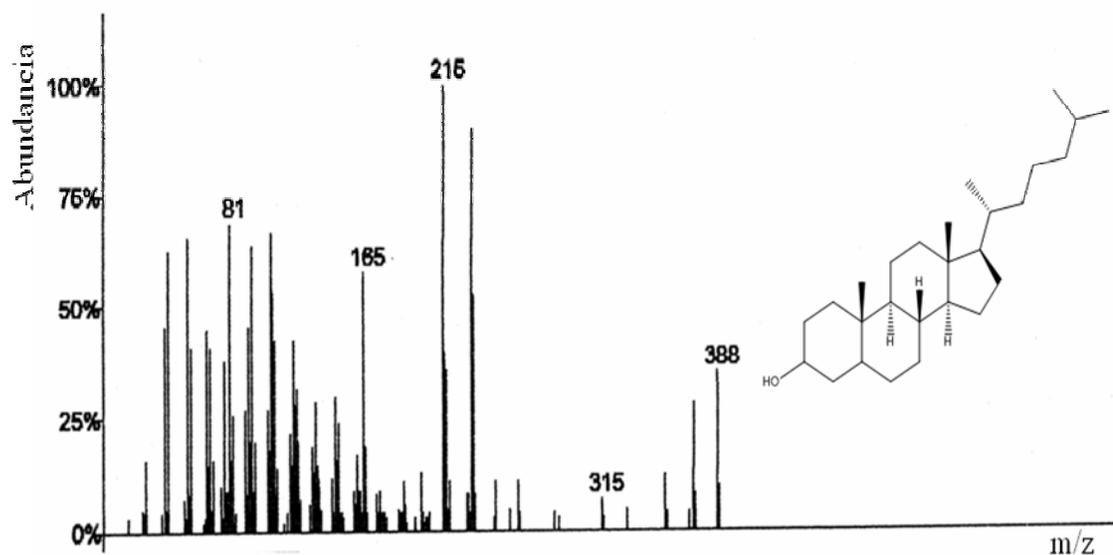


Figura 33. Espectro de masas del colestanol.

El espectro de masas del constituyente III de la subfracción  $\alpha D_2$ , permitió identificarlo como el ergost-22-en-3-ol, (TR= 26,3 minutos) (Figura 34), el cual exhibió un ión molecular a  $m/z$  400 [ $M^+$ ] y los fragmentos correspondientes a los picos de los iones más abundantes a  $m/z$  339, 257, 35, 215, y 55 (pico base). En la figura C3 (Apéndice C) se muestra el patrón de fragmentación correspondiente a este metabolito. Este compuesto se encuentra distribuido en las esponjas *Jaspis stellifera*, *Stylotella agminata*, *Axineila* sp. e *Hymeniacion pertervis*, recolectadas en las costas de Indonesia (36).

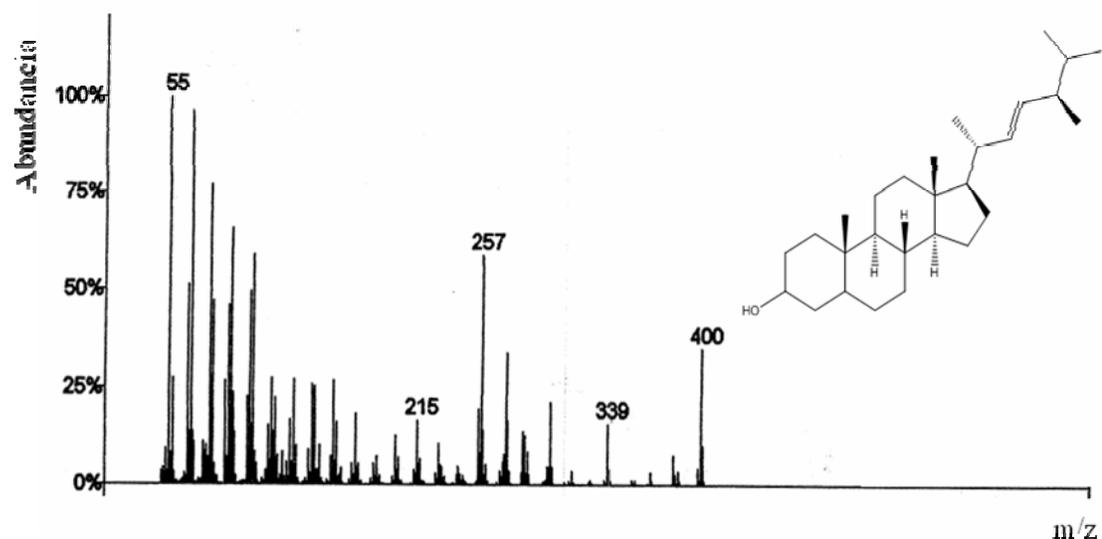


Figura 34. Espectro de masas del ergost-22-en-3-ol.

El constituyente IV de la subfracción  $\alpha D_2$ , se identificó como el ergostanol, (TR= 27,8 minutos) (Figura 35), según evidencias del espectro de masas, el cual desplegó un ión molecular a  $m/z$  402 [ $M^+$ ] y los fragmentos correspondientes a los picos de los iones más abundantes a  $m/z$  345, 303, 276, 233, 215 (pico base), 165, 107 y 43. En la figura C4 (Apéndice C) se muestra el patrón de fragmentación correspondiente a este compuesto.

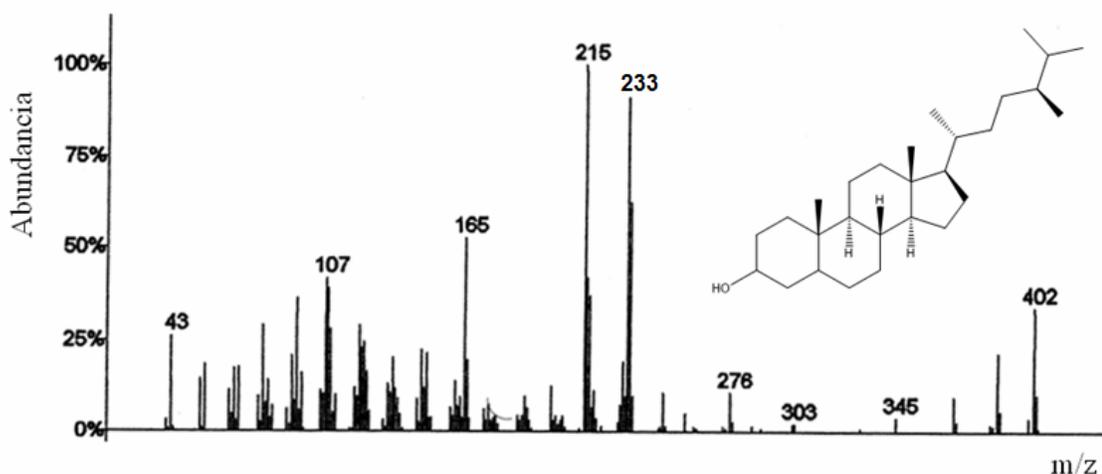


Figura 35. Espectro de masas del ergostanol.

El ergostanol es un esteroide de gran importancia, debido a que es precursor del ergosterol que se interconvierte por irradiación y se transforma a Vitamina D. Este se encuentra generalmente en hongos y levaduras, además ha sido aislado de las esponjas *Jaspis stellifera*, *Gelliodes fibulata*, *Gelliodes gracilis* y *Agelas mauritiana* (2,36).

#### d.1.4.1 Análisis estructural del compuesto $\alpha D_3$

El compuesto  $\alpha D_3$  fue aislado en forma de un sólido blanco (9,6 mg), mediante la realización de una microcolumna a la subfracción  $\alpha D$ . Posteriormente, fue disuelto en cloroformo deuterado, para la realización de los análisis espectroscópicos de RMN de una y dos dimensiones, específicamente RMN  $^1H$ , RMN  $^{13}C$ , DEPT, HMQC y HMBC, para su posterior identificación. Adicionalmente, se le realizó espectroscopia infrarroja para sustentar parte de la información arrojada por la espectroscopia RMN.

El espectro IR (Figura 36) del compuesto  $\alpha D_3$  mostró una absorción a  $3\ 200\ cm^{-1}$ , debida al estiramiento del enlace oxígeno-hidrógeno del grupo hidroxilo (-O-H), otra absorción a  $2\ 450\ cm^{-1}$  ocasionada por el estiramiento del enlace carbono-

hidrógeno alifático (-C-H); a  $1\ 250\ \text{cm}^{-1}$  se observó una banda correspondiente al estiramiento asimétrico del enlace carbono-oxígeno (-C-O) y una banda a  $610\ \text{cm}^{-1}$  asignable a la deformación de sistema  $-\text{CH}_2$ .

En el espectro RMN  $^1\text{H}$  de la subfracción  $\alpha\text{D}_3$  se observan dos señales a campo bajo, una que integra para un protón hidroxílico a  $\delta_{\text{H}}\ 3,65$ , y otra a  $\delta_{\text{H}}\ 3,57$  como un multiplete, el cual integra para un protón asignado a un hidrógeno que se encuentra enlazado a un carbono oxigenado (H-C-O). A campo alto en la zona alifática, el espectro de RMN  $^1\text{H}$  desplegó seis señales asignadas a metilos, de los cuales dos aparecieron como dobletes a  $\delta_{\text{H}}\ 0,83$  y  $\delta_{\text{H}}\ 0,85$ , y cuatro como singletes a  $\delta_{\text{H}}\ 0,62$ ;  $\delta_{\text{H}}\ 0,77$ ;  $\delta_{\text{H}}\ 0,86$  y  $\delta_{\text{H}}\ 0,89$ . Siendo este último, un singlete de base ancha, el cual se esperaba que apareciera en el espectro como un doblete, por lo cual se piensa que no se orientó para el acoplamiento con el protón vecino (Figuras 37-39) (Tabla 14).

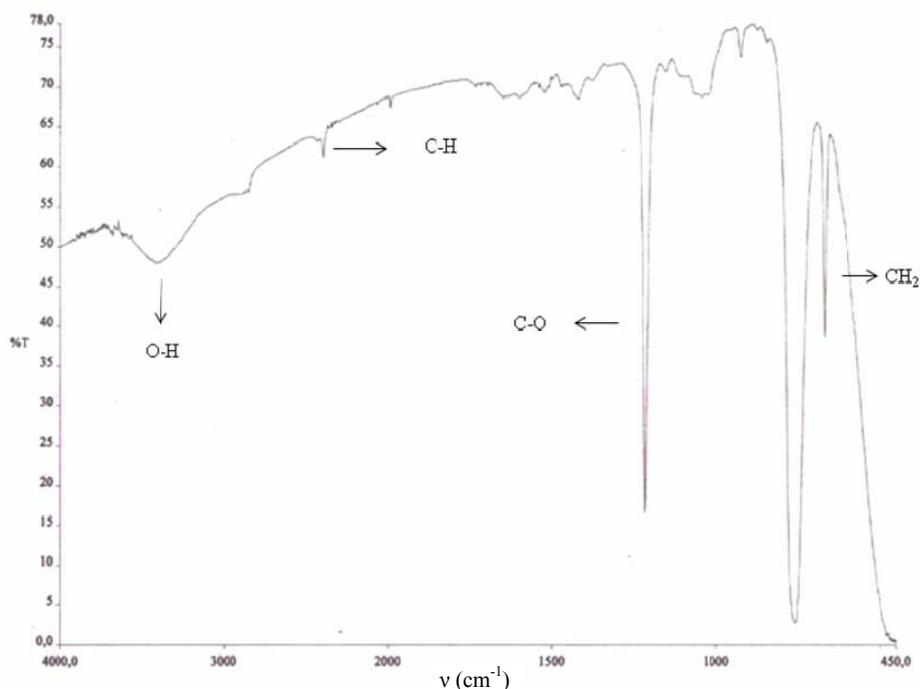


Figura 36. Espectro IR del compuesto  $\alpha\text{D}_3$ .

Tabla 14. Asignaciones de desplazamientos químicos ( $\delta_H$ ) de algunas señales seleccionadas de RMN  $^1H$  del compuesto  $\alpha D_3$ .

Posición	Multiplicidad	$\delta_H$ (ppm) <sup>a</sup>	Asignación
18	singlete ( <i>s</i> )	0,62	C-CH <sub>3</sub>
28	singlete ( <i>s</i> )	0,77	C-CH <sub>3</sub>
26	doblete ( <i>d</i> )	0,83	CH-CH <sub>3</sub>
27	doblete ( <i>d</i> )	0,85	CH-CH <sub>3</sub>
19	singlete ( <i>s</i> )	0,86	C-CH <sub>3</sub>
21	singlete ( <i>bs</i> )	0,89	CH-CH <sub>3</sub>
3	multiplete ( <i>m</i> )	3,57	HO-CH
3	singlete ( <i>s</i> )	3,65	HO-CH

<sup>a</sup>: Datos obtenidos a 400 MHz en CDCl<sub>3</sub>.

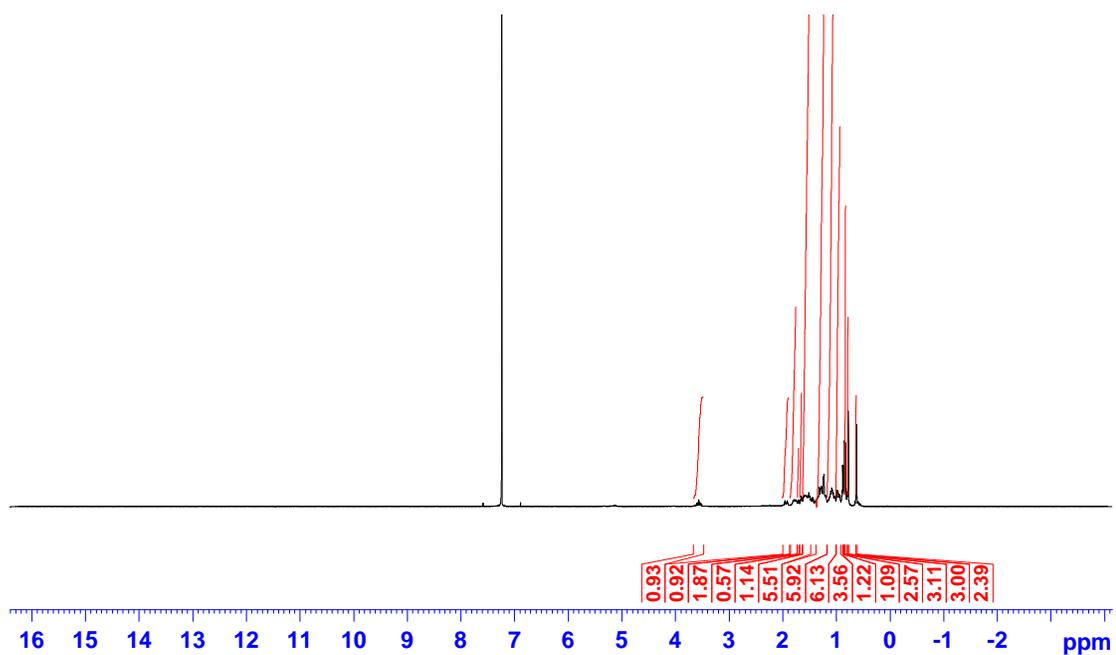


Figura 37. Espectro RMN  $^1H$  del compuesto  $\alpha D_3$ .

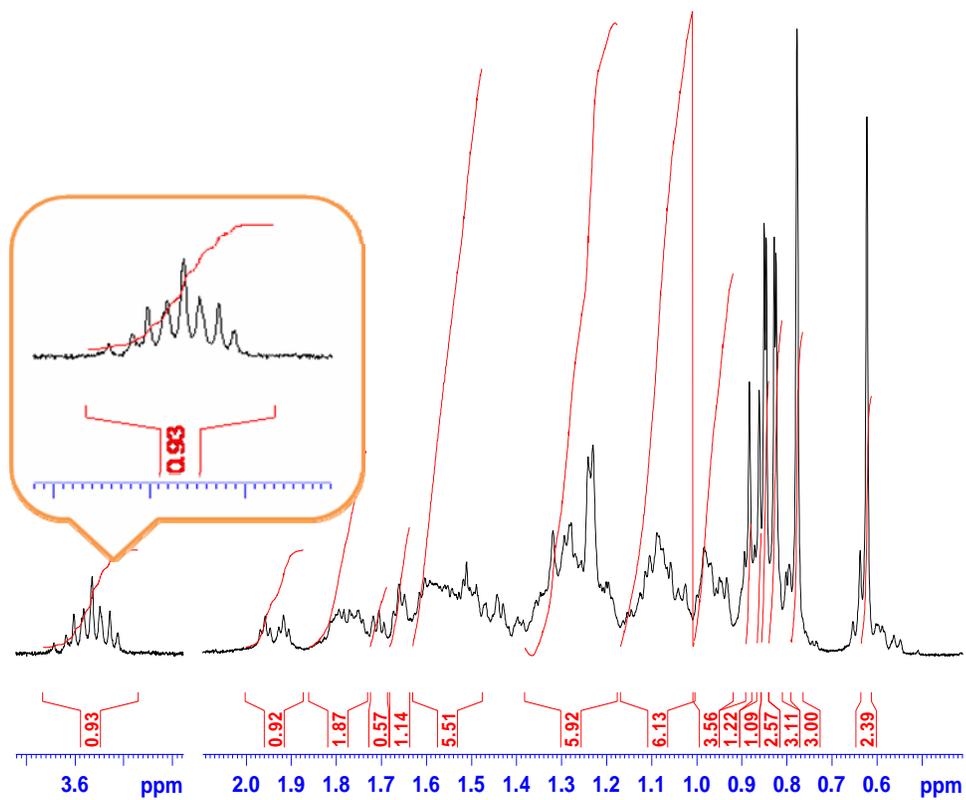


Figura 38. Ampliación del espectro RMN  $^1\text{H}$  del compuesto  $\alpha\text{D}_3$ .

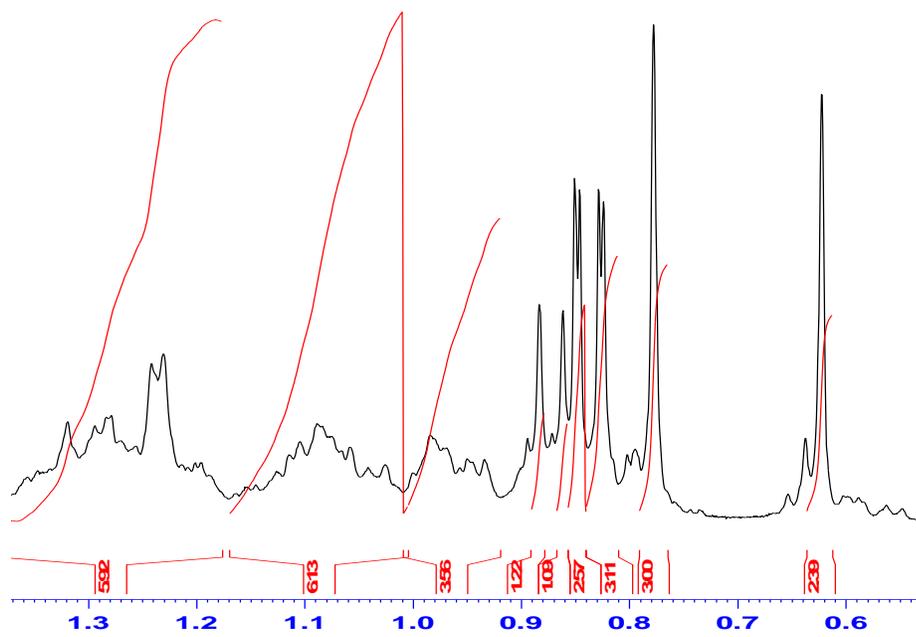


Figura 39. Ampliación de la zona a campo alto del espectro RMN  $^1\text{H}$ .

El espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de este compuesto mostró 28 desplazamientos químicos bien definidos, lo que es indicativo, en este caso, de que el mismo que posee 28 átomos de carbono; por otra parte, no mostró desplazamientos en la zona olefínica, lo cual es consecuente con lo observado en el RMN  $^1\text{H}$ ; es decir que el compuesto no presenta dobles enlace en su estructura. A campo bajo, se destaca una señal a  $\delta_{\text{H}} 71,38$  asignable a un carbono enlazado a un oxígeno. El resto de las señales que se observan corresponden a los desplazamientos de los carbonos alifáticos. A campo mas alto se observan seis señales a  $\delta_{\text{C}} 12,06$ ;  $\delta_{\text{C}} 12,31$ ;  $\delta_{\text{C}} 18,65$ ;  $\delta_{\text{C}} 21,24$ ;  $\delta_{\text{C}} 22,52$  y  $\delta_{\text{C}} 22,80$  correspondientes a los carbonos metílicos (Figuras 40-43) (Tabla 15).

El espectro DEPT-135 (Figuras 44 y 45), proporcionó información acerca de los carbonos metílicos, metilénicos y metínicos presente en la estructura, permitiendo confirmar algunas señales asignadas. Este experimento de RMN, confirmó de que la molécula posee tres carbonos cuaternarios, doce carbonos metilénicos, y un total de trece carbonos entre metílicos y metínicos. Los carbonos cuaternarios se asignaron mediante la información suministrada por las correlaciones en el HMBC y las conectividades directas del HMQC.

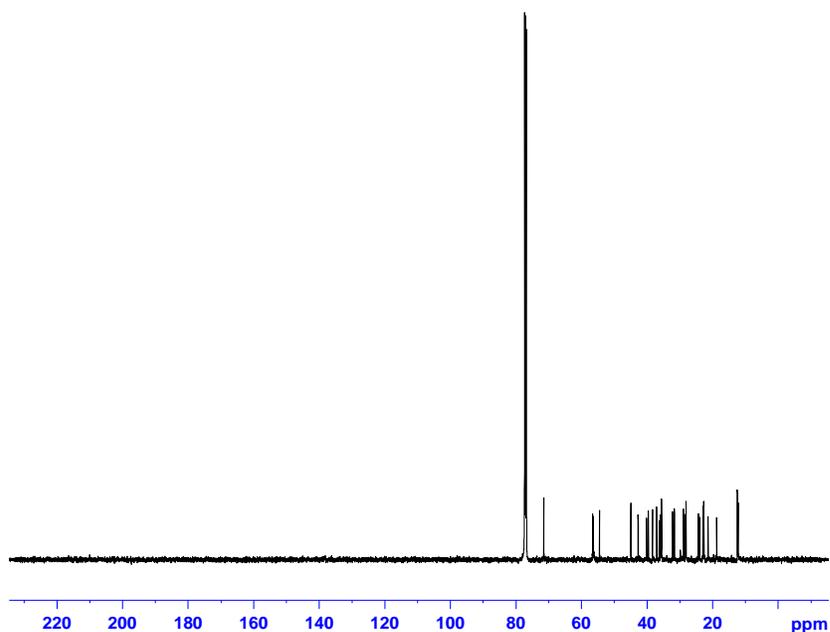


Figura 40. Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto del  $\alpha\text{D}_3$ .

