



**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA  
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLOGICAS**

**Aislamiento e identificación de compuestos con  
actividad anticáncer a partir de la esponja marina  
*Delaubenfelsia raromicrosclera***

**TESIS  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFIA COSTERA  
PRESENTA:**

**Mónica Patricia Ritchie Espinoza**

Ensenada, Baja California, 2003.

"Aislamiento e identificación de compuestos con actividad anticáncer a partir de la esponja marina *Delaubenfelsia raromicrosclera*."

TESIS

que para obtener el grado de  
MAESTRO EN CIENCIAS

presenta

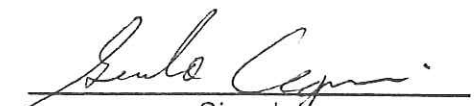
Mónica Patricia Ritchie Espinoza

Aprobada por:



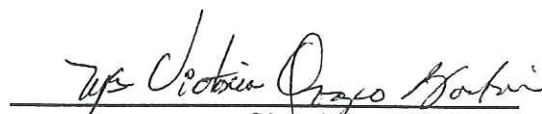
---

Presidente del Jurado  
M.C. Irma Esthela Soria Mercado



---

Sinodal  
Dr. Gerardo Aguirre Hernández



---

Sinodal  
M.C. Maria Victoria Orozco Borbón

# Aislamiento e identificación de compuestos con actividad anticáncer a partir de la esponja marina *Delaubenfelsia raromicrosclera*.

## RESUMEN

Se colectó la esponja marina *Delaubenfelsia raromicrosclera* en la playa Santispac, Bahía Concepción Baja California Sur, en octubre de 2000 con el objetivo extraer compuestos con actividad anticáncer. Se colectaron 3.4 Kg de organismo, mismos que fueron sometidos a una extracción etanólica. Una vez obtenido el extracto crudo el cual tuvo una masa de 152 gramos, se realizó la separación de compuestos según su polaridad por cromatografía en columna de fase inversa C-18 utilizando como eluentes: agua, metanol, mezclas de metanol:diclorometano y diclorometano puro. Las fracciones obtenidas fueron sometidas a un ensayo citotóxico utilizando células de cáncer de colon HCT-116; se seleccionaron las fracciones que presentaron mayor actividad para continuar con la separación de compuestos por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) preparativa. De la fracción que presentó la mayor actividad se aisló un precipitado con una  $LC_{50} = 0.085 \mu\text{g ml}^{-1}$ ; se procedió a la elucidación estructural por medio de Espectroscopia de Infrarrojo, Resonancia Magnética Nuclear de  $H^1$  y  $C^{13}$  y Espectrometría de Masas y se encontró que se trataba de el ácido orto-[isopropanolamina(p-bencil)-N-etilamida]benzoico; con fórmula molecular  $C_{19}H_{22}N_2O_4$  y masa molecular de 342.

## Dedicatorias

Con amor para mi amorcito ,  
por que solo tu podrías haber esperado con tanta paciencia ,  
gracias por amarme.

A mis viejitos lindos de quienes solo he recibido amor.

A mis hermanitos con quienes Dios quiso que compartiera mi vida,  
los quiero mucho

A los peques de la familia,  
los que son y los que vienen, aprendan a su tía Paty eh!

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Baja California, la Facultad de Ciencias Marinas y el Instituto de Investigación Oceanológicas, por brindarme la oportunidad de realizar una de mis metas.

Al Centro de Biotecnología Marina y Biomedicina del Instituto de Oceanografía Scripps de la Universidad de California en San Diego, al Centro de Graduados e Investigación del Instituto Tecnológico de Tijuana y al Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la Universidad Nacional Autónoma de México; por el apoyo brindado en la realización de esta investigación.

A la M.C. Irma Esthela Soria Mercado, quien dirigió esta investigación y a quien le ofrezco mi admiración, respeto y cariño. Gracias por su confianza.

A el Doctor Gerardo Aguirre Hernández y la M.C. María Victoria Orozco Borbón por su valiosa contribución en la realización de este trabajo.

A el Q.F.B. Jorge Casillas Arias, por las facilidades y la confianza para cumplir con mi trabajo; y a Norma y Dámaris por darme una manita cuando la necesité.

A Alberto por darme la idea, y a Leslie y Verónica por su amistad y apoyo.

