



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

“AISLAMIENTO Y DETERMINACION DE LA ESTRUCTURA DE UN
METABOLITO SECUNDARIO CON ACTIVIDAD ANTIBACTERIAL
DE LA ESPONJA MARINA *APLYSINA sp.*”



TESIS
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
OCEANOLOGO
PRESENTA
JUAN JOSE ARRIETA GUZMAN

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA

NOVIEMBRE 1990

ABSTRACT

The marine sponge *Aplysina sp.* was collected in Big Pine Key, Florida, situated in 24°30'N and 91°30'W, in the summer of 1987, and was stored in methanol for 3 months. The marine sponge was soaked in methanol, the solvent was filtrated, and the sponge was sonicated in methanol (2x500 ml.) for 30 min. Both extracts were combined and the solvent was evaporated. The aqueous suspension was diluted with an equal volume of water and extracted sequentially with hexane, dichloromethane, ethyl acetate and methanol. The 4 extracts were dried over sodium sulfate, weighed, screened for antimicrobial activity. The active CH₂Cl₂ and EtOAc extracts were purified by chromatography on silica gel and Sephadex. The pure compound isolated was analyzed by a combination of advanced spectral techniques: Nuclear ¹H Magnetic Resonance spectroscopy, Nuclear Overhauser Enhancement (NOE), ¹³C Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy, and Infrared spectroscopy (IR). Analysis of the spectral data indicated that the compound was 1-acetamido-[3,5-dibromo-1-hydroxy-4,4-dimethoxy cyclohexa-2,5-dione] (C₁₀H₁₃NO₄Br₂). This compound is probably formed from the addition of methanol the extraction solvent, to an unstable arene oxide present in the sponge.

RESUMEN

La esponja marina *Aplysina sp.* fué colectada en Big Pine Key, Florida, situada a 24°30' latitud Norte y 81°30' longitud Oeste, en el Verano de 1987, y almacenada en metanol por 3 meses. El disolvente fué filtrado y la esponja se sometió a ultrasonido en metanol (2x500 mL.) por 30 min. Ambos extractos se combinaron y el disolvente fué eliminado mediante destilación a presión reducida. A la restante suspensión acuosa se le adicionó agua desionizada hasta duplicar su volumen. La fase acuosa se extrajo con disolventes orgánicos, el mecanismo utilizado fué incremento de gradiente de polaridad comenzando con hexano, dicloro-metano, acetato de etilo y metanol. Los cuatro extractos fueron secados con sulfato de sodio y se sometieron a ensayo biológico, se pesaron y se les corrieron espectros de Resonancia Magnética Nuclear Protónica (RMNP). Los extractos activos dicloro-metano y acetato de etilo (CH_2Cl_2 , EtOAc), fueron purificados por cromatografía en columna de gel de sílice y Sephadex.

El compuesto analizado por combinación de los siguientes métodos espectrales: Resonancia Magnética Nuclear Protónica (RMNP), Nuclear Overhauser Enhancement (NOE), Resonancia Magnética Nuclear de Carbono (RMNC¹³), Espectro de Infrarrojo (IR). con fórmula molecular de $C_{10}H_{13}NO_4Br_2$ y de nombre 3,5 dibromo-1-hidroxi-4-dimetoxi-ciclohexadienoacetamida, es inactivo y tiene como precursor a un óxido aromático siendo un metabolito secundario con actividad biológica 'in vivo'.

AI SLAMI ENTO Y DETERMINACION DE LA ESTRUCTURA DE UN
METABOLITO SECUNDARIO CON ACTIVIDAD ANTIBACTERIAL DE LA
ESPONJA MARINA *APLYSINA sp.*

TESIS QUE PRESENTA

JUAN JOSE ARRIETA GUZMAN


APROBADA POR:



Quim. Irma E. Soria Mercado
PRESIDENTE




Oc. Juan A. Fernández Apango.
Sinodal Propietario



Oc. Cuitlahuac Cedillo Acosta
Sinodal Propietario



Oc. Adan Castillo Garcia
Sinodal Suplente



Biol. Mary Kay Harper
Sinodal Suplente



Dr. D. John Faulkner
Sinodal Invitado

Ensenada, Baja California

Octubre de 1990.

ACKNOWLEDGEMENTS

Special thanks professor William H. Fenical for his help in accepted me in his group.

I Thank Diana for her assistace with the technical work in this experiment, and Mary Kay Harper for assistance with the biossays and critical review of the manuscript.

I thank Marine Chemistry Group, Scripps Institution of Oceanography; La Jolla, California 92093, USA.

I thank Professor D.John Faulkner for let me work in his group, and all his assistance with field work.

The research of this thesis was supported by C.Lic. Jost Arrieta.

A MIS PADRES:

C.LIC. JOSE ARRIETA BELTRAN

CATALINA GUZMAN SOTO

POR TODO SU APOYO DURANTE EL TRANCURSO DE MIS ESTUDIOS Y
GRACIAS A ELLOS SE PUDO REALIZAR ESTA TESIS.

A MIS HERMANOS:

ROSA MARIA, MARIA, BERNARDO Y MARGARITA POR CRECER JUNTO A
MI.

A MIS TIOS:

GUILLERMO Y GUILLERMINA. QUIENES FUERON COMO MIS PADRES A LO
LARGO DE TODA LA LICENCIATURA.

A LA FAMILIA VARGAS CASTILLO POR SUS CONSEJOS Y AYUDA.

A MIS SOBRINOS: NEISI, MEMO Y ARMY POR VIVIR BUENOS MOMENTOS
JUNTOS.

A MIS MASCOTAS: 'TOOTSIE' Y 'VODKA'.

A TODOS MIS COMPANEROS DE LA GENERACION XXIII, EN ESPECIAL A
LOS KRISPIROUS CON LOS QUE CONVIVI 5 SEMESTRES MUY BUENOS Y
A LOS DEL AREA DE QUIMICA.

AL CUERPO DE SALVAVIDAS Y RESCATE DE ENSENADA. EN ESPECIAL
AL QUE BRINDO SERVICIO DURANTE EL VERANO DE 1990 POR SER
GRANDES COMPANEROS Y AMIGOS DE TRABAJO.

A MIS AMIGOS: DC. RAFAEL GARCIA DE QUEVEDO MACHAIN, DC.
MINERVA ALONSO, LIC. MARCO CEBALLOS, C.de P. JUAN CARLOS
ARROY FLORES, PO. JORDY VON SON, PO. GILVERTO REYES, PO.
JAVIER BECERRA, DC. JAVIER BECERRA, SR. MARCO GONZALES, SR.
OCTAVIO DURAN, SR. EMERICK SZOKE, DRA. SONIA DE SZOKE, SR.
PAPD ANAYA, SR. POLD ANAYA, CON QUIENES PASE MOMENTOS MUY
ALEGRES EN TODO ESTE TIEMPO DE ESTANCIA EN ENSENADA.

AGRADECIMIENTOS

ESPECIAL AGREDECIMIENTO A LA FAMILIA VALENZUELA CASTILLO POR TODA SU AYUDA A LO LARGO DE MI ESTANCIA EN ENSENADA.

ESPECIAL AGRADECIMIENTO A MIS PRIMOS: ARMANDO VALENZUELA LIMON Y ALMA ROSA CASTILLO ARRIETA, POR TODA SU AYUDA Y BUENOS CONSEJOS.

A MIS PROFESORES DE LA FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS EN ESPECIAL A: DC. FRANCISCO ARANDA, DC. LUIS AMES, ING. ARMANDO RODRIGUEZ PINAL, QUIM. MONTIJO, QUIM. SUAREZ ISLAS, QFB. EDUARDO DURAZO, QUIM. IRMA SORIA, QFB. GRACIELA GUERRA, DC. ROBERTO CALDERON, MC. EDUARDO VENEGAS, DC. ALFREDO SALAS, MC. RICARDO SEARCY Y A TODOS AQUELLOS QUE COLABORARON CON SUS ENSEÑANZAS A LO LARGO DE MI CARRERA.

MUCHAS GRACIAS ING. VERONICA RICALDE POR TODA SU AYUDA A LO LARGO DE MIS ESTUDIOS.

A LOS SINDDALES DE ESTA TESIS: DR. D. JOHN FAULKNER, BIOL. MARY KAY HARPER, QUIM. IRMA E. SORIA MERCADO, DC. CUITLAHUALT CEDILLO, DC. JUAN ANTONIO FERNANDEZ APANGO, DC. ADAN CASTILLO, QUE FUERON MUY AMABLES Y PACIENTES EN LA REVISION DE ESTA TESIS.

ESPECIAL AGRADECIMIENTO A MI AMIGO PEDRO POR SU GRAN AYUDA DURANTE LA ELABORACION DE ESTA TESIS YA QUE SIN EL NO SE UBIERA PODIDO IMPRIMIR.

A UN AMIGO MUY ESPECIAL: PD. ANTONIO FORTUNATO IBARRA PREISER CON EL QUE HE COMPARTIDO MUY BUENOS MOMENTOS A LO LARGO DE TODA MI CARRERA.

CONTENIDO

		Pagina.
1	INTRODUCCION	1
	Antecedentes.	8
	Objetivo.	14
2	MATERIALES Y METODOS	15
3	RESULTADOS.	21
4	DISCUSIONES	35
5	CONCLUSIONES	41
6	APENDICES	
	A1	42
	A2	44
7	REFERENCIAS	47

FIGURA	LISTA DE FIGURAS	PAGINA
1	DIFERENTES NIVELES DE ORGANIZACION EN LAS ESPONJAS MARINAS.	3
2-3	CELULAS GLOBULARES DE LAS ESPONJAS MARINAS.	6
4	METABOLITOS BROMADOS PRESENTES EN ESPONJAS MARINAS DEL ORDEN VERONGIDAE.	10
5	EXTRACCION DE <u>APLYSINA sp.</u>	17
6	ESTRUCTURA DEL COMPUESTO PURO DE LA ESPONJA MARINA <u>APLYSINA sp.</u> DE ACUERDO AL ESPECTRO DE RMNP.	26

TABLA	LISTA DE TABLAS	PAGINA
I	DIFERENTES METABOLITOS BROMADOS DEL ORDEN VERONGIDA.	9
II	ACTIVIDAD ANTIMICROBIAL DE LOS EXTRACTOS CRUDOS DE LA ESPONJA MARINA <u>Aplysina sp.</u>	22
III	ACTIVIDAD ANTIMICROBIAL DE EL EXTRACTO CRUDO DE DICLORO METANO.	22
IV	ACTIVIDAD ANTIMICROBIAL DE EL EXTRACTO CRUDO DE ACETATO DE ETILO.	22
V	DATOS DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR PROTONICA PARA EL METABOLITO SUCUNDARIO DE LA ESPONJA MARINA <u>Aplysina sp.</u>	26
VI	DATOS DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR PROTONICA . EXPERIMENTO NUCLEAR OVERHAUSER ENHANCEMENT (NOE) DE LA ESPONJA MARINA <u>Aplysina sp.</u>	28
VII	DATOS DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR DE CARBONO PARA EL METABOLITO SUCUNDARIO DE LA ESPONJA MARINA <u>Aplysina sp.</u>	28

LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA		PAGINA
1	BIOSINTESIS DEL METABOLITO SECUNDARIO DE LA ESPONJA MARINA <u>Aplysina sp.</u>	12

LISTA DE ESPECTROS

ESPECTRO		PAGINA
1	ESPECTRO DE INFRARROJO DEL COMPUESTO AISLADO DE LA ESPONJA MARINA <u>APLYSINA</u> <u>SP.</u>	24
2	ESPECTRO DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR PROTONICA DEL COMPUESTO AISLADO DE LA ESPONJA MARINA <u>APLYSINA</u> <u>SP.</u>	25
3	ESPECTRO DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR PROTONICA NOE DEL COMPUESTO AISLADO DE LA ESPONJA MARINA <u>APLYSINA</u> <u>SP.</u>	29
4	ESPECTRO DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR DE CARBONO DEL COMPUESTO AISLADO DE LA ESPONJA MARINA <u>APLYSINA</u> <u>SP.</u>	30
5	ESPECTRO DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR DE CARBONO AMPLIFICADO DEL COMPUESTO AISLADO DE LA ESPONJA MARINA <u>APLYSINA</u> <u>SP.</u>	31
6	ESPECTRO DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR DE CARBONO EXPERIMENTO 'DEPT' DEL COMPUESTO AISLADO DE LA ESPONJA MARINA <u>APLYSINA</u> <u>SP.</u>	32

1 INTRODUCCION

La farmacología marina, comprende el estudio de los compuestos derivados de organismos marinos. Algunos compuestos se utilizan en el tratamiento de enfermedades, y otros son sustancias (especialmente toxinas), que provienen de organismos tóxicos tanto para humanos como para animales, (Baslow, 1977). Desde la observación de Emerson y Taft en 1945, (Baslow, op. cit.); se sabe ya de el potencial farmacológico del mar y el aporte que se ha dado a la medicina.