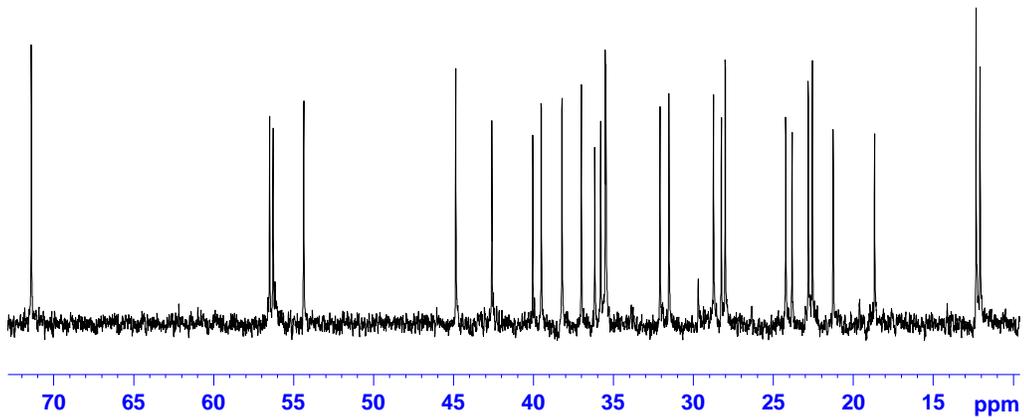


Figura 41. Ampliación general del espectro RMN  $^{13}\text{C}$ .

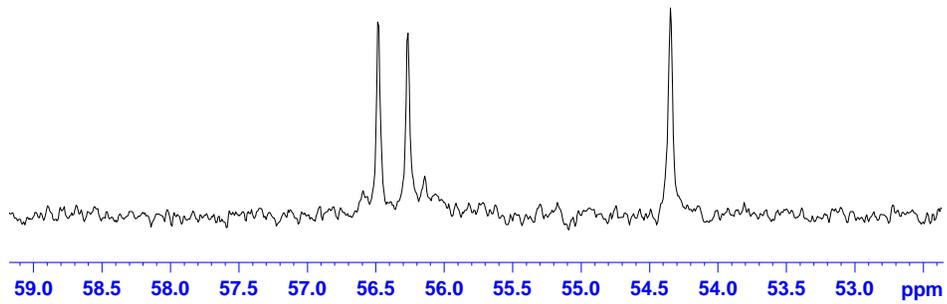


Figura 42. Ampliación a campo bajo del espectro RMN  $^{13}\text{C}$ .

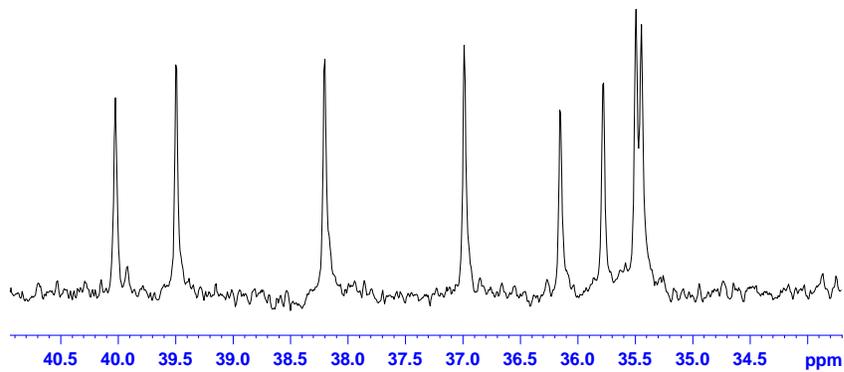


Figura 43. Ampliación a campo bajo del espectro RMN  $^{13}\text{C}$ .

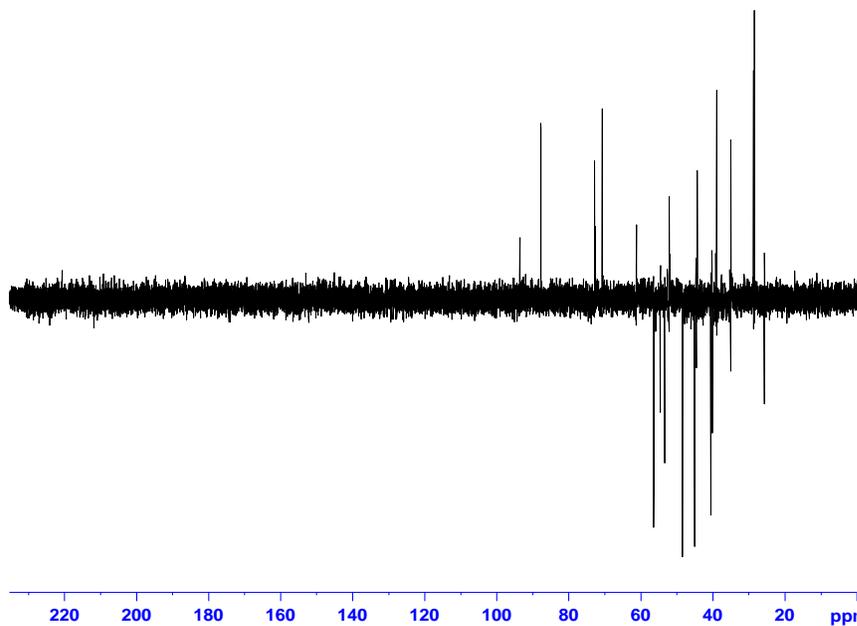


Figura 44. Espectro DEPT 135 del compuesto  $\alpha D_3$ .

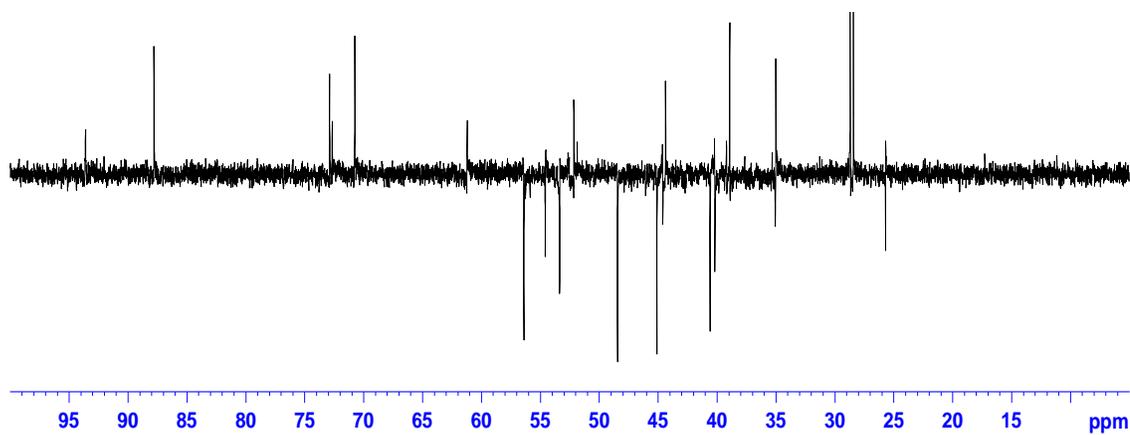


Figura 45. Ampliación del espectro DEPT-135 del compuesto  $\alpha D_3$ .

Tabla 15. Datos seleccionados de RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$ , HMQC y HMBC del compuesto  $\alpha\text{D}_3$ .

Posición	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	HMQC $\delta_{\text{C}}$ (ppm) <sup>a</sup>	HMBC $\delta_{\text{C}}$ (ppm) <sup>a</sup>
1	1,51	38,21	
2	1,62	31,52	
3	3,57	71,38	38,21; 31,52
4	1,08	44,83	
5	1,25	28,73	71,38; 44,89
7	1,64	32,08	
9	-	54,35	
10	-	36,15	
12	1,96	40,03	
13	-	42,58	
14	1,04	56,48	
15	1,53	24,21	
16	1,75	28,24	
17	0,94	56,27	
18	0,62	12,06	56,27; 42,58
19	0,86	21,24	36,15
20	1,27	35,78	
21	0,89	18,65	56,27; 35, 78
22	0,92	36,99	
23	1,28	23,82	
24	1,92	39,50	
25	1,49	28,00	
26	0,83	22,54	28,00; 28,80
27	0,85	22,80	
28	0,77	12,32	36,15; 54,35

<sup>a</sup>: Datos obtenidos a 100 MHz en  $\text{CDCl}_3$ .

Por medio del HMQC, se logró obtener las correlaciones directas existentes entre las señales observadas en los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  del compuesto  $\alpha\text{D}_3$ , entre las cuales cabe destacar, las del  $\text{C}_3$ ,  $\text{C}_{18}$ ,  $\text{C}_{19}$ ,  $\text{C}_{21}$ ,  $\text{C}_{26}$ ,  $\text{C}_{27}$  y  $\text{C}_{28}$  como  $\text{H}_3$ ,  $\text{H}_{18}$ ,  $\text{H}_1$ ,  $\text{H}_{21}$ ,  $\text{H}_{26}$ ,  $\text{H}_{27}$  y  $\text{H}_{28}$ ; además, se observó que los  $\text{C}_9$ ,  $\text{C}_{10}$  y  $\text{C}_{13}$  no presentaban ninguna correlación, presumiblemente por ser los carbonos cuaternarios (Figuras 46-49).

El espectro de HMBC (Figuras 50-52), mostró las correlaciones indirectas existentes entre C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub> con H<sub>3</sub>; C<sub>3</sub> y C<sub>4</sub> con el H<sub>5</sub>; C<sub>9</sub> y C<sub>10</sub> con H<sub>28</sub>; C<sub>10</sub> con H<sub>19</sub>; con estas correlaciones se logró proponer la estructura parcial I o núcleo estructural del esterol (Figura 53). Además de las correlaciones anteriores, mediante este experimento se pudieron observar las conectividades que existen entre el C<sub>17</sub> y C<sub>20</sub> con H<sub>21</sub>; C<sub>13</sub> y C<sub>17</sub> con H<sub>18</sub>; C<sub>25</sub> y C<sub>27</sub> con H<sub>26</sub>; lográndose proponer con esta información, la estructura parcial II o cadena lateral del esterol (Figura 54) (Tabla 15).

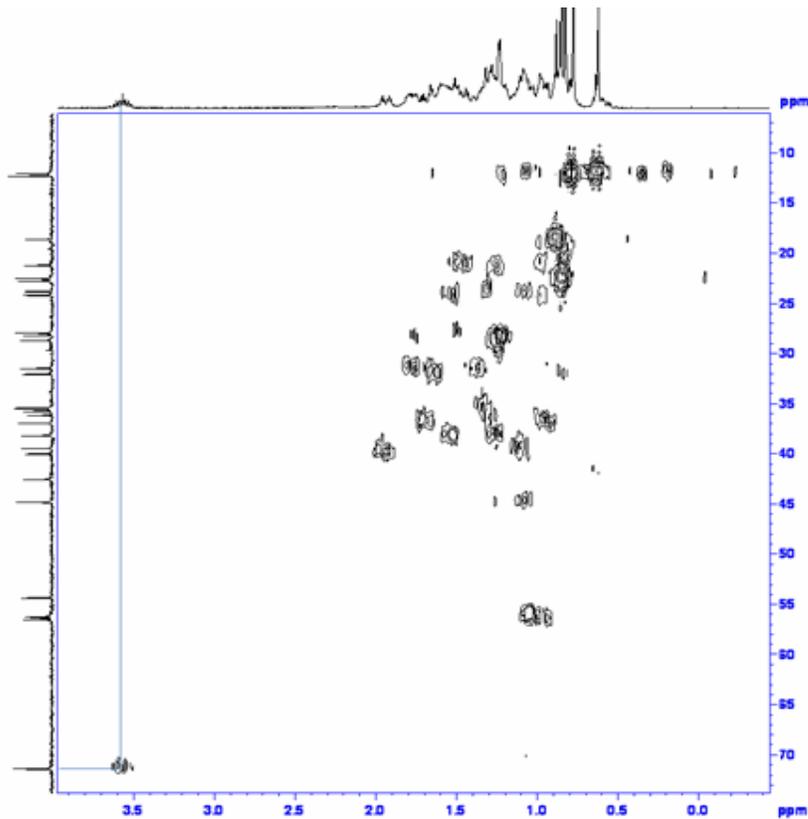


Figura 46. Espectro HMQC del compuesto  $\alpha D_3$ .

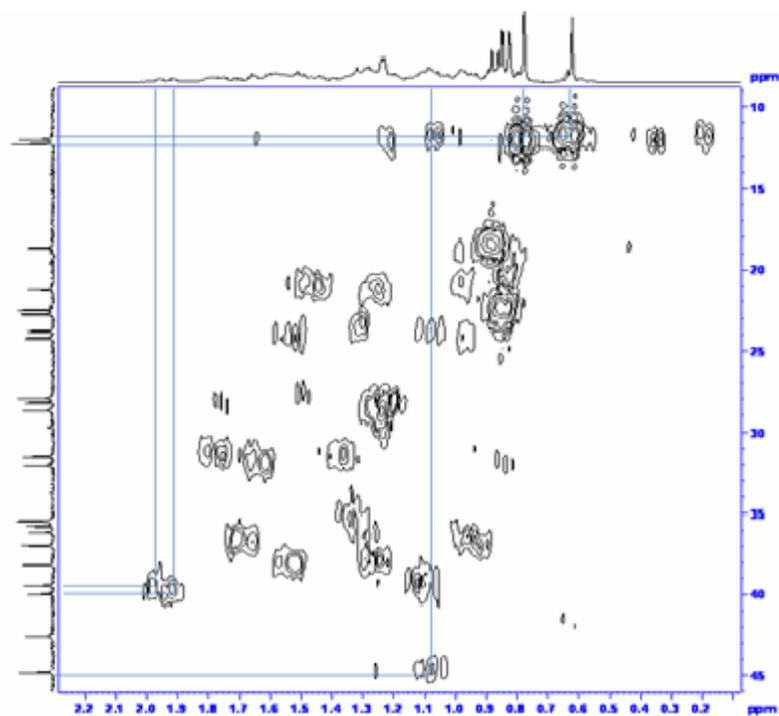


Figura 47. Ampliación I del espectro HMQC del compuesto  $\alpha D_3$ .

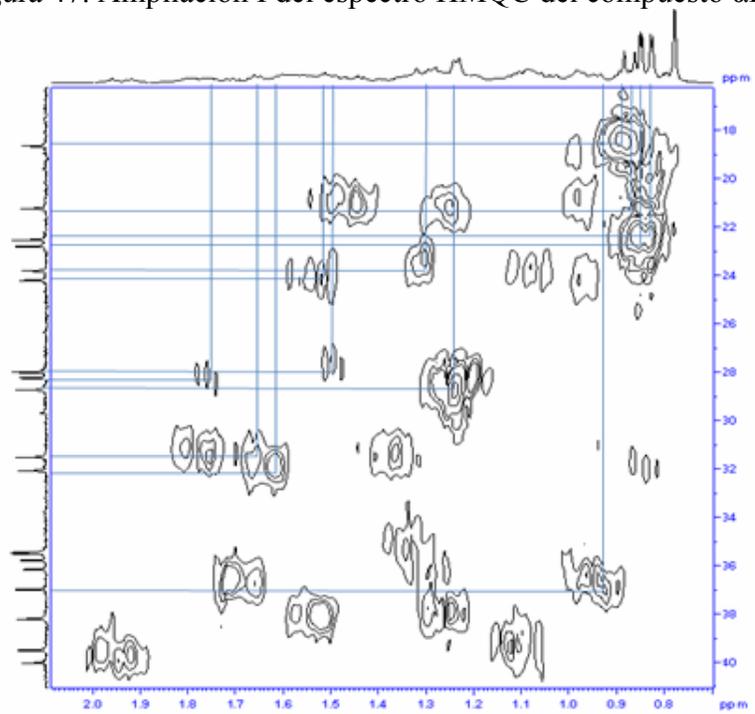


Figura 48. Ampliación II del espectro HMQC del compuesto  $\alpha D_3$ .

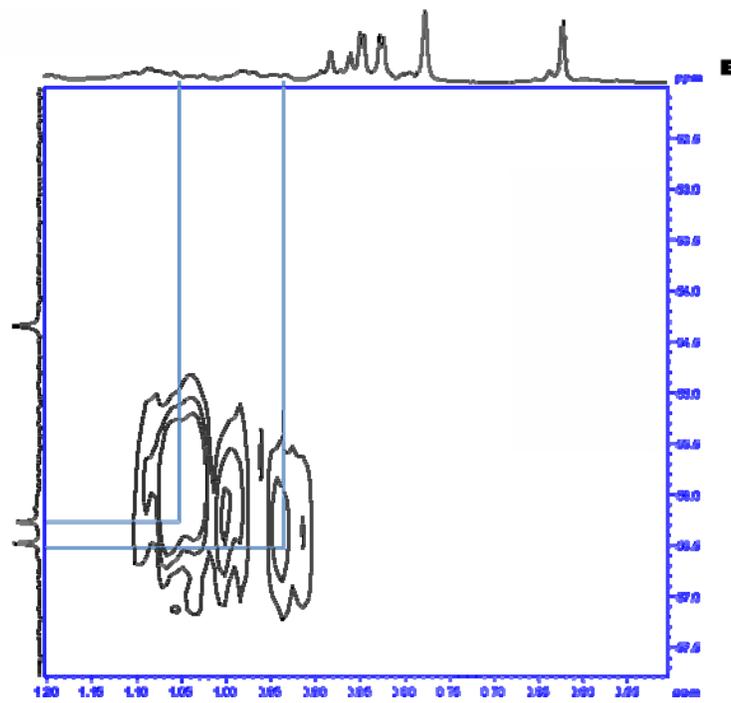


Figura 49. Ampliación III del espectro HMQC del compuesto  $\alpha D_3$ .

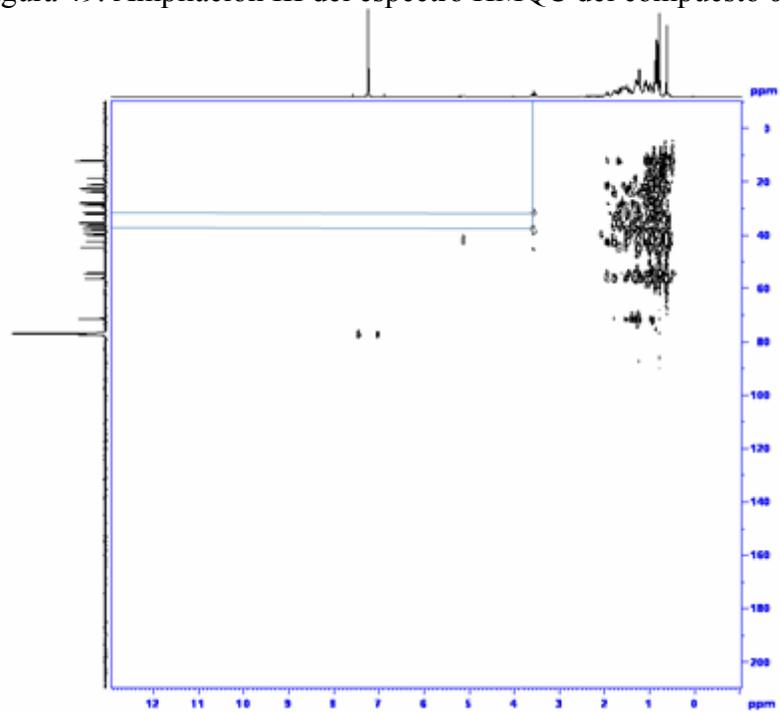


Figura 50. Espectro HMBC del compuesto  $\alpha D_3$ .

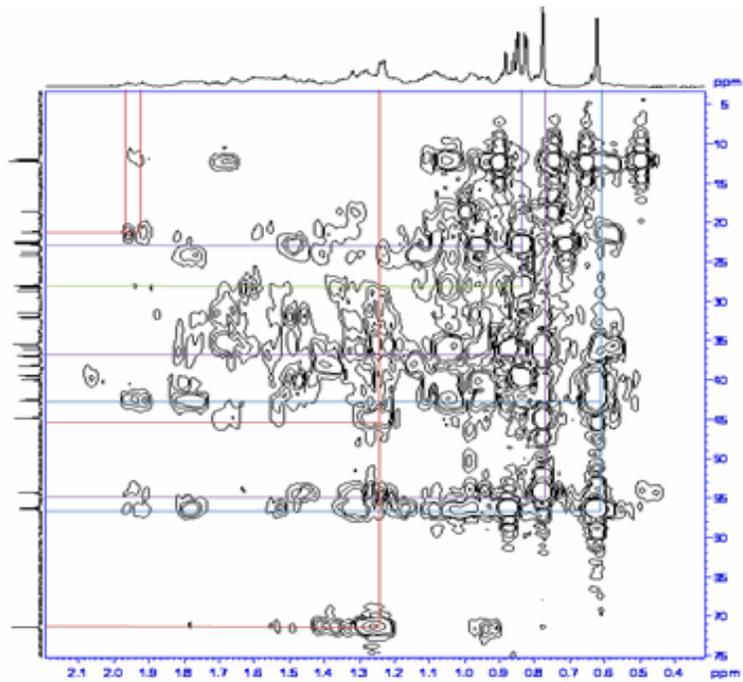


Figura 51. Ampliación I del espectro HMBC del compuesto  $\alpha D_3$ .

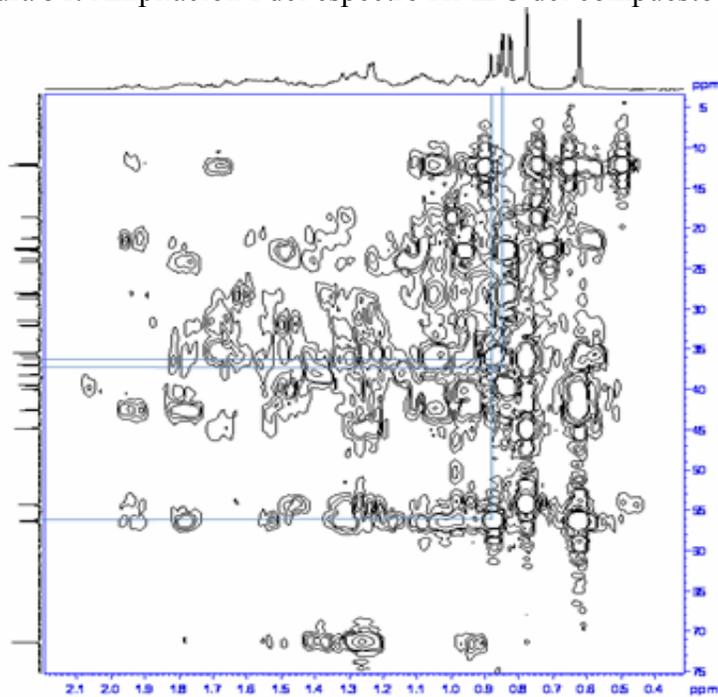


Figura 52. Ampliación II del espectro HMBC del compuesto  $\alpha D_3$ .