# ÍNDICE

	página
1. Introducción	1
1.1 Antecedentes	6
1.2 Objetivos	12
2. Metodología	12
2.1 Colecta e identificación del organismo	12
2.2 Extracción	14
2.3 Separación y ensayo citotóxico	14
2.4 Elucidación estructural	18
2.4.1 Reacción de metilación	19
2.4.2 Espectroscopia Infrarrojo	20
2.4.3 Resonancia Magnética Nuclear H <sup>1</sup> y C <sup>13</sup>	20
2.4.4 Espectrometría de masas	20
3. Resultados y discusiones	21
3.1 Identificación del organismo y extracción	21
3.2 Separación y ensayo citotóxico	21
3.3 Elucidación estructural del compuesto DR <sub>6p</sub>	26
3.3.1 Espectroscopia Infrarrojo	27
3.3.2 Resonancia Magnética Nuclear H <sup>1</sup>	31
3.3.3 Resonancia Magnética Nuclear C <sup>13</sup>	37
3.3.4 Espectrometría de masas	41
3.3.5 Determinación de la fórmula molecular del compuesto DR <sub>6p,m</sub>	44
3.3.6 Determinación de la fórmula molecular del compuesto DR <sub>6p</sub>	46
3.3.7 Estructura química propuesta para el compuesto DR <sub>6p,m</sub>	47
3.3.8 Estructura química propuesta para el compuesto DR <sub>6p,m</sub>	49
4. Conclusiones	51
5. Recomendaciones	51
6. Literatura citada	52

## LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Incidencia y mortalidad de cáncer en México y el mundo. Base de datos Globocan 2000; extraída del banco de datos de la Organización Mundial de la salud.	3
II. Compuestos con actividad anticáncer aislados de organismos marinos.	10
III. Fracciones obtenidas mediante cromatografía en columna fase inversa (C-18) indicando en cada una de ellas el eluyente utilizado y la clave que se le asignó.	17
IV. Masas de las fracciones obtenidas en la separación del extracto crudo por cromatografía en columna fase inversa (C-18).	23
V. Actividad contra células de cáncer de colon HCT-116 de las trece fracciones obtenidas por cromatografía.	24
VI. Actividad contra células de cáncer de colon HCT-116 de las cuatro subfracciones de la fracción DR <sub>6s</sub> y de la fracción DR <sub>6p</sub> .	26
VII. Principales señales y asignaciones de Espectroscopia Infrarroja de los compuestos DR <sub>6p</sub> y DR <sub>6pm</sub> .	31
VIII. Comparación de las principales señales y asignaciones de los espectros de Resonancia Magnética Nuclear H <sup>1</sup> de los compuestos DR <sub>6p</sub> y DR <sub>6pm</sub> .	36
IX. Principales señales observadas en el espectro de Resonancia Magnética Nuclear C <sup>13</sup> del compuesto DR <sub>6pm</sub> .	40

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1a.	Algunos compuestos con actividad anticáncer aislados de organismos marinos.	8
1b.	Algunos compuestos con actividad anticáncer aislados de organismos marinos.	9
3.	Localización de la zona de colecta: Playa Santispac, ubicada en Bahía Concepción, Baja California Sur.	13
4.	Cromatografía de líquidos de fase inversa, sistema utilizado para la separación del extracto crudo.	16
5.	Espectro de Absorción Infrarroja del compuesto DR <sub>6p</sub> .	29
6.	Espectro de Absorción Infrarroja del compuesto DR <sub>6pm</sub> .	30
7.	Espectro de Resonancia Magnética Nuclear H <sup>1</sup> del compuesto DR <sub>6p</sub> .	34
8.	Espectro de Resonancia Magnética Nuclear H <sup>1</sup> del compuesto DR <sub>6pm</sub> .	35
9.	Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de C <sup>13</sup> del compuesto DR <sub>6pm</sub> .	38
10.	Espectro de masas del compuesto DR <sub>6p</sub> .	42
11.	Espectro de masas del compuesto DR <sub>6pm</sub> .	43
12.	Estructura química propuesta para el compuesto DR <sub>6pm</sub> .	48
13.	Estructura química propuesta para el compuesto DR <sub>6p</sub> .	50

## 1. INTRODUCCIÓN

Uno de los principales retos a los que el hombre se ha enfrentado , es el de solucionar los problemas de salud. Es bien sabido que desde la antigüedad, el hombre ha buscado como combatir las enfermedades que atacan a la humanidad, siendo las plantas sus principales herramientas, ya que algunas de ellas han sido reconocidas por ser portadoras de sustancias con propiedades curativas.

Hace aproximadamente 200 años, que el hombre inició la búsqueda de estas sustancias naciendo así lo que hoy conocemos como Química de Productos Naturales, que hoy en día ha dado lugar en gran parte a la industria farmacéutica, de tal manera que aproximadamente el 60 % de los agentes anticáncer y antibióticos disponibles comercialmente o que están en las últimas etapas de investigación clínica son de origen natural (Shu, 1998).

En estos 200 años, se han descubierto una gran cantidad de compuestos activos contra diferentes enfermedades, desafortunadamente, muchos de los fármacos generados en el pasado son ineficaces en la actualidad, principalmente los antibióticos debido a la capacidad que tienen los microorganismos de desarrollar resistencia a los fármacos. Existen además enfermedades cuya cura ha sido todo un reto para la ciencia, como lo son los diferentes tipos de cáncer, y el surgimiento de nuevas enfermedades provocadas principalmente por microorganismos; todo esto da como resultado que siga existiendo una gran necesidad de nuevos fármacos (Fenical, 1996).