La investigación en este campo ha progresado a tal grado que se pueden catalogar ciertos tipos de agentes fisiológicamente activos provenientes de varias clases de organismos marinos. La literatura está repleta con ejemplos de antibióticos, antifungales, y antilevaduras, encontrados en Monoeranos (Baslow, op. cit.); Sustancias ictiotóxicas, antiespasmódicas, anticoagulantes, antivirales y antihelmínticos, en los protistas, (Baslow, op. cit.); antibióticos, factores de agregación y reguladores de crecimiento, en las esponjas, (Baslow, op. cit.); agentes anticoagulantes y antitumorales, en Celenterados, (Baslow, op. cit.); De Equinodermos se tienen agentes espermoimmobilizantes, sustancias neuroactivas y bloqueadores neuromusculares, (Baslow, op. cit.); inhibidores

de crecimiento y hemolíticos. De anélidos algunos insecticidas, agentes cardioactivos de algunos artrópodos, (Baslow, op. cit.) y numerosos compuestos neuroactivos en algunas clases de peces, anfibios y reptiles marinos (Baslow, op. cit.). Esto coloca a los organismos marinos como un recurso material para la industria farmacológica, que está buscando continuamente nuevas estructuras químicas, que son activas en diferentes funciones.

Las esponjas, phylum Porifera, son un grupo de invertebrados primitivos donde la mayoría son marinos, sin embargo, existen alrededor de 150 dulceacuicolas. Tienen vida sésil y son filtroalimentadores, (Simpson, 1984). De todos los animales, son los únicos que no poseen órganos internos y su esqueleto puede ser mineral y/o colagenoso (Morris et al., 1980).

Pueden bombear grandes volúmenes de agua a baja presión con células flageladas (coanocito), (fig.#1), (Bergquist, 1978). Las partículas pequeñas son filtradas del agua y digeridas al mismo tiempo que sale por los canales exhalantes, el material es transportado desde el coanocito hasta el mesohilo donde es digerido, (Barnes, 1977). A pesar de ser organismos con poca organización interna presentan una química altamente desarrollada, frecuentemente contienen metabolitos con esqueletos inusuales de carbón y grupos funcionales poco usuales que son desconocidos en sistemas terrestres, de tal manera que éstos han recibido una

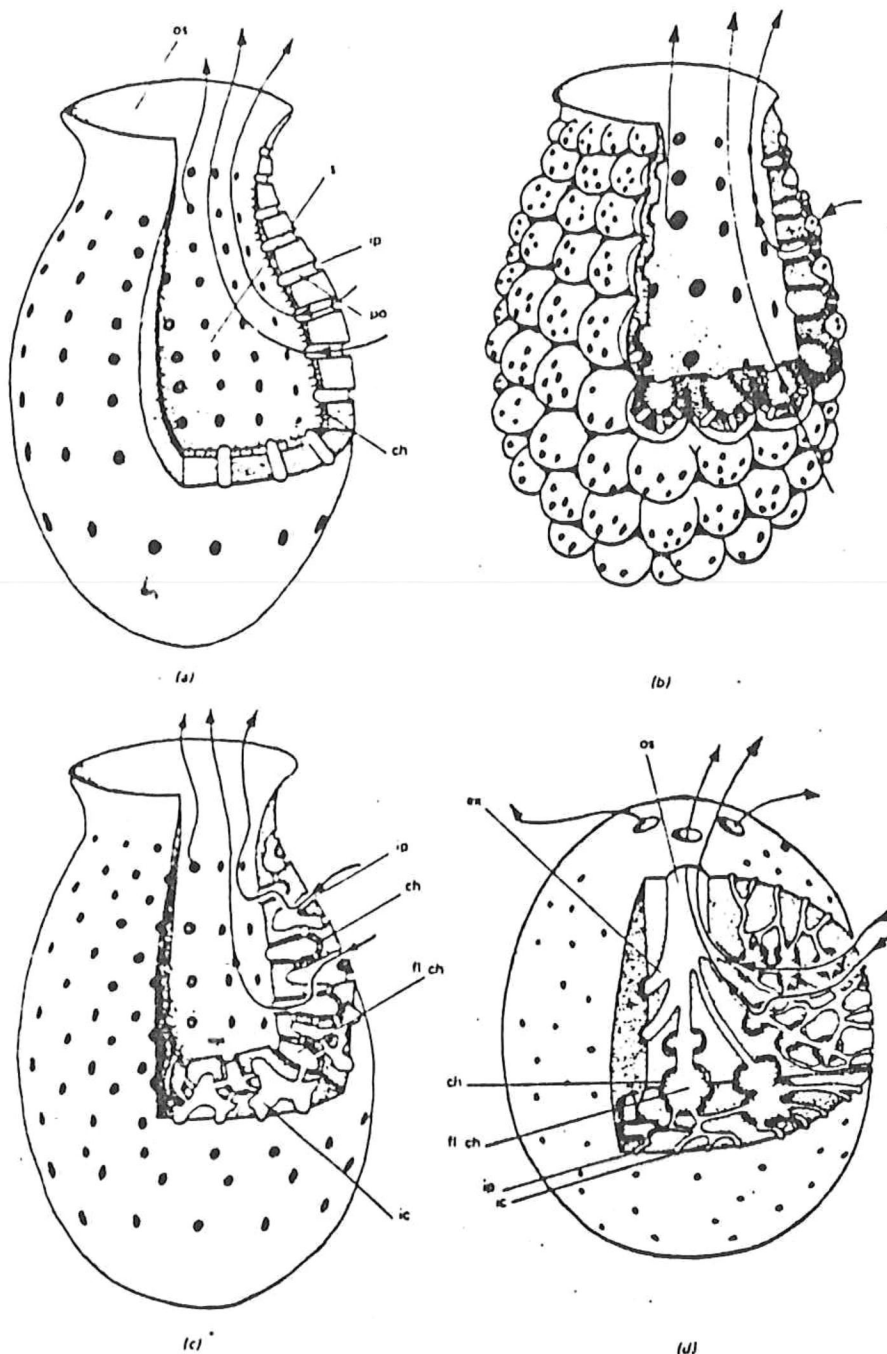


Figura 1. Representación esquemática de los diferentes niveles de organización en las esponjas. a) Ascon: forma más simple con épitelio continuo. b) Sicon: presentando los primeros estados de evolución. c) Sicon: en condiciones más avanzadas. d) Leucon: presenta las más complicadas condiciones, con cámaras aisladas de coanocitos, canales complejos y un mesohil delgado. Las flechas marcan la dirección de la corriente de agua. os, osculo; s, espongel; ip, poro inhalante; po, canal del porocito; ch, coanodermo; flch, cámara del coanocito; ic, canal incurrente; ex, canal exalante. (tomado de Bergquist, 1978).

atención considerable como nuevos compuestos farmacológicamente activos.

Las esponjas contienen grandes cantidades de metabolitos secundarios con distintas clases de actividad biológica; la actividad biológica que presentan un amplio rango de efectos como:

1.- Inhibición del crecimiento de microorganismos. Los metabolitos antimicrobianos actúan para incrementar la retención de comida bacteriana en los coanocitos, ocasionado por el aglutinamiento de bacterias en los canales incurrentes, Bergquist (1978)

2.- Efectos tóxicos contra otros organismos marinos. La producción de sustancias olorosas y nocivas por las esponjas está reconocida, así como la capacidad de causar dermatitis al contacto con ellos y como mecanismo de defensa para repeler a sus predadores (Faulkner, 1984 y Walker, et al., 1985) . Trabajos recientes sugieren el papel de los metabolitos secundarios como ecológicamente activos. En ensayos biológicos se encontró que los extractos crudos de las esponjas tropicales son ictiotóxicos (Thompson et al., 1982). En aguas tropicales la competencia y predación por peces y sobrecrecimiento de coral es más importante que en aguas templadas, (Bergquist y Bedford, 1978). También presentan actividades específicas en un diverso rango de organismos incluyendo invertebrados, (Mc.Clintock, 1987); vertebrados, microorganismos y algas (Thompson, 1985).

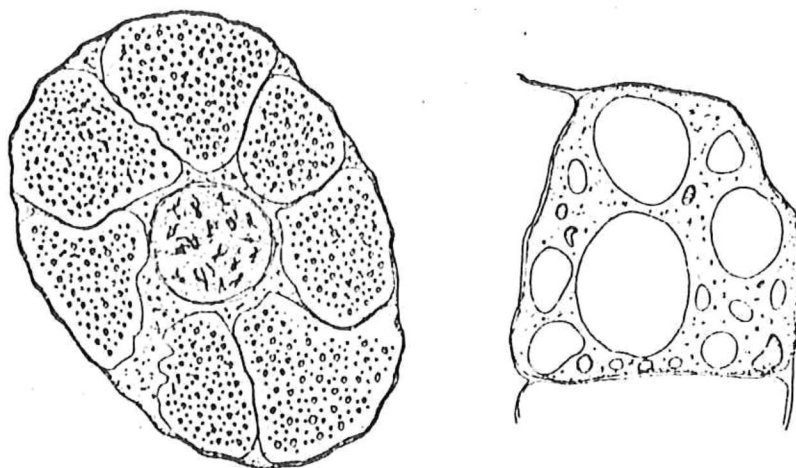


Figura 2. Células globulares: Células con inclusiones de diferentes ordenes de Demospongiae, se encuentran superficialmente y al limite de los canales exhalantes, presentandose en gran número. Célula globular de *Ianthella*.



Figura 3. Células globulares. Archaeocito en fagocitosis de una célula globular (sc).

- 2) Sustancias activas extraídas por MeOH pero que no pueden ser extraídas en disolventes inmiscibles en el agua.
- 3) Sustancias activas que son solo parcialmente extraídas en MeOH.
- 4) Sustancias antimicrobiales que no pueden ser extraídas por MeOH totalmente.

ANTECEDENTES

Los metabolitos de las esponjas marinas fueron revisados en detalle por Minale en 1976 (Bergquist y Wells, 1983). En 1977 la revisión de Minale (Bergquist y Wells, 1983), se limitó a una discusión de terpenoides, lo cual es símbolo del rápido crecimiento en esta área. Otros autores han revisado grupos limitados de compuestos como son esteroides (De Luca et. al., 1976), carotenoides, diterpenoides, sesterpenos, pigmentos nitrogenados, derivados de guanidina, fenoles e indoles (Faulkner, 1980, 1984). Con la revisión por Bergquist y Wells (1983), sobre quimiotaxonomía (tabla I y fig.4) , los químicos marinos han realizado un reacomodo en el nombre de las especies de los siguientes ordenes: Dictyoceratida, Dendroceratida y Verongida (Clase Demospongiae). Las esponjas del Orden Verongida han sido extensivamente reclasificadas, así el género que se conoce como *Verongia* debe ser reemplazado por el sinónimo de *Aplysina*, (Faulkner, 1984).

Debido a que muchas esponjas contienen microorganismos simbióticos, hay algunas veces incertidumbre acerca del verdadero origen de sus metabolitos. Sin embargo, se cree que la mayoría de los metabolitos son producidos por las esponjas, posiblemente en células globulares especializadas, (Walker et. al., 1985), y se ha encontrado muy poca evidencia que las esponjas pueden exudar metabolitos biológicamente activos a una concentración suficiente para

TABLA I.