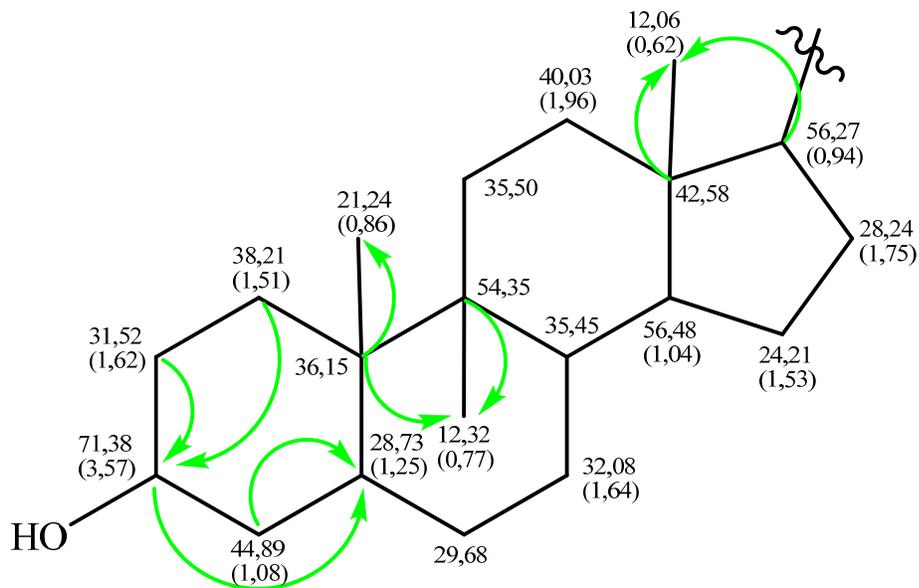


Figura 53. Estructura parcial I del compuesto  $\alpha D_3$  mostrando las correlaciones HMBC.

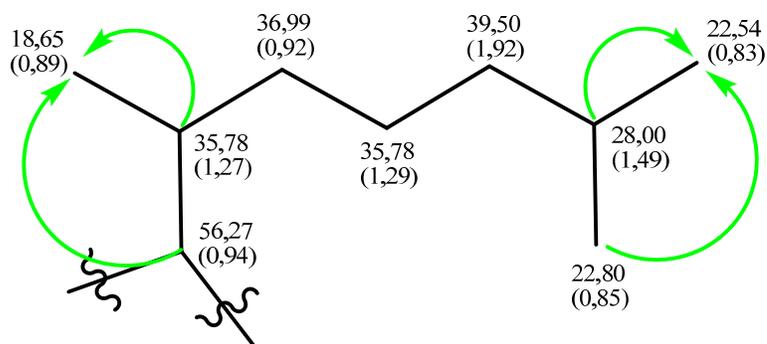


Figura 54. Estructura parcial II del compuesto  $\alpha D_3$  mostrando las correlaciones HMBC.

Basado en las evidencias espectrales mediante el análisis combinado del IR y RMN uni y bidimensional, se propone la posible estructura del compuesto  $\alpha D_3$ , como la de un esteroide derivado del colestano con un metilo adicional en el carbono número 9 de su núcleo estructural (Figura 55). Es importante resaltar, que este es el primer reporte de un análogo 9- metil del colestano en esponjas marinas y en la literatura en general.

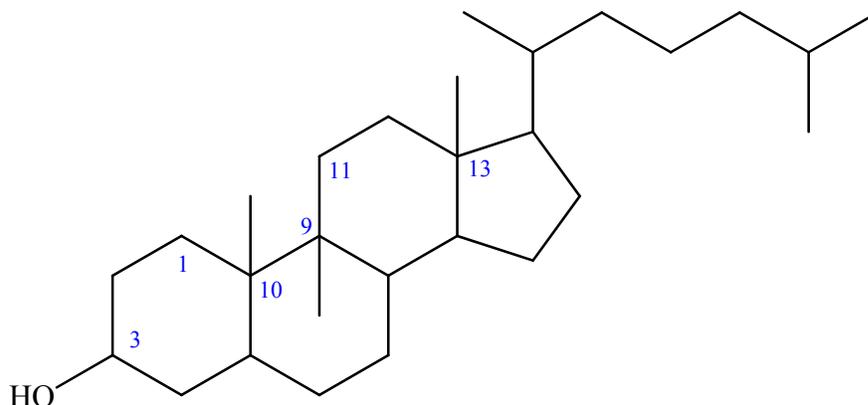


Figura 55. Estructura propuesta para el compuesto  $\alpha D_3$ .

#### *d.1.5 Cromatografía de la subfracción $\alpha E$*

Esta fracción presentó una muy buena separación en la CCF, por lo cual se procedió a separarla, por CCFP utilizando una placa vidrio de 20x20 cm<sup>2</sup> recubierta de sílica gel 10-40  $\mu$ m de 1 mm de espesor, colocándose 39,5 mg de la muestra en la placa. Como solventes se empleó una mezcla de EP-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:4 V/V) y se reveló con una solución ácida de molibdato de amonio, evidenciándose la presencia de una sola mancha, la cual se mostró como un sólido blanco ( $\alpha E_1$ ) con masa con 16,6 mg y R<sub>f</sub> de 0,30, representando el 42,02% del material cromatografiado.

Por lo antes expuesto, a esta subfracción se le realizó RMN de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C y DEPT-135, al analizar los desplazamientos químicos y patrón de acoplamiento de este compuesto, se pudo apreciar la similitud de éstos con los desplazamientos químicos del compuesto de la subfracción  $\alpha C_1$ .

En el espectro RMN <sup>1</sup>H (Figuras 56 y 57) de la subfracción  $\alpha E_1$ , se observaron dos señales importantes a campo bajo, una correspondiente a un protón hidroxílico a  $\delta_H$  3,58 y otra a  $\delta_H$  3,57 como un multiplete, el cual integra para un protón asignado a

un hidrógeno que se encuentra enlazado a un carbono oxigenado (H-C-O); también se pudo apreciar la ausencia de señales en la zona olefínica. A campo alto, el espectro de RMN  $^1\text{H}$  desplegó cinco señales, las cuales fueron asignadas a hidrógenos metílicos, de los cuales tres mostraron ser dobletes a  $\delta_{\text{H}}$  0,84;  $\delta_{\text{H}}$  0,85 y  $\delta_{\text{H}}$  0,89 y dos como singletes a  $\delta_{\text{H}}$  0,63 y  $\delta_{\text{H}}$  0,78 (Tabla 16).

Tabla 16. Asignaciones de desplazamientos químicos ( $\delta_{\text{H}}$ ) de algunas señales de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto  $\alpha\text{E}_1$ .

Posición	Multiplicidad	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) <sup>a</sup>	Asignación
18	singlete ( <i>s</i> )	0,63	C- <u>CH</u> <sub>3</sub>
19	singlete ( <i>s</i> )	0,78	C- <u>CH</u> <sub>3</sub>
26	doblete ( <i>d</i> )	0,84	CH- <u>CH</u> <sub>3</sub>
27	doblete ( <i>d</i> )	0,85	CH- <u>CH</u> <sub>3</sub>
21	doblete ( <i>d</i> )	0,89	CH- <u>CH</u> <sub>3</sub>
3	multiplete ( <i>m</i> )	3,60	HO- <u>CH</u>
3	singlete ( <i>s</i> )	3,65	<u>HO</u> -CH

<sup>a</sup>: Datos obtenidos a 400 MHz en CDCl<sub>3</sub>.

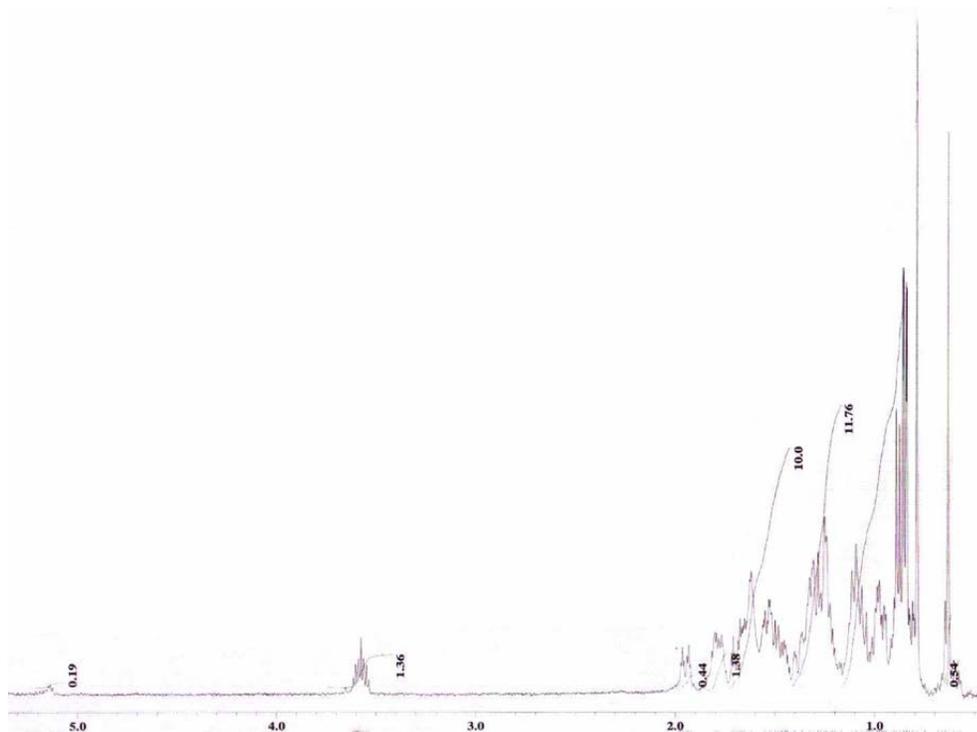


Figura 56. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto  $\alpha\text{E}_1$ .

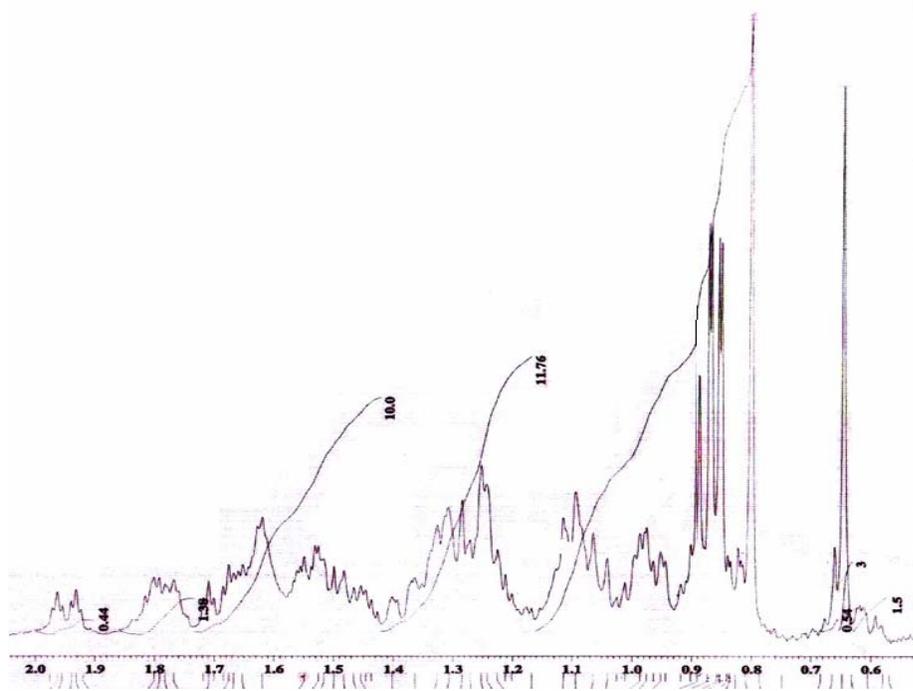


Figura 57. Ampliación del espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto  $\alpha\text{E}_1$ .

El espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de esta subfracción, mostró 27 desplazamientos químicos bien definidos, sugiriendo que este compuesto posee 27 átomos de carbonos, por otra parte, la zona olefinica no mostró señales, lo cual es consecuente con lo observado en el RMN  $^1\text{H}$ ; es decir, que el compuesto no presenta dobles enlace en su estructura. A campo bajo, se destaca una señal a  $\delta_{\text{C}} 71,46$  asignable a un carbono oxigenado. El resto de las señales que se observaron, corresponden a los desplazamientos químicos de los carbonos alifáticos (Figuras 58-61). A campo más alto, se observaron cinco señales a  $\delta_{\text{C}} 12,15$ ;  $\delta_{\text{C}} 12,40$ ;  $\delta_{\text{C}} 18,74$ ;  $\delta_{\text{C}} 22,63$  y  $\delta_{\text{C}} 22,89$  asignados a carbonos metílicos (Tabla 18).

Debido que a esta subfracción no se le realizaron los experimentos bidimensionales de RMN, no se pudo realizar una mejor asignación de los hidrógenos metínicos y metilénicos a sus carbonos correspondientes.

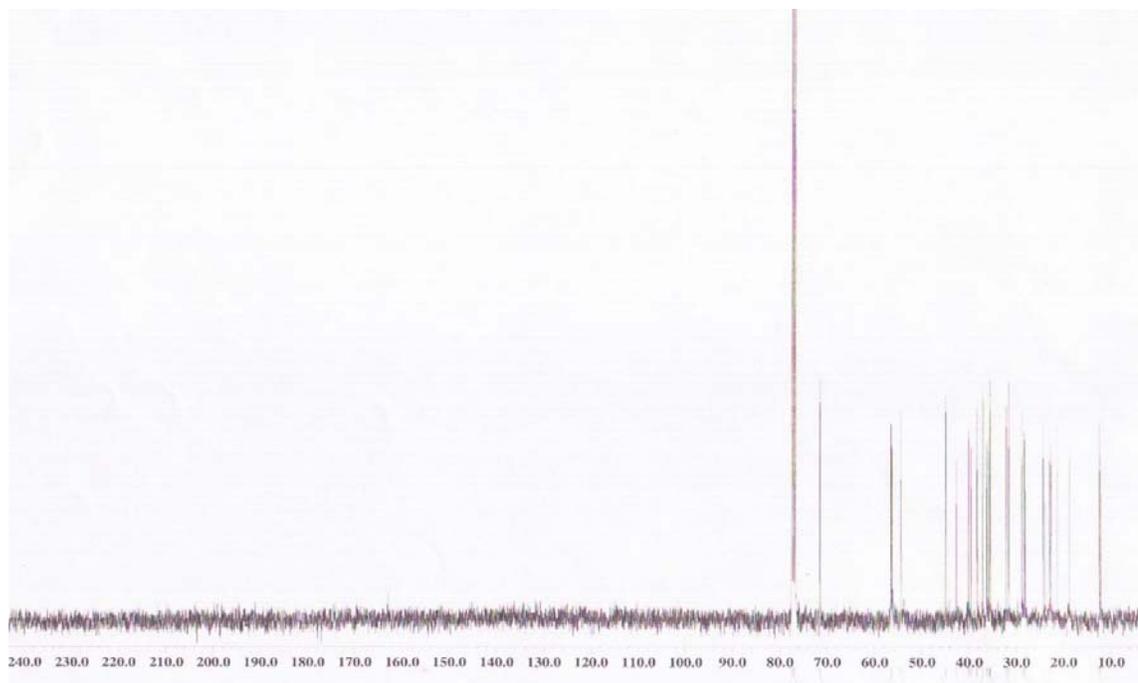


Figura 58. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto  $\alpha\text{E}_1$ .

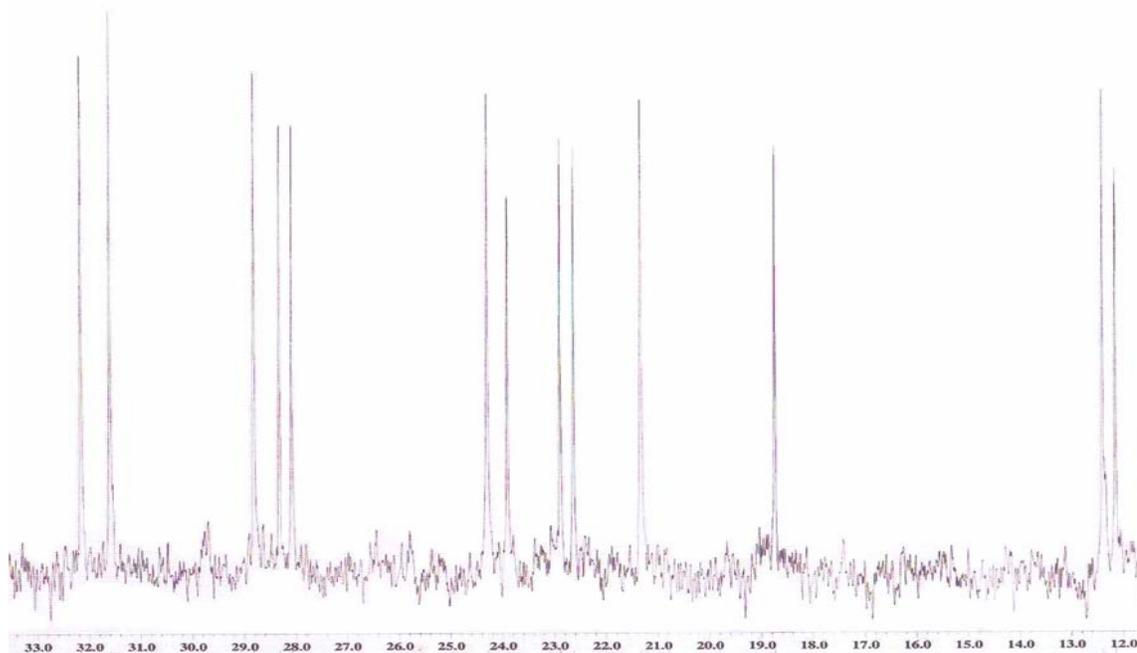


Figura 59. Ampliación I del espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto  $\alpha\text{E}_1$ .

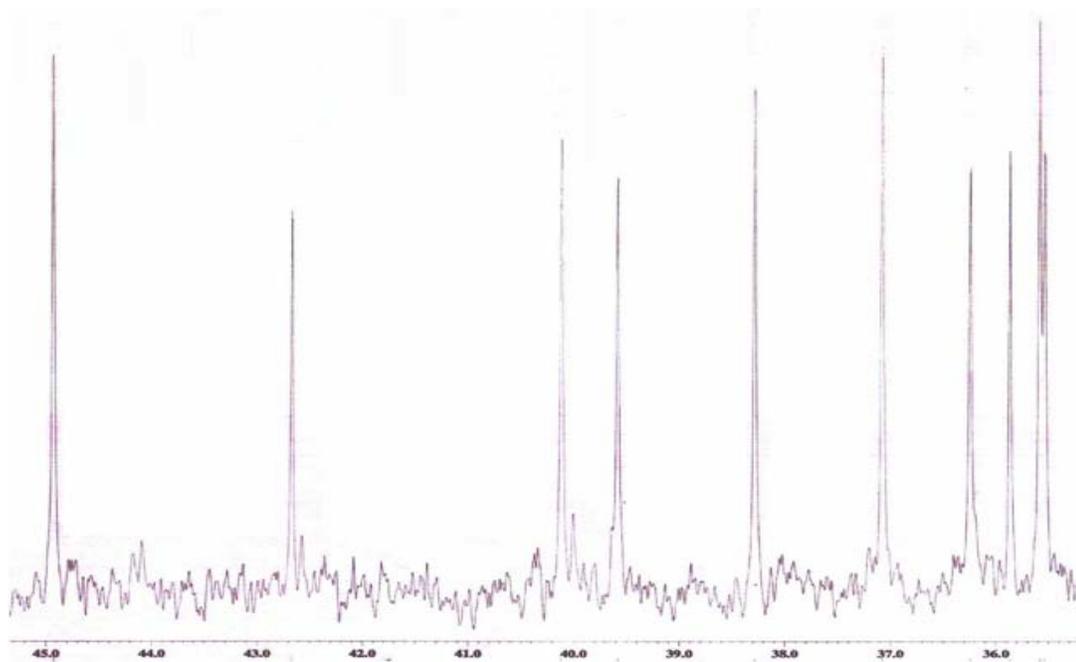


Figura 60. Ampliación II del espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto  $\alpha\text{E}_1$ .

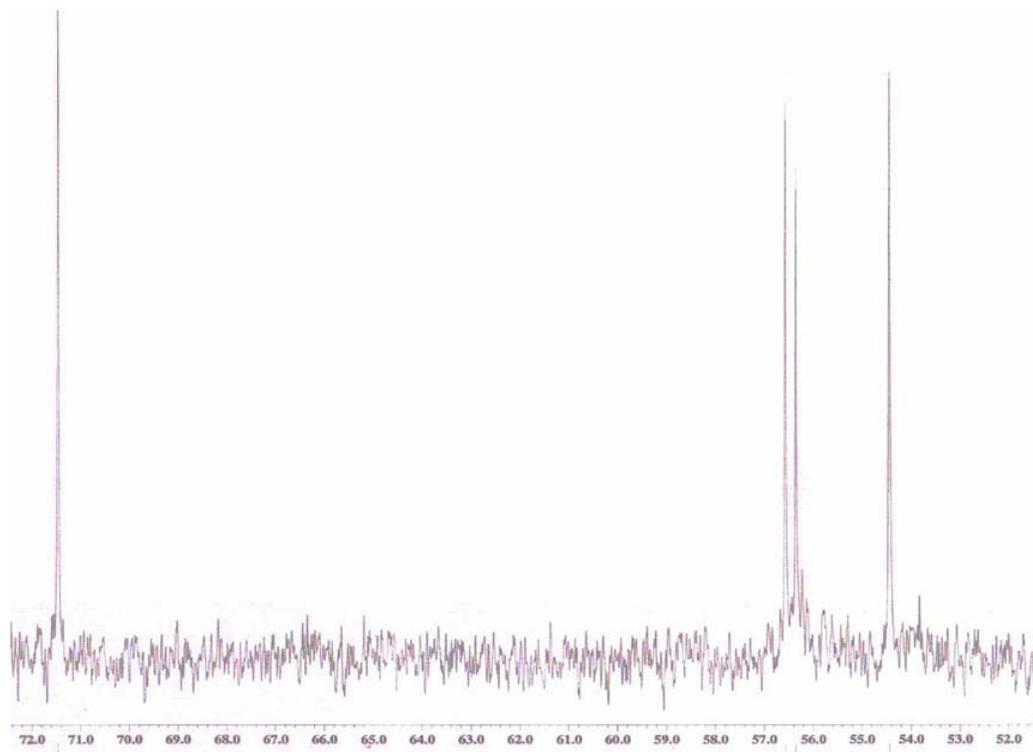


Figura 61. Ampliación III del espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto  $\alpha\text{E}_1$ .

El espectro DEPT-135 (Figuras 62 y 63), proporcionó información acerca de los carbonos metílicos, metilénicos y metínicos presente en la estructura, la cual posee dos carbonos cuaternarios, doce carbonos metilénicos, y una suma de trece carbonos entre metílicos y metínicos.