La prevención y tratamiento del cáncer requieren un continuo desarrollo de nuevos agentes quimioterapéuticos y quimiopreventivos. La quimioterapia

para algunos tipos de cáncer ha tenido importantes avances , como consecuencia se han elevado las tasas de curación, sin embargo ha tenido poco impacto en cáncer de pulmón, colon, hígado, ovario, estómago, próstata, páncreas y cerebro (Cassady, 1990). En la tabla I se muestran datos de mortalidad debida a diferentes tipos de cáncer en México y en el mundo.

La necesidad de encontrar nuevas sustancias con actividad farmacológica, hizo que el hombre diversificara la dirección de su búsqueda y se enfocara a explorar un medio poco explorado y además inmenso en tamaño y en recursos naturales: el mar.

El mar reúne ciertas características que lo convierten en una gran fuente de productos naturales novedosos: constituye tres cuartas partes de la superficie global; de 14 millones de especies que hay en el planeta, el 90 % son marinas (Pellew R., 1996); de los 33 filos que existen en nuestro planeta, 15 son exclusivos marinos y solo uno es exclusivo terrestre (Heywood y Watson, 1995); además, el mar posee propiedades químicas y físicas muy diferentes al medio terrestre; por lo que es muy probable encontrar sustancias nuevas con propiedades farmacológicas novedosas.

En la década de los setentas se inició la búsqueda de productos naturales marinos y en los ochenta ésta se intensificó de tal manera que se han encontrado miles de sustancias nuevas, y se han escrito cientos de publicaciones al respecto (Carte, 1996).

Tabla I. Incidencia y mortalidad de cáncer en México y el mundo. Base de datos Globocan 2000; extraída del banco de datos de la Organización Mundial de la Salud.

<i>Tipo de Cáncer</i>	<i>México</i>		<i>Mundo</i>	
	<i>casos</i>	<i>% mortalidad</i>	<i>casos</i>	<i>% mortalidad</i>
Colon	3081	48	498754	51
Oral	1136	34	169524	47
Nasofaringe	130	37	45976	58
Estómago	5272	79	558458	72
Hígado	603	99	398364	96
Páncreas	2225	85	115697	97
Pulmón	7585	90	901746	90
Piel	772	29	65177	30
Seno	15063	31	105346	35
Cervical	16448	40	470606	49
Utero	5890	27	188952	23
Ovario	2647	68	192379	59
Próstata	8361	60	542990	37
Testicular	737	22	49302	17
Riñón	1284	62	118255	48
Cerebro	1782	81	100446	71
Leucemia	2618	80	144321	75

Es importante mencionar que muchos de estos compuestos nuevos son químicamente complejos y se encuentran en altas concentraciones; esto indica

que su producción, metabólicamente hablando, es cara; por lo tanto deben proveer alguna ventaja al organismo que los produce (Pawlik , 1993).

Los corales, esponjas, tunicados, pepinos marinos, bacterias y hongos marinos, son los organismos en los que se ha encontrado una mayor cantidad de compuestos activos (Faulkner, 1992 y Fenical, 1996). Estos organismos tienen en común ciertas características especiales: son sésiles, es decir no poseen movimiento voluntario; no tienen algún órgano físico de defensa; y abundan en zonas costeras como manglares y arrecifes, en donde existe una gran diversidad biológica (Hickman, *et al.*, 1990).

Algunos investigadores han sugerido que los metabolitos secundarios tienen funciones defensivas, tales como la deterrencia a predadores, competencia por espacio, defensa contra organismos patógenos e inclusive protección contra la radiación ultravioleta (Ruggieri, 1976; Pawlik, 1993).

Enfocándonos a las esponjas tenemos lo siguiente: existen más de 5,000 especies; son los organismos pluricelulares más primitivos que existen; han colonizado todos los habitats acuáticos; específicamente los de la clase demospongiae, se encuentran en todo tipo de ambientes, en zonas someras y profundas, agua dulce y salada, iluminada y oscura, y en cualquier tipo de sustrato como en rocas o arena (Bergquist, 1978).

En un estudio realizado en un arrecife del caribe, solo 11 de un total de 200 especies de peces consumían esponjas; esto sugiere que las esponjas eran evitadas por la mayoría de los peces polifagos (Randall *et al.*, en: Proksch 1994). Las esponjas de la clase calcárea o sclerospongiae pueden deber su protección ante los predadores, a sus espículas de sílica y de carbonato de calcio que tienen inmersas en su tejido blando; sin embargo las esponjas de la

clase demospongiae; a la cual pertenecen el 80% de las 5,000 especies de esponjas que existen; tienen espículas de espongina (fibras proteínicas), las que no detienen a los predadores (Proksch, 1994). El hecho de que estas especies sean evitadas por los peces marinos sugiere que las esponjas son excelentes candidatos a la defensa química, es decir que producen compuestos químicos, con actividad biológica.

En el Golfo de California, se encuentra una zona en la que se puede observar una amplia diversidad biológica: Bahía Concepción, ubicada en el margen occidental del golfo, presenta zonas con manantiales hidrotermales y temperaturas que oscilan entre 38 y 51°C (Cruz Orozco *et al.*, 1991).