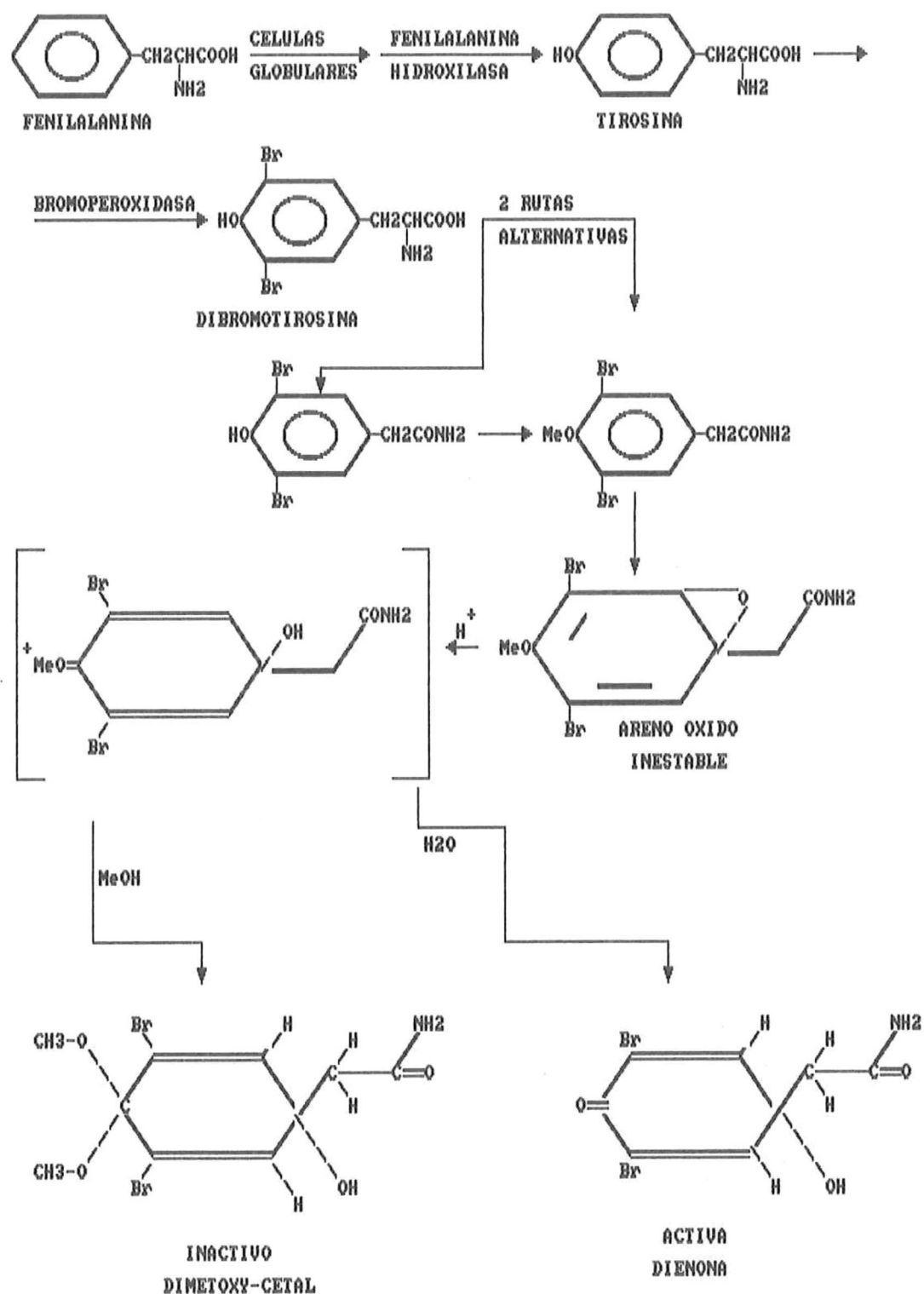
OCURRENCIA Y VARIEDAD DE DERIVADOS BROMADOS DE TIROSINA DE LAS ESPONJAS MARINAS EN EL ORDEN VERONGIDA. (TOMADO DE BERGQUIST Y HELLS, 1983).

TAXON	COMPUESTOS	REFERENCIAS
Familia Aplysinidae		
Genero Aplysina		
<u>Aplysina aerophoba</u>	1, 4, 6-8	Fattorusso et al. (1970, 1971); Minale et al. (1972).
<u>Aplysina aurea</u>	12	Krejcarek et al. (1975).
<u>Aplysina cauliformis</u>	1, 2	Sharma and Burkholder (1967).
<u>Aplysina fistularis</u>	1, 2	Sharma and Burkholder (1967).
<u>Aplysina fistularis v. fulva</u>	7, 9, 10 11, 13	Gopichand and Schmitz (1979).
<u>Aplysina thiona</u>	7, 8	Fattorusso et al. (1970, 1971).
<u>Aplysina sp.</u>	1, 3	Anderson and Faulkner (1973).
<u>Aplysina sp.</u>	1	Minale et al. (1973).
Genero Verongula		
<u>Verongula lacunosa</u>	9	Borders et al. (1974).
Familia Aplysinellidae		
Genero Pseudoceratina		
<u>Pseudoceratina crassa</u>	6	Fulmer et al. (1970).
<u>P. durissima</u>	7, 8	J. Mulder and R. J. Wells (1980, resultados sin publicar).
Genero Psammaplysilla		
<u>Psammaplysilla purpurea</u>	13	Chang and Weinheimer (1977).
Familia Ianthellidae		
Genero Ianthella		
<u>Ianthella flabelliformis</u>	7, 8	L.P. Davies and R. J. Quinn (1980)
<u>Ianthella basta</u>	14, 19	Kazlauskas et al. (1980, 1981).
<u>Ianthella sp.</u>	6	Minale et al. (1972).

detener efectos nocivos de algunos organismos bénticos. Walker et al., (1985) y Thompson et al. (1985), demostraron que a muy bajas concentraciones de arothionina y homoaerotionina de *Aplysina fistularis* puede modificar el posible asentamiento de organismos capaces de crecer en el tejido dañado de la esponja. La alta tasa de exudación que se presenta en el tejido dañado puede ser lo suficientemente activa para detener la posible depredación, ya que las esponjas carecen de protección y se conoce a un par de sus predadores (Alberici et al., 1982) La esporádica ruptura de células globulares causa una exudación continua a una concentración baja de metabolitos (Walker et al., 1985).

En algunos casos excepcionales como es *Disidea herbacea* (Capon y Faulkner, 1985) hay una evidencia circunstancial que sugiere que algunos metabolitos son producidos por organismos simbiotes. Los productos naturales marinos han manifestado un reciente interés en las esponjas, ricas proveedoras de compuestos bioactivos, (Faulkner, 1977). Los fenoles y quinonas bromados, aislados de especies de *Aplysina* incluyen agentes antibacteriales activos, los cuales se derivan de mono o dibromotirosinas, (Adrienne y Rinehart 1981, [Esquema. 1] y Faulkner, 1984). Los metabolitos característicos de *Aplysina* son derivados de dibromotirosina, Sharma y Burkholder, 1967 aislaron el antibiótico 2,6-dibromo-4-acetamida-4-hidroxiciclohexadecanona, de *Verongia cauliformis*, cuando los mismos autores

ESQUEMA 1. RUTA METABOLICA A PARTIR DE LA FENILALANINA O TIROSINA PARA SINTETIZAR UN METABOLITO SECUNDARIO EN LA ESPONJA MARINA *Aplysina* sp. (TOMADO DE ADRIENE et al, 1981).



aislaron el dimetoxicetal de V.fistularis, ellos asumen que tal dimetoxicetal no puede ser formado por adición de metanol a la dienona, y el cetal se encuentra en forma natural como compuesto.

Faulkner y Andersen, 1973 reportan un cetal mixto [Etoxi-Metoxi], que se ha aislado de una especie no descrita de Verongia, sugiriendo que la dienona, el dimetoxicetal y el cetal mixto, pueden ser formados a partir de un precursor común por la adición de un disolvente durante el proceso de extracción.

Este tipo de investigación necesita la colaboración entre químicos orgánicos, químicos ecólogos y farmacólogos moleculares. El aislamiento de nuevos metabolitos de organismos marinos, el estudio de propiedades farmacológicas y papel ecológico de estos compuestos es el principal objetivo de el grupo de investigación de el Dr. John Faulkner en el Instituto de Investigación Oceanografica Scripps en San Diego, Ca. Colaborando con grupos farmacológicos en varias compañías de medicamentos y con el Dr. Robert Jacobs en U.C. Santa Barbara. Las propiedades farmacológicas de muchos de estos compuestos puede ser determinada, siempre y cuando se obtengan las cantidades suficientes para realizar ensayos biológicos.

OBJETIVO

" LLEVAR A CABO EL AISLAMIENTO Y LA DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIAL DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS DE LA ESPONJA MARINA *Aplysina* sp. ASI COMO LA ELUCIDACION DE SUS ESTRUCTURAS".

2 MATERIALES Y METODOS

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear Protónica (RMNP), se determinaron a 360 MHz., utilizando como disolventes cloroformo y metanol deuterados (CDCL₃/CD₃OD) en el espectrómetro construido por el Dr. Wright de U.C.S.D. y en un espectrómetro Bruker WP-200 MHz. Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono (RMN C¹³), utilizando como disolvente Acetona deuterada, se determinaron a 50 MHz. en el mismo espectrómetro Bruker WP-200 MHz. Espectro Infrarrojo, se utilizó como disolvente aceite Nujol, se corrió en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 137 o en un Perkin-Elmer 738.

EXTRACCION

La esponja fué colectada por Buceo SCUBA a 20' de Big Pine Key, Florida, situada a 24^o30' Latitud Norte y 81^o30' Longitud Oeste en el Verano de 1987, y almacenada en metanol (MeOH) por 3 meses.

Al momento de su colecta la esponja marina *Amysina* sp. se sometió a ensayo biológico con los siguientes microorganismos: Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Escherichia coli, Enterobacter aerogenes, Pseudomonas aeruginosa, Candida albicans, Beneckea harveyi (B-392) ,

posteriormente se almacenó en metanol a 4^o C y se procedió a su extracción con cuatro disolventes incrementando el gradiente de polaridad comenzando con hexano, diclorometano, acetato de etilo y metanol (Fig. 5).

SEPARACION

Cada uno de los extractos se sometió a un ensayo antimicrobial con los siguientes microorganismos: Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Escherichia coli, Enterobacter aerogenes, Pseudomonas aeruginosa, Candida albicans, Beneckea harveyi (B-392) y los extractos que dieron prueba positiva (diclorometano y acetato de etilo) (Tabla II), se sometieron a fraccionación mediante cromatografías en columna de líquidos.

Para el extracto de diclorometano se utilizó como fase estacionaria gel de sílice y como eluyentes, disolventes con un gradiente de polaridad como hexano, acetato de etilo,

EXTRACCION

La esponja fué colectada por Buceo SCUBA a 20' de Big Pine Key, Florida, situada a 24^o30' Latitud Norte y 81^o30' Longitud Oeste en el Verano de 1987, y almacenada en metanol (MeOH) por 3 meses.

Al momento de su colecta la esponja marina *Anlysiná sp.* se sometió a ensayo biológico con los siguientes microorganismos: Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Escherichia coli, Enterobacter aerogenes, Pseudomonas aeruginosa, Candida albicans, Beneckea harveyi (B-392) , posteriormente se almacenó en metanol a 4^o C y se procedió a su extracción con cuatro disolventes incrementando el gradiente de polaridad comenzando con hexano, diclorometano, acetato de etilo y metanol (Fig. 5).

SEPARACION

Cada uno de los extractos se sometió a un ensayo antimicrobial con los siguientes microorganismos: Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Escherichia coli, Enterobacter aerogenes, Pseudomonas aeruginosa, Candida albicans, Beneckea harveyi (B-392) y los extractos que dieron prueba positiva (diclorometano y acetato de etilo) (Tabla II), se sometieron a fraccionación mediante cromatografías en columna de líquidos.