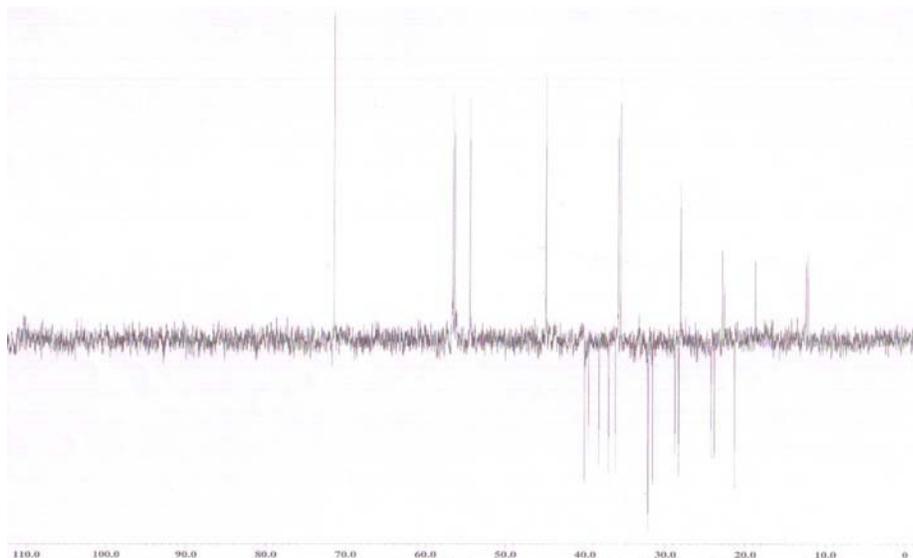


Figura 62. Espectro DEPT-135 del compuesto  $\alpha E_1$ .

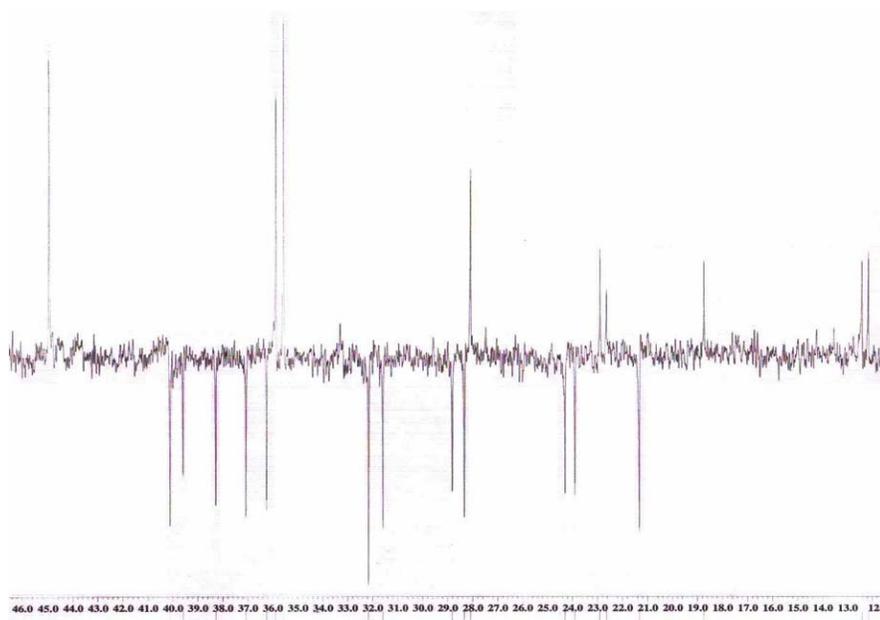


Figura 63. Ampliación del espectro DEPT-135 del compuesto  $\alpha E_1$ .

Debido a que la subfracción  $\alpha C_1$  y subfracción  $\alpha E_1$  presentaron los mismos desplazamientos químicos, tanto el  $\alpha C_1$  como el  $\alpha E_1$  son esteroides  $C_{27}$ , se puede decir que están relacionados estructuralmente ya que poseen el mismo núcleo estructural y

cadena lateral del colestanol. Es de hacer notar que estos dos compuestos de subfracciones distintas ( $\alpha C_1$  y  $\alpha E_1$ ) fueron aislados bajo las mismas condiciones en una CCFP con una mezcla de EP-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:4 V/V), presentando diferentes R<sub>f</sub>; por lo cual se puede decir que no son el mismo compuesto, sino isómeros ópticos del colestanol (Figura 1); posiblemente la diferencia estereoquímica entre ambos se encuentre en la orientación espacial de la cadena lateral en el C<sub>17</sub>; sin embargo, no se pudo establecer cual era el isómero R o S debido a que no se realizaron experimentos más específicos de RMN, tales como ROESY o NOESY, los cuales servirían para discriminar entre ambos esteroisómeros en este tipo de isomería. Además, la subfracción E presentó un CL<sub>50</sub> bajo (1,63 µg/ml) que se puede atribuir a la acción citolítica del compuesto  $\alpha E_1$ .

El colestanol también ha sido aislado como componente mayoritario de la esponja *Aaptos* sp, lo que puede indicar que este compuesto es típico de la quimiotaxonomía de las esponjas de este género, siendo este precursor de muchos más esteroides con estructuras inusuales (52). Las esponjas han logrado colonizar la mayoría de los hábitats acuáticos. El proceso de adaptación a estos ambientes pudo traer como consecuencia cambios en las membranas celulares, en especial en los fosfolípidos y los esteroides que las constituyen, lo cual les permitió adaptarse a su entorno (51).

Muchos estudios han observado un orden creciente de abundancia entre los tres tipos de núcleos encontrados, dirigido en la forma:  $\Delta^7 \rightarrow \Delta^5 \rightarrow \Delta^0$ . Esto se puede explicar por la habilidad que tienen las esponjas para transformar los esteroides, reduciendo (en ese mismo orden) los dobles enlaces de los núcleos, con el fin de satisfacer los requerimientos de sus membranas celulares logrando así la adaptación requerida. Por lo cual las esponjas son consideradas como la mayor fuente de esteroides con estructuras poco comunes en el ambiente marino, lo que puede comprobarse con los 250 esteroides polares descubiertos hasta el año 2002;

adicionalmente, se identificaron 80 esteroides provenientes esponjas marinas, entre los años 2003 y 2008 (53).

Tabla 17. Comparación de los  $\delta_C$  (ppm) de los compuestos  $\alpha C_1$  y  $\alpha E_1$ .

Posición	$\alpha C_1$ ( $\delta_C$ ) <sup>a</sup>	$\alpha E_1$ ( $\delta_C$ ) <sup>a</sup>
1	38,29	38,28
2	31,60	30,59
3	71,46	71,46
4	37,07	37,07
5	44,93	44,93
6	28,81	28,81
7	32,16	32,16
8	35,58	35,58
9	54,43	54,44
10	35,58	35,53
11	21,32	21,11
12	40,11	40,12
13	42,67	42,67
14	56,57	56,57
15	23,89	23,91
16	28,32	28,31
17	56,35	56,36
18	12,14	12,15
19	12,39	12,40
20	35,86	35,86
21	18,73	18,74
22	36,24	36,24
23	24,29	24,28
24	39,58	39,58
25	28,08	28,08
26	22,62	22,63
27	22,88	22,89

<sup>a</sup>: Datos obtenidos a 100 MHz en CDCl<sub>3</sub>.

#### d.1.6 Cromatografía de la subfracción $\alpha F$

Esta subfracción presentó la letalidad más alta ( $CL_{50} < 0,01$   $\mu\text{g/ml}$ ) en *A. salina*, por lo cual fue fraccionada por CC sobre sílica gel 35-70 mesh (0,2 - 0,5 mm), en

una columna de 0,5 cm de diámetro y 30 cm de alto, utilizándose 140,4 mg de la fracción y 4,2 g de sílica gel (relación 1:30 m/m). Como eluyentes se utilizaron mezclas de polaridad creciente de EP-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-AcOEt, AcOEt, AcOEt - MeOH, finalizándose con MeOH al 100%. Se obtuvieron 27 eluatos, los cuales fueron recogidos en erlenmeyers de 25 ml, contentivos de 10 ml cada uno (Tabla 18), los cuales fueron agrupados en 5 subfracciones tomando en cuenta su comportamiento en la CCF por comparación de sus R<sub>f</sub>, según el revelado con luz ultravioleta de longitud de onda corta (100-280 nm) y una solución ácida de molibdato de amonio (Tabla 19). Se recuperó una masa total de 123,5 mg, lo cual representa en el 87,96% del material cromatografiado.

Tabla 18. Fraccionamiento cromatográfico de la subfracción  $\alpha$ F.

Eluatos	Eluyentes	Porcentaje (%) V/V
1 – 5	EP- CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	50-50
6 – 7	EP – CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	40-60
8 – 10	EP – CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	20-80
11 – 14	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100
15 – 17	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> - AcOEt	60-40
18 – 21	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> - AcOEt	40-60
22 – 24	AcOEt	100
25	AcOEt - MeOH	60-40
26 – 27	MeOH	100

Tomando en cuenta las masas de las subfracciones y su separación en la CCF se decidió estudiar las subfracciones  $\alpha$ F<sub>1</sub> y  $\alpha$ F<sub>2</sub>, donde se observó que la subfracción  $\alpha$ F<sub>1</sub> presentaba compuestos con R<sub>f</sub> muy cercanos, lo cual dificultaría la separación en comparación con la subfracción  $\alpha$ F<sub>2</sub>. Por lo cual se le realizó un estudio de los compuestos mayoritarios de la subfracción  $\alpha$ F<sub>1</sub>, por cromatografía de gases acoplada a un detector de masas.

Tabla 19. Subfracciones obtenidas de la separación cromatográfica de la subfracción  $\alpha F$ .

Subfracciones	Eluatos	Masa (mg)
$\alpha F_1$	1-3	41,4
$\alpha F_2$	4 - 12	48,0
$\alpha F_3$	13 - 18	7,7
$\alpha F_4$	19 - 24	11,9
$\alpha F_5$	24 - 27	14,5

A la subfracción  $\alpha F_2$  se le realizó CCFP, utilizando una placa vidrio de 20x20 cm<sup>2</sup> recubierta de sílica gel 10-40  $\mu m$  de 1 mm de espesor, colocándose 38,2 mg de la muestra en la placa; como solventes se empleó una mezcla de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> - AcOEt (3:2 V/V) y se reveló con una solución ácida de molibdato de amonio. Se evidenció la presencia de dos manchas, no muy definidas de compuestos muy cercanos, arrancándose las bandas de la sílica que contenía a estos compuestos, obteniéndose dos líquidos,  $\alpha F_{2.1}$  con 0,35 mg y  $\alpha F_{2.2}$  con 6,18 mg, representando la suma de las masas de estas subfracciones el 17,09% del material cromatografiado (Tabla 21). Tomando en cuenta, que la subfracción  $\alpha F_{2.1}$  poseía muy poca masa se descartó y como se observó que la subfracción  $\alpha F_{2.1}$  poseía más de un compuesto, con R<sub>f</sub> muy cercanos, se analizó por CG-EM. Dichos resultados de la  $\alpha F_1$  y  $\alpha F_{2.2}$  están a la espera para ser interpretados.

Tabla 20. Subfracciones obtenida de la CCFP de la subfracción  $\alpha F_2$ .

Subfracción	Masa (mg)	R <sub>f</sub>
$\alpha F_{2.1}$	0,35	0,81
$\alpha F_{2.2}$	6,18	0,63

#### *d.1.7 Cromatografía de la subfracción $\alpha I$*

Esta subfracción se mostró como un sólido amarillo con una masa de 56,1 mg. Durante la realización de las pruebas de solubilidad a esta subfracción, se observó la

precipitación de un sólido gomoso en acetato de etilo, por lo cual se realizó la precipitación de dicho sólido; el cual fue separado del líquido (solución madre), lavado varias veces en acetato de etilo y purificado con carbón activado, para ser recristalizado en una mezcla de AcOEt-MeOH. De este proceso se obtuvo la subfracción  $\alpha I_{1,2}$ , un sólido blanco (4,9 mg) que al realizarle CCF mostró, por revelado una sola mancha que evidenciaba la existencia de un solo compuesto, por lo cual se decidió estudiarlo mediante experimentos de RMN.

La parte soluble en acetato de etilo,  $\alpha I_{1,1}$  mostró ser un líquido amarillo de 1,9 mg, el cual exhibió una “estela” larga en el revelado de CCF; es decir, una mezcla compleja de compuestos; considerando lo anterior, se realizó el estudio de los constituyentes por CG-EM. Esta subfracción presentó una  $CL_{50}$  significativa (0,29  $\mu\text{g/ml}$ ), por lo cual se puede decir, que posiblemente este sólido gomoso sea el responsable de la letalidad presentada en la fracción  $\alpha I$ . Se recuperó una masa total de 6,8 mg que representa el 12,12 % del material tratado. Los resultados de estas dos subfracciones están a un en espera para ser analizados.

Tabla 21. Subfracciones obtenidas del tratamiento de lavado realizado a subfracción  $\alpha I$ .

Subfracción	Característica	Masa (mg)
$\alpha I_{1,1}$	Líquido amarillo	1,9
$\alpha I_{1,2}$	Sólido blanco	4,9

## **d.2 Cromatografía de la fracción soluble en acetato de etilo (FAE) de *Aplysina lacunosa***

La fracción soluble en acetato de etilo de *A. lacunosa* fue fraccionada por CC sobre sílica gel 35-70 mesh (0,2 - 0,5 mm), en una columna de 2,5 cm de diámetro y 50 cm de alto, para ello se empleó una relación 1:50 (g de muestra: g sílica gel), utilizándose 2,7165 g de la fracción y 135,8875 g de sílica gel. Se utilizaron mezclas

de polaridad creciente de EP-CHCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub>-AcOEt, AcOEt, AcOEt - MeOH, como eluyentes finalizándose con MeOH al 100%. Se obtuvieron 66 eluatos, los cuales fueron recogidos en recipientes de 250 ml contentivos de 50 ml cada uno (Tabla 22), los cuales fueron agrupados en 12 subfracciones tomando en cuenta su comportamiento en la CCF, por comparación de sus R<sub>f</sub>. Se utilizó luz ultravioleta de longitud de onda corta (100-280 nm) y una solución ácida de molibdato de amonio como agentes reveladores (Tabla 23).

Se recuperó una masa total de 2,3405 g la cual representó el 88,15% del material cromatografiado. La figura 68 muestra el esquema de separación de los componentes de esta fracción de *A. lacunosa*, mostrando todas las cromatografías sucesivas realizadas para la obtención de los mismos.

Debido a los resultados arrojados por los análisis además de la actividad antibacteriana (los cuales se mostraran más adelante) y por separación de los componentes en la CCF realizadas a las subfracciones βE, βG, βI y βL, las mismas se cromatografiaron nuevamente, para tratar de aislar los metabolitos bioactivos.

Tabla 22. Fraccionamiento cromatográfico de la FAE de *Aplysina lacunosa*.

Eluatos	Eluyentes	Porcentaje (%) V/V
1 – 8	EP – CHCl <sub>3</sub>	60-40
9 – 14	EP – CHCl <sub>3</sub>	40-60
15 – 18	EP – CHCl <sub>3</sub>	20-80
19 – 24	CHCl <sub>3</sub>	100
25 – 32	CHCl <sub>3</sub> - AcOEt	60-40
33 – 37	CHCl <sub>3</sub> - AcOEt	40-60
38 – 50	AcOEt	100
51 – 57	AcOEt - MeOH	60-40
58 – 60	AcOEt - MeOH	20-80
61– 66	MeOH	100

Tabla 23. Subfracciones obtenidas de la separación cromatográfica FAE de *A. lacunosa*.

Fracciones	Eluatos	Masa (mg)
$\beta$ A	1 – 8	121,1
$\beta$ B	9 – 14	191,9
$\beta$ C	15 – 18	66,5
$\beta$ D	19 – 24	93,6
$\beta$ E	25 – 32	314,8
$\beta$ F	33 – 36	266,6
$\beta$ G	37 – 50	671,2
$\beta$ H	51 – 53	15,4
$\beta$ I	54 – 55	321,0
$\beta$ J	56 – 57	47,7
$\beta$ K	58 – 60	38,7
$\beta$ L	61– 66	192,0

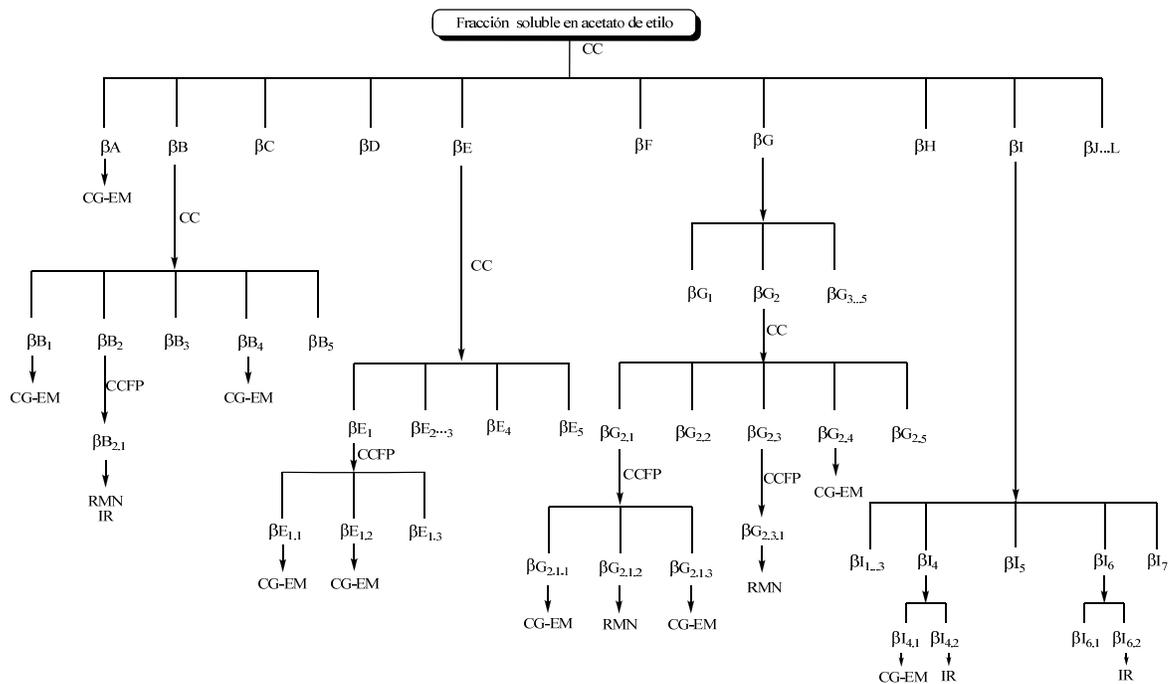


Figura 64. Esquema de fraccionamiento de la fracción soluble en acetato de etilo de la esponja *A. lacunosa*.

### d.2.1 Actividad antibacteriana de las subfracciones $\beta E$ , $\beta G$ , $\beta I$ , y $\beta L$

Como se observa en la tabla 24, las subfracciones  $\beta E$  y  $\beta G$  presentaron la mayor actividad antibacteriana contra las cepas ensayadas (100% de las bacterias fueron sensibles), mostrando una actividad fuerte contra estas bacterias; mientras que las subfracciones  $\beta I$  y  $\beta L$  solo mostraron actividad moderada y fuerte frente a las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Salmonella* sp., respectivamente. Lo dicho anteriormente, muestra que existe más de un metabolito con actividad bactericida en esta esponja.

Tabla 24. Actividad antibacteriana de las subfracciones  $\beta E$ ,  $\beta G$ ,  $\beta I$  y  $\beta L$ , provenientes de la FAE de la esponja *A. lacunosa*.

Microorganismos	$\beta E$	$\beta G$	$\beta I$	$\beta L$	% EAM
Bacterias :					
<i>Staphylococcus aureus</i>	+++	+++	-	++	75,00
<i>Listeria monocytogenes</i>	+++	+++	-	-	25,00
<i>Escherichia coli</i>	+	+++	-	-	25,00
<i>Salmonella</i> sp.	+++	+++	+++	-	75,00
%MSE	100,00	100,00	25,00	25,00	

+++; Actividad fuerte (diámetro superior a 18 mm), ++: Actividad moderada (diámetro entre 15-18 mm), +: Actividad leve (diámetro entre 11-14 mm), -: no hay actividad, %MSE: porcentaje de microorganismos sensibles a cada extracto, %EAM: porcentaje de extractos activos contra un mismo microorganismo. Estudio realizado con una concentración de 40 mg/ml.

Si se observa la tabla 5 (Sección c.1), la FAE de esta esponja no presentó actividad contra la bacteria *Salmonella* sp; sin embargo, la mayoría de sus subfracciones mostraron actividad bactericida contra dicha bacteria. Pudo haber ocurrido que los compuestos bioactivos en contra de esta bacteria, estaban en poca proporción y al realizarse la separación cromatográfica aumentara la concentración de

estos compuestos; también es el caso de que existiera un efecto antagónico entre los constituyentes, que neutralizaba el efecto de los metabolitos activos contra esta bacteria, y al separarlos se suprimió dicho efecto. Debido a la prominente actividad de estas subfracciones se decidió hacer un estudio de los constituyentes de éstas.

#### *d.2.2 Cromatografía de la subfracción $\beta A$*

Esta subfracción se presentó como la menos polar de esta esponja, por lo cual se decidió realizar un estudio de los metabolitos menos polares de esta especie. Sin embargo, al realizar el revelado de la CCF se observó que no presentaba separación con ninguna mezcla de solventes, lo que evidenciaba una mezcla compleja de compuestos. Las características de esta subfracción eran las de un líquido (121,1 mg), casi incoloro, soluble en éter de petróleo, cloroformo y acetato de etilo. Analizando las características del mismo se le realizó un estudio de los componentes por CG-EM; aún se están esperando dichos resultados para ser analizados.

#### *d.2.3 Cromatografía de la subfracción $\beta B$*

Debido a la buena separación que presentó en CCF esta subfracción y la cantidad significativa de la misma, se utilizó CC para la separación de los compuestos. Para la CC se empleó sílica gel 35-70 mesh (0,2 - 0,5 mm), en una columna de 1 cm de diámetro y 24 cm de alto, en una relación 1:30, utilizándose 191,9 mg de la subfracción y 5,745 g de sílica gel. Se utilizaron como eluyentes éter de petróleo y mezclas de polaridad creciente de EP-CHCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub>-AcOEt, AcOEt, AcOEt-MeOH, finalizándose con MeOH al 100%. Se obtuvieron 73 eluatos, los cuales fueron recogidos en recipientes de 50 ml, contentivos de 25 ml cada uno (Tabla 25), los cuales fueron agrupados en 5 subfracciones, tomando en cuenta su comportamiento en la CCF por comparación de sus R<sub>f</sub>. Utilizándose luz UV de

longitud de onda corta (100-280 nm) y una solución ácida de molibdato de amonio para el revelado (Tabla 26).

Se recuperó una masa total de 186,8 mg la cual representó el 97,34% del material cromatografiado. Tomando en cuenta el criterio de mejor separación observado en el revelado de la CCF, se decidió estudiar los constituyentes de las subfracciones  $\beta B_1$ ,  $\beta B_2$  y  $\beta B_4$ .

Tabla 25. Fraccionamiento cromatográfico de la subfracción  $\beta B$ .