En un estudio ecológico de la zona realizado en 1998 y 1999 se encontró que los organismos de una parte de esta Bahía, específicamente playa Santispac, presentaban una gran competencia por espacio (Kelly-Gutiérrez, 1999); lo cual convierte a las esponjas de este lugar en organismos con alta probabilidad de producir metabolitos secundarios con actividad biológica.

Malcolm Gibson Dickinson viajó en una expedición por el Golfo de California a finales de los años 30's, con el fin de definir la fauna del golfo. En dicha expedición encontró 26 nuevas especies de esponjas y un género nuevo: *Delaubenfelsia*; con una única especie a la cual le dio el nombre de *Delaubenfelsia raromicrosclera*. Este nuevo género fue clasificado en la clase Demospongiae, orden Hadromerida y familia Choanitidae. Esta esponja fue ubicada precisamente en la playa Santispac (Dickinson, 1945).

En la presente investigación, se llevará a cabo el estudio químico de la esponja marina *Delaubenfelsia raromicrosclera* con la finalidad de encontrar e

identificar los compuestos presentes en dicha esponja y determinar su citotoxicidad contra células de cáncer de colon.

## 1.1 ANTECEDENTES

Como ya se ha mencionado, en las últimas décadas se han aislado una gran cantidad de compuestos con actividad anticáncer a partir de organismos marinos; sin embargo son pocos los que llegan a ser desarrollados como medicamentos, debido en primer lugar al tiempo requerido para que se cubran las diferentes etapas de los estudios clínicos a los que son sometidos los nuevos fármacos (tabla II, figuras 1a y 1b), y en segundo lugar, muchos de estos compuestos son inestables y no pueden ser sintetizados totalmente y/o con rendimiento aceptable.

El compuesto Eleuterobina fue aislado de un coral blando de las costas de Australia, con potencial contra el cáncer en ovarios; se cree que tiene posibilidades más promisorias que el Taxol, utilizado por muchos años contra ese problema (Long, *et al.*), 1998).

El compuesto Pseudopterosin fue descubierto en un coral gorgonio del Mar del Caribe *Pseudopterogorgia elisabethae*, y actualmente se utiliza en forma de crema para proteger el daño provocado por cáncer en la piel (Mayer, *et al.*, 1998).

La Briostatina es un compuesto aislado de un briozoario en Bahía de Todos Santos y San Diego y ahora se encuentra en su fase de prueba II para leucemia (Shu, 1998).

El compuesto Spongouridina fue aislado de la esponja del caribe *Cryptotethia crypta*; este compuesto tiene una potente capacidad de inhibir el

crecimiento de tumores y sirvió como base para la síntesis de arabinosil-citosina (ara-c) con potente actividad antileucémica (Carte ,1996)

Otro compuesto interesante es el Dercitin, aislado de la esponja *Dercitus sp.* Colectada en Las Bahamas. Este compuesto posee actividad citotóxica contra células de melanoma B-16 y células de cáncer de pulmón *invitro* en concentraciones de rango nanomolares (Burres *et al.*, 1989).

La Halicondrina B fue aislada de la esponja *Halicondria okadai* y ha mostrado una potente actividad *invivo* contra células de leucemia P388 y células de melanoma B16. Este compuesto ha generado un gran interés como agente anticáncer potencial y se encuentra en estudios clínicos en vías de desarrollarse como medicamento (Shu, 1998).

El compuesto Teopederin A, aislado de la esponja marina *Theonella sp.* es altamente citotóxico contra células de leucemia P388 con una LC<sub>50</sub> por debajo de 1 ng ml<sup>-1</sup> (Fusetani *et al.*; 1992).

Otro compuesto citotóxico que merece mención es Cibrostatina 1 , aislado de la esponja *Cribochalina sp.* colectada en el océano Indico. Este compuesto muestra actividad contra las nueve líneas celulares de melanoma humano del panel de el Instituto Nacional del Cáncer (Petit *et al.*, 1992).

