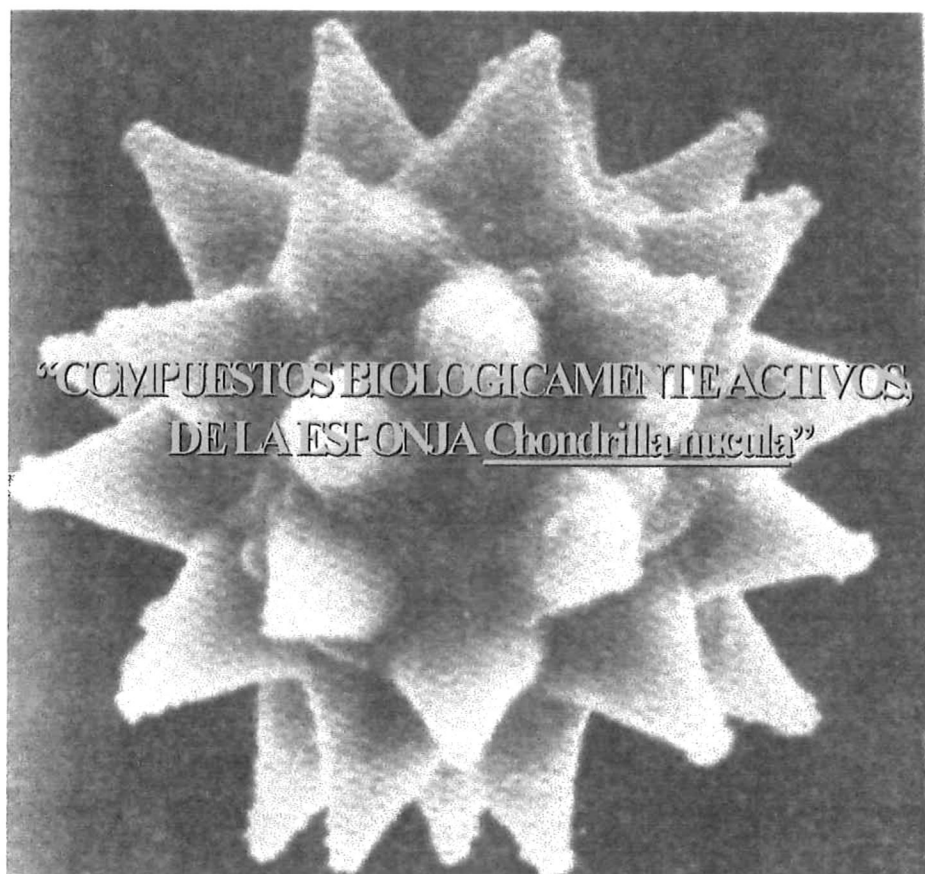
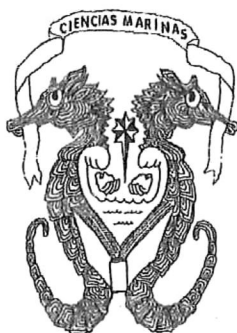




UNIVERSIDAD AUTONOMA DE
BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS



"COMPUESTOS BIOLOGICAMENTE ACTIVOS
DE LA ESPONJA Chondrilla nucula"



TESIS
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
OCEANOLOGO
PRESENTA:
ALFREDO MONTIEL PICHARDO

Ensenada, Baja California, Septiembre 1999.

**"COMPUESTOS BIOLOGICAMENTE ACTIVOS
DE LA ESPONJA CHONDRILLA SP"**

TESIS

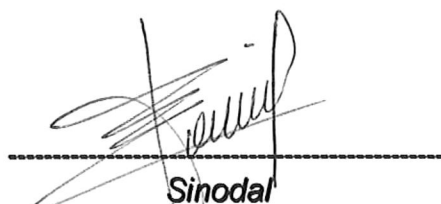
QUE PRESENTA

ALFREDO MONTIEL PICHARDO

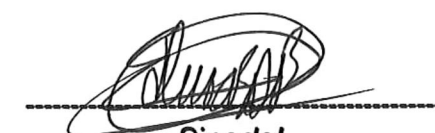
APROBADA POR:



Presidente del Jurado
M.C. Juan Antonio Fernández Apango



Sinodal
M.C. Irma E. Soria Mercado



Sinodal
M.C. Eduardo Durazo Beltrán

RESUMEN

Se llevaron a cabo tres colectas de la esponja marina *Chondrilla nucula*, esta se realizó en Bahía Concepción en la playa Santispac Baja California Sur, México, la cual se localiza a los 111°53' de longitud W y los 26°44' de latitud N. El objetivo del presente trabajo fue el aislar, purificar y caracterizar las fracciones poseedoras de los compuestos activos contra *Artemia salina* presentes en la esponja marina *Chondrilla sp.* para esto se llevaron a cabo fraccionaciones de extractos etanólicos de las muestras; mediante cromatografías por columna, fase normal y fase reversa C₁₈, así como CCD (Cromatografía en Capa Delgada). Las fracciones y subfracciones resultantes fueron sometidas a pruebas de actividad sobre *Artemia salina*, la cual correlaciona positivamente con actividad citotóxica. Para caracterizar los compuestos presentes en las muestras y corroborar la actividad entre estas se recurrió a la espectroscopia por IR (Infrarojo) y RMN (Resonancia Magnético Nuclear), la cual mediante la comparación entre señales nos permitió ver la similitud entre las fracciones activas. Finalmente a partir de la esponja marina *Chondrilla nucula* se aislaron y tipificaron un total de 30 fracciones de las cuales únicamente 18 presentaron actividad sobre *Artemia salina*. De los 18 compuestos activos contra *A.salina* sólo uno proviene de la fracción no polar siendo con probabilidad ácidos grasos. Se pudo observar que las fracciones polares presentaron la mayor actividad en % de mortalidad contra *Artemia salina*.

INDICE

	PAGINA
INTRODUCCIÓN.	1
ANTECEDENTES.	5
OBJETIVO.	9
METODOLOGIA.	
Area de colecta.	10
Criterios de selección del área.	10
Colecta e identificación de la especie.	10
Numero de muestras.	12
Fechas de colecta.	15
Aislamiento y purificación.	
Obtención de Extractos.	15
Eliminación de materia orgánica.	15
Concentración del extracto.	16
Eliminación de humedad.	16
Fraccionación de los compuestos.	16
Determinación de la bioactividad.	24
Metodología para el bioensayo.	25
Caracterización por espectroscopia.	26
Espectroscopia por IR.	26
Espectroscopia por RMN.	26

RESULTADOS.

Fraccionación de los extractos.	28
Resultados de Bioactividad.	
Bioactividad de las fracciones.	29
Análisis Espectral.	40
Espectroscopia por Infrarojo (IR).	40
Espectroscopia Por Resonancia Magnético Nuclear (RMN).	41

DISCUSIONES.	45
---------------------	-----------

CONCLUSIONES.	53
----------------------	-----------

BIBLIOGRAFIA.	54
----------------------	-----------

INDICE DE TABLAS

TABLA I. Sistemas y volúmenes de disolventes utilizados para la fracción 3M ₃ F.AcOEt.....	21
---	----

TABLA II. Sistemas y volúmenes de disolventes propuestos por Blunt J.W. (1987), para la columna 3M ₄	22
---	----

TABLA III. Prueba de actividad contra <i>Artemia salina</i> para las fracciones 3M ₃ - f.hex (hexano) , 3M ₃ - f.AcOEt (acetato de etilo) y 3M ₃ - f.H ₂ O (acuosa). Así como para las fracciones A-1, B-23, C-27, D-30, E-42, F-47, G-56, H-60, I-63	30
---	----

TABLA IV. Prueba de actividad contra <i>Artemia salina</i> para las fracciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 presentes en la fracción 3M ₃ -F.AcOEt	31
--	----

TABLA V. Prueba de actividad contra <i>Artemia salina</i> para los extractos 3M ₄ T-1, extracto 3M ₄ T-2 y extracto 3M ₄ T-3 pertenecientes a tres puntos de muestreo dentro de la zona de colecta	33
---	----

TABLA VI. Prueba de actividad contra <i>Artemia salina</i> para las 13 fracciones, resultado de la cromatografía en columna fase reversa C ₁₈ , presentes en el Extracto 3M ₄	34
---	----

TABLA VII. Prueba de actividad contra <i>Artemia salina</i> para las 15 subfracciones obtenidas a partir de cromatografía en capa fina de las fracciones 9 y 10.....	35
--	----

TABLA VIII. Prueba de actividad contra <i>Artemia salina</i> para los extractos 3M₆ T-2 y extracto 3M₆ T-3 pertenecientes a dos puntos dentro de la zona de colecta	37
--	-----------

TABLA IX. Prueba de actividad contra <i>Artemia salina</i> para las 8 subfracciones resultado de cromatografía en capa fina de las fracciones 9 y 10.....	38
--	-----------

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Localización del área de colecta, mapa de Bahía Concepción, mostrando el área de Santispac resaltada con un círculo..... 11

Figura 2.- Espículas de tipo Esferáster presentes en *Chondrilla nucula*...13

Figura 3.- Detalle de una espícula de tipo Esferáster presente en *Chondrilla nucula*.14

Figura 4.- Diagrama en el que se muestra el proceso de fraccionación de la muestra 3M₃, resultados en pruebas de actividad sobre *A. salina*, así como las fracciones que se sometieron a análisis de IR y RMN..... 32

Figura 5.- Diagrama en el que se muestra el proceso de fraccionación de la muestra 3M₄, resultados en pruebas de actividad sobre *Artemia salina*, así como los fracciones que sometieron a análisis de RMN y los valores de R_f de cada subfracción..... 36

Figura 6.- Diagrama en el que se muestra el proceso de fraccionación de la muestra 3M₆, resultados en pruebas de actividad sobre *Artemia salina*, así como las fracciones que sometieron a análisis de RMN y los valores de R_f de cada subfracción..... 39

AGRADECIMIENTOS:

A mi director de tesis y amigo M.C. Juan Antonio Fernández Apango por todo el tiempo y paciencia invertidos en la realización de este trabajo, así como la confianza que deposito en mi persona. Gracias profesor !

A mis sinodal, M.C. Irma Esthela Soria Mercado por su tiempo y valiosos comentarios para la realización de esta tesis y por brindarme su amistad a pesar de todo.

A mi sinodal M.C. Eduardo Durazo Beltran por sus valiosos comentarios para la realización de esta tesis.

A todos mis compañeros de laboratorio: Liza Kelly, Nirari Cardenas, Alexandra, Maricarmen y Monica M.P.

A los profesores Felipe C. y Dora W.

DEDICATORIA :

Al señor Alfredo Montiel Higuera, por su apoyo y paciencia a lo largo de mi vida.
..... Gracias por todo papá !.

A la señora Rosa María Pichardo de Montiel , por creer siempre en mi y nunca dejarme en el olvido, pronto nos volveremos a ver, te lo prometo.
..... Te quiero mamá !.

A la señora Consuelo Cervantes de Pichardo, por guiarme en gran parte de mi vida y no dejarme nunca solo. Gracias mamá Chelito!.

A mis hermanos: Mauricio por ser la cabeza de mi familia; Cesar por nunca dejar de ser quien es; Gabriela por siempre intentarlo y Ulises por ser la persona mas noble que he conocido; por ser como son , por el apoyo y animo brindado..... Gracias Hermanos!.

A Monica Montiel P. por ser una de las razones mas grandes para seguir adelante, por nunca darme la espalda cuando mas la necesite y por alegrar mis díasGracias Hermanita!

A Ivan Gutiérrez Palacios (Chino) , por soportarnos todo este tiempo; por ser mi mejor amigo y hermano. Gracias cuñado!.

A la Familia Montiel y Familia Pichardo , en especial a mi tío Alfonso Pichardo por siempre animarme.