Para el extracto de diclorometano se utilizó como fase estacionaria gel de sílice y como eluyentes, disolventes con un gradiente de polaridad como hexano, acetato de etilo,

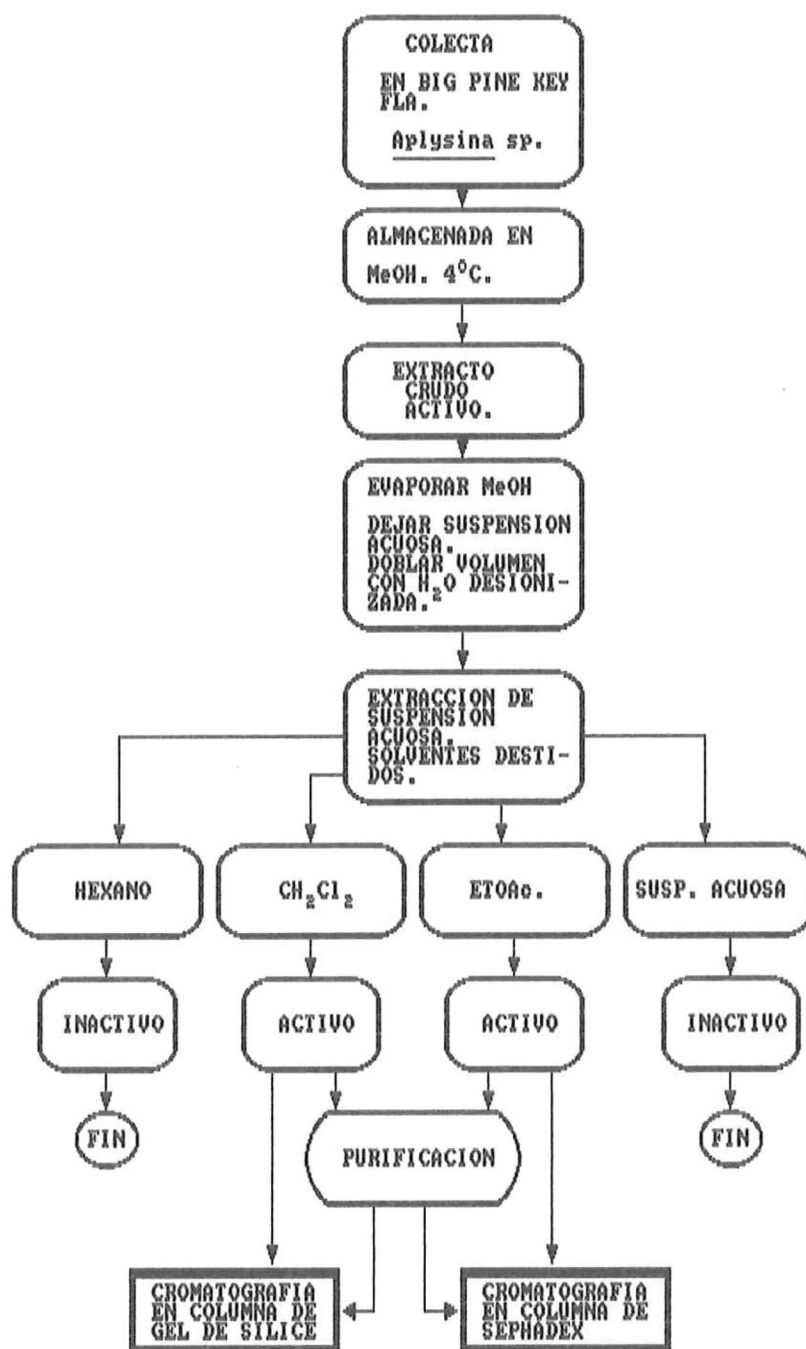


FIG.5 DIAGRAMA DE BLOQUES DEL TRATAMIENTO DE LA MUESTRA DE LA ESPONJA MARINA MARINA *Aplysina sp.*

metanol y mezclas de ellos , las fracciones obtenidas (se monitorearon mediante Cromatografía en capa delgada, en gel de sílice). se sometieron a un análisis de antibiosis con S. aureus.(Tabla III).

Para el extracto de acetato de etilo se utilizó Sephadex como fase estacionaria y como disolvente metanol, las fracciones obtenidas igual que en el caso anterior se monitorearon mediante ccd y antibiosis con S.aureus. (Tabla IV).

A cada una de las fracciones de estos extractos se sometió a un análisis de RMNP y todas aquellas que resultaron ser iguales se reunieron.

PURIFICACION

Cada una de las fracciones obtenidas anteriormente y que resulto activa, se purificó mediante cristalización con metanol-acetato de etilo, se secaron mediante una corriente de N₂ líquida y se les determinó un espectro de R.M.N.

ENSAYO BIOLOGICO

Una porción de los cristales ya purificados se sometieron a un ensayo antibacterial de la siguiente manera.

I.MICROORGANISMOS:

A. PATOGENOS HUMANOS: Staphylococcus aureus: gram positivo, Bacillus subtilis.- gram positivo, Escherichia coli- gram negativa, Enterobacter aerogenes- gram negativa, Pseudomonas aeruginosa- gram negativa; fluorescencia verde. Candida albicans - hongo

B. BACTERIAS MARINAS:

Beneckea harveyi (B-392) - gram negativa; luminescente.

II. MEDIO DE PREPARACION.

A. Medio solido

1. Para Patogenos Humanos: Se tomó 10 g. de Bacto-Tryptona con 1 g. de extracto de hongo, 8 g. de NaCl, 1 g de Glucosa, 0.5 g. de Tris HCl. y 17 gs. de Bacto-Agar y se diluyó en 1 litro de agua desionizada.

2. Para Bacterias Marinas: Se tomó 5 g. de Bacto-Tryptona, 3 g. de extracto de hongo, 3 ml. de glycerol (grado analítico) 17 g. de Bacto-Agar se diluyó en 250 ml. de agua desionizada con 750 ml. de agua de mar (filtrada por un filtro de 2-8 miliporo).

Se preparó 2 lts. de medio, se taparon con papel aluminio, y se esterilizaron en una autoclave a 15 libras de presión por 15 minutos. Aun caliente se colocó en cajas de petri de 100 x 15 ml. (alrededor de 20 ml. por caja). Se dejaron solidificar a temperatura ambiente toda la noche y almaceno a 4° C.

B. Medio líquido.

Se preparó el medio de acuerdo como al medio sólido, exceptuando la adición de Bacto-agar. Se pipeteó el medio no esteril dentro de pequeños vials de 1/3 a 1/2 de su capacidad. Se pusieron las tapas sin apretar y autoclave a 15 psi/15 min. Se dejó solidificar a temperatura ambiente toda la noche y se apretaron las tapas y almacenó a

temperatura ambiente.

PROCEDIMIENTO PARA EL BIOENSAYO ANTIMICROBIAL.

A. El compuesto que fué probado se diluyó en un "sensidisco" esteril y se dejó secar (Se usó metanol como disolvente realizándose varias aplicaciones y el disco seco se puso en la placa).

B. Se etiquetó la caja de Petri con el nombre del organismo y nombre (s) de compuesto (s) a ser probados.

C. Usando pinzas estériles se aplicaron los discos secos a la superficie del agar, se incubó toda la noche a temperatura de 30-37°.

D. Las muestras donde se presentó la formación de un halo alrededor del disco, indican inhibición de crecimiento y por lo tanto es una indicación de la toxicidad del compuesto.

3 RESULTADOS

Extractos:

Se obtuvieron cuatro extractos: Hexano, Diclorometano, Acetato de etilo y Metanol. Cada uno con pesos respectivamente de:

Hexano.- w= 35.79 mgs.

CH₂Cl₂.- w= 164.47 mgs.

EtOAc.- w= 149.38 mgs.

MeOH.- w= 10.19 gs.

Después de la purificación del extracto activo-(CH₂Cl₂ que fué mediante cromatografía en columna en gel de Sílice se obtuvieron 14 fracciones diferentes de las cuales de la 7-10 resultaron activas apoyándose en su espectro de Resonancia Magnética Nuclear Protónica, se unieron 2 fracciones que resultaron ser iguales para dar un peso final de 56.57 mg. Después de la cristalización, se obtuvo un peso final de 5.6 mg.

ENSAYO ANTIMICROBIAL DE EXTRACTOS:

Extracto de Dicloro-metano: La fracción seleccionada de dicloro-metano, se probó sobre las bacterias y se observó prueba positiva (inhibición de crecimiento Bacteriano) para S.aureus, E.coli, B.subt, E.aero, y B-392 .(tabla II). Posteriormente el extracto fué purificado mediante Cromatografía en gel de Sílice y se probó sobre la bacteria S. aur dando prueba positiva (Tabla III).

Extracto de Acetato de Etilo: Esta fracción resultó ser

TABLA II.
ACTIVIDAD ANTIMICROBIAL DE LOS EXTRACTOS CRUDOS
DE LA ESPONJA MARINA Aplysina sp.

ORGANISMOS	EXTRACTOS CRUDOS		SOLVENTES	
	HEX	CH ₂ CL ₂	ETOAc	MeOH
<u>S. aur</u>	INACTIVO	15 mm.	20 mm.	INACTIVO
<u>E. coli</u>	INACTIVO	14 mm.	18 mm.	INACTIVO
<u>P. areu</u>	INACTIVO	INACTIVO	8 mm.	INACTIVO
<u>B. sub</u>	INACTIVO	19 mm	22 mm.	INACTIVO
<u>E. aero</u>	INACTIVO	10 mm.	11 mm.	INACTIVO
<u>C. alb</u>	INACTIVO	INACTIVO	INACTIVO	INACTIVO
<u>B-392</u>	INACTIVO	23 mm.	26 mm.	INACTIVO

TABLA III.
RESULTADOS DEL EXTRACTO DE DICLORO METANO.
DE LA ESPONJA MARINA Aplysina sp.
PURIFICACION POR CROMATOGRAFIA EN GEL DE SILICE

FRACCIONES	ORGANISMO <u>S.aur</u>
1-6	NEGATIVO
7-11	POSITIVO
12-14	NEGATIVO

TABLA IV.
RESULTADOS DEL EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO
DE LA ESPONJA MARINA Aplysina sp.
AL PURIFICARSE POR CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE SEPHADEX

FRACCIONES	ORGANISMO <u>S.aur</u>
1	NEGATIVA
2	POSITIVA
3	NEGATIVA

activa para todas las bacterias (S.aur, E.coli, P.areu, B.subt, E.aero, B-392) excepto para C.alb. (Tabla II). Posteriormente se purificó mediante Cromatografía en columna de Sephadex obteniéndose 3 fracciones diferentes y una fracción presentó actividad positivo al ser probado sobre la bacteria S. aur. (Tabla IV).

Los extractos Hexánico y Metanólico resultaron inactivos para todas las bacterias (Tabla II).

ANALISIS ESPECTRAL:

La fracción que contiene al compuesto puro CH_2Cl_2 se sometió a los siguientes Análisis espectroscópicos:

Espectroscopia de Infrarrojo:

El espectro 1 presenta señales característicos para oxhidrilos aromáticos a 3450 cm^{-1} , también se observan las señales características para grupos alcanos a 1370 y 1460 cm^{-1} . Se asume que en la señal intensa y ancha comprendida entre 2850 y 3050 cm^{-1} se encuentra enmascarada la señal para dobles enlaces, ya que ésto se confirma con las absorciones a 1675 cm^{-1} , la cual es típica para dobles ligaduras.

Se puede observar la presencia de grupos funcionales amidas, con una absorción intensa característica en 1601 cm^{-1} . Entre $1050-1262 \text{ cm}^{-1}$ se observan varias señales características de ésteres aromáticos.