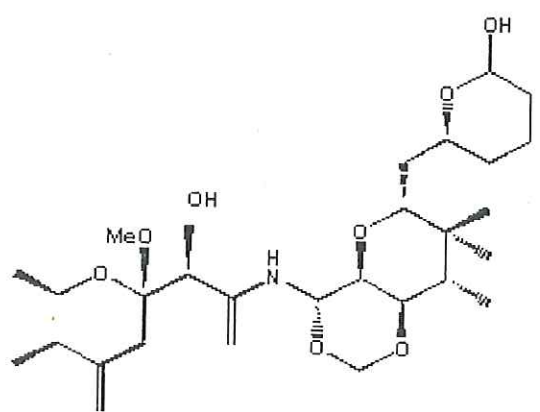
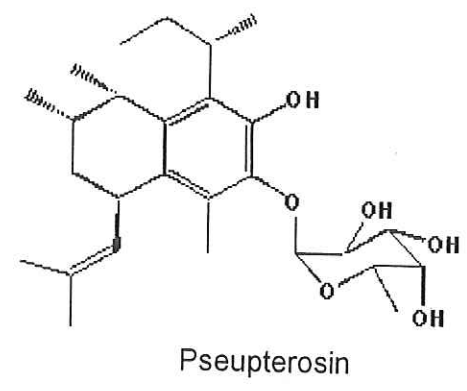
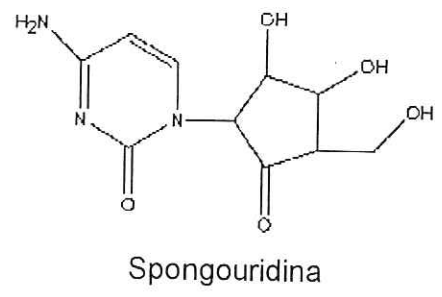
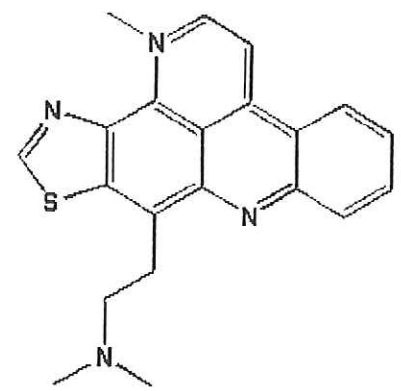
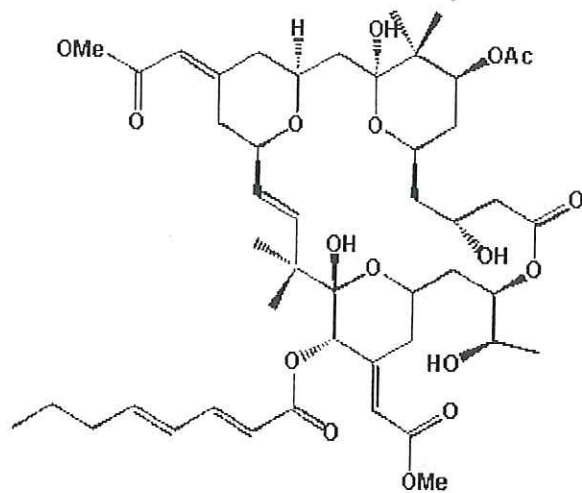
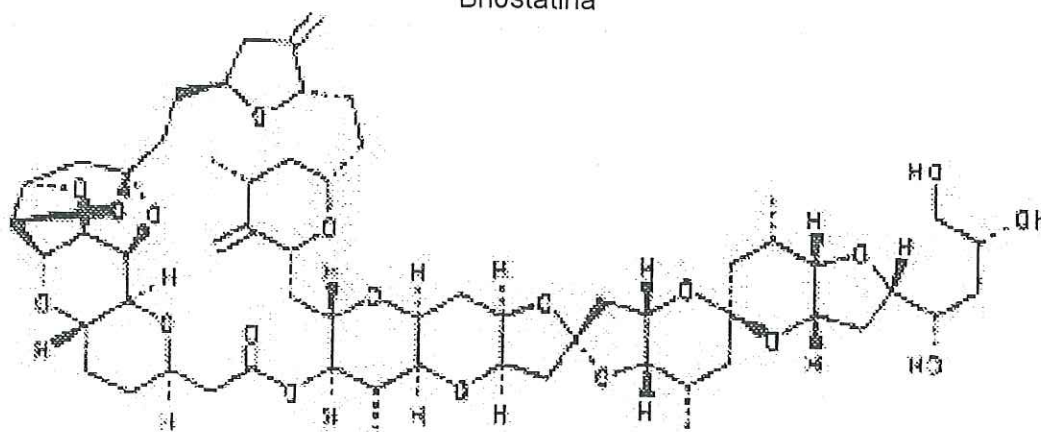


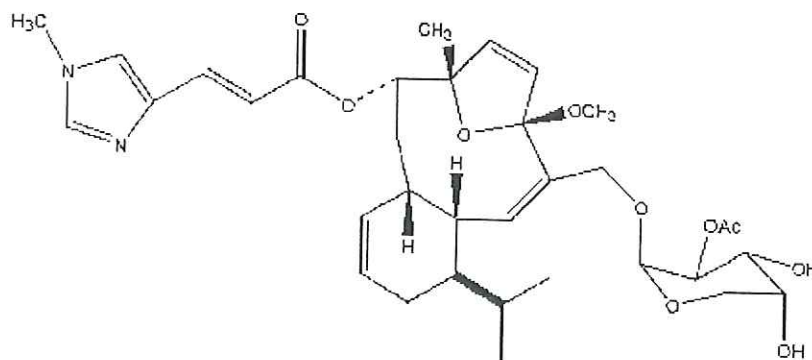
Figura 1a.- Algunos compuestos con actividad anticancer aislados de organismos marinos.



Briostatina



Halicondrina B



Eleuterobina

Figura 1b.- Compuestos con actividad anticancer aislados de organismos marinos.