A Mis amigos: Omar, Camilo, Rex , Jose Luis, Fernando, Cesar, Gerardo, Alejandro Kurczin y a mi super amiga Getsemany.

INTRODUCCIÓN.

El hombre siempre ha enfrentado el problema de la salud, por lo que naturalmente ha tenido necesidad de descubrir productos que suplan estas necesidades, apoyándose en disciplinas como la química de los productos naturales y la farmacognosia. Por la naturaleza terrestre del hombre, se ha enfocado al estudio de compuestos derivados de organismos también terrestres, pero en los últimos 20 años estas dos ramas de la ciencia se han desarrollado en el aspecto marino y debido a la gran diversidad y abundancia de organismos que en este ecosistema se presentan, los hacen en nuevos objetos de estudio (Gregson *et al.* , 1979).

Los océanos y mares del mundo cubren aproximadamente el 70.6 % de la superficie del planeta incluyéndose en éstos, una gran variedad de especies (Baslow, 1977). Es el papel de la oceanología el estudio integral de los océanos, de ahí el buscar compuestos químicos de interés, pues de alguna manera, los organismos de los que provienen interactúan con el medio marino.

Existen notables diferencias entre los compuestos bioactivos (aquellos que interaccionan con los sistemas bioquímicos y/o fisiológicos de otros organismos) derivados de organismos marinos y aquellos obtenidos de organismos terrestres. Estas diferencias se originan principalmente en la composición química de los organismos de ambos ecosistemas. Un punto de

partida para la mayoría de los estudios quimicoecológicos son precisamente estas características químicas, únicas de los organismos marinos; Por ejemplo el 99 % de los compuestos terpenos marinos se encuentran halogenados con Cl^- o Br^- , característica que no se presenta en los compuestos terpenos terrestres, por otro lado los compuestos terpenos terrestres se encuentran altamente oxigenados, a comparación de los terpenos de origen marino los cuales contienen menos de un 30% de oxígeno en sus estructuras (Bakus *et al.*, 1986).

Los productos naturales derivados de plantas y animales que presentan actividad biológica poseen gran importancia por su potencial farmacológico, además de que su conocimiento es de gran valor en la agroquímica, pesquerías, salud pública, química de los alimentos, química de los productos naturales, biología marina, ecotoxicología, ecología química del medio ambiente marino, y biotecnología (Kelly Gutiérrez, 1997), y aún en etnohistoria (Tyler, 1995), medicina tradicional (Farnsworth, 1980) y medicina veterinaria (Sikarwar *et al.* 1994)

La investigación en el campo de la farmacología ha progresado a tal grado que se pueden catalogar cientos de agentes fisiológicamente activos provenientes de organismos marinos. En la literatura se muestran ejemplos de antibióticos, antifungales y antilevaduras, encontradas en organismos representantes del reino monera; sustancias ictiotóxicas, antiespasmódicas,

anticoagulantes, antivirales en protistas; antibióticos, factores de agregación y factores de crecimiento en esponjas (Baslow, 1977). Esto coloca a los organismos marinos como un recurso potencial para la industria farmacológica, que está buscando continuamente nuevas estructuras químicas activas en diferentes funciones (Baker; 1984).

Las esponjas (Phylum Porifera) son los animales pluricelulares más primitivos, no poseen tejidos ni órganos verdaderos y sus células despliegan considerable independencia. Sus estructuras están sostenidas por un esqueleto de fibras de espongina y de espículas silíceas o calcáreas, o bien de ambas cosas. Sus cuerpos están organizados alrededor de un sistema de conductos de agua, una especialización correlacionada con el sesilismo. La forma de crecimiento es parte de una respuesta adaptativa a las restricciones en el espacio disponible, la inclinación del sustrato y velocidad de las corrientes. Se conoce además que la alimentación, el intercambio gaseoso y la eliminación de desechos dependen del flujo de agua a través del cuerpo (Barnes, 1988).

Las esponjas de la clase Demospongiae son las más comunes, de mayor diversidad, abundancia y distribución, por lo que han recibido mayor atención por químicos y bioquímicos. Más de un ciento de especies de esponjas de esta clase se han investigado por sus metabolitos secundarios, lo cual ha llevado a descubrir más de doscientos nuevos compuestos con

características estructurales únicas y sin fuentes terrestres paralelas (Scheuer, 1978).

Brusca (1973) menciona que el Golfo de California es considerado como un área de gran interés producto de los altos niveles de endemismo.

Ireland *et al.*(1993) encontraron 736 metabolitos nuevos reportados, obtenidos de esponjas en el período de 1977 a 1985.

En México los problemas de salud son muy notorios, el cáncer se presenta como la segunda causa de muerte en el país, tan sólo en 1994 el número de casos de cáncer fue de 46,384, (S.S.A., 1994).

Anteriormente se recurría a la herbolaria, (uso de hierbas nativas de la región con el fin de curar enfermedades), con la llegada de la medicina moderna el uso de ésta pasa a segundo plano ya que la primera proporcionaba fármacos muy efectivos; actualmente 120 preparaciones derivadas de plantas y arbustos terrestres son comercialmente vendidas en Estados Unidos (Cox y Balick, 1994); por el contrario el empleo de medicamentos de origen marino es en la actualidad muy pobre a nivel mundial y en nuestro país lo es todavía más, solamente el "Alexán" de los laboratorios Pfizer es comercializado en México y es un derivado sintético de un metabolito obtenido de la esponja *Cryptotethya cripta* (Rosenstein, 1988).

México es un país que cuenta con una basta riqueza en número de especies de interés, ocupando uno de los primeros lugares por su megadiversidad biológica, es posible que algunas de ellas sean poseedoras de compuestos con características farmacológicas, con apenas el 1.4% de la superficie del planeta México posee cerca del 10% de todas las especies conocidas del mundo SEMARNAP (1996).

En la actualidad el estudio de nuevos fármacos a nivel nacional es muy escaso, y mucho más todavía el estudio de fármacos a partir de organismos marinos; de gran importancia es el que se empiecen a desarrollar proyectos en los cuales se pretenda dar una visión completa de las posibles fuentes de productos con valor para la industria farmacológica en México.

ANTECEDENTES

Las esponjas tienen una asombrosa cantidad de metabolitos secundarios, particularmente terpenos, de los cuales, muchos presentan actividad *in vitro* contra un gran número de microorganismos terrestres (Faulkner, 1978; Berquist y Wells, 1983, citados por Scheuer, 1986).

Ireland *et al.* (1993) realizaron un análisis de distribución de metabolitos secundarios nuevos reportados para el período comprendido entre 1977 y 1985, mostrando que el 93% de los compuestos de origen marino reportados

pertenecen a los siguientes grupos (macroalgas 35.22 %, esponjas 29.36 %, coelenterados 22.34 % y equinodermos 7.58 %).

Nigrelli *et al.* (1959; citados por Green, 1974) fueron los primeros en obtener un amplio espectro de compuestos antimicrobianos de una esponja marina; La sustancia llamada ectyonina extraída de la esponja *Microciona prolifera*, con propiedades antimicrobianas contra bacterias grampositivas, gramnegativas y acción contra *Candida albicans*.

Sharma *et al.* (1968; citados por Green, 1974) reportaron las propiedades químicas de algunas sustancias antibióticas de las esponjas *Dysidea herbacea*; *Homaxinella* sp; *Pellina carbonaria*; *Phakellia flabellata*; *Plakortis* sp; *Aplysina* (sin. *Verongia*) *fistularis* y *A. cauliformis*.

Andersen y Faulker en 1973 (citados por Green, 1974) reportaron la actividad antibacteriana de invertebrados del Golfo de California. Encontrando que *Verongia thiona* y *Verongia* sp. (*Verongia* = *Aplysina*) producen sustancias con propiedades antibacterianas.

Green (1974) probó la actividad biológica de extractos metanólicos y acetónicos de esponjas marinas colectadas en el golfo de México y en la costa del Pacífico de Norteamérica en zonas templado-frías, templado-cálidas, y tropicales. De las 24 especies de esponjas estudiadas, extractos de 15

especies mostraron tener actividad contra *Bacillus subtilis* y extractos de 12 especies mostraron tener actividad contra *Escherichia coli*.

Pettit, *et al.* (1981) reportaron la búsqueda de metabolitos en organismos del Golfo de California incluyendo entre éstos a las esponjas por sus compuestos activos, en las zonas de Bahía Kino en Sonora en los años de 1971 y 1976.

Sigel *et al.* (1970; citados por Scheuer, 1986) observaron efectos citotóxicos en un extracto crudo de *Haliclona viridis* en células cancerosas humanas KB. Actualmente se considera a las esponjas como una de las fuentes más ricas de metabolitos activos de interés, incluyéndose en éstos su poder citotóxico (Baker, 1984; Ireland *et al.* 1993).

Munro y Blunt (1987) mencionan que el ensayo con *Artemia salina* es una prueba simple de letalidad y no es específica para actividad antitumoral. Por otro lado mencionan que es un buen indicador de citotoxicidad y es ideal para la rápida evaluación de procedimientos de fraccionación.

De Rosa *et al.* (1989) reportan la actividad biológica en base a ensayos con *Artemia salina* para determinar la citotoxicidad, de un derivado del avarol aislado de la esponja marina *Dysidea avara*.

De Rosa *et al.* (1994) determinaron la citotixicidad de 23 compuestos biológicamente activos (hidroquinonas) aislados de las esponjas *Ircinia*

spinosula y *Dysidea avara*, por medio de ensayos de letalidad con *Artemia salina* el cual correlaciona con citotoxicidad en células cancerosas.

Chondrilla nucula es una esponja de la clase Demospongiae, diferente a otras esponjas comunes siendo esta muy densa ; En su forma, tamaño y color se asemeja al hígado de pollo. *Chondrilla nucula* se desarrolla en un rango de hábitats desde arrecifes de coral hasta pantanos de manglar. En los arrecifes se desarrolla como una delgada capa incrustada; en el manglar se desarrolla alrededor de las raíces sumergidas a manera de una piel lobulada. Experimentos previos utilizan a la esponja como alimento para peces predatorios de arrecife mostrando un alto grado de variabilidad en las defensas químicas de *Chondrilla nucula* (Swearingen y Pawlik, 1998).

Carballeira y Maldonado(1986), reportan el aislamiento y la caracterización de una cadena de ácidos grasos: entre ellos el ácido 5,9-Hexadecadienoico proveniente de la esponja marina *Chondrilla nucula*.

Una revisión a la longitud de las cadenas de ácidos grasos en diferentes esponjas, ha revelado que la esponja *Chondrilla nucula* presenta un 38% de cadenas C_{30} presente en los ácidos grasos de la esponja. Se tiene caracterizada la estructura de C_{30} y se le ha identificado como un nuevo ácido graso poliinsaturado (Litchfield et al., 1980).

OBJETIVO:

Aislar, purificar y caracterizar las fracciones poseedoras de los compuestos activos contra *Artemia* salina presentes en la esponja marina *Chondrilla* sp. colectada en Playa Santispac, Bahía Concepción, B.C.S.

METODOLOGIA

Area de colecta:

La colecta de los organismos se realizó en Bahía Concepción en la playa Santispac en Baja California Sur, México, la cual se localiza a los 111°53' de longitud W y los 26°44' de latitud N. (fig. 1)

Criterios de selección del área:

Los criterios de selección se basaron en prospecciones previas a lo largo de la península. Se seleccionó a la playa de Santispac por la presencia de organismos y fácil acceso a la zona de colecta.