Espectro de Resonancia Magnética Nuclear Protónica (RMNP):

En el espectro 2, (Tabla V.) se presenta una banda simple a 2.40 ppm . que integra para 2 protones y se asignan a los

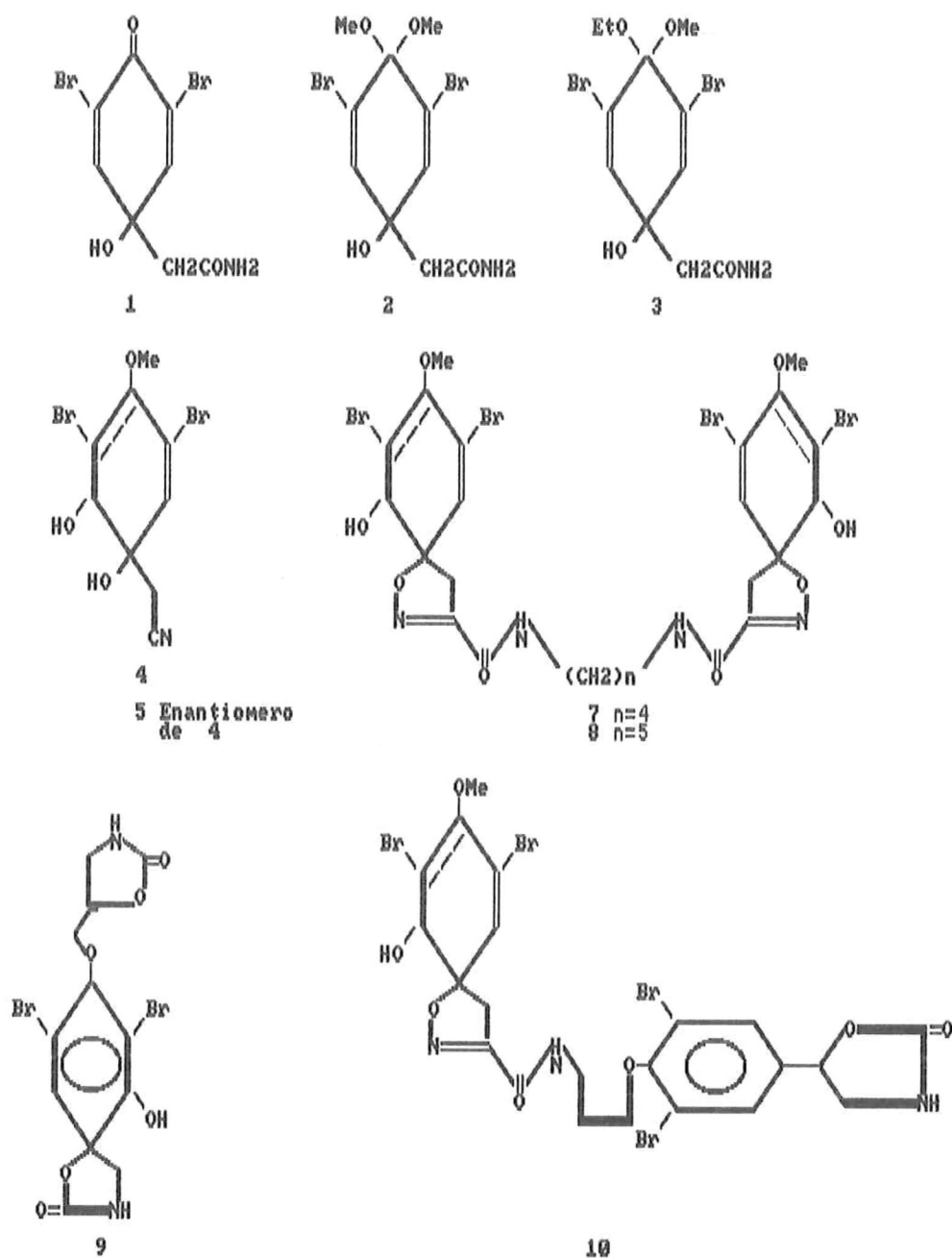
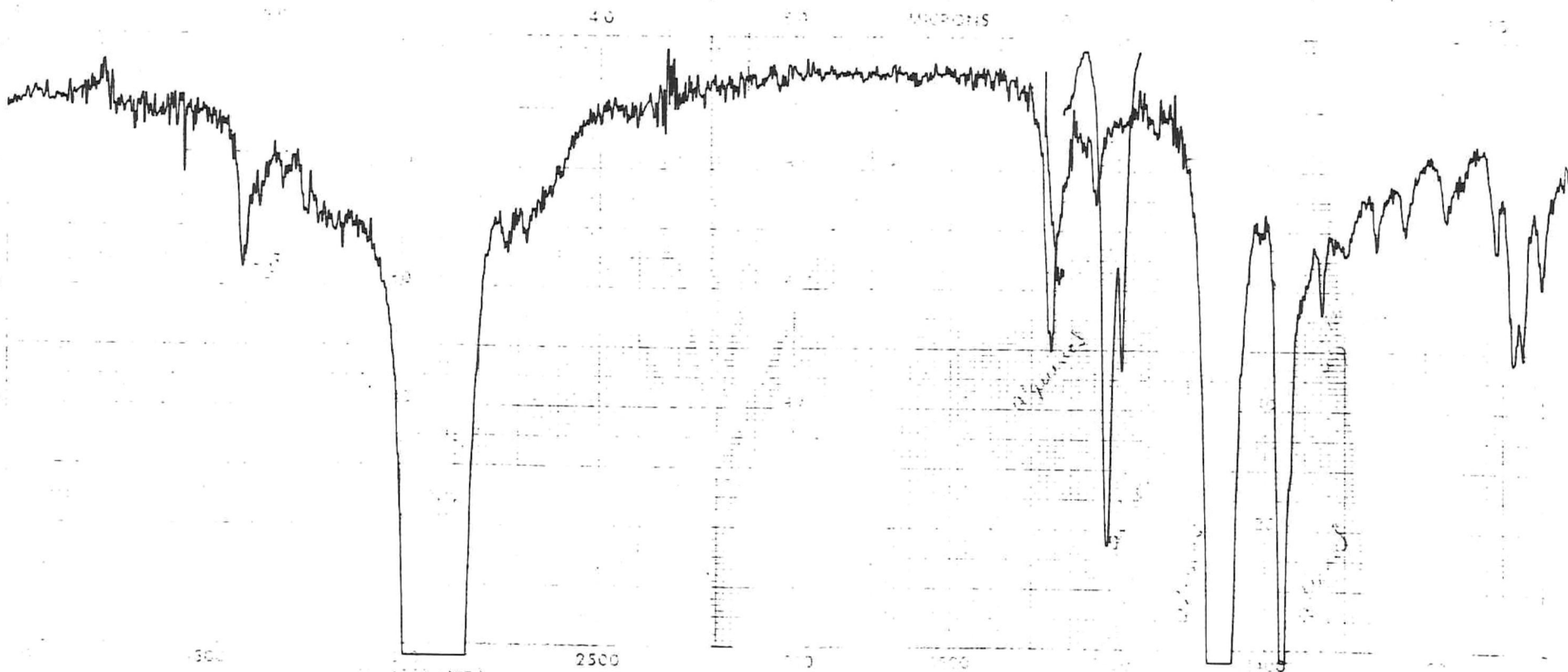


FIG. 4. METABOLITOS BROMADOS PRESENTES EN ESPONJAS MARINAS DEL DEL ORDEN VERONGIDAE. (TOMADO DE BERGQUIST Y WELLS, 1983).



87-117-2-10

X 10/14/68/111

SIGN

Aceite Nujol
1 mg/2 ml

TELEFACH

DEPENDENCIA Polytene 1600

Espectro 1. Espectro de Infrarrojo
para el compuesto: 3,5 dibromo-hi-
droxi-4-dimetoxy-ciclohexadieno-a-
cetamida. Extraido de la esponja
marina Aplysina sp.

3
5 min
3
SOLVENTE

NUMBER

X

DATE

2

37-117-2-9 CDCL3/CD3NO 7DEC97

PPM

7.4672
7.4610

6.8154

3.5133

3.4054

3.3876

3.1345

3.0661

2.5297

2.4007

Espectro 2. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear Protónica (360 MHz) para el compuesto: 3,5 dibromo-hidroxi-4-dimetoxi-ciclohexadieno-acetamida. Extraído de la esponja marina Aplysina sp.

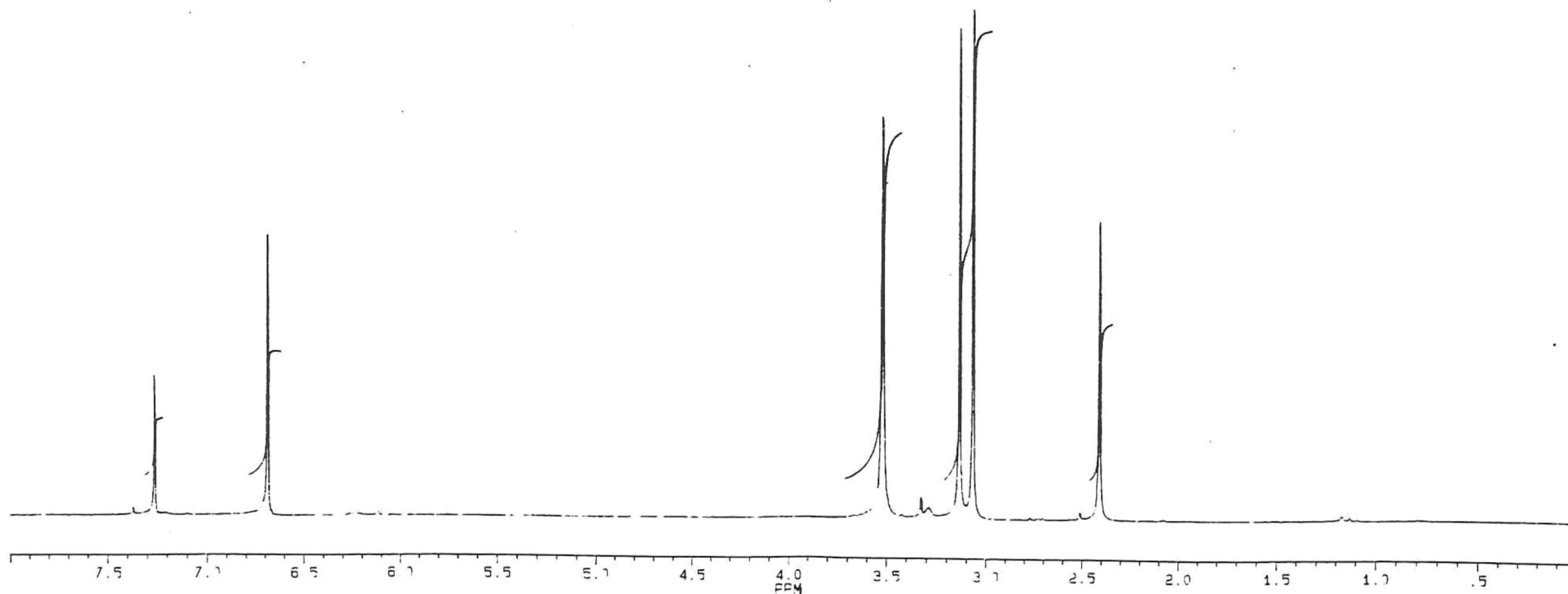


TABLA V. RESULTADOS DEL ESPECTRO DE RMNP DEL COMPUESTO AISLADO DE LA ESPONJA MARINA APLYSINA *sp.*

C #	Desplazamiento químico en ppm.δ
2	s, 1H, 6.68
6	s, 1H, 6.68
7	s, 2H, 2.40
OH (C#1)	s, 1H, 3.51
NH2 (C#8)	s, 2H, 3.51
OCH3 (C#4)	s, 3H, 3.05
OCH3 (C#4)	s, 3H, 3.13

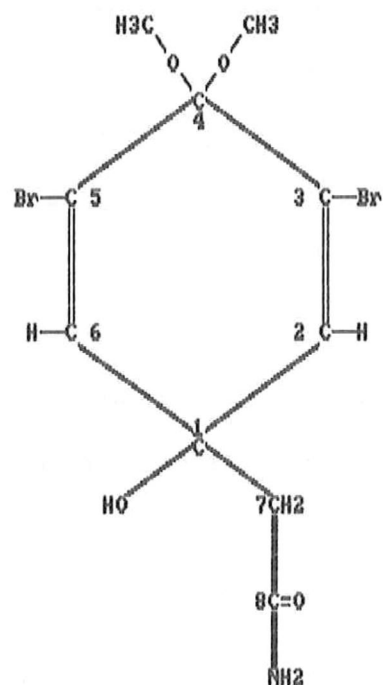


FIG.6 ESTRUCTURA DEL COMPUESTO AISLADO DE LA ESPONJA MARINA APLYSINA *sp.*

protones de un CH_2 , a 3.05 y 3.13 ppm., dos señales simples que integran para 3 protones cada una, y que se asignan a los protones de 2 grupos O-CH_3 . En 3.51 ppm., se observa una señal simple que integra para 3 protones y se le asignan a los protones de un grupo amino (NH_2) y uno de un grupo OH. También se presenta una señal simple en 6.68 ppm., que integra para 2 protones, asignados a los protones vinílicos desplazados a campo bajo. La señal en 7.26 ppm. corresponde al disolvente.

Espectro de Nuclear Overhauser Enhancement (NOE), de Resonancia Magnética Nuclear Protonica (RMNP): (Tabla VI.) En el espectro 3 el protón irradiado a 2.4 ppm. (CH_2) se observa NOE con 6.68 ppm. (C=H)₂.

Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono (RMN¹³C):

Espectro 4 y 5 (Tabla VII), se obtuvieron las siguientes señales: a 47.43 ppm. una señal asignada a un Carbono de un Metileno, y otras señales a 47.72, 48.15, 48.59, 48.99, 49.42, 49.85, 50.27 ppm. características del disolvente Acetona-D₆, a 51.745 y 51.792 ppm. asignadas a los carbonos de dos grupos metoxilos O-CH_3 , a 71.80 ppm. correspondiente a un carbono con un grupo funcional alcohol, a 98.05 ppm. asignada al carbón de OCO , a 122.92 ppm. señal para 2 carbonos con bromo (CBr)₂, a 143.50 ppm. señal que corresponde a 2 carbonos vinílicos (CH)₂ y a 173.75 ppm. correspondiente al carbón de un grupo amida.