Eluatos	Eluyentes	Porcentaje (%) V/V
1 – 6	EP	100
7 – 12	EP- CHCl <sub>3</sub>	90-10
13 – 24	EP- CHCl <sub>3</sub>	70-30
25 – 35	EP- CHCl <sub>3</sub>	60-40
36 – 42	EP- CHCl <sub>3</sub>	40-60
43 – 47	EP- CHCl <sub>3</sub>	20-80
48 – 58	CHCl <sub>3</sub>	100
59 – 63	CHCl <sub>3</sub> - AcOEt	50-50
64 – 67	CHCl <sub>3</sub> - AcOEt	40-60
68 – 70	AcOEt	100
71 – 73	MeOH	100

Tabla 26. Subfracciones obtenidas de la separación cromatográfica de la subfracción  $\beta B$ .

Subfracciones	Eluatos	Masa (mg)
$\beta B_1$	1 – 16	16,1
$\beta B_2$	9 – 14	120,9
$\beta B_3$	15 – 18	15,0
$\beta B_4$	19 – 24	24,6
$\beta B_5$	25 – 32	10,2

#### d.2.3.1 Cromatografía de la subfracción $\beta B_1$

Esta subfracción se presentó como un líquido verde viscoso (16,1 mg) que al realizarle el revelado de la CCF, se observó que no presentaba separación con

ninguna mezcla de solventes; lo cual evidenciaba una mezcla compleja de compuestos. Esta subfracción resultó, soluble en éter de petróleo, cloroformo y acetato de etilo. Analizando las características del líquido en cuestión, se decidió realizar un estudio de los componentes por CG-EM, cuyos resultados están a la espera para ser analizados.

#### d.2.3.2 Cromatografía de la subfracción $\beta B_2$

Esta subfracción presentó una muy buena separación en la CCF al ser revelada; además de una masa apreciable, por lo cual se procedió a separar por CCFP, utilizándose tres placas vidrio de 20x20 cm<sup>2</sup> recubierta de sílica gel 10-40  $\mu$ m del mm de espesor; colocándose un total de 118,1 mg de la muestra repartida en las tres placas, y como solventes de elución se empleó una mezcla de EP-CHCl<sub>3</sub> en una proporción 2:3, revelándose con una solución acida de molibdato de amonio. Así, se evidenció la presencia de una sola banda, arrancándose la franja de la sílica que poseía este compuesto, obteniéndose la subfracción  $\beta B_{2,1}$ , la cual se mostró como un sólido blanco con una masa de 14,9 mg y un R<sub>f</sub> de 0,38, representando el 12,61% del material cromatografiado.

A esta subfracción se le realizó espectroscopia IR, RMN de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C y DEPT-135, observándose que poseía desplazamientos químicos ( $\delta_H$  y  $\delta_C$ ) similares a los que presentan los compuestos triterpenoidales.

El espectro IR (Figura 65) del compuesto  $\beta B_{2,1}$  mostró una absorción a 3 200 cm<sup>-1</sup>, debida al estiramiento del enlace oxígeno-hidrógeno del grupo hidroxilo (-O-H), a 3 000 cm<sup>-1</sup> una banda correspondiente al estiramiento carbono – hidrógeno para dobles enlaces (=C-H), otra absorción a 2 450 cm<sup>-1</sup> ocasionada por el estiramiento del enlace carbono-hidrogeno alifático (-C-H), a 1 250 cm<sup>-1</sup> se observó una banda

correspondiente al estiramiento asimétrico del enlace carbono-oxígeno (-C-O) y una banda a  $610\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la deformación de sistema  $-\text{CH}_2$ .

En el espectro RMN  $^1\text{H}$  de la subfracción  $\beta\text{B}_{2.1}$  se observaron tres señales a campo bajo, un doblete que integra para un hidrógeno a  $\delta_{\text{H}} 5,35$ , asignado a un protón olefínico debido a la existencia de un doble enlace en la estructura de la molécula, otra a  $\delta_{\text{H}} 3,65$  como un singlete correspondiente a un protón hidroxílico y otra a  $\delta_{\text{H}} 3,51$  exhibe un multiplete, el cual integra para un protón, asignado a un hidrógeno que se encuentra enlazado a un carbono que está unido a un átomo de oxígeno (H-C-O). A campo alto, el espectro de RMN  $^1\text{H}$  desplegó 8 señales asignadas a grupos metilos, de las cuales tres aparecieron como dobletes a  $\delta_{\text{H}} 0,79$ ;  $\delta_{\text{H}} 0,88$  y  $\delta_{\text{H}} 0,90$ , y cinco como singletes a  $\delta_{\text{H}} 0,66$ ;  $\delta_{\text{H}} 0,77$ ;  $\delta_{\text{H}} 0,80$ ;  $\delta_{\text{H}} 0,84$  y  $\delta_{\text{H}} 0,99$  (Figuras 66-68) (Tabla 27).

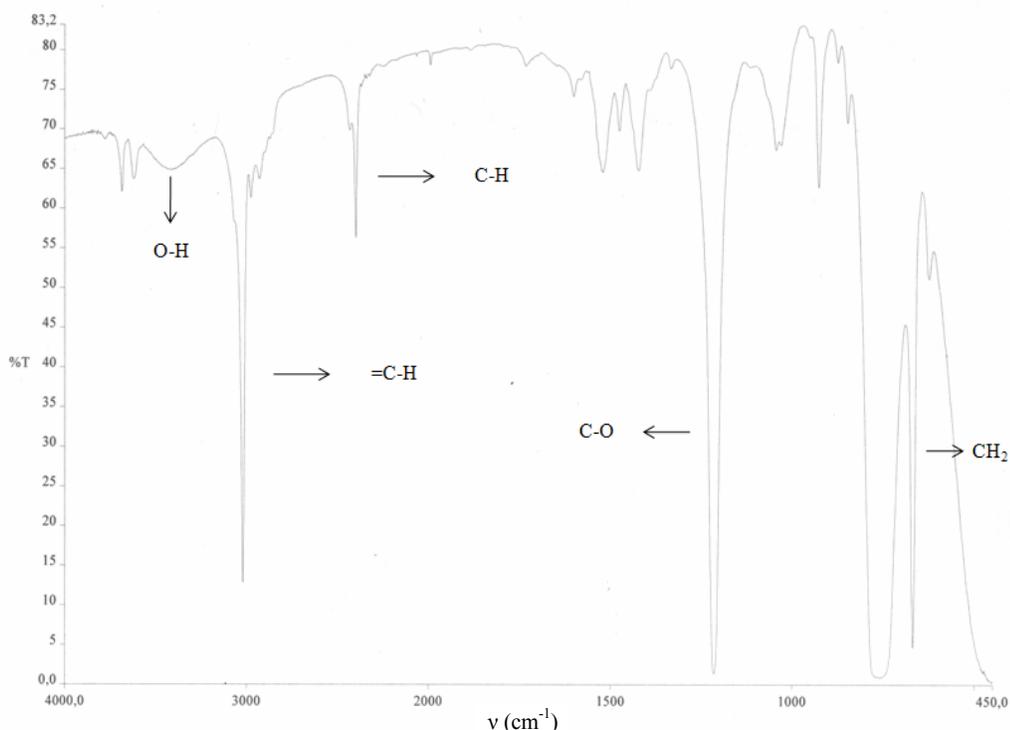


Figura 65. Espectro IR del compuesto  $\beta\text{B}_{2.1}$

Tabla 27. Asignaciones de desplazamientos químicos ( $\delta_H$ ) de algunas señales seleccionadas de RMN  $^1H$  del compuesto  $\beta B_{2.1}$ .

Nº de señales	Multiplicidad	$\delta_H$ (ppm)	Asignación
1	singlete ( <i>s</i> )	0,66	C- <u>CH</u> <sub>3</sub>
2	singlete ( <i>s</i> )	0,77	C- <u>CH</u> <sub>3</sub>
3	doblete ( <i>d</i> )	0,79	CH- <u>CH</u> <sub>3</sub>
4	singlete ( <i>s</i> )	0,80	C- <u>CH</u> <sub>3</sub>
5	singlete ( <i>s</i> )	0,84	C- <u>CH</u> <sub>3</sub>
6	doblete ( <i>d</i> )	0,88	CH- <u>CH</u> <sub>3</sub>
7	doblete ( <i>d</i> )	0,90	CH- <u>CH</u> <sub>3</sub>
8	singlete ( <i>s</i> )	0,99	C- <u>CH</u> <sub>3</sub>
9	doblete ( <i>d</i> )	5,35	-C=C- <u>H</u>
10	multiplete ( <i>m</i> )	3,51	HO- <u>CH</u>
11	singlete ( <i>s</i> )	3,65	<u>HO</u> -CH

<sup>a</sup>: Datos obtenidos a 400 MHz en CDCl<sub>3</sub>.

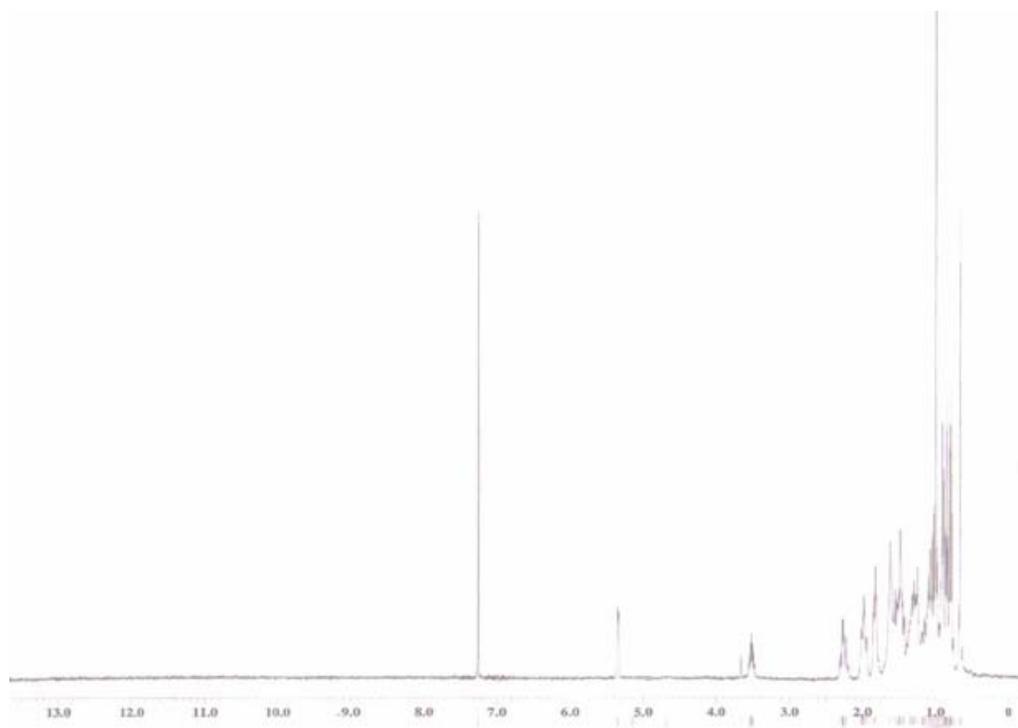


Figura 66. Espectro de RMN  $^1H$  del compuesto  $\beta B_2$ .

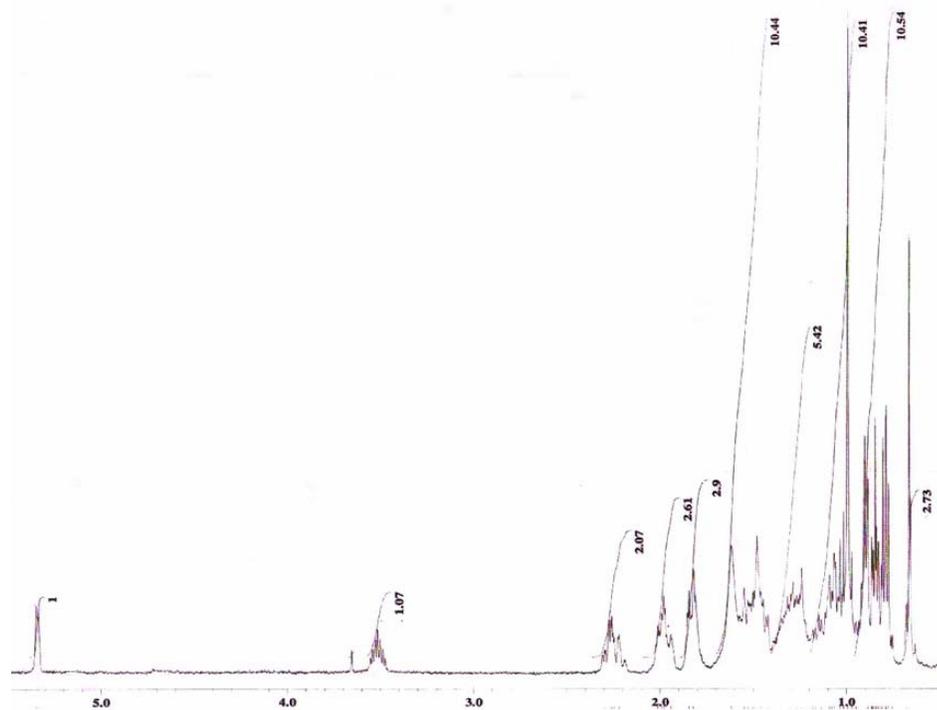


Figura 67. Ampliación I del espectro de RMN <sup>1</sup>H del compuesto  $\beta B_{2.1}$ .

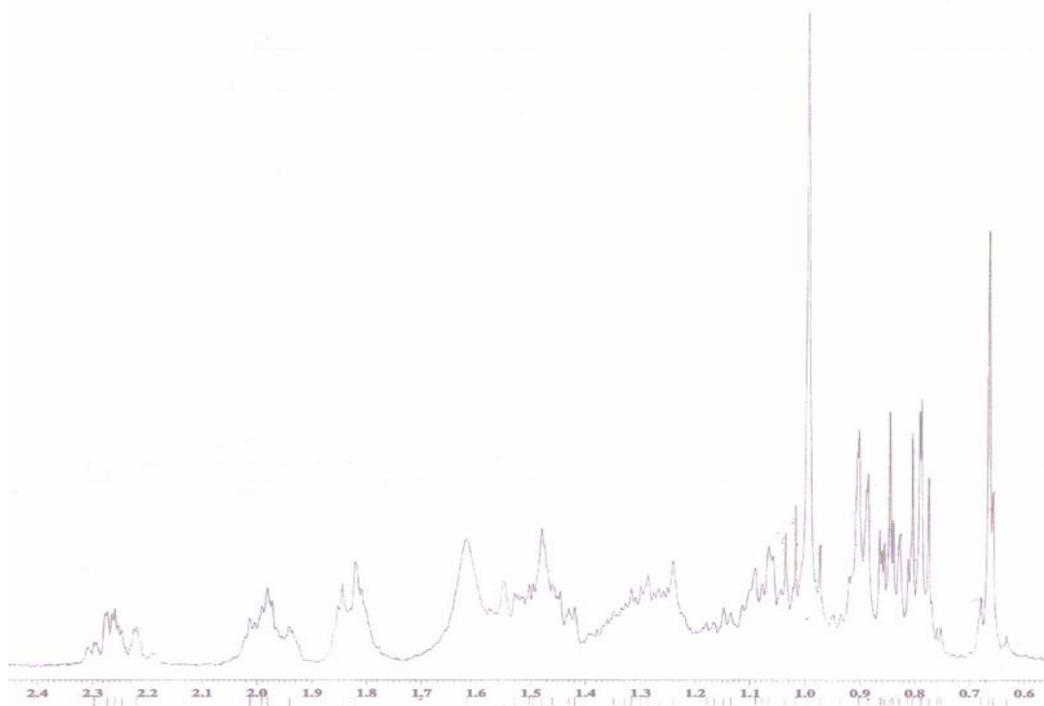


Figura 68. Ampliación II del espectro de RMN <sup>1</sup>H del compuesto  $\beta B_{2.1}$ .

El espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de esta subfracción exhibió 32 desplazamientos químicos bien definidos, sugiriendo que este compuesto posee 32 átomos de carbono; por otra parte la zona olefínica mostró dos desplazamientos uno a  $\delta_{\text{C}}$  140,82 y otro a  $\delta_{\text{C}}$  121,79, lo cual está en concordancia con lo observado en los espectros IR y RMN  $^1\text{H}$ ; es decir, que el compuesto presenta un doble enlace en su estructura. A campo bajo, se destaca una señal a  $\delta_{\text{C}}$  71,88 asignable a un carbono oxigenado. El resto de las señales que se observan corresponden a los desplazamientos de los carbonos alifáticos (Figuras 69-72). A campo más alto, se observan ocho señales a  $\delta_{\text{C}}$  11,93;  $\delta_{\text{C}}$  12,31;  $\delta_{\text{C}}$  12,51;  $\delta_{\text{C}}$  15,96;  $\delta_{\text{C}}$  16,60;  $\delta_{\text{C}}$  18,77;  $\delta_{\text{C}}$  18,83 y  $\delta_{\text{C}}$  19,47 asignados a carbonos metílicos (Tabla 28).

Las señales mostradas por el espectro DEPT-135 (Figuras 73 y 74), ayudaron a confirmar la identificación de siete carbonos metilénicos, ocho metílicos y diez metínicos en la estructura del compuesto triterpenoidal.

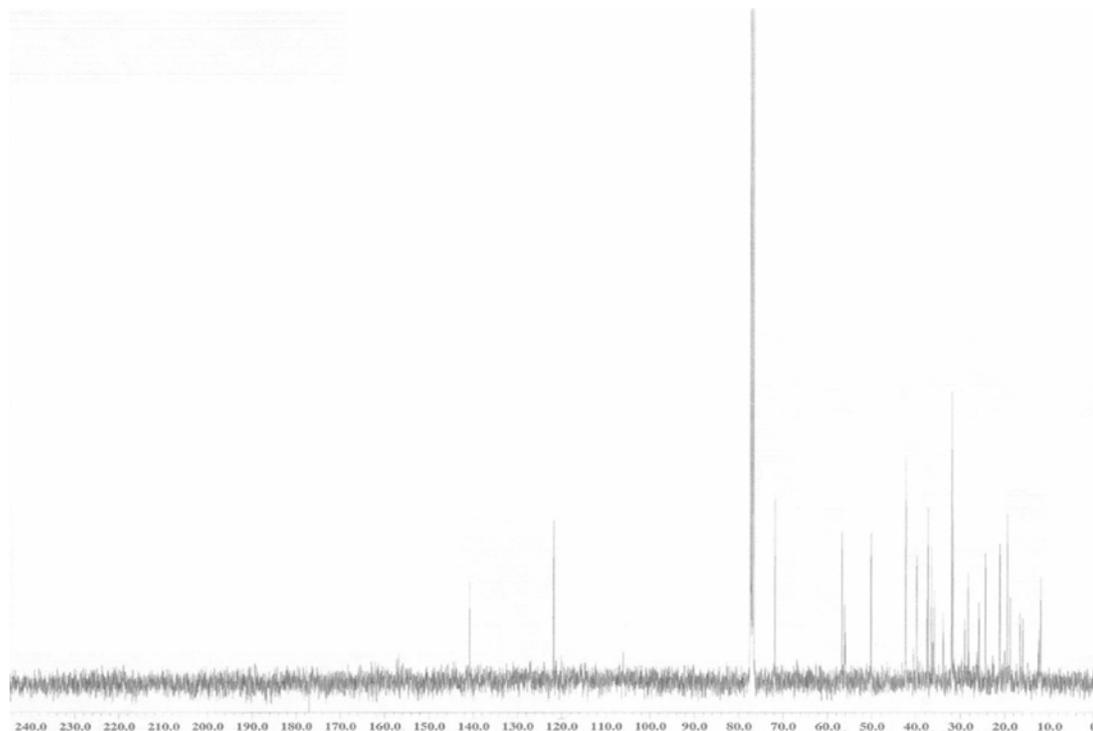


Figura 69. Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto  $\beta\text{B}_{2.1}$ .

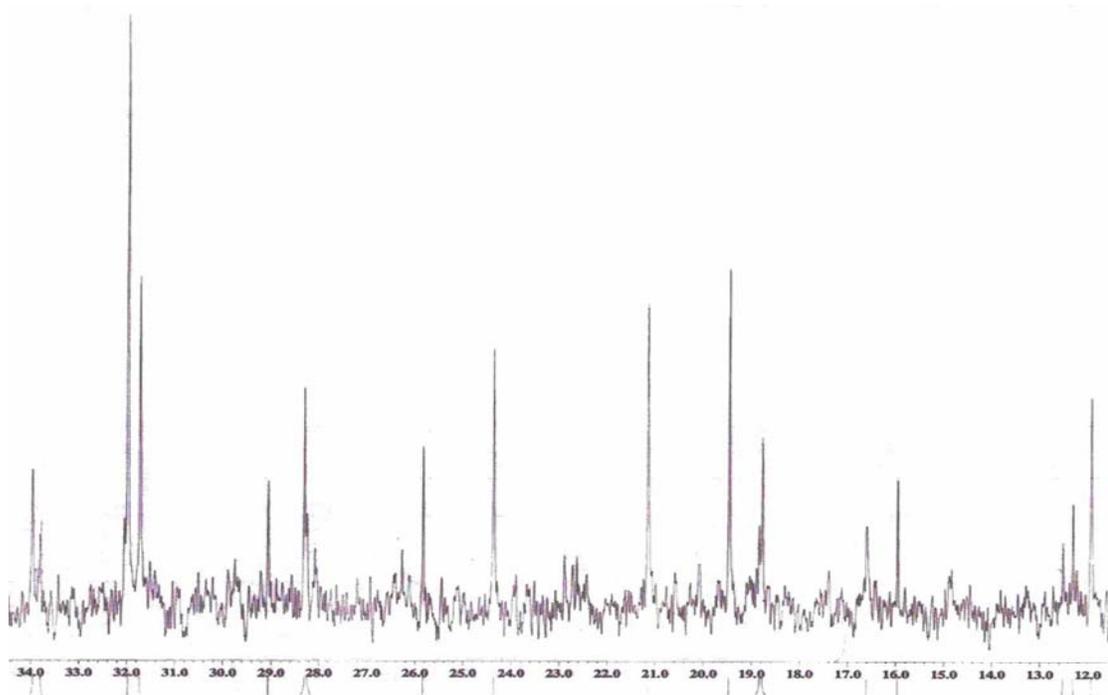


Figura 70. Ampliación I del espectro RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto  $\beta\text{B}_{2.1}$ .