Colecta e identificación de la especie:

Las colectas se realizaron mediante técnicas de buceo libre y scuba en la zona intermareal. Los organismos fueron colectados desprendiendo los organismos del sustrato rocoso con espátulas. Posteriormente se limpiaron removiendo partículas indeseables (organismos visibles, arena, etc), una parte fue preservada en hielo para su posterior identificación taxonómica y el resto puestos en bolsas de plástico con cierre hermético (tipo "Zip-lock") hasta el arribo al laboratorio.

Una vez en el laboratorio, las esponjas se limpiaron de organismos epibiontes y flora o fauna vecina, cortados en fragmentos de 1-2 cm por lado y

sumergidos en etanol al 95% (Encarnación y Keer, 1992), con el doble propósito de preservar las muestras y comenzar con la extracción de los metabolitos.

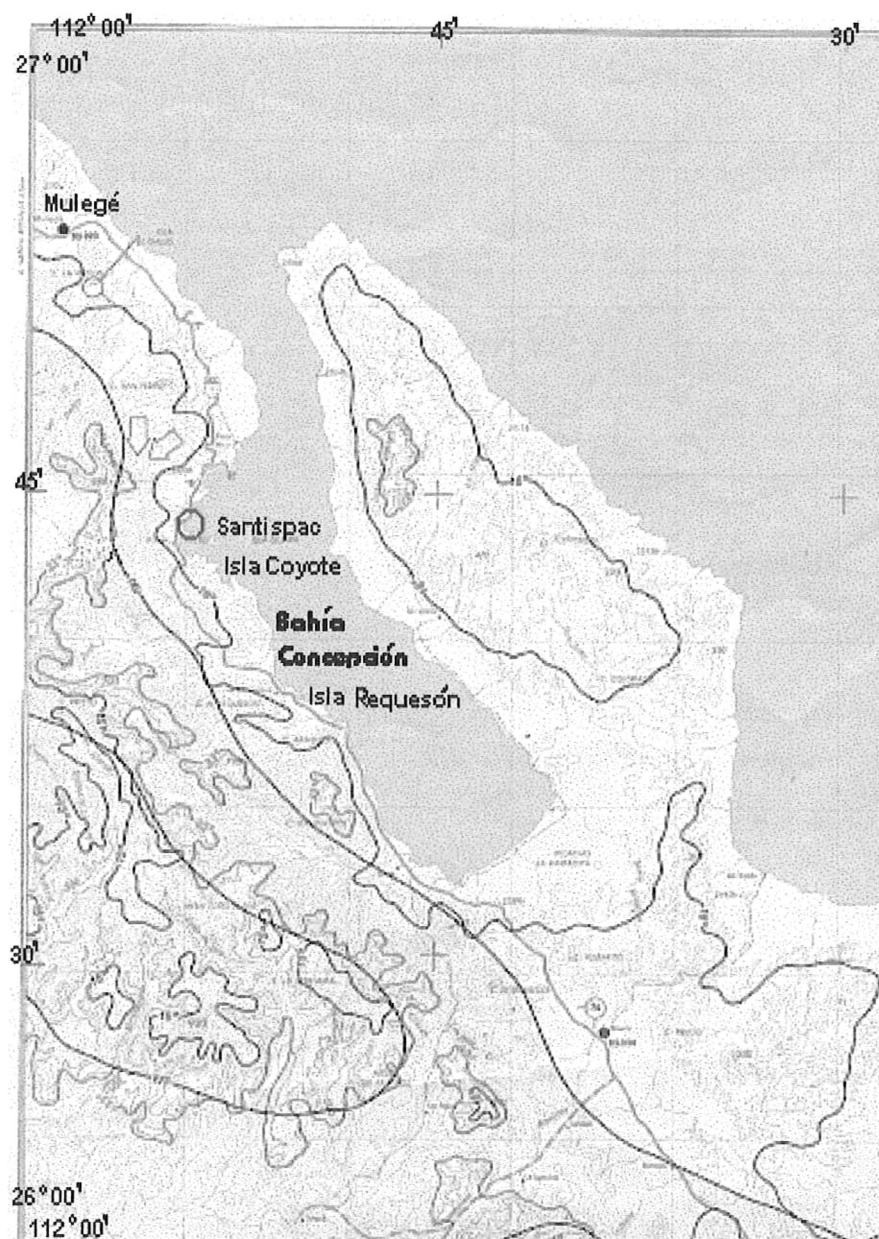


Figura 1.- Localización del área de colecta, mapa de Bahía Concepción, mostrando el área de Santispac resaltada con un círculo.

La identificación de la especie se realizó con base en el trabajo de Vázquez Maldonado (1994). (fig. 2 y 3)

Phyllum: Porifera

Clase : Demospongiae

Orden : Hadromerida

Familia: Chondrillidae

Genero: *Chondrilla*

Especie: *nucula*

Número de muestras:

Se planteó una serie de colectas trimestrales con base en la presencia de organismos. Cada colecta fue de aproximadamente un kilogramo de muestra por punto. Los puntos de colecta se seleccionaron con base a la presencia de organismos en el medio; una vez escogida el área de colecta esta se mantuvo en lo sucesivo. El criterio de selección de tales puntos fue: presencia de la esponja. Al coleccionar los organismos y efectuar 3 muestreos disminuimos la posibilidad de que la actividad encontrada tenga una génesis ajena al organismo.

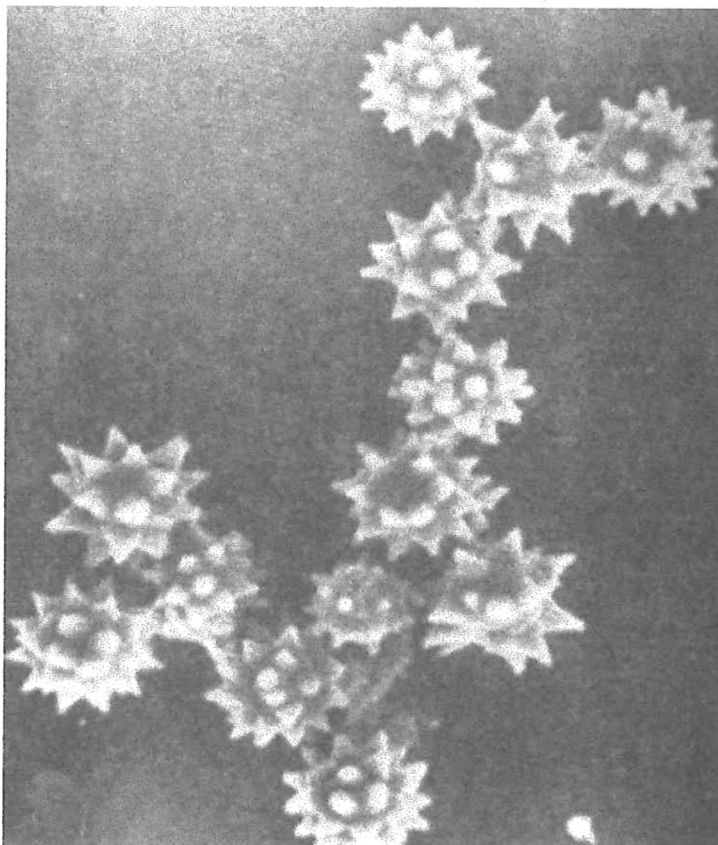


Figura 2.- Espiculas de tipo Esferáster presentes en *Chondrilla nucula*
(Tomado de Green y Gómez, 1986)

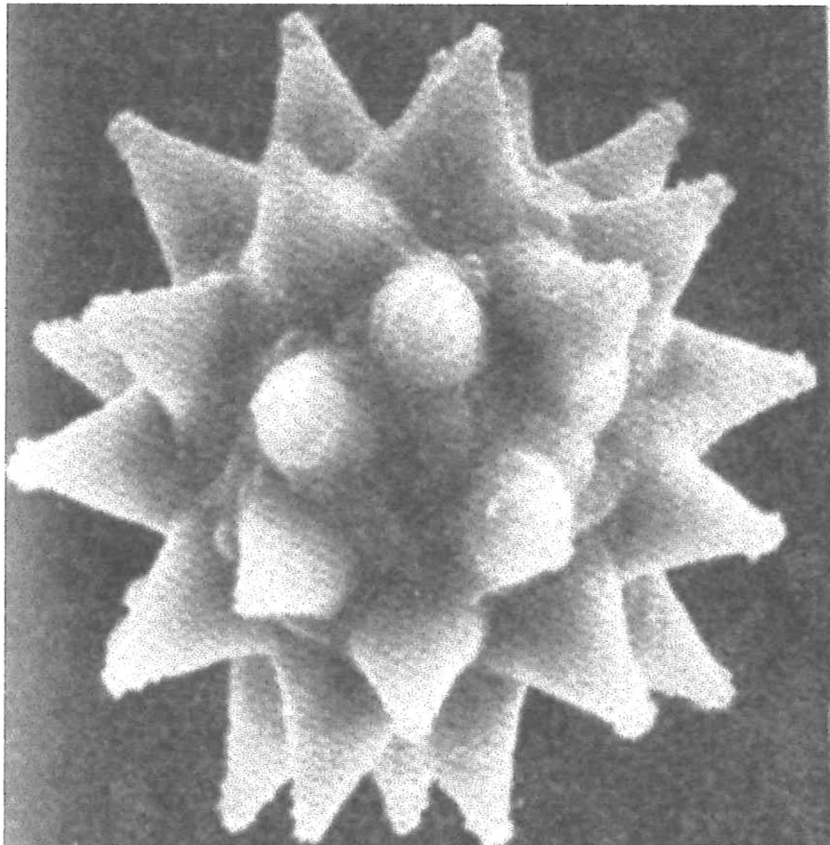


Figura 3.- Detalle de una espícula de tipo Esferáster presente en *Chondrilla nucula*
(Tomado de Green y Gómez, 1986)

Fechas de colecta :

Las colectas se realizaron en las siguientes fechas.

3^{ra} colecta 1 al 4 mayo de 1998.

4^{ta} colecta 1 al 4 agosto de 1998.

5^{ta} colecta 24 septiembre de 1998.

Aislamiento y purificación**Obtención de Extractos.**

Las esponjas correspondientes a las tres colectas fueron sumergidas en etanol con un tiempo de extracción de siete días, repitiéndose este procedimiento por tres veces bajo la relación 1:1.5 muestra (MTA): etanol (EtOH) volumen a volumen (v/v) con el objeto de extraer los compuestos bioactivos.

Eliminación de materia orgánica.

Transcurridos los siete días de extracción , el etanol fue filtrado sobre papel filtro Whatman # 4, con el propósito de eliminar la mayor cantidad de materia orgánica visible presente en el extracto.

Concentración del extracto.

Una vez libres de materia orgánica, la muestra fue concentrada por destilación a presión reducida mediante rotaevaporación (Brinkmann-Böchi), con una temperatura de baño de 45°C, con el fin de que los compuestos no se desnaturalizarán.

Finalmente se dio nomenclatura a los extractos, de la siguiente forma:

$3M_3$; $3M_4$; $3M_6$. El coeficiente 3 - representa extracción con Et-OH. El subíndice indica el número de colecta. Por ejemplo: $3M_1$ corresponde al extracto etanolico de la 1^{er} colecta

Eliminación de humedad

Una vez concentradas las muestras $3M_3$, $3M_4$ y $3M_6$ se procedió a la eliminación de humedad por 36 hrs. en un liofilizador Labconco No.18.

Fraccionación de los compuestos

Todos los extractos fueron analizados por separado, existiendo diferencias en los métodos de separación, por lo que se mencionarán por separado.

Extracto 3M₃

El extracto 3M₃ fue sometido a extracción por disolventes en embudo de separación primero en hexano y posteriormente con acetato de etilo obteniéndose tres extractos: 3M₃ - f.hex (fracción hexano) , 3M₃ - f.AcOEt (fracción acetato de etilo) y 3M₃ - f.H₂O (fracción acuosa) . Cada fracción fue concentrada mediante destilación a presión reducida y por último fue liofilizada. Posteriormente se sometieron a pruebas de actividad con la finalidad de tener un criterio bajo el cual se pudiera escoger la fracción adecuada para llevarse a separación por cromatografía en columna.