Tabla II. Compuestos con actividad anticáncer aislados de organismos marinos.

<b>Compuesto</b>	<b>Organismo del que fue aislado</b>
Eleuterobina	Coral : <i>Eleutherobia sp.</i>
Pseudopterosina	Coral : <i>Pseupdoterogorgia elisabethae</i>
Spongouridina	Esponja: <i>Cryptotethia crypta</i>
Dercitin	Esponja: <i>Dercitus sp.</i>
Halicondrina B	Esponja: <i>Halicondria okadai</i>
Teopederin	Esponja: <i>Theonella sp.</i>
Cibrostatina 1	Esponja: <i>Cibrochalina sp.</i>
Briostatina 1	Briozario: <i>Bugula neritina</i>

En 1998 y 1999 se realizó un estudio de Ecotoxicología por parte de la Facultad de Ciencias Marinas de la Universidad Autónoma de Baja California, en el que entre otras cosas se investigó la toxicidad de los organismos bentónicos de la playa Santispac, de Bahía Concepción, Baja California Sur contra el crustáceo *Artemia salina* ya que se ha observado que existe una correlación entre la toxicidad contra *Artemia salina* y la actividad anticancerígena (Ferrigni *et al.*, 1984; Kinghorn *et al.*, 1967 en Meyer *et al.*, 1982)]. De 65 diferentes especies de organismos bentónicos que se encontraron en la zona, 48 resultaron tóxicos a *Artemia salina* , y quien presentó la mayor actividad citotóxica durante las cuatro estaciones del año, fue la esponja *Delaubenfelsia raromicrosclera* (Kelly-Gutiérrez, 1999), de ahí el interés de determinar cuales son los compuestos responsables de dicha

interés de determinar cuales son los compuestos responsables de dicha actividad ya que no se encontró ninguna referencia de estudios anteriores realizados sobre esta esponja.

## 1.2 OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL:

Llevar a cabo el aislamiento, purificación y elucidación estructural de compuestos con actividad anticáncer presentes en la esponja marina *Delaubenfelsia raromicrosclera*.

### OBJETIVOS PARTICULARES:

- Colectar e identificar taxonómicamente a la esponja marina *Delaubenfelsia raromicrosclera*.
- Aislar y purificar por métodos cromatográficos, los compuestos con actividad anticáncer presentes en la esponja marina *Delaubenfelsia raromicrosclera*.
- Probar la actividad anticáncer de los compuestos aislados por medio de un ensayo con células de cáncer de colon HCT-116
- Elucidar la estructura química de los compuestos aislados, utilizando métodos espectrales y reacciones químicas.

## 2. METODOLOGÍA

### 2.1 COLECTA E IDENTIFICACIÓN DEL ORGANISMO

La esponja se colectó en la playa Santispac ubicada en el margen occidental de Bahía Concepción, Baja California Sur, en el mes de octubre del 2000. Esta bahía se localiza en la costa oriental de la península entre los paralelos 26° 33' y 26° 53' de latitud norte y los meridianos 111° 42' y 111° 56' de longitud oeste (figura 3). Tiene un estero que presenta una extensión aproximadamente de cuatro hectáreas, con vegetación de manglar en un 60% de su superficie y se comunica con la bahía por un canal de 4 metros de ancho con baja profundidad; en este estero la temperatura varía entre 32.8 y 30.5 ° C en verano, y entre 27 y 24 ° C en invierno durante el día (Magallanes, 1992).

La colecta se hizo por buceo libre. Se obtuvieron tres especímenes que sumaban una masa de 3.4 Kg, los cuales fueron colocados en bolsas de plástico tipo ziplock, y se trasladaron en hielo a la Facultad de Ciencias Marinas en la ciudad de Ensenada, Baja California para su posterior análisis.

Se tomó una pequeña muestra del organismo y se envió al Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la Universidad Nacional Autónoma de México para su identificación taxonómica.