TABLA VI. DATOS PARA EL ESPECTRO DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR
 PROTONICA (NOE) DEL COMPUESTO
 3,5 DIBROMO-1-HIDROXI-4-DIMETOXI-CICLOHEXADIENO-ACETAMIDA

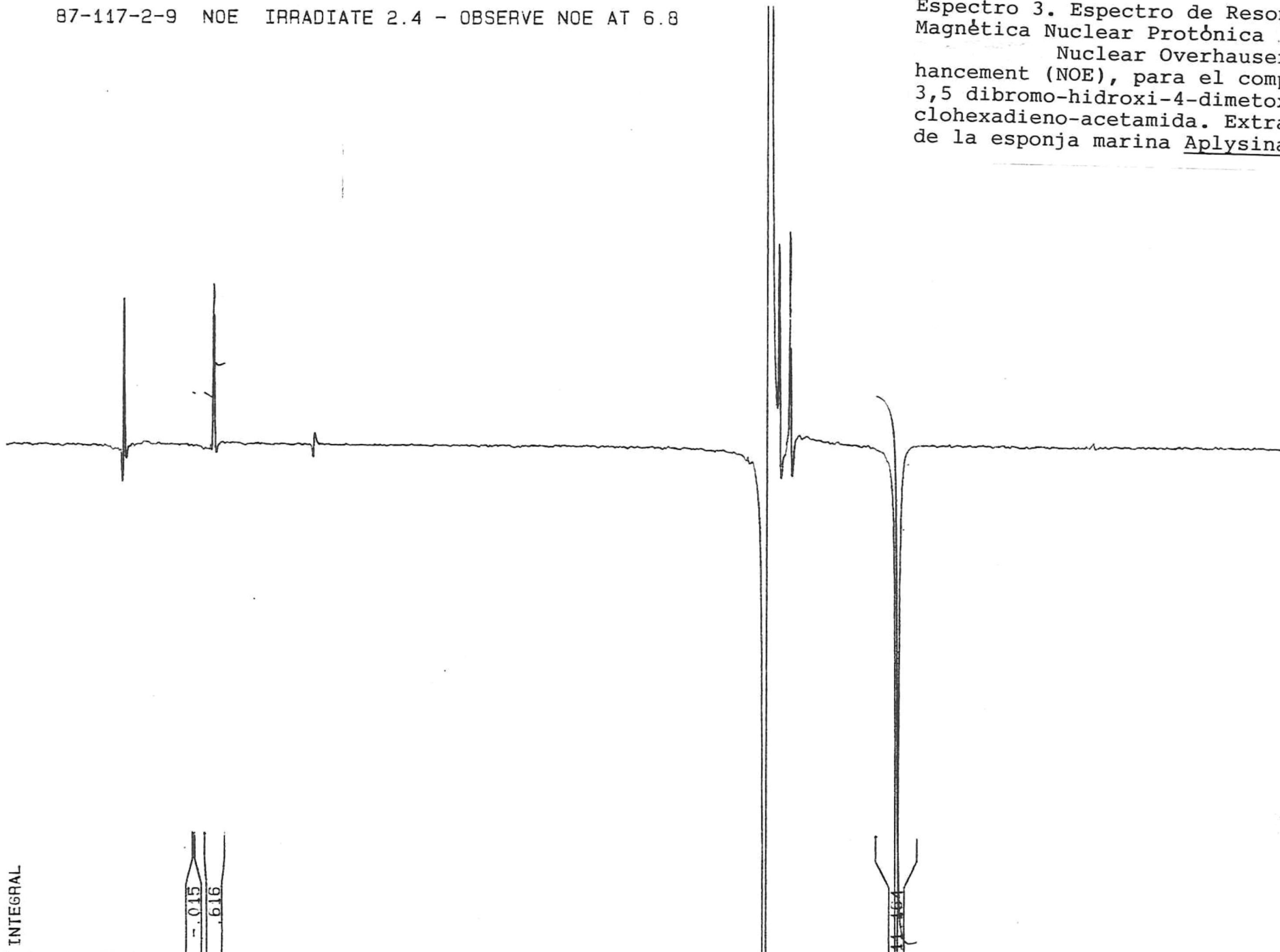
PROTON IRRADIADO	ENHANCED SIGNAL
2.4 ppm. δ (H-7)	6.80 ppm. δ (H-6,2)

TABLA VII. RESULTADOS DEL ESPECTRO DE RMN ^{13}C DEL COMPUESTO
 AISLADO DE LA ESPONJA MARINA APLYSINA sp.

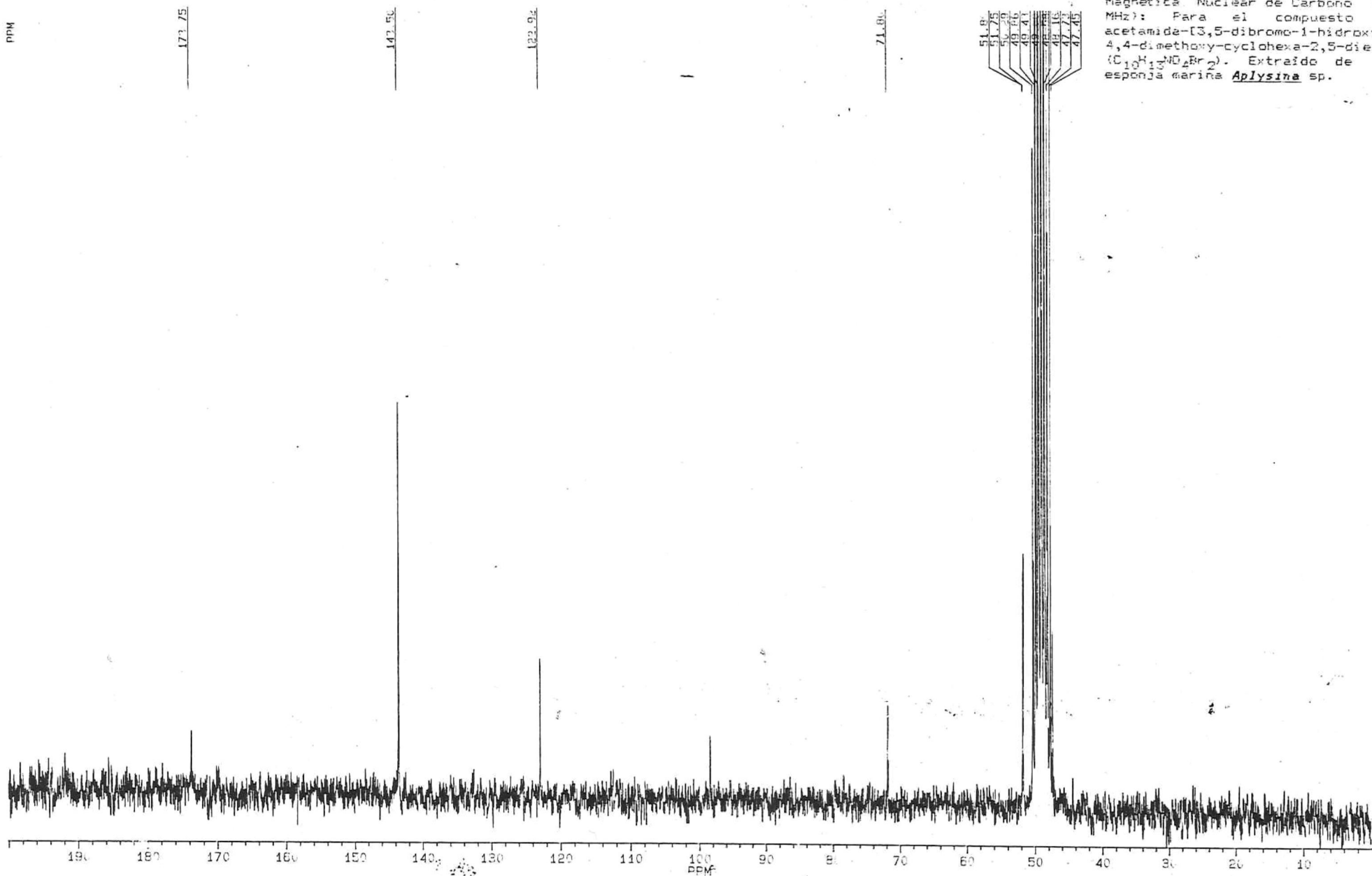
Carbon #	Desplazamiento químico en ppm. δ
1	71.800
2	143.000
3	122.920
4	98.050
5	122.920
6	143.500
7	47.430
8	173.750
OCH ₃ (C#4)	51.745
OCH ₃ (C#4)	51.792

87-117-2-9 NOE IRRADIATE 2.4 - OBSERVE NOE AT 6.8

Espectro 3. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear Protónica Nuclear Overhauser Enhancement (NOE), para el compuesto 3,5 dibromo-hidroxi-4-dimetoxi-ciclohexadieno-acetamida. Extraído de la esponja marina Aplysina sp.



Espectro 4. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono (50 MHz): Para el compuesto 1-acetamida-[3,5-dibromo-1-hidroxy-4,4-dimethoxy-cyclohexa-2,5-dieno] ($C_{10}H_{12}NO_4Br_2$). Extraído de la esponja marina *Aplysina* sp.