Para la fracción 3M₃ - f.hex. se realizó una cromatografía en columna Flash con gel de sílice fase normal ("Baker" Flash Chromatography Columns) (Still , 1978).

Condiciones de la columna 3M₃ - f.Hex.

- a) Medidas de la columna: 2 cm diámetro/ 55 cm altura
- b) Volumen de la columna: 200 ml
- c) Adsorbente: silica gel 230--400 mesh 60 A⁺
- d) Volumen ocupado por gel de sílice: 200 ml
- e) Cantidad de adsorbente: 94.2901gr. de gel de sílice
- f) Muestra: 0.5 g. extracto orgánico 3M₃ - f.hex
- g) Relación muestra/ gel de sílice: 1: 188
- h) Flujo de columna: 2 cm min⁻¹

Sistemas y volúmenes de disolventes utilizados.

1) Hexano (Hex)	200 ml
2) Hexano : Diclorometano (1:1) (Hex:DCM)	200 ml
3) Diclorometano (DCM)	200 ml
4) Diclorometano : Acetato de etilo (1:1) (DCM:AcOEt)	200 ml
5) Acetato de etilo (AcOEt)	200 ml
6) Etanol (EtOH)	50 ml

La columna cromatográfica fue montada vía seca. La muestra se adicionó adsorbida en 1g de gel de sílice. Se colectaron fracciones de aprox. 10ml cada una, las cuales fueron unidas de acuerdo a la semejanza que presentaban en "cromatografía en capa delgada" (ccd), dando 9 fracciones denominadas A-1 (Hexano), B-23 (Hexano : DCM), C-27 (Hexano : DCM), D-30 (Hexano : DCM), E-42 (DCM), F-47 (DCM), G-56 (DCM), H-60 (DCM), I-63 (DCM : AcOEt).

Estas 9 fracciones fueron separadas sobre placas preparativas con gel de sílice, de 5 x 20 cm (Sigma-Aldrich); a la misma concentración en dos sistemas de disolventes diferentes; DCM : CCl₄ (tetra cloruro de carbono) (50 : 50) y Hexano : éter dietílico (80:20), empleando como reveladores; luz ultra violeta (u.v.), sulfato cérico (al 1% en ácido sulfúrico (H₂SO₄) 2N) y vainillina en H₂SO₄ al 10% o una combinación de ellos.

Unas placas de gel de sílice fueron impregnadas con nitrato de plata (AgNO₃) al 10% y corridas en iguales sistemas para resolver la presencia de esteroides (Domínguez, 1988), estas placas también se revelaron empleando luz uv, y vainillina al 10 % en H₂SO₄. (fig. 4)

La fracción **3M₃-F.AcOEt.** se sometió a cromatografía en columna, que, dada su polaridad se corrió en gel de sílice fase reversa C₁₈ elaborada por nosotros (Evans M.B.; 1980).

Condiciones de la columna 3M₃-F.AcOEt.

- a) Medidas de la columna: 9 mm diámetro/ 46 cm altura
- b) Volumen de la columna: 35 ml
- c) Adsorbente: gel de sílice C₁₈ 230--400 mesh 60 Å
- d) Volumen ocupado por gel de sílice: 17 ml
- e) Cantidad de adsorbente: 8.7004 g de gel de sílice
- f) Muestra: 0.5 g extracto orgánico 3M₃-F.AcOEt.
- g) Relación muestra/ gel sílice : 1:17
- h) Flujo de columna: 2 cm min⁻¹

La columna cromatográfica fue montada en seco al vacío. La muestra se adicionó en forma de papilla, empleando el sistema de disolventes que se observa en la (Tabla I).

TABLA I.- Sistemas y volúmenes de disolventes utilizados para la fracción **3M₃-F.AcOEt.**

	<i>H₂O</i>	<i>MeOH</i>	<i>AcOEt</i>
1	100% (30ml)	0	_____
2	90% (27ml)	10% (3.0ml)	_____
3	75% (22.5ml)	25% (7.5ml)	_____
4	60% (18ml)	40% (12ml)	_____
5	45% (13.5ml)	55% (16.5ml)	_____
6	30% (9.0ml)	70% (21ml)	_____
7	15% (4.5ml)	85% (20.5ml)	_____
8	10% (3.0ml)	90% (27ml)	_____
9	_____	100%(30ml)	0
10	_____	90% (27ml)	10% (3.0ml)
11	_____	75% (22.5ml)	15% (7.5ml)
12	_____	60% (18ml)	40% (12 ml)
13	_____	45% (13.5ml)	55% (16.5ml)
14	_____	30% (9.0ml)	70% (21.0ml)
15	_____	15% (4.5ml)	75% (25.5ml)
16	_____	10% (3.0ml)	90% (27.0ml)
17	_____		100% (30ml)

Se colectaron fracciones de aprox. 14 ml cada una. Posteriormente se agruparon aquellas que resultaron iguales tras un monitoreo en Cromatografía en Capa Delgada (CCD), en el cual se utilizaron como sistemas AcOEt : MeOH

(99.5:0.5., y 99 :1). Posteriormente se liofilizaron con la intención de eliminar la humedad presente en las fracciones. (fig. 4)

Extracto 3M₄

El Extracto 3M₄ se sometió a una cromatografía Flash con gel de sílice Fase Reversa C18 preparada en el laboratorio ("Baker" Flash Chromatography Columns) (Still , 1978). La columna cromatográfica fue montada vía seca. La muestra se adicionó en forma de papilla.

En este experimento, el sistema de disolventes empleado para la separación de los compuestos presentes en la muestra fue el propuesto por Blunt (1987). (Tabla II).

TABLA II.- Sistemas y volúmenes de disolventes propuestos por Blunt J.W. (1987), para la columna 3M₄

Fracción No	Eluente	Volumen
1	H ₂ O	100 ml
2	H ₂ O	100 ml
3	H ₂ O-MeOH (3 :1)	100 ml
4	H ₂ O-MeOH (3 :2)	100 ml
5	H ₂ O-MeOH (2 :3)	100 ml
6	H ₂ O-MeOH (1 :4)	100 ml
7	H ₂ O-MeOH (1 :9)	100 ml
8	MeOH	100 ml
9	MeOH-DCM (9 :1)	100 ml
10	MeOH-DCM (3 : 1)	100 ml
11	MeOH-DCM (1 :1)	100 ml
12	DCM	200 ml
13	MeOH-H ₂ O	400 ml

Condiciones de la columna 3M₄

- a) Medidas de la columna: 2 cm diámetro/ 55 cm altura
- b) Volumen de la columna: 200 ml
- c) Adsorbente: silica gel C₁₈ 230--400 mesh 60 Å
- d) Volumen ocupado por silica gel: 200 ml
- e) Cantidad de adsorbente: 94.2901 g. de silica gel
- f) Muestra: 9.8825 g. extracto orgánico 3M₄-F.AcOEt
- g) Relación muestra / gel de sílice : 1: 9
- h) Flujo de columna: 2 cm min⁻¹

Fueron colectadas fracciones de aprox. 100 ml. para las primeras 11 fracciones, 200ml para la fracción 12 y 400 ml en para la fracción 13 respectivamente. Cada fracción fue liofilizada para remover la humedad presente en las fracciones. (fig. 5)

Para corroborar la metodología de obtención de los compuestos activos, así como para tipificar las propiedades cromatográficas de la actividad, el Extracto crudo 3M₆ fue tratado de manera similar a 3M₄, con la diferencia de que se adicionó una mayor cantidad de extracto a la columna flash C₁₈

Condiciones de la columna 3M₆

- a) Medidas de la columna: 2 cm diámetro/ 55 cm altura
- b) Volumen de la columna: 200 ml
- c) Adsorbente: sílica gel C₁₈ 230--400 mesh 60 Å
- d) Volumen ocupado por sílica gel: 200 ml
- e) Cantidad de adsorbente: 83.7937g. de gel de sílice
- f) Muestra: 10.092 g. extracto orgánico 3M₆
- g) Relación muestra/sílica gel: 1: 9
- h) Flujo de columna: 2 cm min⁻¹

La columna cromatográfica se montó vía húmeda. La muestra se adicionó en forma de papilla. Fueron colectadas fracciones de aprox. 100 ml en las primeras 11, 200 ml en la fracción 12 y 400 ml en la fracción 13. cada fracción fue liofilizada con la intención de retirar la humedad presente en las fracciones (fig. 6).

Determinación de la bioactividad :

Se probó la bioactividad de los extractos antes y después de iniciar el proceso de separación de las fracciones por cromatografía. Los bioensayos se realizaron en cada paso de la metodología con la finalidad de poder ubicar las fracciones bioactivas, y posibles compuestos responsables de la misma,

monitoreando su actividad biológica, situación que es llamada "Aislamiento Biodirigido". Esto nos permitió contar con una referencia del patrón de actividad de cada fracción separada.

La bioactividad consistió en determinar la citotoxicidad de la muestra empleando como organismo de prueba *Artemia salina* (Meyer, 1982) que correlaciona positivamente con actividad antitumoral y contra cáncer, con un coeficiente de 0.9 (Fenical, 1997).

Metodología para el bioensayo.

1) Se prepararon soluciones de las muestras con 3 concentraciones diferentes con la siguiente relación de concentración ejemplo: 10, 1, 0.1, mg ml⁻¹ aproximadamente.

2) Se tomó un volumen conocido de 100 µl de cada disolución para cada vial; las muestras se manejaron por triplicado y en ocasiones por quintuplicado.

3) Una vez colocados los 100 µl de la muestra dentro del vial, se procedió a secar la muestra, y sus replicas.

4) Se añadió a cada concentración, 500ml de H₂O_{mar} con 10 y en ocasiones 15 Artemias (dependiendo del ensayo) para cada concentración, procurando tener un error en el número de Artemias de ± 1 ; de esta forma se tiene un volumen final de 0.9 ml por vial (muy aproximado a 1ml)

5) Los viales se dejaron por 24 hrs a temperatura controlada ($\approx 20 \pm 2^\circ\text{C}$) tras lo cual se contaron las artemias muertas y el total de artemias en cada vial.

Los ensayos se corrieron con artemias en estadio nauplio I; estadio alcanzado a las 19 hrs de ponerse a eclosionar.

Caracterización por espectroscopía:

Se caracterizaron las fracciones obtenidas mediante la aplicación de métodos espectroscópicos como infrarrojo (IR) y Resonancia Magnética Nuclear Protónica ^1H -RMN, lo cual nos permitió darnos una idea del tipo de compuestos predominante en cada fracción analizada, para determinar si son de interés químico, por su actividad o por ambos criterios.

Espectroscopía por IR

Los espectros de IR se obtuvieron mediante película en un Espectrofotómetro de Infrarojo "Perkin - Elmer modelo 1330", las muestras se corrieron sobre celdas de NaCl, corriéndose los espectros de las fracciones provenientes de la muestra 3M_3 - f.hex.

Espectroscopía por RMN

Los espectros de RMN se obtuvieron en un espectrofotómetro de resonancia magnético nuclear modelo "Oxford 300 MH" en el CMBB* en

SCRIPPS Institution of Oceanography *. Algunas fracciones se corrieron en CDCl_3 , otras se corrieron en sulfóxido de dimetilo deuterado (DMSO).

* Center for Marine Biotechnology and Biomedicine.

* Las muestras se corrieron con la ayuda de la Dra. Mercedes Cueto del CMBB en SCRIPPS.