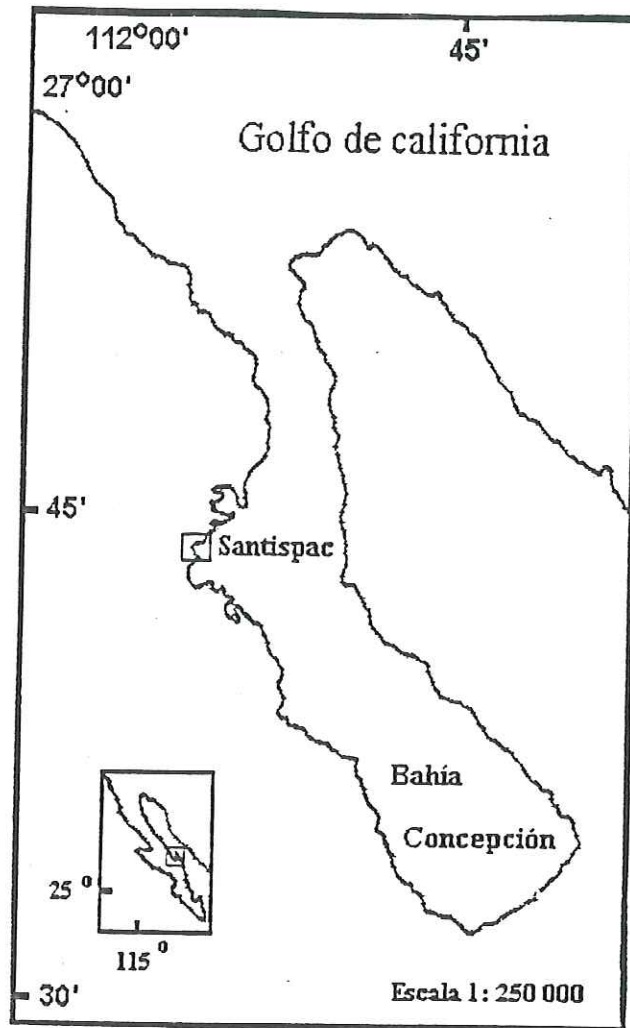


Figura 3. Localización de la zona de colecta: playa Santispac, ubicada en Bahía Concepción, Baja California Sur

## **2.2 EXTRACCIÓN**

Las esponjas se cortaron en trozos de aproximadamente 2 cm<sup>3</sup>. Se eliminó toda la materia orgánica que tenían adherida, como piedras y restos de conchas; así como otro tipo de organismos tales como ofiuros y poliquetos. Se pesó la masa del tejido y se colocó en frascos a los cuales se les agregó alcohol etílico suficiente para cubrir todo el tejido y se dejaron en reposo a temperatura ambiente durante diez días. Al término de este tiempo se eliminó el disolvente por decantación y a la porción sólida restante se le agregó de nuevo etanol para una segunda extracción.

El extracto decantado se filtró a presión reducida primeramente empleando una tela de lino y posteriormente papel wathman # 1. Una vez filtrado se concentró por rotavaporación (destilación a presión reducida) cuidando que la temperatura no sobrepasara los 45° C.

Para la segunda extracción se siguió con el mismo procedimiento para lo cual se filtró y se concentró y finalmente se juntaron ambos extractos y se pesaron en seco.

## **2.3 SEPARACIÓN Y ENSAYO CITOTÓXICO**

La separación del extracto crudo se llevó a cabo de manera biodirigida (Waterman , 1990); es decir a cada fracción separada se le realizó el ensayo citotóxico para células cancerosas de colon humano HCT-116, con el fin de ir eliminando las fracciones inactivas o poco activas.

La separación se inició mediante el uso de cromatografía en columna de líquidos empleando gel de sílice fase inversa (C-18) (Evans *et al.*, 1980) de la manera siguiente:

Se montó una columna de aproximadamente 40 cm de longitud y 3 cm de diámetro, con gel de sílice fase inversa C-18 en metanol como adsorbente, y se empleó vacío para la elución (figura 4) (Coll y Bowden, 1986); una vez montada la columna se estabilizó mediante elución con agua destilada. Enseguida se adicionó la muestra, la cual se preparó de la manera siguiente : se disolvieron 10 gramos de extracto crudo en 200 ml de una mezcla de diclorometano-metanol-agua 1:1:1 y se agregaron a 5 gramos de gel de sílice C-18; posteriormente se concentraron por rotavaporación a un volumen aproximado de 50 ml.

Se eluyeron a través de la columna porciones de 150 ml de agua y mezclas de agua con metanol, metanol puro, mezclas de metanol con diclorometano y diclorometano puro en las proporciones que se especifican en la tabla III (Blunt, *et al.*, 1987).