51.795
51.745

50.278

48.852

49.424

48.905

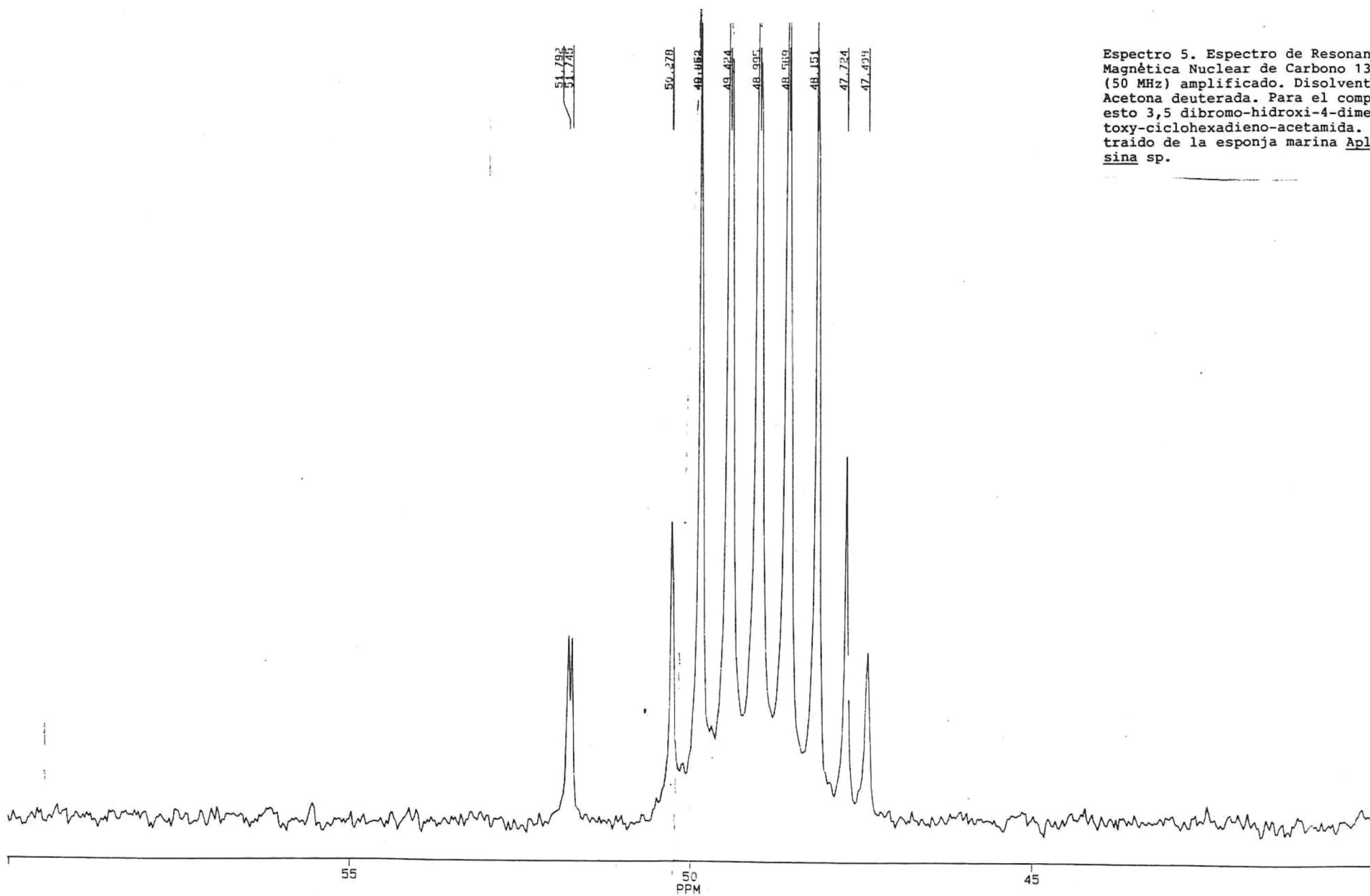
48.569

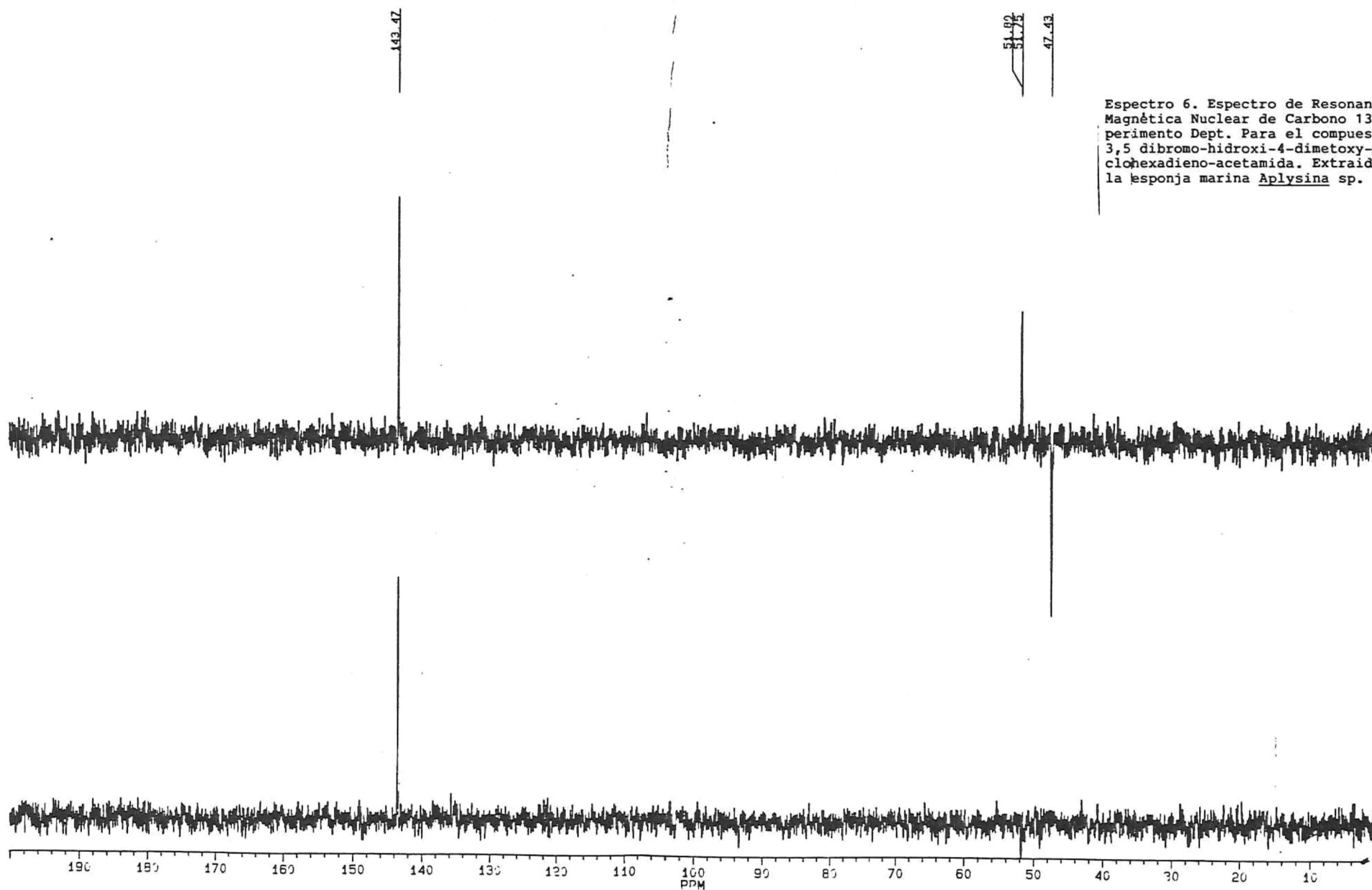
48.151

47.724

47.491

Espectro 5. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13 (50 MHz) amplificado. Disolvente Acetona deuterada. Para el compuesto 3,5 dibromo-hidroxi-4-dimetoxi-ciclohexadieno-acetamida. Extraído de la esponja marina Aplysina sp.





Espectro 6. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13 experimento Dept. Para el compuesto 3,5 dibromo-hidroxi-4-dimetoxi-ciclohexadieno-acetamida. Extraído de la esponja marina Aplysina sp.

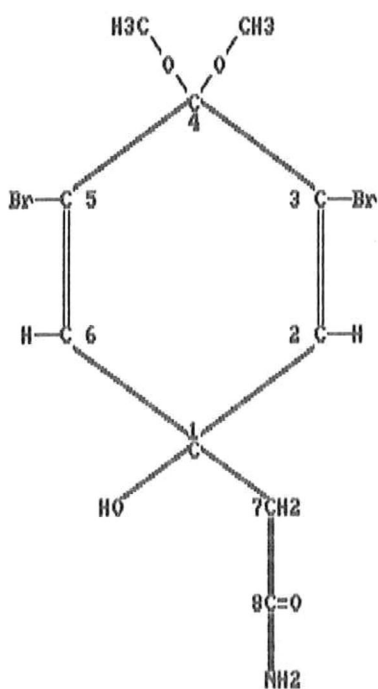


FIG.6 ESTRUCTURA DEL COMPUESTO AISLADO DE
APLYSINA sp.

Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono
(RMN¹³C), Experimento 'Dept': En el espectro 6 a 47.43 marca
señal característica para grupo metileno (CH₂).

4 DISCUSIONES

La esponja marina *Ablysina* sp. sintetiza un metabolito secundario con actividad biológica 'in vivo' con fórmula molecular $C_{10}H_{13}NO_4Br_2$. (fig. 6). La anterior hipótesis se basa en la elucidación de la estructura compuesto, que fué determinada mediante métodos espectrofotométricos de infrarrojo (espectro 1), por RMN^P (espectro 2), RMN¹³C (espectro 4), de NOE (espectro 3) y deducción personal de D.J.Faulkner.

Mediante la siguiente ecuación (1) se pudo determinar el grado de insaturaciones presentes en el compuesto:

$$(1) x = \frac{2C+B-A+2}{2}$$

En donde:

C= # de Carbonos

B= # de Nitrogenos

A= # de Halogenos y/o Hidrogenos

Sustituyendo:

$$x = \frac{21-15+2}{2} = 4 \text{ grados de insaturación}$$

Apoyándose en el libro "Tables of Spectral Data for Structure Determinación of Organic Compounds" (Pretsch et al., 1983) y (Hall et al., 1980). Se pudieron analizar los espectros de RMN^P, RMN¹³C, IR.

Sabiendo que el compuesto presenta en su estructura 4 grados de insaturación y mediante los datos del espectro de

RMN¹³C. (Espectro 4), podemos observar que una de estas insaturaciones, corresponde a la señal en 173.75 ppm, la cual se asigna al Carbono # 8 de la molécula, este carbono se encuentra en forma de un grupo amida y se corrobora mediante el espectro de Infrarrojo, observándose una banda intensa a los 1670 cm⁻¹, (Espectro 1). En 143.50 ppm. se observa otra señal que corresponde a dos carbonos olefinicos simétricos y se le asigna a los Carbonos 2 y 6, los cuales son carbonos terciarios, por lo que contienen un Protón cada uno. Esto se corrobora mediante el espectro de RMNP. Ya que podemos ver claramente la presencia de una señal simple a 6.68 ppm. y que integra para dos protones, (Espectro 2). En Infrarrojo también podemos observar la señal correspondiente a estas vibraciones, como una banda ancha e intensa entre 2850-3050 cm⁻¹ y en 1675 cm⁻¹, (Espectro 1).

Para confirmar lo anterior, se corrió un espectro "Nuclear Overhauser Enhancement" (NOE), Espectro 3, irradiando el protón que se encuentra en el Carbono # 7 y se observó una interacción dipolo-dipolo con los protones de los Carbonos 2 y 6, observándose la señal invertida en 2.4 ppm. posición en la que se encuentra una señal en RMN^P (Espectro 2) y que integra para los dos protones del metileno. La señal en RMN¹³C a 122.92 ppm. representa una señal para dos Carbonos 3 y 5 de la molécula, los cuales también tienen substituidos a un bromo

cada uno.

En el espectro de RMN^{13}C también observamos una señal a 98.05 ppm. corresponde a un carbono sustituido con dos Oxigenos y se le asigna al Carbono # 4, La presencia del Carbonito se observa en infrarrojo mediante una señal a 1601 cm^{-1}

Podemos observar en infrarrojo (Espectro 1) una señal a 3450 cm^{-1} característica de grupos alcoholes y en el espectro de $^{13}\text{CRMN}$ una señal a 71.80 ppm. Esta señal se asigna a un Carbono con sustituyente oxhidrilo y corresponderia para el Carbono # 1. En el espectro de RMNP se observa una señal simple en 3.51 ppm. y se asigna al protón del oxhidrilo, únicamente que la integración para esta señal, corresponde a tres Protones, 2 del grupo amida (NH_2), substituida en el Carbono # 8, se encuentran presentes también en esta señal.

La señal en 51.8 ppm. en RMN^{13}C Se asigna al Carbono # 10 con la presencia de un grupo metoxilo, corroborándose con la señal en RMNP a 3.13 ppm., la cual integra para tres protones.

En 51.75 ppm. se observa otra señal simple en el espectro RMN^{13}C con otro grupo metoxilo y se apoya mediante la presencia de una señal simple en RMNP a 3.05 ppm. que integra para los tres protones del metoxilo. La presencia de estos dos grupos metoxilos se corrobora mediante el espectro de infrarrojo, ya que aquí se observan

señales para éteres, intensas entre $1370-1460\text{ cm}^{-1}$.

La razón por la que los grupos metoxilos dan señales distintas, estando éstos enlazados al mismo átomo de carbono (carbono # 4) es el efecto que ejercen los grupos alcohol y amido que se encuentran en el otro extremo de la molécula; el grupo amido (NH_2) presenta un ambiente más electronegativo que el grupo alcohol (^-OH), por lo que afecta a un grupo metoxilo y lo desplaza a campo más bajo, por lo que el metoxilo que presenta el carbono # 9, se vé afectado por el grupo amido y el carbono # 10 por el grupo alcohol.

Por último, el espectro de RMN^{13}C presenta una señal mas en 47.50 ppm . Esta señal se asigna al carbono # 7. La presencia de los dos protones en este carbono se registran mediante la presencia de una señal simple a 2.40 ppm . en RMN^{P} , y que integra para dos protones, los cuales no tienen interacción alguna con protones vecinos, por lo que se considera un metileno aislado.

Con todos los datos anteriores, podemos concluir que efectivamente la estructura encontrada, corresponde a la siguiente formula molecular $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{NO}_4\text{Br}_2$. y de nombre 3,5-dibromo-1-hidroxi-4-dimetoxi-ciclohexadieno-acetamida.

La esponja marina *Aplysina* sp. sintetiza metabolitos secundarios los cuales son característicos de esta especie, por lo que son utilizados como indicadores quimiotaxonomicos y está comprobado que son derivados de los aminoácidos

fenilalanina y tirosina (Faulkner, 1984).