RESULTADOS

Fraccionación de los extractos

Extracto 3M₃

A partir del la fraccionación del extracto 3M₃, la fracción 3M₃ - f.hex (fracción hexano) originó 9 fracciones denominadas A-1(Hexano), B-23 (Hexano : DCM), C-27 (Hexano : DCM), D-30 (Hexano : DCM), E-42 (DCM), F-47 (DCM), G-56 (DCM), H-60 (DCM), I-63 (DCM : AcOEt). De igual forma de la fracción 3M₃-F.AcOEt. se originaron 10 fracciones eluidos a partir de los siguientes eluentes de la fracción 1 a la 9 (H₂O:MeOH) y la fracción 10 (MeOH :AcOEt).

Extracto 3M₄

A partir de la fraccionación extracto 3M₄ se originaron 13 fracciones ; de las cuales las fracciones 9 y 10 se separaron mediante cromatografía en capa fina dando origen a 15 fracciones. Se determinó el R_f de cada una de las 15 fracciones encontradas. fig. 5.

Extracto 3M₅

A partir del Extracto 3M₅ fueron colectadas 13 fracciones, posteriormente de las fracciones 9 y 10 se originaron 8 fracciones por medio de separación mediante cromatografía en capa fina, de las cuales se determinó el R_f de las fracciones encontradas . fig. 6.

Bioactividad de las fracciones.

Extracto 3M₃

Se realizaron pruebas de actividad a las fracciones provenientes del extracto 3M₃ las cuales se denominaron 3M₃ - f.hex (hexano), 3M₃ - f.AcOEt (acetato de etilo) y 3M₃ - f.H₂O (acuosa). Observándose actividad en cada una de las tres fracciones contra *Artemia salina*.

Posteriormente se realizaron pruebas de actividad sobre las fracciones denominadas B-23, D-30, E-42, F-47, I-63, resultado de la cromatografía en columna Flash fase normal, de la fracción 3M₃ - f.hex. De las cuales únicamente la fracción I-63 presento actividad contra *Artemia salina*. Es importante mencionar que en la cromatografía realizada se obtuvieron 9 fracciones de las cuales las fracciones A-1, C-27, G-56, H-60, no fueron sometidos a pruebas de actividad ya que las cantidades obtenidas fueron muy pequeñas (Tabla III).

TABLA III.- Prueba de actividad contra *Artemia salina* para las fracciones 3M₃ - f.hex (hexano) , 3M₃ - f.AcOEt (acetato de etilo) y 3M₃ - f.H₂O (acuosa). Así como para las fracciones A-1,B-23,C-27, D-30, E-42, F-47, G-56, H-60, I-63.

Fracciones	Concentración [mg ml ⁻¹]	Mortalidad [%]
3M ₃ - f.hex	41.25	100
3M ₃ - f.AcOEt	72.6	100
3M ₃ - f.H ₂ O	110.35	45.4
A-1(Hexano)	NP	NP
B-23 (Hex:DCM)	9.8	NA
C-27 (Hex:DCM)	NP	NP
D-30 (Hex:DCM)	7.5	NA
E-42 (DCM)	6.7	NA
F-47 (DCM)	15.2	NA
G-56 (DCM)	NP	NP
H-60 (DCM)	NP	NP
I-63 (DCM:AcOEt)	23.9	100

DCM = diclorometano ; AcOEt = acetato de etilo

NA = No Activo ; NP = No Probado

De igual forma se realizó una segunda cromatografía por columna sobre la fracción 3M₃-F.AcOEt, que a diferencia de la anterior se corrió con ge de sílice fase reversa C₁₈, del cual se originaron 10 fracciones. De las cuales únicamente las fracciones 8 y 9 presentaron actividad. (Tabla IV)

TABLA IV.- Prueba de actividad contra *Artemia salina* para las fracciones 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10 presentes en la fracción 3M₃-F.AcOEt .

Fracción	Concentración [mg ml ⁻¹]	Mortalidad [%]
1 (H ₂ O :MeOH)	5.9	6.5
2 (H ₂ O :MeOH)	0.45	NA
3 (H ₂ O :MeOH)	0.35	NA
4 (H ₂ O :MeOH)	0.85	NA
5 (H ₂ O :MeOH)	0.3	NA
6 (H ₂ O :MeOH)	0.25	NA
7 (H ₂ O :MeOH)	0.6	NA
8 (H ₂ O :MeOH)	0.2	85.71
9 (H ₂ O :MeOH)	0.9	28.57
10 (MeOH :AcOEt)	0.9	NA

NA = No Activo ; MeOH = metanol ; AcOEt = acetato de etilo

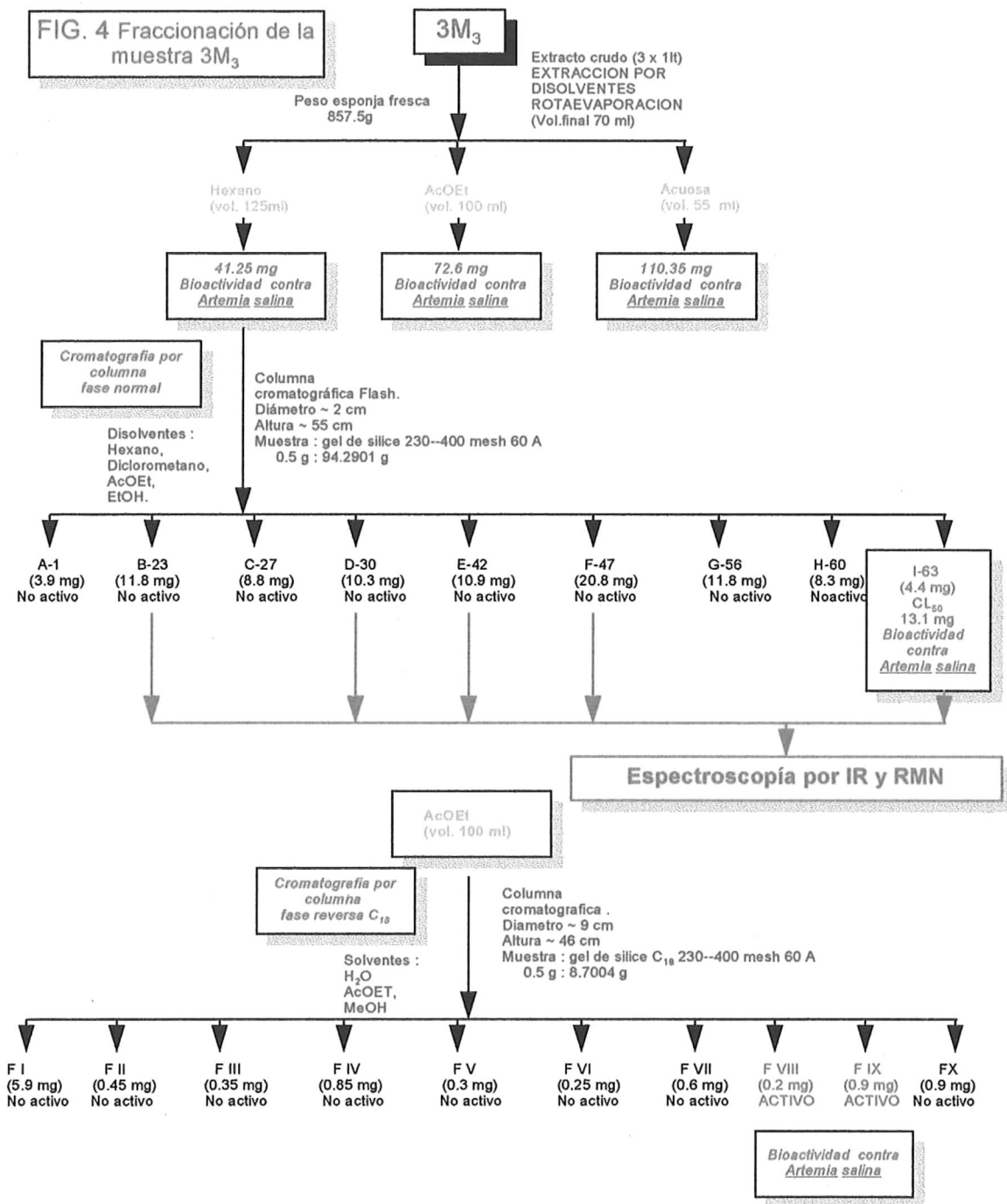


Figura 4.- Diagrama en el que se muestra el proceso de fraccionación de la muestra 3M₃, resultados en pruebas de actividad sobre *A. salina*, así como las fracciones que se sometieron a análisis de IR y RMN.

Extracto 3M₄

Se realizó una primer prueba de actividad sobre los extractos 3M₄ T-1, extracto 3M₄ T-2 y extracto 3M₄ T-3 pertenecientes a tres diferentes puntos dentro de la zona de colecta. De los tres diferentes puntos de colecta únicamente el extracto 3M₄ T-1 presentó actividad evidente. (Tabla V)

TABLA V.- Prueba de actividad contra *Artemia salina* para los extractos 3M₄ T-1, extracto 3M₄ T-2 y extracto 3M₄ T-3 pertenecientes a tres puntos de muestreo dentro de la zona de colecta.

Extracto	Concentración [mg ml ⁻¹]	Mortalidad [%]
3M ₄ T-1	93.3	47.9
3M ₄ T-2	100.2	2.85
3M ₄ T-3	101.3	NA

NA = No Activo.

T-1, T-2, T-3 = punto de colecta 1, 2 y 3 respectivamente.

Se realizaron pruebas de actividad sobre las 13 fracciones, resultado de la cromatografía en columna fase reversa C_{18} , presentes en el **Extracto 3M₄**. Se pudo observar que solamente las fracciones 1,5,6,7,9 y 10 de las 13 fracciones iniciales presentaron actividad contra *Artemia salina*. (Tabla VI).

TABLA VI.- Prueba de actividad contra *Artemia salina* para las 13 fracciones, resultado de la cromatografía en columna fase reversa C_{18} , presentes en el **Extracto 3M₄**.

Fracción #	Concentración [mg ml ⁻¹]	Mortalidad [%]
1 H ₂ O	20.1	100
2 H ₂ O	11.4	NA
3 H ₂ O-MeOH	4.0	NA
4 H ₂ O-MeOH	2.2	NA
5 H ₂ O-MeOH	15.35	50.0
6 H ₂ O-MeOH	11.1	100
7 H ₂ O-MeOH	7.2	100
8 MeOH	13.6	8.01
9 MeOH-DCM	11.1	50
10 MeOH-DCM	11.2	100
11 MeOH-DCM	22.6	NA
12 CH ₂ CL ₂	5.85	NA
13 MeOH-H ₂ O	3.0	NA

MeOH = metanol ; DCM = diclorometano ;

NA = No Activo.

A partir de las fracciones 9 y 10, ambas eluidas con MeOH-DCM, se originaron 15 subfracciones por medio de cromatografías en capa fina. A cada fracción encontrada se les realizaron pruebas de actividad contra *Artemia salina* ; de las 15 subfracciones encontradas solamente las número 1,2,3,4,5,7,8,9,10,11 y 12 presentaron un alto grado de actividad. (Tabla VII).

TABLA VII.- Prueba de actividad contra *Artemia salina* para las 15 subfracciones obtenidas a partir de cromatografía en capa fina de las fracciones 9 y 10.