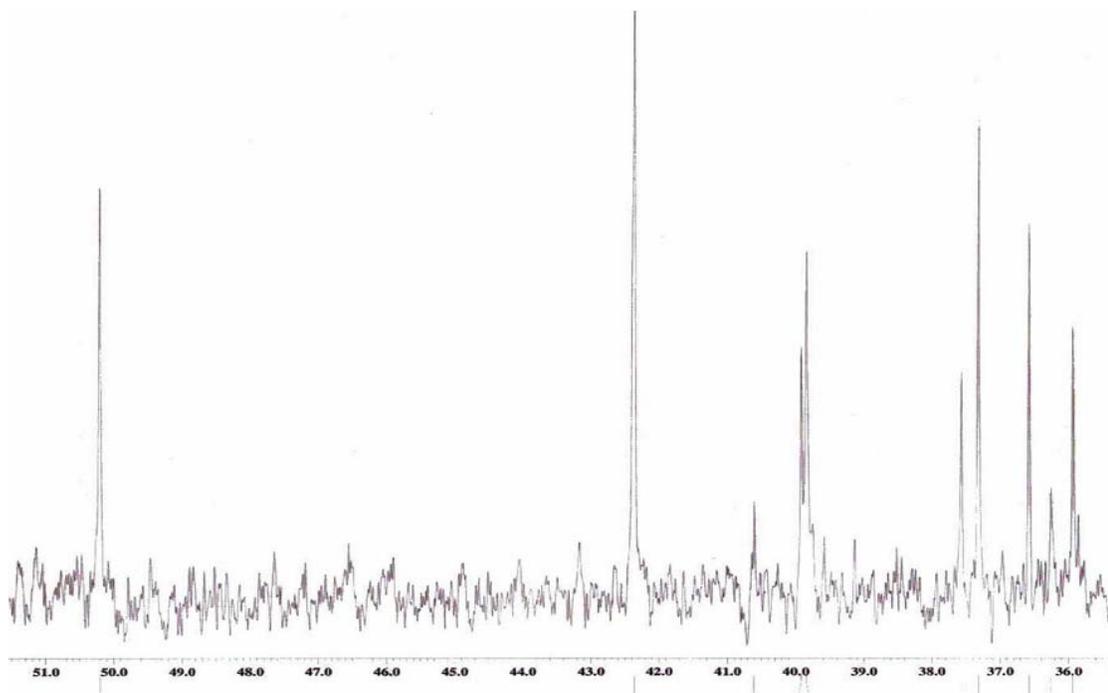


Figura 71. Ampliación II del espectro RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto  $\beta\text{B}_{2.1}$ .

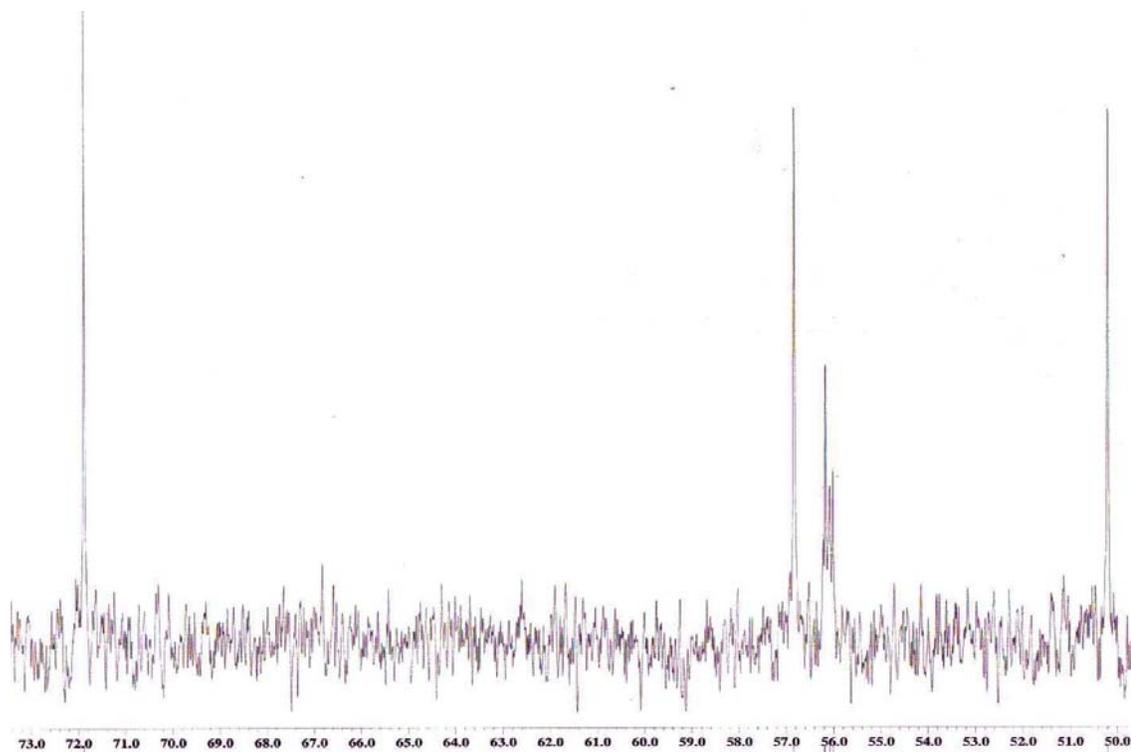


Figura 72. Ampliación III del espectro RMN <sup>13</sup>C del compuesto βB<sub>2.1</sub>.

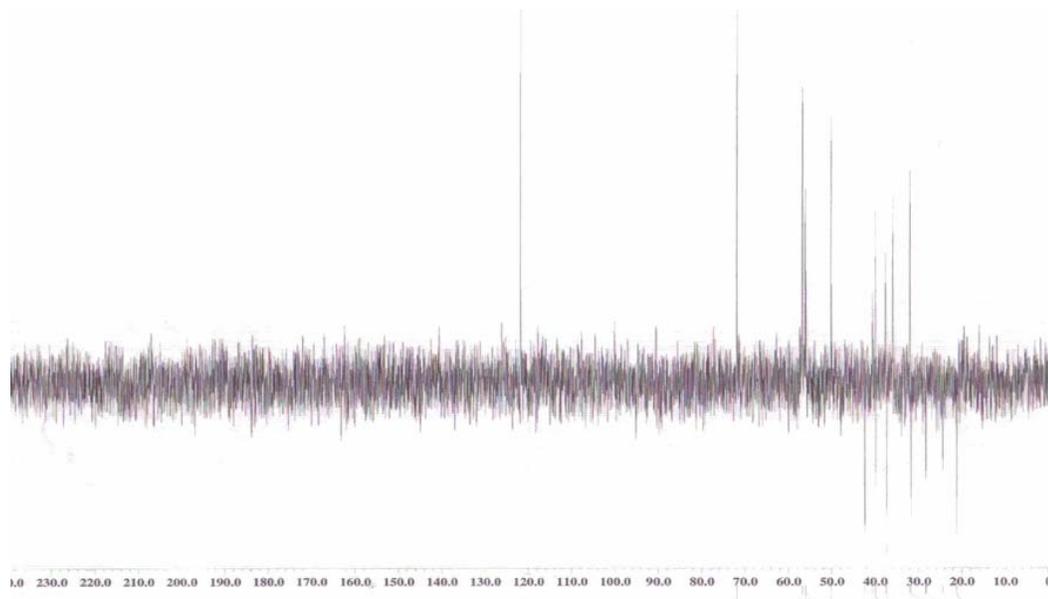


Figura 73. Espectro DEPT del compuesto βB<sub>2.1</sub>.

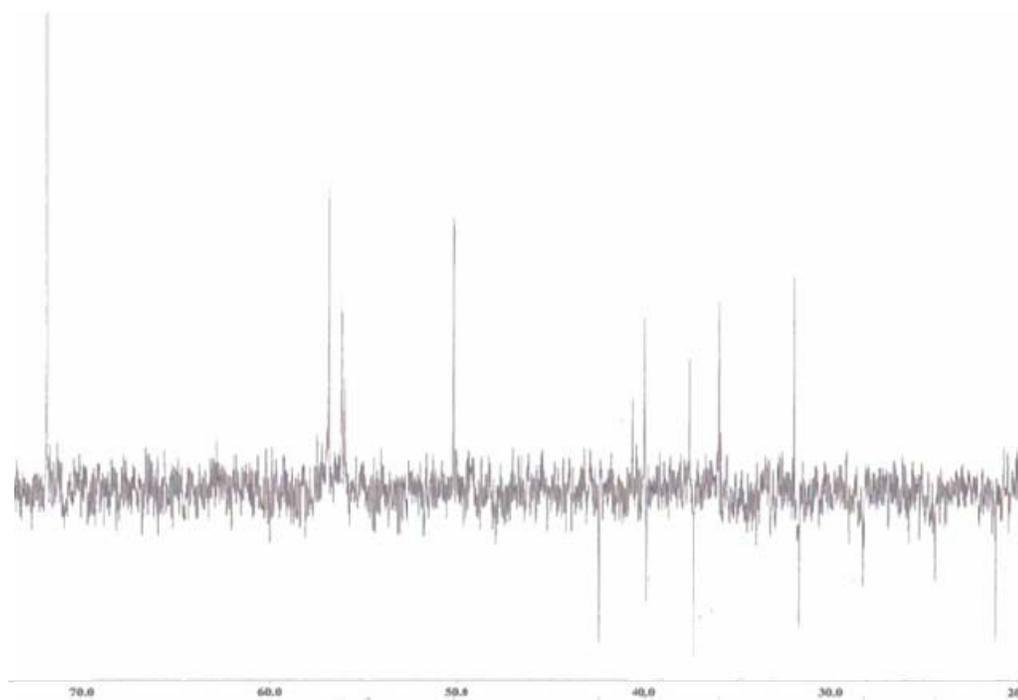


Figura 74. Ampliación del DEPT-135 del compuesto  $\beta B_{2.1}$ .

Tabla 28. Desplazamientos químicos del RMN de  $^{13}C$  del compuesto  $\beta B_{2.1}$ .

Nº de Señales	$\delta_C$ (ppm) <sup>a</sup>	Nº de Señales	$\delta_C$ (ppm)
1	11,93	17	35,94
2	12,13	18	36,57
3	12,51	19	37,31
4	15,96	20	37,57
5	16,60	21	39,84
6	18,77	22	39,91
7	18,83	23	40,61
8	19,47	24	42,36
9	21,16	25	50,20
10	24,36	26	56,02
11	25,83	27	56,08
12	28,30	28	56,18
13	29,06	29	56,83
14	31,72	30	71,88
15	31,97	31	121,79
16	33,96	32	140,82

<sup>a</sup> :Datos obtenidos a 100 MHz en  $CDCl_3$ .

Debido a que no se realizaron otros experimentos bidimensionales de RMN, no se pudo obtener más información sobre este compuesto, por lo cual solo se puede decir que posiblemente sea un derivado de un triterpeno pentacíclico con esqueleto estructural tipo olenano, ursano o lupano, con un grupo hidroxilo, un doble enlace, ocho carbonos metílicos y siete metilénicos. La prueba de Liebermann-Burchard para caracterizar este tipo de metabolito, resultó positiva para esta subfracción, lo cual podría lo antes dicho.

Este viene a ser el primer reporte de triterpenos pentacíclicos para esta especie de esponja, y para este género, inclusive. No es común encontrar esta familia de metabolitos secundarios en poríferos, generalmente estos terminan siendo precursores de los esteroides, que son más comunes en las esponjas marinas; sin embargo, en la esponja *Pseudoaxinella* sp. se ha reportado la presencia de triterpenos pentacíclicos, lo cual está en concordancia con lo antes expuesto (54). También han sido aislados en esponjas marinas, sesquiterpenos y sesterterpenos con actividad biológica significativa (49).

Los triterpenos son una familia de terpenos que contienen alrededor de 30 átomos de carbono, procedentes de la incorporación biosintética de seis unidades de isoprenilo. Se han descrito provenientes de fuentes naturales, más de 40 triterpenos cíclicos con fórmula  $C_{30}H_{52}$ , alrededor de 150 con fórmula  $C_{30}H_{52}O$  y además numerosos compuestos relacionados. Se piensa que la mayoría tiene un origen biosintético, resultado de la ciclación enzimática de escualeno ( $C_{30}H_{52}$ ) o del óxido de escualeno ( $C_{30}H_{52}O$ ). La presencia de estos triterpenos es habitual en plantas superiores, pero también en animales, hongos y bacterias (2, 55).

Los triterpenos más abundantes presentan los esqueletos de olenano, ursano y lupano, generalmente con funciones oxigenadas en los carbonos 2, 3, 6, 23, 28 (Figura 75) (2).

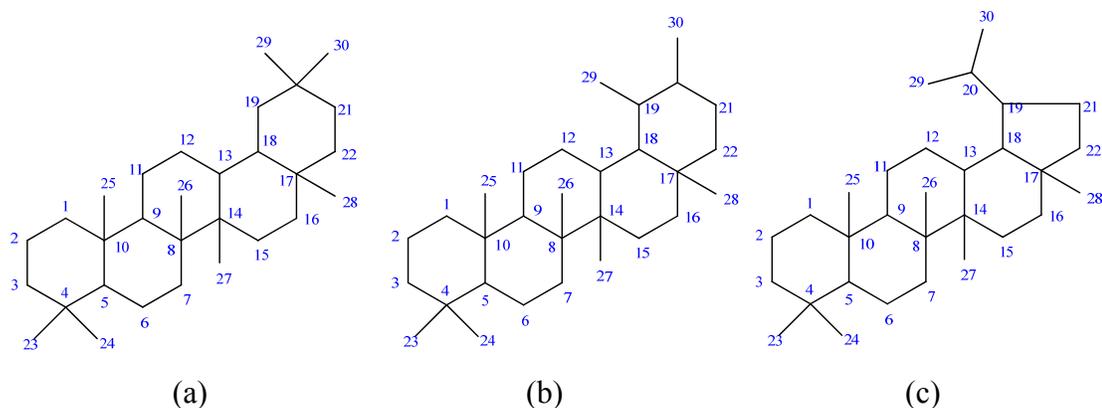


Figura 75. Estructuras más abundantes de los triterpenos, oleanano (a), ursano (b) y lupano (c).

#### d.2.4 Cromatografía de la subfracción $\beta B_4$

Esta subfracción se presentó como un líquido amarillo de (24,6 mg), que al realizarle el revelado de la CCF, se observó que no presentaba separación con ninguna mezcla de solventes, lo que evidenciaba una mezcla compleja de compuestos. Esta subfracción resultó ser soluble en éter de petróleo, cloroformo y acetato de etilo. Analizando las características del líquido, se decidió realizarle un estudio por CG-EM para conocer los constituyentes de la mezcla.

#### d.3 Cromatografía de la subfracción $\beta E$

Debido a que esta subfracción presentó una actividad antibacteriana significativa (Tabla 6) y como la cantidad de la misma era suficiente para separarla, se le realizó una CC con sílica gel 35-70 mesh (0,2 - 0,5 mm), en una columna de 1 cm de diámetro y 28 cm de alto, utilizándose 294,5 mg de la subfracción y 8,844 g de sílica gel, en relación 1:30. Se utilizaron como eluyentes mezclas de polaridad creciente: EP- $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3$  - AcOEt, AcOEt, AcOEt - MeOH,

finalizándose con MeOH al 100%. Se obtuvieron 32 eluatos, los cuales fueron recogidos en fiolas de 50 ml contentivos de 25 ml cada uno (Tabla 29), los cuales fueron agrupados en 5 subfracciones tomando en cuenta su comportamiento en la CCF por comparación de sus  $R_f$ . Utilizándose UV (100-280 nm) y una solución ácida de molibdato de amonio, como agentes reveladores (Tabla 30). Se recuperó una masa total de 276,7 mg, la cual representa el 93,95% del material cromatografiado.

Tabla 29. Fraccionamiento cromatográfico de la subfracción  $\beta E$ .

Eluatos	Eluyentes	Porcentaje (%) V/V
1 – 5	EP- $\text{CHCl}_3$	40-60
6	$\text{CHCl}_3$	100
7 – 9	$\text{CHCl}_3$ - AcOEt	80-20
10	$\text{CHCl}_3$ - AcOEt	60-40
11 – 14	$\text{CHCl}_3$ - AcOEt	20-80
15 – 17	AcOEt	100
18 – 21	AcOEt - MeOH	40-60
22 – 25	AcOEt - MeOH	50-50
26 – 28	AcOEt - MeOH	20-80
29 – 32	MeOH	100

Tabla 30. Subfracciones obtenidas de la separación cromatográfica de la subfracción  $\beta E$ .

Subfracciones	Eluatos	Masa (mg)
$\beta E_1$	1 – 3	139,0
$\beta E_2$	4 – 12	10,0
$\beta E_3$	13 – 17	7,3
$\beta E_4$	18 – 19	50,5
$\beta E_5$	20 – 32	70,1

#### d.3.1 Cromatografía de la subfracción $\beta E_1$

Esta subfracción presentó buena separación en la CCF, además de una masa apreciable, por lo cual se procedió a separarla por CCFP utilizándose 2 placas de vidrio de 20x20  $\text{cm}^2$  recubiertas de sílica gel 10-40  $\mu\text{m}$  de 1 mm de espesor,

colocándose, un total de 95,5 mg de la muestra repartidas en las dos placas y como solvente de elución se empleó  $\text{CHCl}_3$ , revelándose con una solución ácida de molibdato de amonio. Se evidenció la presencia de tres bandas, arrancándose así las franjas de la sílica que poseían los metabolitos, obteniéndose tres líquidos rojizos solubles en acetato de etilo y metanol (Tabla 31). Tomando en cuenta que al realizar la capa CCF de estas tres subfracciones obtenidas, se observó que poseían más de un componentes con  $R_f$  cercanos, y considerando que provenían de una subfracción con actividad antibacteriana apreciable, se decidió realizarle una análisis de los constituyentes de las subfracciones  $\beta E_{1.1}$  y  $\beta E_{1.2}$ , por CG-EM, para conocer los metabolitos responsables de la bioactividad observada.

Se pudo recuperar un total de 8,3 mg, lo cual representa el 8,69% de la subfracción cromatografiada.

Tabla 31. Subfracciones obtenidas de la CCFP de la subfracción  $\beta E_1$ .

Subfracción	Masa (mg)	$R_f$
$\beta E_{1.1}$	4,4	0,18
$\beta E_{1.2}$	3,3	0,42
$\beta E_{1.3}$	0,6	0,66

#### d.4 Cromatografía de la subfracción $\beta G$

Considerando que esta subfracción exhibió la mayor actividad antibacteriana, además de una cantidad de masa significativa, se le realizó CC para la separación de los componentes. Para dicha cromatografía se empleó sílica gel 35-70 mesh (0,2 - 0,5 mm), en una columna de 1 cm de diámetro y 42 cm de alto, utilizándose 650 mg de la fracción y 19,5153 g de sílica gel en una proporción 1:30. Se utilizaron como eluyentes  $\text{CHCl}_3$  y mezclas de polaridad creciente de  $\text{CHCl}_3$  - AcOEt, AcOEt, AcOEt - MeOH, finalizándose con MeOH al 100%. Se obtuvieron 41 eluatos, los cuales fueron recogidos en fiolas de 50 ml contentivas de 25 ml cada uno (Tabla 32), los

cuales fueron agrupados en 5 subfracciones según su comportamiento en la CCF, por comparación de sus  $R_f$ , después del revelado (Tabla 33).

El porcentaje de recuperación fue de 97,67%, ya que se obtuvo una masa total de 634,86 mg.

Tabla 32. Fraccionamiento cromatográfico de la subfracción  $\beta G$ .

Eluatos	Eluyentes	Porcentaje (%) V/V
1 – 4	CHCl <sub>3</sub>	100
5 – 6	CHCl <sub>3</sub> - AcOEt	40-60
7 – 21	AcOEt	100
22 – 24	AcOEt - MeOH	80-20
25 – 30	AcOEt - MeOH	60-40
31 – 32	AcOEt - MeOH	40-60
33 – 36	AcOEt - MeOH	20-80
37 – 41	MeOH	100

Tabla 33. Subfracciones obtenidas de la separación cromatográfica de la subfracción  $\beta G$ .

Fracciones	Eluatos	Masa (mg)
$\beta G_1$	1 – 6	0,26
$\beta G_2$	7 – 23	390,00
$\beta G_3$	24 – 28	182,00
$\beta G_4$	29 – 40	62,00
$\beta G_5$	41	0,60

#### d.4.1 Cromatografía de la subfracción $\beta G_2$

Tomando en cuenta la cantidad de masa que poseía esta subfracción, y que provenía de una subfracción con un buen potencial antibacteriano (Tabla 25), se utilizó CC para la separación de los componentes, empleándose sílica gel 35-70 mesh (0,2 - 0,5 mm), en una columna de 1 cm de diámetro y 42 cm de alto, utilizándose 250,5 mg de la subfracción y 7,515 g de sílica gel en una proporción

1:30. Se utilizaron mezclas de polaridad creciente de CHCl<sub>3</sub> - AcOEt, AcOEt, AcOEt - MeOH, como solventes de elución, finalizándose con MeOH al 100%. Se obtuvieron 29 eluatos, los cuales fueron recogidos en fioles de 50 ml contentivos de 25 ml cada uno (Tabla 34), los cuales fueron agrupados en 5 subfracciones, según su comportamiento en la CCF por comparación de sus R<sub>f</sub>, después de ser reveladas (Tabla 35).

Se obtuvo un porcentaje de recuperación de 80,47%, el cual corresponde a una masa de 201,6 mg.

Tabla 34. Fraccionamiento cromatográfico de la subfracción βG<sub>2</sub>.

Eluatos	Eluyentes	Porcentaje (%) V/V
1 – 5	CHCl <sub>3</sub> - AcOEt	50-50
6 – 7	CHCl <sub>3</sub> - AcOEt	40-60
11 – 17	AcOEt	100
18 – 21	AcOEt – MeOH	80-20
22 – 25	AcOEt – MeOH	50-50
26 – 29	MeOH	100

Tabla 35. Subfracciones obtenidas de la separación cromatográfica de la subfracción βG<sub>2</sub>.

Subfracciones	Eluatos	Masa (mg)
βG <sub>2.1</sub>	1 – 2	134,1
βG <sub>2.2</sub>	3	24,3
βG <sub>2.3</sub>	4 – 21	30,4
βG <sub>2.4</sub>	22	2,3
βG <sub>2.5</sub>	23-29	10,5

#### d.4.1.1 Cromatografía de la subfracción βG<sub>2.1</sub>

Considerando que esta subfracción tenía la mayor cantidad de masa, y una buena separación en la CCF, se procedió a separarla por CCFP utilizando tres placas

de vidrio de 20x20 cm<sup>2</sup> recubiertas de sílica gel 10-40 μm de 1mm de espesor, colocándose un total de 134,1 mg de la muestra repartidas en las tres placas; y como solventes de desarrollo se empleó una mezcla de CHCl<sub>3</sub> - AcOEt en proporción 2:3. Posterior al revelado, se evidenció la presencia de tres bandas definidas, arrancándose las franjas de sílica, para obtener tres subfracciones: βG<sub>2.1.1</sub>, la cual era un sólido amarillo (masa 5,4 mg; R<sub>f</sub> 0,35), βG<sub>2.1.2</sub>, un líquido amarillo viscoso (masa 12,8 mg; R<sub>f</sub> 0,63) y βG<sub>2.1.3</sub>, un sólido marrón (masa 2,2 mg; R<sub>f</sub> 0,75) (Tabla 36). Todas las subfracciones mostraron ser solubles solamente en metanol, según la masa de las subfracciones obtenidas, se obtuvo un porcentaje de recuperación de 15,21%.