Otros autores han aislado el mismo compuesto de otras especies de *Aplysina*. Sharma y Burkholder, 1967 aislaron el mismo compuesto de *Aplysina fistularis*, pero ellos asumen que tal compuesto se encuentra en forma natural como compuesto y no puede ser formado por adición del disolvente. Faulkner y Andersen, en 1973 reportaron el dimetoxi-cetal de una especie no descrita de *Aplysina*, y ellos asumen que puede ser formado a partir de un precursor común por la adición de un disolvente durante el proceso de extracción, y dependiendo del disolvente se puede obtener diferentes compuestos, siendo estos diferentes compuestos derivados del mismo precursor y por consecuencia derivados de fenilalanina y tirosina (Faulkner, 1984).

En el presente estudio se puede observar que se cuenta con un metabolito secundario con actividad biológica 'in vivo'. El compuesto pierde su actividad al momento de ser purificado, ya que el solvente que se utilizó (metanol) modifica la estructura del compuesto.

El compuesto puro un dimetoxi es inactivo y la actividad a lo largo de la extracción era ocasionada por otro compuesto, una dienona que se encontraba en menor concentración y al momento de la cristalización su estructura cambia a la del dimetoxi.

La esponja marina *Aplysina* sp. sintetiza los metabolitos secundarios en el mesohil y son transportados

dentro de unas células especializadas globulares hacia la superficie del canal exhalante por donde son exudados como un mecanismo de quimio-defensa capaz de actuar contra sus depredadores u otros organismos capaces de vivir como epifitos.

5 CONCLUSIONES

1. El compuesto aislado de la esponja marina *Aplysina* sp. se identificó como un dimetoxi-ketal de fórmula molecular de $C_{10}H_{13}NO_4Br_2$, y de nombre 3,5 dibromo-hidroxi-ciclohexadieno-acetamida.

2. La esponja marina *Aplysina* sp. presenta un metabolito secundario con actividad biológica, el cual pierde su actividad cuando se disuelve con metanol.

APENDICE 1

BIOSINTESIS DE FENILAMINA Y DIBROMOTIROSINA-DERIVANDO
COMPUESTOS ANTIMICROBIALES POR LA ESPONJA MARINA *APLISYNA*
sp.

Los productos naturales marinos han enfocado un reciente interés como un potencial farmacéutico, proveniente de esponjas marinas las cuales han mostrado ser ricas en compuestos bioactivos. Los fenoles y quinonas bromados aislados de especies de *Aplysina* (*Verongia*) incluyen agentes activos antibacteriales los cuales se proponen ser derivados de mono o dibromotirosina, Minale *et al.*, (1976). Se piensa que los metabolitos secundarios con actividad biológica en la esponja marina *Aplysina sp.* son sintetizados en células especializadas, tales células son de estructura globular realizándose dentro de ellas la actividad enzimática encargada de la transformación de los aminoácidos a los compuestos activos.

Sin embargo varios autores han publicado que dicha conversión 'in vivo' no ha sido demostrada. Adrienne *et al.* (1981), reinvestigó la biosíntesis de *Aplysina fistularis* usando precursores encerrados en liposomas y demostró la conversión de la fenilalanina (phe) y tirosina (Tyr) en una dienona así como el producto rearranged dibromohomogentisamida, tanto la phe y tyr mostraron ser precursores biosintéticos de la dienona, ocurriendo una

rápida conversión de phe y tyr por la esponja. La incorporación de tyr en liposomas en el experimento de alimentación (relativo al que no tiene liposomas) argumenta que esta técnica es de importante valor para el futuro de estudios de biosíntesis marina, particularmente para la introducción de precursores menos polares. La ruta biosintética se obtuvo con los estudios con precursores marcados Adrienne et al. (1981), así como la conocida ocurrencia de nitrilos de bromofenol y oximas en especies de Verongia (Minale, 1976).

APENDICE 2

QUIMIOTAXONOMIA DE *APLYSINA* *sp.*

Los estudios quimiotaxonómicos, requieren de datos biológicos y químicos:

1. La caracterización química de los compuestos deberá ser precisa.
2. El asignamiento taxonómico de cada espécimen del cual los compuestos fueron extraídos deberá ser acertada, y mantener un estándar aceptable en cuanto a los especímenes a estudiar.
3. El espectro de especies muestreadas en cualquier investigación deberá ser lo suficientemente amplio, que permita los límites de variación natural correspondientes al taxa a ser estudiado.

El primer trabajo relacionado con quimiotaxonomía se llevo a cabo por Bergmann (1949) trabajando en colaboración con M.W. De Laubenfels, un taxonomista de esponjas. Bergmann contribuyo relacionando publicaciones anteriores sobre compuestos lípidos en invertebrados, e hizo unos comentarios detallados acerca de la integridad taxonómica entre varios grupos de demospongiae. Además Bergmann's trabajo con otras categorías de diferentes compuestos, en mayor énfasis con esteroides, y todas las sugerencias taxonómicas se basaron en en la comparación de los distintos tipos de esteroides de un rango de organismos. Desde el trabajo de Bergmann se han realizado algunos trabajos quimiotaxonómicos: basándose en

esteroles y pigmentos (Liaci, 1964, 1965), aminoácidos libres (Bergquist y Hartman, 1969, Bergquist y Hogg, 1969), esteroides (Bergquist et al., 1980; De Rosa et al., 1973; Voogt, 1976), mucopolisacáridos ácidos (Evans y Bergquist, 1977; Stempien, 1966), compuestos derivados de dibromotirosina, furanoterpenos y derivados de bromopirrole (Cimino et al., 1975), ácidos grasos (Litchfield et al., 1976). Los resultados de estas contribuciones fueron revisadas por Bergquist (1978).

Problemas en quimiotaxonomía: Frecuentemente las esponjas se encuentran asociadas a otros organismos, como; extraños organismos en su superficie, en los canales de su sistema y en la matrix intercelular, lo cual constituye gran parte de su cuerpo. Se debe tener cuidado en saber la proveniencia del compuesto, cuánto proviene de la esponja y cuánto a sus asociados, o determinar si el compuesto es un producto de la esponja o un producto de diferente origen. En algunos casos las esponjas tienen extremadamente altas densidades de Cyanophyceae y/o bacterias. Hay 2 otros posibles orígenes de un compuesto en particular:

- 1) puede ser el producto de interacción biológica entre la esponja y su simbiote.
- 2) La elaboración metabólica por la esponja de un precursor proveniente del simbiote.

La clasificación de Demospongiae dentro de toda Porifera se ha hecho basándose en las características de las espículas

de su esqueleto. Desde el trabajo de Levi (1956) ha existido un cambio y los esquemas para la clasificación han incorporado: características reproductivas, bioquímicas, histológicas y ultraestructurales, en adición con detalles esqueléticos.

6 REFERENCIAS

1. ALBERICI, Braekman, Dalozze & Tursch, 1982. Tetrahedron. 38. USA: 18.
2. ADRIENE A. Tymiak and Kenneth L. Rinehart, Jr, 1981. Biosynthesis of Dibromotyrosine-Derived Antimicrobial Compounds by the Marine sponge *Aplysina fistularis* (*Verongia aurea*). J. Am. Chem. Soc. 103. USA: 6763-6765.
3. ALBIZATI Kim F. and D. John Faulkner. 1985. Stevensine, a novel Alkaloid of an unidentified Marine Sponge. USA. Journal of Organic Chemistry, 50, 4163.
4. BARNES, 1977. Zoologia De Los Invertebrados. 3ra Edición. México, 69-82.
5. BASLOW, 1977. Marine Farmacology. 2nd Demospongiae. Mar Biol. USA. 3. 247-263.
6. BERGQUIST P.R. and W.D. Hartman. 1969. Physiologically active substances from marine sponges II. Antimicrobial substances present in extracts of the sponge *Verongia archeri* and other species of the genus *Verongia*. Marine Biology. USA. 3. 347-368.
7. BERGQUIST P.R. and Hartman. 1969. Free amino acids patterns and the classification of the Demospongiae. Mar. Bio. USA. 3. 247-263
8. BERGQUIST P.R., 1978. Sponges. Univ. of Calif. Press, Berkeley.

9. BERGQUIST P.R. & Bedford J.J., 1978. The Incidence of antibacterial activity in marina Demospongiae; systematic and geografic considerations. *Marin. Biol.* 46. 215-221.
10. BERGQUIST P.R. & Wells R.J. 1983. Chemotaxonomy of the Porifera: The Development and Current Status of the Demospongiae. *Marine Natural Reports*. Vol 5. 1-47.
11. CAPON Robert J. and D.John Faulkner. 1985. Herbasterol an Ichthyotoxic 9,11-Secosterol from the sponge *Dysidea herbacea*.USA. *Journal of Organic Chemistry*, 50, 4771-4773.
12. DE LUCA P., M. De Rosa, L. Minale, and G. Sodano. 1973. Marine Sterols with a New Pattern of Side-chain alkylation from the Sponge *Aplysina* (= *Verongia*) *aerophoba*. *J.C.S. Perkin I.* 2132-2135.
13. FAULKNER D.J. & Andersen R.J., 1972. Antibiotics from marine organisms of the gulf of california. *Food-Drugs from the sea Conference*. England. 111-115.
14. FAULKNER D.J. & Andersen R.J., 1973. A novel antibiotic from a sponge of the genus *Verongia*. *Tetrahedron Letters*. 14. Great Britain. 1175-1178.
15. FAULKNER D.J., 1977. Interesting aspects of Marine Natural Products Chemistry. *Tetrahedron*. 33. Great Britain.1421-1443.
16. FAULKNER D.J. 1984. *Natural Products Reports*. England.

- 551-567.
17. FAULKNER, D.J. 1980. Sesterpenos from Spongidia. *Journal Organic Chemistry*. 45. 24. 4976-4979.
 18. FATTORUSSO E., L. Minale, and G. Sodano. 1972. Aeroplysinin-1, an Antibacterial Bromo-compound from the Sponge *Verongia aerophoba*. *J.C.S. Perkin I*. 16-18.
 19. HALL L.D., and Jeremy K.M. Sanders. 1980. Complete Analysis of H NMR Spectra of Complex Natural Products Using a Combination of One-and Two-Dimensional Techniques, 1-Dehydrotestosterone. *Journal of the American Chemical Society*. USA. Vol 102, number 18. 5703-5711.
 20. MC.CLINTOCK J.B. 1987. Investigation of the relationship between invertebrate predation and biochemical composition, energy content, Spicule armament and toxicity of benthic sponges at Mc Murdo Sound, Antarctica. USA. *Marine Biology*. 94. 479-487.
 21. MOODY K., R.H. Thompson, E. Fattorusso, L. Minale, and G. Sodano. 1972. Aerothionin and Homoaerothionin: Two tetrabromo Spirocyclohexadienylisoxazoles from *Verongia* Sponges, *J.C.S. Perkin I*. 18-24.
 22. MORRIS, Abbott and Harderlie. 1980. Intertidal Invertebrates of California. Cap 2:

- Porifera: 'Sponges' Bakus Gerald J. & Abbott Donald P. pps. Stanford, Ca. USA. 21-39.
23. PRETSCH Erno, Clerc T., Seibl J., Simon W. 1983. Tables of Spectral for Structure Determination of Organic Compounds. Germany.
 24. SHARMA G.M. and P.R. Burkholder. 1967. Studies on the antimicrobial substances of sponges II. Structure and Synthesis of a bromine-Containing Antibacterial compound from a marine sponge. Tetrahedron Letters. Great Britain. 42. 4147-4150.
 25. SHARMA G.M., B. Vig and P.R. Burkholder. 1967. Studies of the Antimicrobial substances of Sponges III. Chemical properties of some antibacterial compounds from Marine Sponges.
 26. SHARMA, G.M., B. Vig and P.R. Burkholder. 1970. Studies on the Antimicrobial Substances of Sponges. IV. Structure of a Bromine-Containing Compound from a Marine Sponge. J. Org. Chem. 35. 8. 2823-2826.
 27. SIMPSON Tracy L. 1984. The Cell Biology of Sponges. USA.
 28. THOMPSON, J.E., Walker, R.P. Wratten, S.J. and Faulkner, D.J. 1982. Tetrahedron. 38. 1865.
 29. THOMPSON J.E. 1985. Exudation of biologically-active metabolites in the sponge *Aplysina fistularis*. I. Biological evidence. Marine Biology. USA. 88. 23-26.

30. WALKER, R.P. Thompson, J.E., and Faulkner. D.J. 1985.
Exudation of biologically-active metabolites in
the sponge *Aplysina fistularis*. II. Chemical
evidence. Mar Biol. 88. 27-32.