Fracción #	Concentración [mg ml⁻¹]	Mortalidad [%]
1	8.2	100
2	2.2	NA
3	13.6	100
4	5.4	NA
5	6.7	100
6	0.3	NA
7	12.9	100
8	3.3	NA
9	7.4	100
10	7.1	100
11	11.0	100
12	8.6	100
13	6.6	100
14	10.8	100
15	10.0	50

NA = No Activo

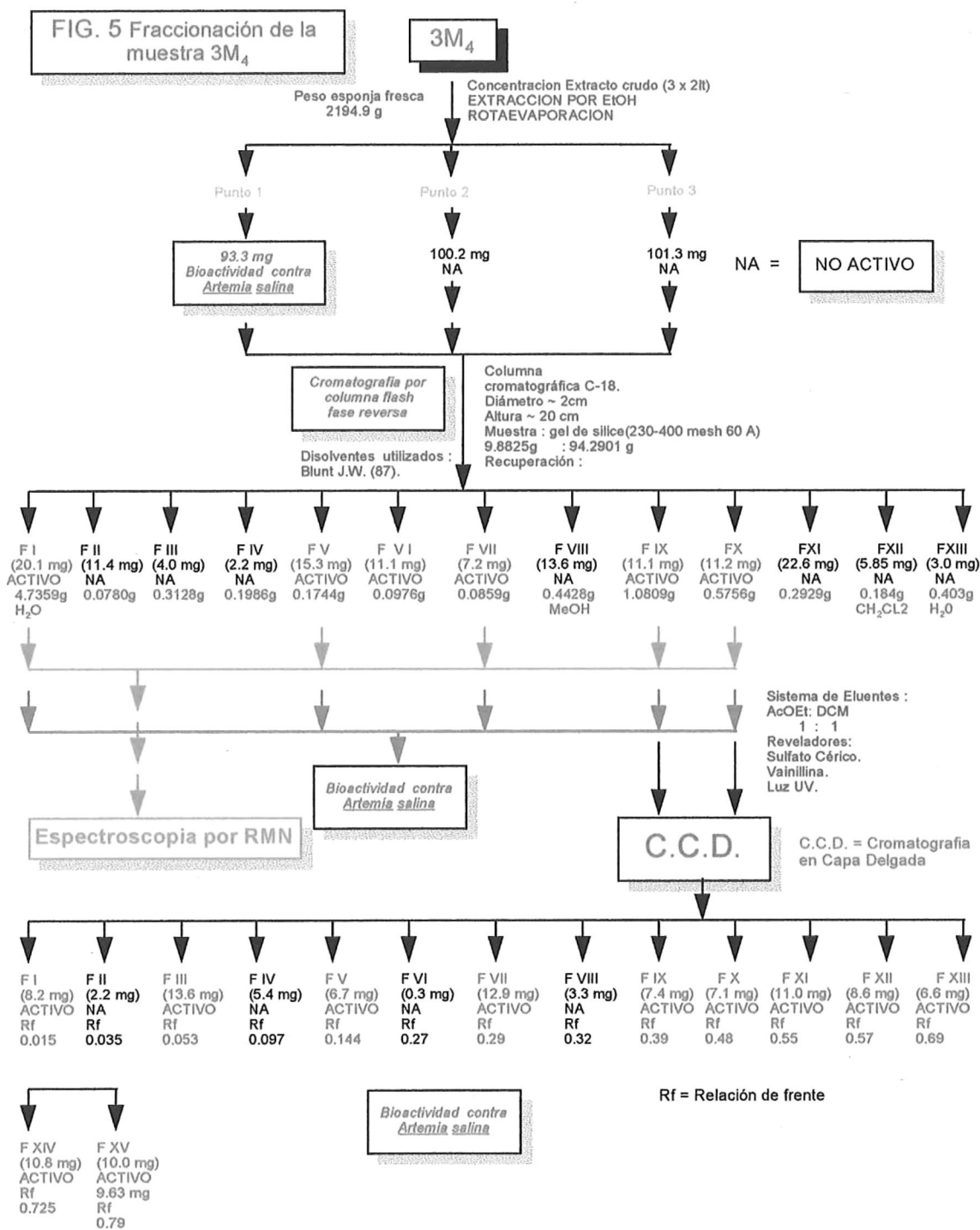


Figura 5.- Diagrama en el que se muestra el proceso de fracciónación de la muestra 3M₄, resultados en pruebas de actividad sobre *Artemia salina*, así como los fracciones que sometieron a análisis de RMN y los valores de Rf de cada subfracción.

Extracto 3M₅

Al igual que al extracto anterior (3M₄) se realizó una prueba de actividad sobre los extractos 3M₅ T-2 y extracto 3M₅ T-3 pertenecientes a puntos diferentes dentro de la zona de colecta. De los dos diferentes puntos de colecta únicamente el extracto 3M₅ T-3 presentó actividad evidente. Es importante mencionar que el extracto 3M₅ T-1 no se sometió a prueba de actividad, ya que este fue sometido a extracción por solventes no observándose resultados de actividad en ninguna de las fracciones obtenidas. (Tabla VIII).

TABLA VIII.- Prueba de actividad contra *Artemia salina* para los extractos 3M₅ T-2 y extracto 3M₅ T-3 pertenecientes a dos puntos dentro de la zona de colecta.

Extracto	Concentración [mg ml ⁻¹]	Mortalidad [%]
3M ₅ T-1	NP	NP
3M ₅ T-2	95.13	4.6
3M ₅ T-3	92.1	60.14

NP = No Probado

T-1, T-2, T-3 = punto 1, 2 y 3 respectivamente.

A partir del Extracto 3M₅ T-1 se obtuvieron tres extractos denominados 3M₅ - f.hex (hexano) , 3M₅ - f.AcOEt (acetato de etilo) y 3M₅ - f.H₂O (acuosa) , los cuales fueron sometidos a pruebas de actividad contra *Artemia salina* . Los resultados mostraron que ninguno de los extractos probados presentó actividad evidente.

Se realizaron pruebas de actividad sobre 13 fracciones resultado de la cromatografía en columna fase reversa C_{18} , presentes en el **Extracto 3M₆**; pudiéndose observar que en ninguna de las 13 fracciones se presentó actividad contra *Artemia salina*.

A partir de las fracciones 9 y 10 ambas eluidas con MeOH-DCM se originaron 8 subfracciones por medio de CCD. A cada fracción encontrada se les realizaron pruebas de actividad contra *Artemia salina*; de las 8 subfracciones encontradas solamente las número 1,2,3,4,5,6 y 7 presentaron un alto grado de actividad. (Tabla IX)

TABLA IX. Prueba de actividad contra *Artemia salina* para las 8 subfracciones resultado de cromatografía en capa fina de las fracciones 9 y 10.

Fracción #	Concentración [mg ml⁻¹]	Mortalidad [%]
1	9.8	100
2	9.5	100
3	11.3	100
4	17.2	100
5	27.2	100
6	11.3	66.6
7	20.4	20
8	18.1	13.3

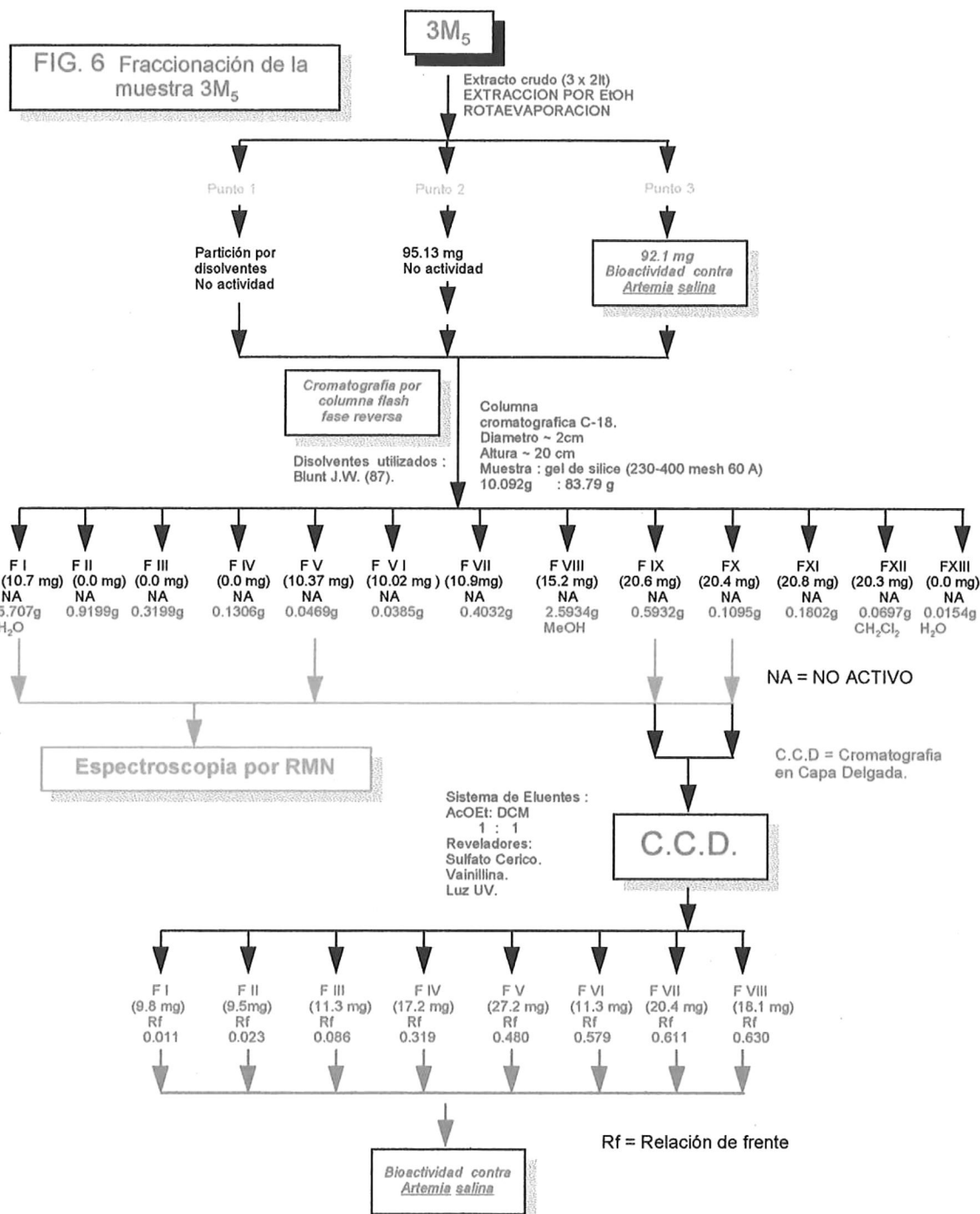


Figura 6.- Diagrama en el que se muestra el proceso de fraccionación de la muestra 3M₅, resultados en pruebas de actividad sobre *Artemia salina*, así como las fracciones que sometieron a análisis de RMN y los valores de Rf de cada subfracción.

Análisis Espectral

9 fracciones provenientes de la muestra 3M₃ - f.hex denominadas como A-1, B-23, C-27, D-30, E-42, F-47, G-56, H-60, I-63 se sometieron a los siguientes análisis espectroscópicos.

Espectroscopia Por Infrarojo.

Básicamente las señales de las 9 fracciones fueron semejantes, a excepción de la muestra B-23. En ellos se observó una señal entre los 3300 y 3600 cm⁻¹ característica de los iones oxidrilo (OH) para todas las fracciones, siendo la señal de unas muestras mas intensa que en otras, únicamente la fracción B-23 no presentó esta señal. Se observó una señal entre los 2800 y 3000 cm⁻¹ característica de grupos alcano, presente en todas las fracciones apoyándose con señales secundarias representativas del grupo, las cuales se encontraban entre los 1450 - 1500 cm⁻¹ y los 1350 a 1400 cm⁻¹. Entre los 1660 y 1740 cm⁻¹ aparece una señal intensa característica del grupo carbonilo (-C = O) lo cual nos hace pensar que las señales presentes en todos los espectros podrían representar a ácidos, sin descartar a los ésteres, aldehídos y cetonas. Entre los 1250 y 1300 cm⁻¹ se observó una señal secundaria característica de los éteres presente en todos los espectros con excepción del espectro de la fracción B-23. Entre los 1100 - 1150 cm⁻¹ señal característica de los éteres la cual no se encuentra presente en el espectro de la fracción B-

23. Se pudo observar la presencia del grupo alqueno con una señal intensa entre los $700 - 840 \text{ cm}^{-1}$ no presente en la fracción B-23. Los grupos funcionales se determinaron en base a Silverstein *et al.* (1981).