Al realizarle una CCF a cada una de las estas tres subfracciones, se pudo observar que solo βG<sub>2.1.2</sub> presentaba una mancha bien definida; mientras que las otras se mostraban como “estelas” largas, lo que indicaba que poseían más de un compuesto o eran unas mezclas complejas. Considerando lo anterior, se decidió realizar un análisis de los constituyentes de las subfracciones βG<sub>2.1.1</sub> y βG<sub>2.1.3</sub> mediante el uso de la cromatografía de gases con un detector de masas. A la subfracción βG<sub>2.1.2</sub> como mostraba ser un solo compuesto, se le realizó algunos experimentos de RMN para tratar de caracterizar la estructura de este compuesto.

Tabla 36. Subfracciones obtenidas de la CCFP de la subfracción βG<sub>2.1</sub>.

Subfracción	Masa (mg)	R <sub>f</sub>
βG <sub>2.1.1</sub>	5,4	0,35
βG <sub>2.1.2</sub>	12,8	0,63
βG <sub>2.1.3</sub>	2,2	0,75

El espectro RMN <sup>1</sup>H (Figuras 76 y 77) de la subfracción βG<sub>2.1.2</sub>, mostró a campo bajo en la región aromática, dos señales a δ<sub>H</sub> 7,52 y δ<sub>H</sub> 6,81; a campo alto exhibió 4 señales, una a δ<sub>H</sub> 3,25 asignable a hidrógenos metílicos de un grupo éster (CH<sub>3</sub>O-CO), dos singletes a δ<sub>H</sub> 3,19 y δ<sub>H</sub> 3,17 que corresponden a hidrógenos

metilénicos vecinos a grupo éster (RO-CO-CH<sub>2</sub>), y un singlete a  $\delta_H$  2,65 asignados a hidrógenos metílicos de un grupo acetato (CH<sub>3</sub>-CO<sub>2</sub>) (Tabla 37).

El espectro de RMN <sup>13</sup>C (Figuras 78 y 79) mostró a campo bajo, dos picos a  $\delta_C$  172,21 y  $\delta_C$  171,51 asignados a carbonos carboxílicos con diferente entorno químico (RO-CO-R); en la región aromática se destacan cuatro señales, una a  $\delta_C$  151,54 correspondiente a carbonos aromáticos metínicos vecinos a un átomo de nitrógeno, una señal a  $\delta_C$  142,10 asignada a carbonos cuaternarios, y otra a  $\delta_C$  121,10 correspondiente a carbonos metínicos del núcleo aromático. A campo alto, se observan tres señales: una a  $\delta_C$  71,40 correspondiente a carbonos metilénicos enlazados a un átomo de oxígeno (CH<sub>2</sub>-O), otra a  $\delta_C$  50,29 asignada a carbonos metílicos enlazados a un átomo de un sistema carboxílico (CH<sub>3</sub>-O-CO-R), y a  $\delta_C$  44,68 un desplazamiento asignado a carbonos metilénicos vecinos a un grupo carbonilo (CH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>R) (Tabla 38).

Tabla 37. Asignación de desplazamientos químicos ( $\delta_H$ ) de algunas señales de RMN <sup>1</sup>H de la subfracción  $\beta G_{2.1.2}$ .

Nº de señales	Multiplicidad	$\delta_H$ (ppm)	Asignación
1	singlete (s)	7,52	Aromatico
2	singlete (s)	6,81	Aromatico
3	singlete (s)	3,25	CH <sub>3</sub> O-CO
4	singlete (s)	3,19	RO-CO-CH <sub>2</sub> -R
5	singlete (s)	3,17	
6	singlete (s)	2,65	CH <sub>3</sub> -CO <sub>2</sub>

<sup>a</sup>: Datos obtenidos a 400 MHz en CD<sub>3</sub>OD.

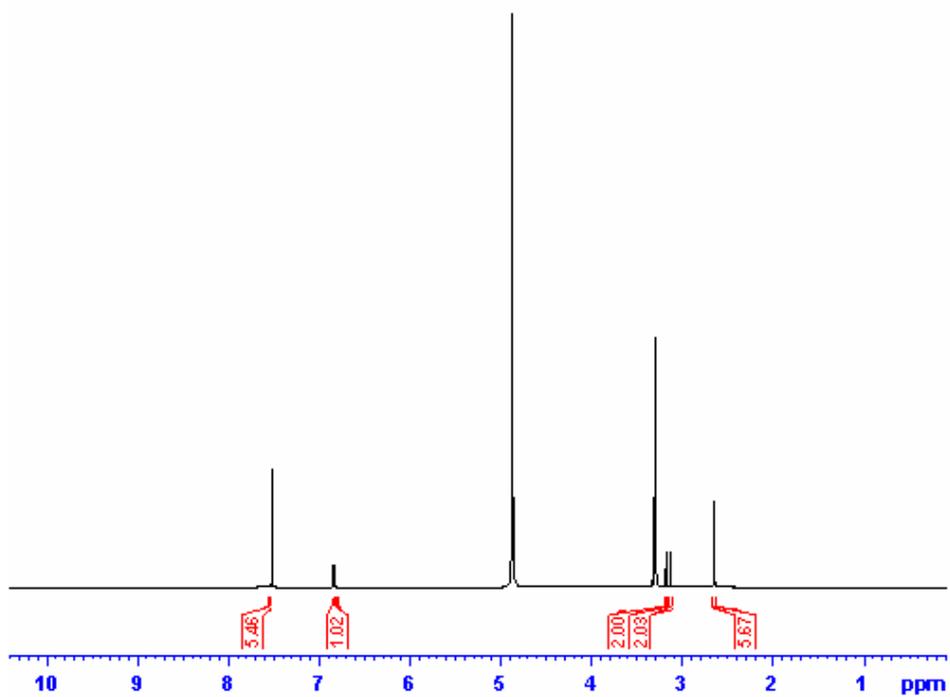


Figura 76. Espectro RMN  $^1\text{H}$  de la subfracción  $\beta\text{G}_{2.1.2}$ .

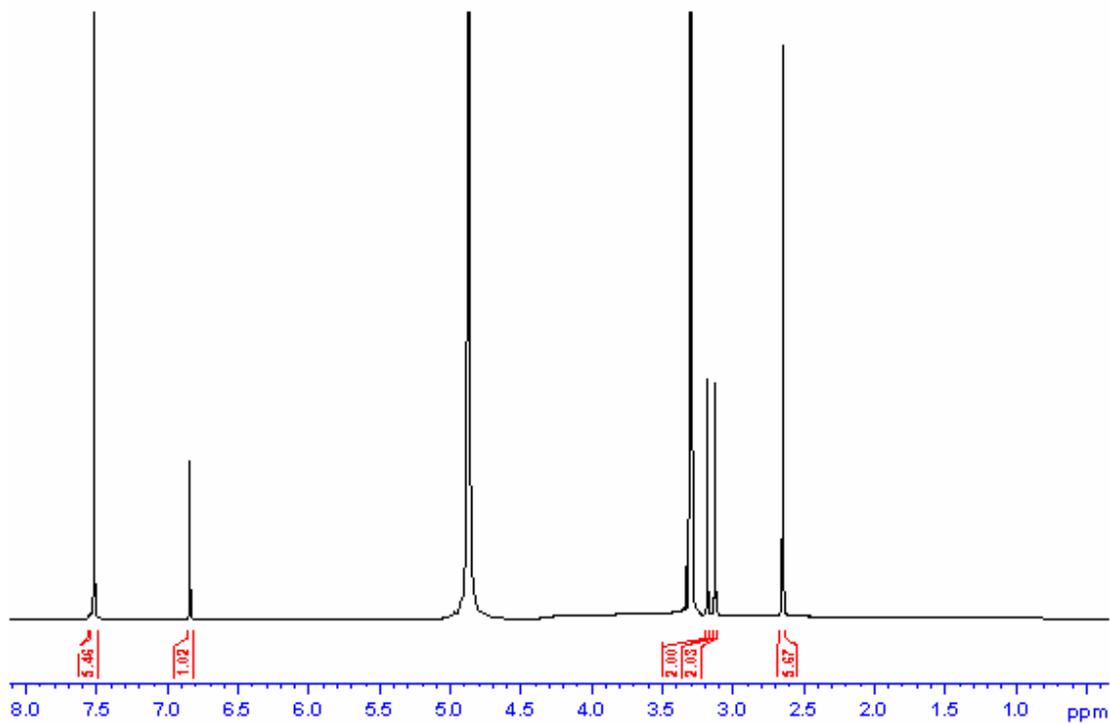


Figura 77. Ampliación del espectro RMN  $^1\text{H}$  de la subfracción  $\beta\text{G}_{2.1.2}$ .

Tabla 38. Asignación de desplazamientos químicos ( $\delta_c$ ) de algunas señales de RMN  $^{13}\text{C}$  de la subfracción  $\beta\text{G}_{2.1.2}$ .

Nº de señales	$\delta_c$ (ppm)	Asignación
1	44,68	$\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-CO}_2\text{R}$
2	50,29	$\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{-O-CO-R}$
3	71,40	$\text{O-}\underline{\text{C}}\text{H}_2$
4	120,10	Aromático
5	142,10	Aromático
6	151,52	Aromático
7	171,51	$\text{R-O-}\underline{\text{C}}\text{O-R}$
8	172,53	

<sup>a</sup>: Datos obtenidos a 100 MHz en  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

Posiblemente, existan más señales para este compuesto en el RMN  $^{13}\text{C}$ , pero fueron solapadas con las del solvente. Tomando en cuenta la información obtenida de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , no se puede asegurar una estructura definitiva y concluyente. A través de la interpretación de dichos espectros y por comparación con el modelado RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de algunas estructuras usando el programa Predictor ChemBioDraw Ultra 2008, se puede decir que es un compuesto aromático con núcleo de la piridina, con grupos carboxílicos como sustituyentes, proponiéndose como estructura probable la mostrada en la figura 80.

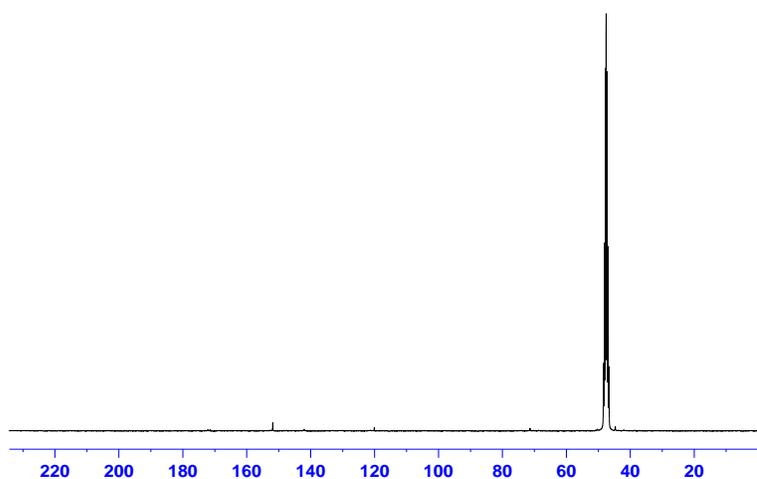


Figura 78. Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  de la subfracción  $\beta\text{G}_{2.1.2}$ .

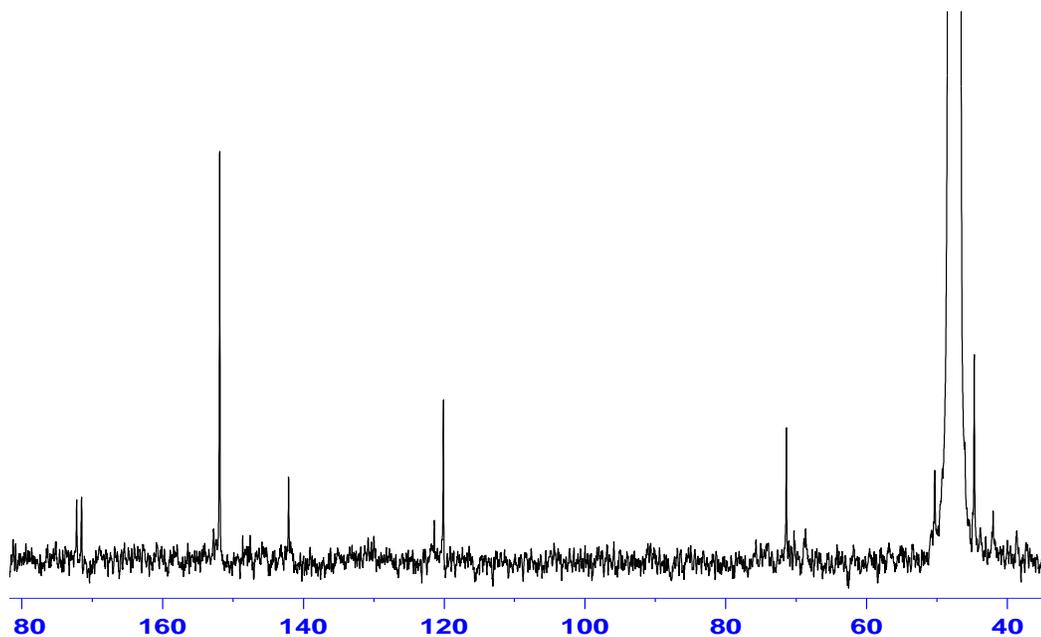


Figura 79. Ampliación del espectro RMN  $^{13}\text{C}$  de la subfracción  $\beta\text{G}_{2.1.2}$ .

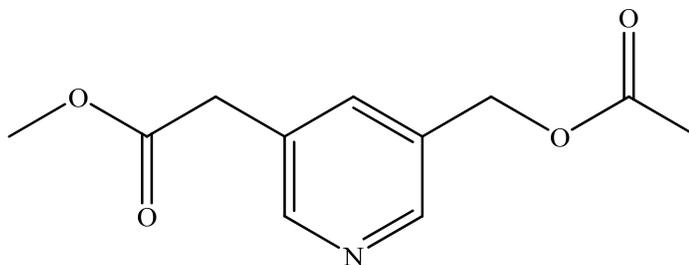


Figura 80. Posible núcleo estructural del compuesto de la subfracción  $\beta\text{G}_{2.1.2}$ .

#### d.4.1.2 Cromatografía de la subfracción $\beta\text{G}_{2.3}$

Esta subfracción se mostró como un sólido amarillo pálido, con masa igual a 30,4 mg que al ser disuelto en metanol y agregarle AcOEt se formaba un gel. Se procedió a separarlo por CCFP utilizando una placa vidrio de 20x20 cm<sup>2</sup> recubierta con sílica gel 10-40  $\mu\text{m}$  de 1 mm de espesor, y AcOEt como eluyente. Al revelarla, se evidenció la presencia de una mancha, se arrancó la franja obteniéndose la subfracción  $\beta\text{G}_{2.3.1}$  (sólido blanco de 6,6 mg y  $R_f = 0,45$ , soluble en metanol) con un porcentaje de recuperación del 21,71%. En vista de que la CCF de ésta presentó una mancha

definida, lo cual evidenciaba que era un solo compuesto, se decidió realizarle experimentos de RMN para identificar la estructura de este compuesto, cuyos resultados están a la espera para ser analizados.

#### d.4.1.3 Cromatografía de la subfracción $\beta_{G_{2.4}}$

Esta subfracción se presentó como un sólido amarillo (2,3 mg soluble en metanol), que al realizar el revelado de la CCF se observó que presentaba más de un compuesto con  $R_F$  cercanos; debido a su poca masa y considerando que esta subfracción provenía de la fracción con mayor actividad antibacteriana, se le realizó un estudio de los componentes por CG-EM, los cuales están a la espera para ser analizados.

### **d.5 Cromatografía de la subfracción $\beta_I$**

La actividad antibacteriana que presentó esta subfracción contra *Salmonella* sp. con llevó a la separación de los componentes por CC, en una columna de 1 cm de diámetro y 32 cm de alto; para ello se empleó una relación 1:30, utilizándose 300 mg de la fracción y 9,3526 g de sílica gel 35-70 mesh. Se utilizaron mezclas de polaridad creciente de EP- $CHCl_3$ ,  $CHCl_3$ ,  $CHCl_3$  - AcOEt, AcOEt, AcOEt - MeOH, finalizándose con MeOH al 100%. Se obtuvieron 51 eluatos, los cuales fueron recogidos en fiolas de 50 ml contentivas de 25 ml cada una (Tabla 39), agrupándolos en 7 subfracciones sus  $R_f$ , revelándose luz UV y solución ácida de molibdato de amonio (Tabla 40). Se recuperó una masa total de 296,2 mg, que representa el 98,73% del material cromatografiado.

Tabla 39. Fraccionamiento cromatográfico de la subfracción  $\beta I$ .

Eluatos	Eluyentes	Porcentaje (%) V/V
1 – 2	EP – CHCl <sub>3</sub>	60-40
3 – 7	EP – CHCl <sub>3</sub>	40-60
8 – 11	CHCl <sub>3</sub>	100
12 – 16	CHCl <sub>3</sub> - AcOEt	60-40
17 – 22	CHCl <sub>3</sub> - AcOEt	40-60
23 – 28	AcOEt	100
29 – 33	AcOEt - MeOH	80-20
34 – 37	AcOEt - MeOH	60-40
38 – 41	AcOEt - MeOH	40-60
42 – 44	AcOEt - MeOH	20-80
45 – 51	MeOH	100

Tabla 40. Subfracciones obtenidas de la separación cromatográfica de la subfracción  $\beta I$ .

Subfracciones	Eluatos	Masa (mg)
$\beta I_1$	1 – 7	1,2
$\beta I_2$	8 – 15	3,0
$\beta I_3$	16 – 28	12,0
$\beta I_4$	29	90,0
$\beta I_5$	30 – 31	72,0
$\beta I_6$	32 – 50	102,0
$\beta I_7$	51	16,0

#### d.5.1 Cromatografía de la subfracciones $\beta I_4$ y $\beta I_6$

Las subfracciones  $\beta I_4$  y  $\beta I_6$ , se presentaron como sólidos amarillos de 90,00 y 120,00 mg respectivamente y como contenían mayor cantidad masa, se procedió a separar sus componentes. Al tratar de disolver a estas dos subfracciones, se obtenían precipitados marrones, por lo se procedió a la precipitación de éstos en metanol, los cuales fueron lavado varias veces con metanol, acetato de estilo, cloroformo y éter de petróleo, observándose que no se disolvían en ninguno de estos solventes.

Se obtuvieron dos subfracciones en ambos casos, una soluble en metanol y el precipitado, los cuales se denotaron como las subfracciones  $\beta I_{4.1}$  y  $\beta I_{6.1}$ , sólidos amarillos solubles en metanol con masas 30,7 y 20,9 mg respectivamente, y  $\beta I_{4.2}$  y  $\beta I_{6.2}$ , sólidos marrones insolubles con masas de 48,3 y 74,6 mg, respectivamente. Considerando que la subfracción  $\beta I_{4.1}$  tenía mayor masa y características similares a la  $\beta I_{6.1}$ , se procedió a realizar el análisis de los componentes solamente de ésta, por CG-EM, cuyos resultados aún están a la espera para ser analizados.

Tomando en cuenta las que subfracciones  $\beta I_{4.2}$  y  $\beta I_{6.2}$  eran insolubles en la mayoría de los solventes, solo se le realizó espectroscopia IR para observar algunos grupos funcionales en estas subfracciones. Los espectros IR de la subfracciones  $\beta I_{4.2}$  y  $\beta I_{6.2}$  (Figuras 82 y 83) mostraron: una banda ancha e intensa a  $3\ 389\text{ cm}^{-1}$  debida a la tensión del enlace oxígeno-hidrógeno (O-H), una absorción correspondiente al estiramiento del enlace carbono-hidrogeno (C-H) a  $2\ 926\text{ cm}^{-1}$ , otra absorción a  $2\ 853\text{ cm}^{-1}$  debida al estiramiento carbono-hidrógeno alifático, y otra banda correspondiente al estiramiento C=O de un carbonilo a  $1\ 658\text{ cm}^{-1}$ .

Tomando en cuenta las bandas observadas en el IR, la alta polaridad y su insolubilidad en la mayoría de los solventes, se puede decir que posiblemente estas subfracciones contienen compuestos naturales glicosídicos.

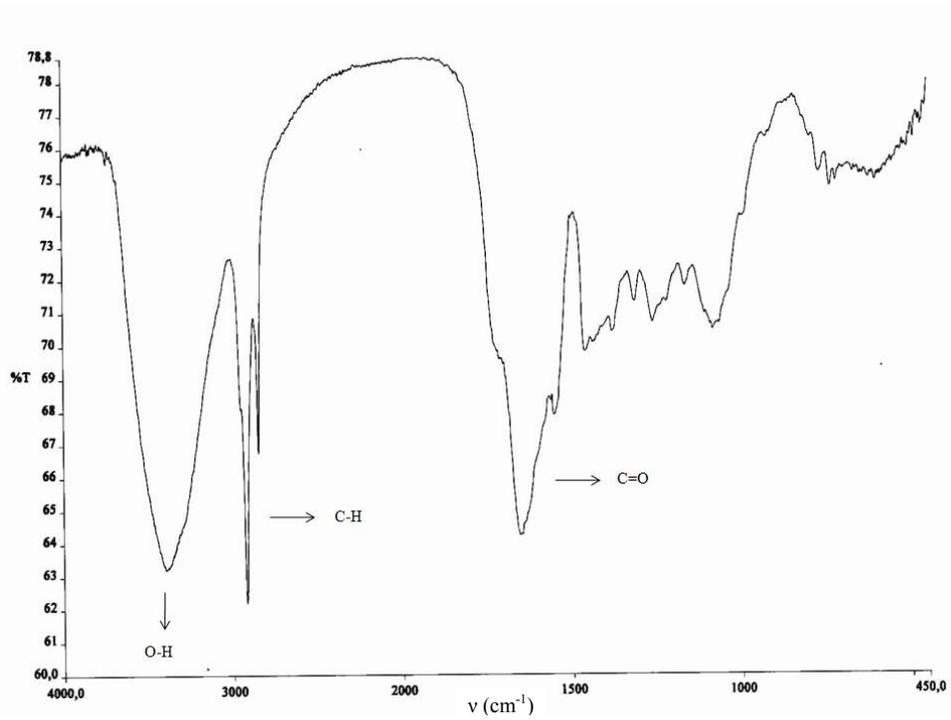


Figura 81. Espectro IR de la subfracción  $\beta I_{4.2}$ .