Espectroscopia Por Resonancia Magnético Nuclear Protónica (HRMN)

De las 9 fracciones provenientes de la muestra 3M₃ - f.hex únicamente las denominadas como B-23, D-30, E-42, F-47, G-56, I-63 se sometieron a análisis espectroscópico por resonancia.

Debido a la similitud de las señales la interpretación de ellos se llevo a cabo de manera global, únicamente la fracción B-23 se interpretó por separado. Las señales se determinaron en base a Silverstein *et al.* (1981).

En la fracción 23 se presentan dos bandas simples a 9.8 y 9.3 ppm los cuales se asignan a protones aldehídicos; dos bandas dobles de dobles centrados a los 7.5 y 7.7 ppm se asignan a protones aromáticos ambos se encuentran interactuando en posición para, debido a una constante de acoplamiento pequeña; a 6.45 ppm se presenta una señal triple muy pequeña la cual se puede asignar a protones olefínicos, una señal similar a la anterior se presenta a 5.4 ppm asignada a insaturaciones o protones de -OH ; se presenta una señal cuádruple centrada a los 4.17 ppm la cual se asigna a la presencia de un metilo (-CH_3) su desplazamiento nos indica la desprotección de protones

vecinos por posibles oxígenos de ésteres ; se presentó un grupo de bandas simples y dobles que van desde los 2.8 a 0.1 ppm este grupo es característico de radicales alquilo ($-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}-$, etc). los cuales probablemente integran la cadena larga de un éster de ácido graso.

A partir de la fracción B-23 se pueden interpretar las señales de las fracciones D-30, E-42, F-47, G-56, I-63 todos estos espectros son parecidos entre si únicamente las señales 9.8 y 9.39 ppm ; 6.45 ppm ; 4.17 ppm y 2.8 ppm no se presentan, el resto de las señales es el mismo para todos los espectros .

También se llevó a cabo la comparación e interpretación de las señales de la fracciones 1-3M₄ y 1-3M₅; 5-3M₄ y 5-3M₅; 7-3M₄; 9-3M₄ y 9-3M₅; 10-3M₄ y 10-3M₅. Comparando las fracciones 1-3M₄ y 1-3M₅; Ambas presentaron las mismas señales, observándose una serie de bandas simples que van desde 9.0 a 7.2 ppm, con señales características para los protones de carbono pertenecientes a un grupo amida. De los 4.5 a los 2.8 ppm se presentan bandas simples representativas de grupos alquinos, metoxilos ($\text{CH}_3\text{-O-}$), aminas aromáticas y -OH .

Comparando los fracciones 5-3M₄ y 5-3M₅, en ambas muestras se presentaron las siguientes señales: a 6.9 ppm se presenta una banda simple representativa para protones de insaturaciones unidos a grupos carbonilo

vecinos. Una banda simple a 5.3 ppm indica un patrón de desplazamiento para protones olefinicos. A 3.5 ppm se presenta una señal simple la cual puede pertenecer a un metoxilo ($\text{CH}_3\text{-O}$). En el espectro 5-3M₅ aparece una banda doble a 2.41 ppm representativa de grupos alquilo unidos a grupos electronegativos O, N, ó S, ésta señal no aparece en la fracción 5-3M₄. Se presentó una banda simple a 1.48 ppm la cual se puede asignar a metilos o grupos alquilo cíclicos; a 1.25 ppm se observa una banda simple representativa de los grupos alquilo; una última banda doble se observó a 0.9 ppm la cual es característica de protones metílicos de alcanos.

Las fracciones 7-3M₄, 9-3M₄, 9-3M₅; en sus espectros presentaron una señal doble y una simple que va de 9.0 a 7.2 ppm asignada a protones del carbono pertenecientes al grupo amida; a 5.4 ppm se observó una banda doble asignada a insaturaciones o protones de OH ; se presentaron dos señales dobles a 2.2 y 2.1 ppm asignada a grupos alquilo desprotegidos; Se presentó una última serie de señales simples y dobles que van de 2.5 a 0.5 ppm asignadas a protones de desplazamiento para grupos alquilo CH_3 -, -CH_2 -, -CH- , la única diferencia entre estas tres fracciones fue que la fracción 9-3M₅ se corrió en DMSO.

Las fracciones 10-3M₄ y 10-3M₅ presentaron en sus espectros una señal doble y una simple que van de 5.4 a 5.1 ppm asignadas a protones de insaturaciones u protones de grupos OH ; También presentan una señal simple

a 4.3 ppm asignada a CH_2 unidos al oxígeno de un éster. Se presentó una serie de señales simples de 3.95 a 3.4 asignada a grupos metoxilo $\text{CH}_3\text{-O}^-$ este grupo de señales no se observó claramente en la fracción 10 3M_4 debido a la señal asignada al DMSO; Se presentaron dos bandas simples de 2.8 a 2.5 ppm asignada a grupos alquilo unidos a grupos electronegativos; a 1.5 ppm se presentó una banda simple la cual se asignó a grupos alquilo. Por último se presentaron una serie de señales simples de 1.15 a 0.9 asignadas a grupos alcano.

DISCUSIONES

La separación de las fracciones con compuestos activos de la esponja marina *Chondrilla nucula* se inició con las fracciones de naturaleza no polar (fracción hexano) con base en su actividad y debido a que su polaridad hace fácil trabajar con ella.

De la fracción hexano (3M₃), solamente es relevante la I-63 - eluida de la cromatografía en columna con diclorometano : acetato de etilo, por su actividad sobre *Artemia salina* . Por la forma de obtención de esta fracción así como por su comportamiento en cromatografía en capa delgada con CCl₄ : DCM ($\epsilon^o=0.23$) y forma de revelar a la vanillina, podemos decir que se trata de un lípido, ya sea un ácido graso o un esteroles.

Para determinar si eran esteroides, se efectuó una CCD impregnada con AgNO₃ y Hexano:Eter ($\epsilon^o=0.058$) de acuerdo a Domínguez (1988). A diferencia de la placa inicial, las manchas se desplazaron hacia la parte superior, alejándose del punto de aplicación. Es interesante notar que aunque el sistema de eluentes fue menos polar, las manchas se desprendieron con mayor facilidad del punto de aplicación.

La mayoría de las fracciones mostraron manchas equivalentes entre sí, a excepción de un punto con R_f de 0.67 en la citada fracción I-63. Con base a lo anterior proponemos a este punto como el compuesto(s) activo(s).

De los espectros de IR, en donde se observaron señales típicas para grupos hidroxilo, alcanos, carbonilos y ésteres, suponemos que las fracciones pueden ser *ésteres de ácidos grasos*. El análisis de los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) permite estimar la estructura química de los metabolitos presentes; Estos deben poseer protones aldehídicos; metilos cuyos protones pudieran ser desplazados por ésteres vecinos y grupos alquilo. Estos grupos funcionales probablemente integran la cadena de un *ácido graso*. El que haya señales que puedan ser asignados a otro tipo de compuestos - protones aromáticos - indica que se trata de fracciones susceptibles de ser purificadas.

La mortalidad sobre *Artemia salina* coincide con la propuesta de que la fracción I-63 está constituida por ácidos grasos ya que se ha demostrado que éstos, sean saturados o no, poseen toxicidad contra ella (Curtis, R. F. *et al.*, 1974; citados por Wah, 1993).

Aunado a lo anterior, varios trabajos (Carballeira *et al.*, 1987; Carballeira y Maldonado, 1986; Litchfield *et al.*, 1980), mencionan que *Chondrilla nucula* es una esponja rica en ácidos grasos de varios tipos, con 13 hasta 30 carbonos en su cadena, y varios tipos y números de insaturaciones, de manera que es posible que nuestra fracción activa aislada esté constituida por ácidos grasos.

Es importante hacer notar que no hay reportes publicados de la actividad de *Chondrilla nucula* contra *Artemia salina* hasta el desarrollo del presente trabajo.

Por lo que, se trabajó con las fracciones de naturaleza más polar (fracción AcOEt) seleccionadas por su actividad contra *A. salina*; a diferencia de la fracción anterior la polaridad de la fracción AcOEt hace difícil el proceso de separación de los compuestos en la fracción, debido a esto se elaboró en el laboratorio, gel de sílice fase reversa C₁₈ (Evans., 1980).

A partir de la fracción AcOEt (3M₃) se encontró que solamente las fracciones 8 y 9 - eluidas con MeOH-AcOEt - presentaron actividad. El experimento (columna flash fase reversa con eluentes seleccionados por su comportamiento en gel de sílice fase normal) efectuado con esta fracción nos sirvió de modelo sobre el cual nos basamos para trabajar posteriormente.

Con la colecta (3M₄) y (3M₅) se llevaron a cabo pruebas de actividad sobre *Artemia salina* con esponja colectada en cada punto de muestreo, (tres puntos ubicados dentro del área de estudio). Se observó que, en cada colecta, sólo uno de ellos mostró actividad sobre *Artemia salina* pero el punto con muestra activa varió de muestreo en muestreo, esto es, presentó variación a nivel microgeográfico. Estas observaciones concuerdan con lo encontrado por Swearingen y Pawlik (1998) quienes indican que *Chondrilla nucula* posee una

alta variabilidad intercolonial de sus defensas químicas contra la depredación por peces, siempre que los metabolitos que actúan sobre *Artemia salina* actúen también como deterrentes. Sin embargo ellos no encontraron variación de los niveles de defensas en diferentes localidades geográficas en tanto que nosotros sí las encontramos pero a nivel microgeográfico. Ello nos indica que puede ser el tamaño de la colecta el que permite que haya mayor abundancia de colonias químicamente activas y ser encontrada, éstas colonias, con mayor o menor facilidad.

Dada la variación de actividad entre puntos de colecta, se optó por juntar las muestras del área, en cada muestreo, ya que con ello se incrementó la cantidad de los activos, mismos que pueden estar presentes pero debido a su baja concentración pueden no ser detectados.

Tras someter a cromatografía de baja presión el total de la colecta 3M₄, y conjuntar los criterios de rendimiento con el de actividad sobre *A. salina*, por fracción, se seleccionaron las fracciones 1(H₂O), 5(H₂O-MeOH), 7(H₂O-MeOH), 9(MeOH-DCM) y 10(MeOH-DCM) que fueron sometidas a análisis de resonancia magnética nuclear (RMN), lo cual permitió darnos una idea de la estructura química de los metabolitos presentes en ellas.

En base a las señales de RMN, se pudo observar que las fracciones anteriormente mencionadas guardan similitudes entre sí, - como grupos amida,

alquilo, metoxilo ($\text{CH}_3\text{-O-}$), grupos -OH , alquilo cíclicos y grupos electronegativos como O, N, S, aminas aromáticas (todas las señales se encontraron presentes en cada una de las fracciones).

No fue posible proponer un compuesto, o grupo de compuestos, que comprendiera la diversidad de grupos funcionales que las señales de RMN marcan. Es importante señalar que no se pudo comparar con estudios previos, dado que no hay trabajos publicados efectuados con *Chondrilla nucula* que analicen los compuestos de la fracción polar.

A las señales de RMN se les dio un doble empleo, por un lado tener datos de la estructura química de cada fracción y comparar entre ellas, y por el otro, tomar la decisión de seguir analizando las fracciones que mostraran señales de grupos funcionales interesantes, desde el punto de vista químico.