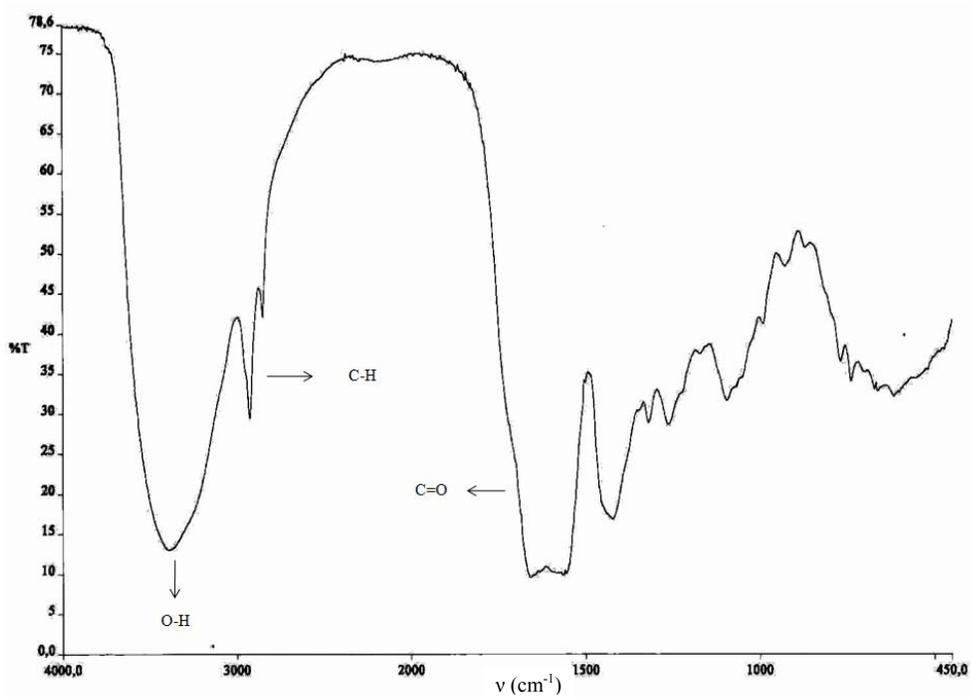


Figura 82. Espectro IR de la subfracción  $\beta I_{6.2}$ .

## CONCLUSIONES

El análisis químico preliminar realizado a las fracciones solubles en acetato de etilo de las esponjas marinas *Aplysina lacunosa*, *Aplysina fulva*, *Cliona varians*, *Cinachyrella kuekenthali*, *Aphimedon viridis* y *Aaptos pernucleata*, evidenció la presencia de varias familias de metabolitos secundarios, como esteroides, triterpenos, metilencetonas, taninos y alcaloides.

Las fracciones solubles en acetato de etilo de las esponjas *A. lacunosa*, *A. fulva* y *Aaptos pernucleata* presentaron actividad bactericida, entre fuerte y moderada, tanto para bacterias Gram (+) como Gram (-).

La FAE de la esponja *Aaptos pernucleata*, fue la única que presentó actividad leve frente a las cepas de hongos ensayadas, específicamente contra *Candida albicans*.

Las FAE de las esponjas *C. kuekenthali*, *Amphimedon viridis* y *Aaptos pernucleata*, presentaron las letalidades más significativas frente *A. salina*, con valores de CL<sub>50</sub> de 4,10; 1,13 y <0,01 µg/ml, respectivamente.

Mediante el análisis por CG-EM de la subfracción  $\alpha$ A, procedente de *Aaptos pernucleata*, se lograron identificar algunos constituyentes como los ésteres metílicos de los ácidos 12-metiltridecanoico, 14-metilhexadecanoico, 7,10-octadecadienoico y pentacosanoico, atribuyéndose la letalidad de esta subfracción a la mezcla de estos compuestos.

El análisis de los datos obtenidos por RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y DEPT de la subfracciones  $\alpha\text{C}_1$  y  $\alpha\text{E}_1$ , así como la comparación de los mismos con los datos teóricos del programa Predictor ChemBioDraw Ultra 2008, llevaron a proponer como estructuras de los compuestos aislados, a dos esteroisómeros del colestanol.

El estudio por CG-EM de la subfracción  $\alpha\text{D}_2$ , procedente de *Aptos pernucleata*, evidenció la presencia de una mezcla de esteroides, de los cuales se lograron identificar algunos constituyentes como colesterol, colestanol, ergost-22-en-3-ol y ergostanol.

El análisis sistemático realizado con los datos de IR, RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  1D y 2D, y DEPT-135, de la subfracción  $\alpha\text{D}_3$  procedente de *Aptos pernucleata*, llevó a proponer como posible estructura del compuesto aislado en esta subfracción, a un derivado del colestanol con un metilo adicional en el  $\text{C}_9$ .

El análisis realizado por IR, RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y DEPT-135 de la subfracción  $\beta\text{B}_{2,1}$  proveniente de *A. lacunosa*, y los datos teóricos del programa Predictor ChemBioDraw Ultra 2008, permitieron proponer como posible núcleo estructural del compuesto aislado, un derivado triterpenoidal con esqueleto lupano, con 32 átomos de carbono, un grupo hidroxilo, un doble enlace y ocho carbonos metílicos.

La subfracción  $\beta\text{G}_{2,1,2}$  se caracterizó empleando RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , así como comparación con datos teóricos del programa Predictor ChemBioDraw Ultra 2008; proponiéndose el núcleo estructural de la piridina con dos grupos ésteres como sustituyentes.

El análisis de las bandas observadas en los espectros IR de la subfracciones  $\beta\text{I}_{4,2}$  y  $\beta\text{I}_{6,2}$ , además de su polaridad y solubilidad en agua, permitieron inferir, que los constituyentes mayoritarios de éstas, son compuestos glicosídicos.

## ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etilo
CC	Cromatografía de columna
CCF	Cromatografía de capa fina
CCFP	Cromatografía de capa fina preparativa
CG-EM	Cromatografía de gases acoplado a un detector de masas
CL <sub>50</sub>	Concentración letal media
DETP	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
EP	Éter de petróleo
FAE	Fracción soluble en acetato de etilo
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
RMN <sup>13</sup> C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono
RMN <sup>1</sup> H	Resonancia Magnética Nuclear de Protón
ROESY	Rotating Frame Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
TR	Tiempo de retención

## BIBLIOGRAFÍA

1. Gros, E.; Pomilio, A.; Seldes, A. y Burton, G. 1985. Introducción al estudio de los productos naturales. Monografía N° 30. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. Programa Regional de Desarrollo Científico y tecnológico. Washington, D.C.
2. Marcano, D. y Hasegawa, M. 2002. *Fitoquímica Orgánica*. Segunda edición. Litopar. Universidad Central de Venezuela. Caracas.
3. Luckner, M. 1984. *Secondary Metabolism in Microorganisms, Plants, and Animals*. Springer-Verlag. Nueva York.
4. Garateix, A.; García, T.; Salceda, E. y Soto, E. 2003. Compuestos de origen marino como instrumentos para el estudio del sistema nervioso. *Revista de Ecología, Oceanología, y Biodiversidad Tropical*, 1: 23-26.
5. De Lara, G. 1992. Toxic properties of some marine algae. *Rev. Soc. Mex. Hist. Nat.*, 43: 81-85.
6. Garateix, A. 2005. El mar: fuente de nuevos fármacos. *Elementos*, 58 (12): 39-47.
7. D' Armas, H.; Bermúdez, D. y Caserta, A. 2004. Bioactividad de algunos octocorales de aguas venezolanas. *Saber*, 16 (2): 19-25.
8. Faulkner, D. 1995. Chemical riches from the ocean. *Chem. Brit.*, Págs. 680-684.
9. Hernández, M. y Hernández, M. 2005. Bioactivos marinos en Venezuela: una revisión. *Saber*, 17 (5): 3-9.
10. Montes, B. y Lener, C. 2003. *Esponjas marinas*. Segunda edición. USEB. Brasil.
11. Alcolado, P. 1986. *Las esponjas*. Editorial científico técnico. Cuba.

12. Erpenbeck, D. y Van Soest, R. 2006. Status and Perspective of Sponge Chemosystematics. *Marine Biotechnology*, 1:1-18.
13. Valle, H. y Santafé, G. 2009. Esteroles libres de la esponja marina *Mycale laevis*. *Revista de la facultad de química farmacéutica. Universidad de Antioquia*, 16 (1):103-109.
14. Habsah, M.; Zalilawati, M.; Khozirah, S.; Jalifah, L.; Nordin, L. y Abd, M. 2009. Antibacterial and DPPH Free Radical-Scavenging Activities of Methanolic Extracts of *Aaptos* sp. (Marine Sponges). *J. Trop. Agric. Sci.*, 32 (1): 43–50.
15. Santafé, G.; Montaña, M.; Sánchez, E. y Torres, O. 2007. Estudio químico y de actividad bactericida de las fracciones esterólicas de las esponjas *Suberites aurantiaca* y *Amorphinopsis* sp recolectadas en la bahía de Cispatá en Córdoba. *Revista Electrónica Hominis*, 1: 26- 30.
16. West, R. y Cardellina, J. 1988. Isolation and identification of eight new polyhydroxylated sterols form the sponge *Dysidea etheria*. *J. Org.Chem.*, 53 (12): 2783-2287.
17. Gross, H. y Proksch, P. 1997. Wound activation of protoxins in marine sponge *Aplysina aerophoba*. *Journal of Chemical ecology*, 23 (5): 1451-1463.
18. Acosta, A. y Rodríguez, A. 1992. 11-oxo-aerothionin: A cytotoxic antitumor bromotirosine-derived alkaloid from the caribbean marine sponge *Aplysina lacunosa*. *J. Nat. Prod.*, 55: 1007-1012.
19. Kazanjian, A. y Fariñas, M. 2006. Actividades biológicas del extracto acuoso de la esponja *Aplysina lacunosa* (Porifera: Aplysinidae). *Revista de Biología Tropical*, 54: 189-200.
20. Nuñez, C. y De Almeida, E. 2008. Chemical variability within the marine sponge *Aplysina fulva*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 36: 283-296.
21. Moura, R. 2006. CvL, a lectin from the marine sponge *Cliona varians*: Isolation, characterization and its effects on pathogenic bacteria and *Leishmania promastigotes*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 145: 517–523.

22. Santafe, G. 2005. Estudio químico de organismos marinos con potencialidad farmacológica, presentes en aguas del Caribe colombiano. *Revista de Biología Tropical*, 37: 98-110.
23. Herlta, A.; Mandera, L.; Rombangb, W.; Rumampukb, R.; Soemitroc, S.; Steglichd, W.; Tariganc, P. y Nussbaum, F. 2004. Alkaloids from marine organisms. Part 8: Isolation of bisdemethylaaptamine and bisdemethylaaptamine-9-*O*-sulfate from an Indonesian *Aptos* sp. marine sponge. *Tetrahedron*, 60 (29): 6101-6104.
24. Khozirah, S.; Kee, C.; Zalilawati, R.; Tan, J.; Faridah, A.; Salahudin, R.; Zurina, Z.; Nordin, L.; Habsah, M. y Abdu, A. 2009. Cytotoxic Aaptamines from Malaysian *Aptos aptos*. *Mar. Drugs*, 7: 1-8.
25. Shimogawa, H. y Kuribayashi, S. 2006. Cinachyramine, the novel alkaloid possessing a hydrazone and two aminals from *Cinachyrella* sp. *Tetrahedron Letters*, 47: 1409-1411.
26. Barnathana, G. y Genina, E. 2003. Phospholipid fatty acids and sterols of two *Cinachyrella* sponges from the Saudi Arabian Red Sea: comparison with *Cinachyrella* species from other origins. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 135: 297-308.
27. Henríquez, W.; Sevcikb, C.; D'Suzeb, G.; Visbalc, G. y Christophersend, C. 2009. Un nuevo aminoácido, 2-*N*-acetilglucosamina- $\alpha$ -*o*-threonina (2-*N*-AcNGlc- $\alpha$ -*O*-Thr), aislado de la esponja marina *Cinachyrella kuekentali* (ULICZKA, 1929). *Libro de resúmenes de la Asociación Venezolana de Química*.
28. Tsuda, M. y Hirano, K. 1999. Pyridemin A, a cytotoxic pyridine alkaloid with an isoxazolidine moiety from sponge *Amphimedon* sp. *Tetrahedron Letters*, 40: 4819-4820.
29. Hernández, W.; Crescente, O. y López, I. 1997. Evolución de la actividad antibacteriana fototóxica y tóxica del extracto metanólico de la esponja marina *Amphimedon viridis*. *Acta científica venezolana*, 48 (1): 341.
30. Domínguez, X. 1973. *Métodos de Investigación Fitoquímica*. Editorial Limusa. México.

31. Bauer, A.; Kirby, A.; Sherris, J. y Turk. M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45(4): 493-496.
32. Monks, N.; Lerner, A.; Henriques, F.; Farias, E.; Schapoval, E.; Suyenaga, A.; Da Rocha, G.; Schwartzmann, A. y Mothes, B. 2002. Anticancer, antichemotactic and antimicrobial activities of marine sponges collected off the coast of Santa Catarina, southern Brazil. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 281: 1-12.
33. Madubunyi, I. 1995. Antimicrobial activities of the constituents of *Garcinia kola* seeds. *Intern. J. Pharm.*, 33 (3): 232-237.
34. Stephan, C. 1977. Methods for calculating in LC<sub>50</sub>. En: *American Society for Testing and Material (ASTM) aquatic toxicology and hazard evaluation*. F.L. Mayer y J. Hamelink (eds), Philadelphia, Pennsylvania.
35. Meyer, B.; Ferrigni, N.; Putnam, J.; Jacobsen, L.; Nicols, D. y McLaughlin, J. 1982. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*, 45 (1): 31-34.
36. Duque, C.; Martínez, A. y Pe Auala, G. 1983. Esteroles en esponjas marinas. *Revista Colombiana de Química*, 12 (1):51-68.
37. Pereira, F.; Márquez, S.; Nascimento, A.; Gandolfi, R.; Hajdu, E.; Peixinho, S.; Custódio, M. y Berlinck, R. 2006. Metabólitos derivados da dibromotirosina das esponjas *Aplysina fulva*, *A. conulosa* (sp. n.) e *A. fistularis*. *Libro de resumen de la Sociedad Brasileira de Química*.
38. Silvestri, J; Zea, S. y Duque, C. 1994. Actividad antibacteriana de algunas esponjas del Caribe colombiano. *Revista colombiana químico-farmacéutica*, 1 (4):21-26.
39. Hernandez, Y. 2004. Estudio químico y actividad biológica de la esponjas *Cinachyrella kuekenthali* (Ulieszka, 1929). Trabajo de grado. Departamento de Química. Universidad de Oriente. Cumaná.

40. Galeno, P.; Torres, O.; Zuluoga, J.; Angulo, A. y Santafe, G. 2007. Obtención de sustancias antimicrobianas de esponjas marinas de la bahía de Cispata. *Scientia et Technica*, 13(33):221-224.
41. Stainer, R.; Ingrahan, J. y Adelberg, E. 1984. *Microbiología*. Reverte. Barcelona, España.
42. Sepcic, K.; Batista, U.; Vacelet, J.; Macek, P. y Turk, T. 1997. Biological activities of aqueous extracts from marine sponges and cytotoxic effects of 3-Alkylpyridinium polymers from *Reniera sarai*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 117: 47-53.
43. Mora, J.; Newmark, F.; Santos, M. y Sánchez, J. 2008. Evaluación de extractos de esponjas marinas como nuevas fuentes de sustancias antimicrobianas. *Rev. Esp. Quimioter.*, 21 (3):174-179.
44. Paul, V. 1992. *Ecological Roles of marine natural products*. Comstock Publishing Associates. London.
45. Poulton, G. y Spino, J. 1999. *Natural products chemistry*. University of Victoria. Canadá.
46. Green, G.; Schulte, S.; Jhu, M.; Wrigth, G.; Bakus, B. y Gómez, P. 1990. Antibiosis and antifouling in marine sponges: laboratory versus field studies. En: *New perspectives in sponge biology. Proc. Third Internat. Sponge Conf.* Ruetzler, K. (Ed.).Massachusetts. Págs 102-108.
47. Becerro, M.; Turon, X. y Uriz, M.1997. Multiple functions for secondary metabolites in encrusting marine invertebrates. *J. Chem. Ecol.*, 23:1527-1547.
48. Pérez, O. y Lazo, F. 2010. Ensayo de *Artemia*: útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. *Rev. Protección Veg.*, 22 (1):34-43.
49. Lanza, V. 1998. Determinación de la actividad biológica de la esponja marina *Aplysina fistularis*. Trabajo de grado. Departamento de Biología. Universidad de Oriente. Cumaná.

50. Laport, M.; Santos O. y Muricy, G. 2009. Marine sponges: Potential sources of new antimicrobial drugs. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 10: 86-105.
51. Castellanos, L. y Duque, C. 2008. Composición química y actividad *antifouling* de la fracción lipídica de la esponja marina *Cliona tenuis* (Clionidae). *Rev. Colomb. Quím.*, 37 (3): 259-274.
52. Habsah, M.; Zalilawati, M.; Khozirah, S.; Jalifah, L.; Nordin, L. y Abd, M. 2009. Antibacterial and DPPH Free Radical-Scavenging Activities of Methanolic Extracts of *Aaptos* sp. (Marine Sponges). *J. Trop. Agric. Sci.*, 32(1): 43–50.
53. Valle, H. y Santafé G. 2009. Esteroles libres de la esponja marina *Mycale laevis*. *Revista de la facultad de química farmacéutica. Universidad de Antioquia*, 16 (1):103-109.
54. Brito, L.; Andrade, J.; Charzeddin, L y Fariñas, M. 2001. Toxicidad aguda del extracto metanólico de la esponja marina *Pseudoaxinella* sp. *Libro de resumen del IX Congreso Latinoamericano sobre Ciencias del Mar*.
55. Poralla, K.1999. *Comprehensive Natural Products*. Pergamon. New York.

## **HOJA DE METADATOS**

## Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/5

<b>Título</b>	ESTUDIO QUÍMICO Y BIOACTIVIDAD DE LAS ESPONJAS MARINAS (PORIFERA: DEMOSPONGIAE) MÁS COMUNES DE ISLA LARGA Y MANGLE QUEMAO, BAHÍA DE MOCHIMA. ESTADO SUCRE, VENEZUELA
<b>Subtítulo</b>	

### Autor(es)

<b>Apellidos y Nombres</b>	<b>Código CVLAC / e-mail</b>	
RAÚL DEL VALLE CEDEÑO RAMOS	<b>CVLAC</b>	
	<b>e-mail</b>	
	<b>e-mail</b>	
	<b>CVLAC</b>	
	<b>e-mail</b>	
	<b>e-mail</b>	

### Palabras o frases claves:

Bioactividad
Esponjas marinas
Productos naturales

## Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/5

### Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias	Química de los Productos Naturales

### Resumen (abstract):

La evaluación química preliminar y el estudio de las propiedades antibacterianas, antifúngicas y letales de las fracciones solubles en acetato de etilo de las esponjas *Aplysina lacunosa*, *A. fulva*, *Cliona varians*, *Cinachyrella kuekenthali*, *Amphimedon viridis* y *Aaptos pernucleata*, recolectadas en la Bahía de Mochima, estado Sucre, evidenciaron la posible presencia alcaloides, esteroides, triterpenos, metilcetonas y taninos con potencial actividad biológica. Las fracciones solubles en acetato de etilo de las esponjas *Aaptos pernucleata*, *A. fulva* y *A. lacunosa*, fueron las únicas que mostraron actividad antibacteriana en contra de *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli*, siendo *A. lacunosa* la que presentó los mayores halos de inhibición. La actividad antifúngica no fue significativa, solo la esponja *Aaptos pernucleata* presentó actividad leve contra *Candida albicans*. La actividad letal en *Artemia salina*, con mayor importancia la mostraron las esponjas *C. kuekenthali*, *Amphimedon viridis* y *Aaptos pernucleata*, con valores de  $CL_{50}$  de 4,10; 1,13 y  $<0,01$   $\mu\text{g/ml}$  respectivamente. Los resultados del estudio de la letalidad de las subfracciones  $\alpha\text{A}$ ,  $\alpha\text{E}$ ,  $\alpha\text{F}$  y  $\alpha\text{I}$ , obtenidas mediante el fraccionamiento cromatográfico convencional, provenientes de la esponja *Aaptos pernucleata* demostraron la presencia de varios compuestos con potencial letal en esta esponja; lográndose identificar mediante CG-EM algunos constituyentes, como los ésteres metílicos de los ácidos 12-metiltridecanoico, 14-metilhexadecanoico, 7,10-octadecadienoico y pentacosanoico, y los esteroides: colesterol, colestanol, ergost-22-en-3-ol, y ergostanol. También, se logró aislar y caracterizar por RMN, dos esteroisómeros del colestanol, y un análogo 9-metil del colestanol. La actividad antibacteriana mostrada por las subfracciones del  $\beta\text{E}$ ,  $\beta\text{G}$ ,  $\beta\text{I}$ , y  $\beta\text{L}$ , provenientes de la esponja *A. lacunosa*, contra las bacterias *S. aureus*, *Salmonella* sp, *L. monocytogenes* y *E. coli*, evidenció la presencia de metabolitos con potencial actividad bactericida; lográndose aislar un constituyente alcaloidal con núcleo piridínico y dos grupos ésteres como sustituyentes. Además, de la subfracción  $\beta\text{B}$  se aisló un triterpeno pentacíclico  $\text{C}_{32}$ , derivado del lupano. Considerando los resultados obtenidos, se puede inferir que los metabolitos identificados en las especies *A. lacunosa* y *Aaptos pernucleata*, posiblemente son los causantes de la bioactividad observada.

## Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/5

### Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Haydelba D'Armas, Ph.D.	<b>ROL</b>	CA <input type="checkbox"/> AS <input checked="" type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	<b>CVLAC</b>	4297804
	<b>e-mail</b>	haydelba@yahoo.com
María Amaro, M.Sc.	<b>ROL</b>	CA <input type="checkbox"/> AS <input checked="" type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	<b>CVLAC</b>	8438864
	<b>e-mail</b>	meamaro_2000@yahoo.com
Hernando Herrera, M.Sc.	<b>ROL</b>	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	<b>CVLAC</b>	5872352
	<b>e-mail</b>	herreram40@hotmail.com
Yvanovis Dasilva, M.Sc.	<b>ROL</b>	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	<b>CVLAC</b>	12660605
	<b>e-mail</b>	yndasilva@yahoo.es

Fecha de discusión y aprobación:

Año      Mes      Día

2010	11	30
------	----	----

Lenguaje: Spa

## Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/5

### Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
Tesis – cedenor.doc	Application/Word

### Alcance:

**Espacial :**      Internacional      (Opcional)

\_\_\_\_\_

**Temporal:**      Temporal      (Opcional)

\_\_\_\_\_

### Título o Grado asociado con el trabajo:

Licenciado en Química

\_\_\_\_\_

**Nivel Asociado con el Trabajo:** Licenciado

\_\_\_\_\_

### Área de Estudio:

Química

\_\_\_\_\_

Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado:

UNIVERSIDAD DE ORIENTE

\_\_\_\_\_

**Derechos:**

**Los resultados de este trabajo de grado no han sido publicados sólo se otorga el derecho de ver el resumen.**

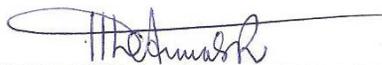
---

---

---



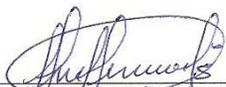
Raúl Del valle Cedeño Ramos



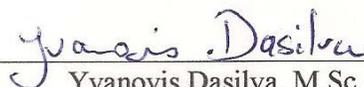
Haydelba D' Armas, Ph.D.



María Amaro, M.Sc.



Hernando Herrera, M.Sc.



Yvanovis Dasilva, M.Sc.

**POR LA SUBCOMISIÓN DE TESIS:**