Con la finalidad de separar los compuestos activos de la muestra 3M₄ se seleccionaron las fracciones 9 y 10 en base a su actividad y cantidad de muestra disponible, ambas fracciones son productos de la cromatografía en columna, las fracciones se sometieron a CCD de las cuales se originaron 15 subfracciones, los resultados de las pruebas de actividad contra *Artemia salina* mostraron que 10 ellas fueron activas, es probable que los compuestos activos presentes en estas subfracciones también se encuentren presentes en otras fracciones producto de la cromatografía, las cuales no se analizaron por

cuestiones prácticas. Es de señales que las señales de RMN mostraron mucha similitud entre las fracciones. Se determinó el Rf de cada subfracción para poder identificarlas en otras muestras posteriormente.

Con el propósito de corroborar los resultados encontrados en la muestra anterior (3M₄), se siguió la misma metodología con la muestra (3M₅).

Del total de la colecta, se sometieron a ensayo las fracciones producto de la columna, encontrando que ninguna de ellas mostró actividad. Esto contrasta con los resultados obtenidos en el ensayo de la columna (3M₄), toda vez que debiera de haberse encontrado actividad en alguna de las fracciones. Es probable que el activo presente en la muestra no se haya encontrado a una concentración en la cual pudiera ser detectado en el ensayo, ya que existe variación en la actividad como se discutió anteriormente.

Para tener un patrón de comparación, se efectuaron análisis por RMN de cada fracción lo que permitió obtener información de la estructura química de los metabolitos presentes en cada fracción. Se presentaron señales para grupos amida; grupos alquinos, CH₃-O⁻ metoxilos, aminas aromáticas y ⁻OH, grupos carbonilo; grupos electronegativos como O, N, S, y grupos alcanos.

Al comparar las señales de las fracciones equivalentes de ambas muestras 3M₄ y 3M₅ se observaron únicamente diferencias en las fracciones: 5(3M₅) en la cual aparece una señal característica para grupos electronegativos

O, N, S, y en la 10(3M₅) en la cual aparecen una serie de señales simples características de grupos metoxilo. Este grupo de señales no se observó claramente en la fracción 10(3M₄) debido a la señal asignada al DMSO con el cual se corrió la muestra en el RMN, siendo muy probable que esta señal se encuentre interfiriendo con las demás dificultando su observación.

De la muestra 3M₅, las fracciones 9 y 10 ambas inactivas, por CCD se obtuvieron 8 subfracciones, las cuales fueron llevadas a prueba de actividad sobre *A. salina*, siendo *todas* activas.

Estos resultados corroboran la hipótesis de que los metabolitos activos se encontraban originalmente a baja concentración causando que los ensayos previos a la CCD dieran inactivos, de igual manera se pone de manifiesto la importancia de haber juntado las muestras de los tres diferentes puntos de colecta.

El hecho de que no se haya encontrado el mismo número de subfracciones por cada muestra concuerda con Swearingen y Pawlik (1998), mostrando otra vez, la variabilidad en el tiempo y área de colecta, de la producción de metabolitos activos en *C. nucula*.

Con base en el R_f de cada subfracción por muestra y comparándolos entre sí, se observó que las subfracciones VIII, X y XII de la muestra (3M₄) junto con las subfracciones de la muestra (3M₅) IV, V y VI fueron muy similares

entre sí, lo que lleva a pensar que se tienen 20 subfracciones producto de la CCD. Sin embargo, la actividad contra *Artemia salina* de las subfracciones (3M₄)-VIII y (3M₅)-IV no es la misma, situación que indica que se trata de dos compuestos - o grupo de compuestos - diferentes. Con base en este criterio de actividad se concluye que existen 21 subfracciones producto de la CCD, de las cuales 2 se presentaron tanto en la muestra (3M₄) como en la (3M₅).

CONCLUSIONES

1) A partir de la esponja marina *Chondrilla nucula* se aislaron y tipificaron un total de 30 fracciones de las cuales únicamente 18 presentaron actividad sobre *Artemia salina*.

2) De los 18 compuestos activos contra *Artemia salina* sólo uno proviene de la fracción no polar, características de ácido graso.

3) Las fracciones polares presenta la mayor actividad en % de mortalidad contra *Artemia salina*. Dichas fracciones polares no han sido estudiadas hasta el momento.

4) Se propone una metodología con la que es posible obtener fracciones activas contra *Artemia salina*.

BIBLIOGRAFIA

Baker, J.T. 1984 .

" Natural Products and Drug Development" .

P. Krogsgaard-Larsen, S. Brogger Christensen, H. Kofod, eds.
Copenhagen.

Bakus G., Targettn. and Schulte B. 1986.

Chemical ecology of marine organisms. An overview.

Journal of Chemical Ecology. Vol 12. No5 pp 951-981.

Baslow. 1977.

Marine Pharmacology. 2nd Ed.

Robert E. Krieger Publishing Company. Huntington, N. Y.

Barnes. 1988.

Zoología de los Invertebrados.

3ra edición. México, 69-82.

Blunt J.W. 1997.

**Reverse Phase Flash Chromatography: A Method For The
Rapid Partitioning of Natural Product Extracts.**

Journal of Natural Products.

Vol. 50, No. 2, pp. 290-292.

Brusca, C.R. 1973.

"Common Intertidal Invertebrates of the Gulf of California".

The University of Arizona Press. Tucson, Arizona. pp 247

Carballeira N.M., Maldonado L., Porras B. 1987.

Isoprenoid Fatty Acids From Marine Sponges. Are Sponges Selective?

LIPIDS, Vol. 22, No. 10.

Carballeira N.M., Maldonado L. 1986.

Identification of 5,9 Hexadecadienoic Acid in the Marine Sponge *Chondrilla nucula*

LIPIDS, Vol. 21 No. 7 (1986).

Cox, P. A. and M. J. Balick (1994).

The ethnobotanical approach to drug discovery.

Scientific American June 82 - 87.

De Rosa S., Crispino A., De Giulio., Strazzulo G. 1989

A new bioactive derivative of avarol from the marine sponge *Dysidea avara*.

Journal of Natural Products

Vol. 52, No. 3, pp 646-648.

May-Jun.

De Rosa S., De Giulio A., Iodice C. 1994

**Biological effects of prenylated hydroquinones:
Structure-activity relationship studies in antimicrobial, brine
shrimp, and fish lethality assays.**

Journal of Natural Products

Vol. 57, No. 12, pp1711-1716.

Dominguez, Xorge A. 1988.

Metodos de Investigación Fitoquímica.

Edit. Limusa México pp. 139 - 148.

Encarnación. D., R. Kerr. G., S. 1992

**Compuestos con actividad antimicrobiana de organismos
marinos.**

Revista Mexicana de Ciencias farmaceuticas. vol 22 (6):33-41

Evans M.B. 1980.

**The Preparation and Evaluation of Superior Bonded Phases
for Reversed-Phase, High-Performance Liquid
Chromatography.**

Chromatografía Vol. 13, No. 1. pp 5 - 10.

Farnsworth N.R. 1980.

**The development of pharmacological and chemical research
for application to traditional medicine in developing countries.**

Journal of Ethnopharmacology, 2 : 173 - 181.

Fenical, W. 1997.

Apuntes del Curso de Farmacognosia Marina.

Departamento de Agronomía y Departamento de Biología Marina

Universidad Autónoma de Baja California Sur;

La Paz, B.C.S. México.

Green G. 1974.

"Antibiosis in marine sponges".

Centro de Ciencias del Mar y Limnología. U.N.A.M. México. DF.

pp 199-205.

Green G., Gomez P. 1986.

Estudio Taxonómico de las Esponjas de la Bahía de Mazatlán, Sinaloa, México.

An. Inst. Cienc. del Mar y Limnol. Univ. Nal. Autón. México, 13

(3): 273 - 300.

Gregson, R.P., B.A. Baldo, P.G. Thomas, R.J. Quinn, P.R. Bergquist,

J.F. Stephens and A.R. Horne (1979).

Fluorine is a major constituent of the marine sponge

***Halichondria moorei*.**

Science 206 : 1108 - 1109.

Ireland, Ch, M., B.R. Copp, M.O. Foster, L.A. McDonald, D.C. Radisky and J. Ch. Swersey . 1993 .

**"Biomedical Potential of Marine Natural products in :
Marine Biotechnology Vol. I : Pharmaceutical and Bioactive
Natural Products.**

D.H. Attaway and O.R. Zaborsky [eds]. Plenum Press, New
York.

Kelly - Gutiérrez, L. 1997.

**"Compuestos Bioactivos de la Esponja Marina
Pseudosuberites pseudos "**

Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Marinas, Universidad
Autónoma de Baja California. Ensenada B.C. México.

Litchfield C., Tyszkiewicz J., Dato V. 1980.

**5,9,23-Triacontratrienoic Acid, Principal Fatty Acid of the
Marine Sponge *Chondrilla nucula***

LIPIDS, Vol. 15, No. 3 ., pp 200-203.

Meyer, B.N. ; N.R. Ferrigni, J.E. Putnam, L.B. Jacobsen, D.E. Nichols and
J.L. McLaughlin, 1982.

**Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active
Plant Constituents.**

Planta Medica 45, 31.

Munro M .H.G., Blunt J.W., Luibrand R.T. 1987

The Search for Antiviral and Anticancer Compounds from Marine Organisms.

Biorganic Marine Chemistry

Vol. 1, pp 94-165.

Pettit, G.R. Rideout and J.A. Hasler. 1981.

"Isolation of Geodiastatins 1 and 2 from the Marine Sponge *Geodia Mesotriaena* "

J. Nat. Prod. 44 (5): 588 - 592

Rosenstein, E. 1988.

Diccionario de Especialidades Farmacéuticas 34 Edición Mexicana.

Ediciones P.L.M. México, D.F.

Scheuer p.1978.

Chemistry of Marine Natural Products.

Academic Press. New York, USA. pp 201.

Scheuer p. 1986.

Marine Resources: The search for new chemicals from marine organisms.

Quarterly. Vol 8. No 4. University of Hawaii Sea Grant College program. pp 1-8.

Secretaria de Salubridad y Asistencia Informe anual. 1994.

<http://www.ssa.gob.mx>

SEMARNAP. 1996.

**Programa de Areas Naturales Protegidas de México
1995 - 2000 .**

Secretaría del Medio Ambiente Recursos Naturales y Pesca.

Sikarwar R.L.S, Bajpai A.K. and Painuli R.M. 1994.

**Plants Used as Veterinary Medicines by Aborigines of
Madhya Pradesh**

Int. J. Pharmacog., 32 (1994), No.3,pp. 251-255.

Silverstein R.M., Bassler G.C., Morrill T.C. 1981.

**Identificación Espectrofotométrica de Compuestos
Organicos**

Editorial Diana pp. 353

Still, W.C. 1978.

"Baker Flash Chromatography Columns"

Journal of Organic Chemistry 43, 2933.

Swearingen III D.C., Pawlik J.R. 1998.

**Variability in the chemical defense of the sponge *Chondrilla
nucula* against predatory reef fishes.**

Marine Biology (1998) 131: 619 - 627

Tyler Varro E. 1995.

Plant Drugs, Healing Herbs, and PhytoMedicinals.

Herbalgram No. 33, pp 36 - 46.

Vázquez Maldonado L.E. 1994.

**Estudio Taxonómico y Distribución de las Esponjas del
Pacífico Mexicano de los Estados de Nayarit,
Michoacán y Guerrero, México.**

Tesis de Licenciatura. Area Interdisciplinaria de Ciencias del Mar
Departamento de Biología Marina, Universidad Autónoma de Baja
California Sur. La Paz, B.C.S. México. pp 30-34.

Wah Sam, T. 1993.

Toxicity Testing Using the Brine Shrimp: *Artemia salina*.

en: **Bioactive Natural Products Detection, Isolation and
Structural Determination.**

S. M. Colegate y R. J. Molyneux [eds.]. CRC Press. pp. 558.