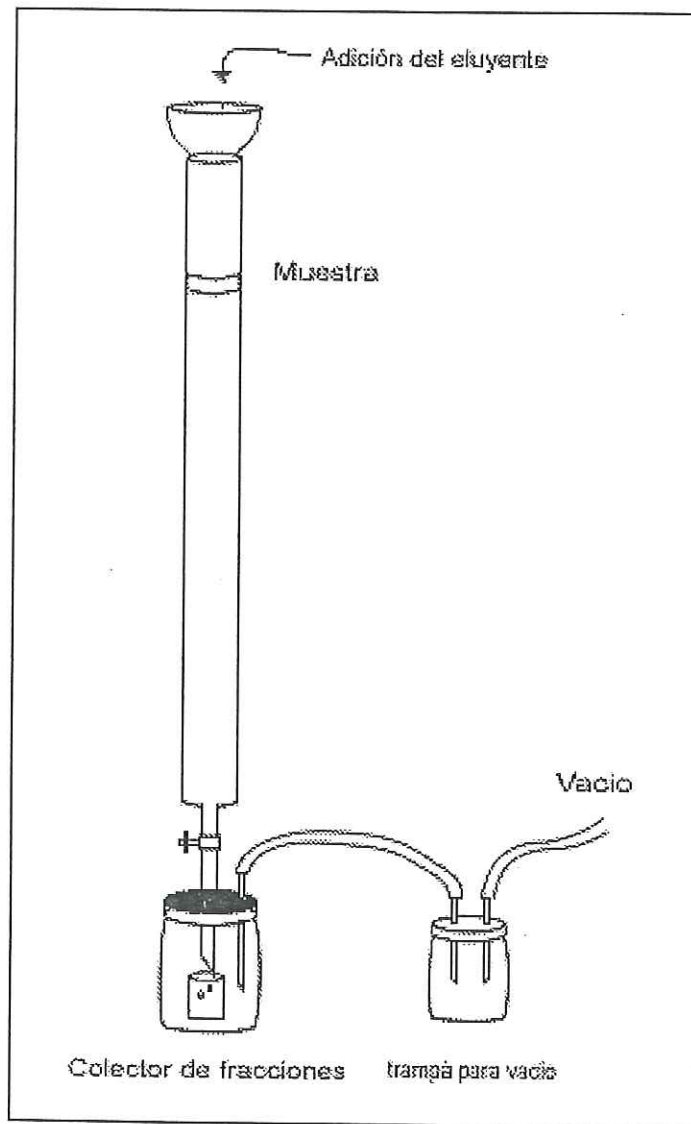


Figura 4.- Cromatografía de líquidos de fase inversa, sistema utilizado para la separación del extracto crudo.

Tabla III . Fracciones obtenidas mediante cromatografía en columna fase inversa (C-18), indicando para cada una de ellas, el eluyente utilizado, y la clave que se le asignó.

Fracción	Eluyente	Clave
1	H <sub>2</sub> O	DR <sub>1</sub>
2	H <sub>2</sub> O	DR <sub>2</sub>
3	H <sub>2</sub> O:CH <sub>3</sub> OH 3:1	DR <sub>3</sub>
4	H <sub>2</sub> O:CH <sub>3</sub> OH 3:2	DR <sub>4</sub>
5	H <sub>2</sub> O:CH <sub>3</sub> OH 2:3	DR <sub>5</sub>
6	H <sub>2</sub> O:CH <sub>3</sub> OH 1:4	DR <sub>6</sub>
7	H <sub>2</sub> O:CH <sub>3</sub> OH 1:9	DR <sub>7</sub>
8	CH <sub>3</sub> OH	DR <sub>8</sub>
9	CH <sub>3</sub> OH:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 9:1	DR <sub>9</sub>
10	CH <sub>3</sub> OH:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 3:1	DR <sub>10</sub>
11	CH <sub>3</sub> OH:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 1:1	DR <sub>11</sub>
12	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	DR <sub>12</sub>
13	H <sub>2</sub> O:CH <sub>3</sub> OH 1:1	DR <sub>13</sub>

Las fracciones obtenidas se concentraron por rotavaporación y se envió una muestra de cada una de ellas al Centro de Biotecnología marina y Biomedicina del Instituto de Oceanografía Scripps, de la Universidad de California en San Diego en La Jolla California para la realización del ensayo citotóxico para células cancerosas de colon humano HCT-116.

Las fracciones que mostraron la mayor actividad se seleccionaron para continuar la purificación. En estas fracciones se formó un precipitado café el cual fue separado por filtración al vacío para su posterior análisis.

La parte soluble de estas fracciones fue analizada mediante cromatografía en capa delgada en gel de sílice fase inversa (C-18) empleando como eluente una mezcla de metanol:diclorometano 2:8, se reunieron aquellas que presentaron similitud en sus relaciones frontales y en el número de manchas.

Estas fracciones fueron separadas por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés) utilizando un cromatógrafo HPLC preparativo Waters modelo DSC serie #98DSC238M con gases He y N<sub>2</sub>; y una mezcla de agua:acetonitrilo 60:40 como eluente.

Las fracciones obtenidas mediante este sistema, así como el precipitado obtenido anteriormente fueron sometidas de nuevo a el ensayo citotóxico de células de cáncer de colon HCT-116.

## **2.4 ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL**

Para la elucidación estructural del compuesto que presentó la mayor actividad; el cual se nombro DR<sub>6p</sub>; se utilizaron reacciones químicas (metilación) y métodos espectroscópicos como Espectroscopia de Infrarrojo, Resonancia Magnética Nuclear de H<sup>1</sup> y C<sup>13</sup> y Espectrometría de Masas.

### 2.4.1 REACCIÓN DE METILACIÓN

Se mezclaron 40 mg del compuesto DR<sub>6p</sub> con 3 ml de complejo trifluoruro bórico-metanol (BF<sub>3</sub> :CH<sub>3</sub>OH) mas 2 ml de metanol y se pusieron en reflujo a 50°C durante 2 horas.

Se le agregaron 5 ml de agua destilada y se llevó a pH=9 con una solución de hidróxido de amonio al 10%. Se filtró y se hizo una extracción con un volumen igual de diclorometano. La fase orgánica fue concentrada por rotavaporación y el concentrado se sometió a percolación a través de una columna de vidrio de 30 cm de longitud y 1.5 cm de diámetro, empleando gel de sílice ( 230-400 mesh) como adsorbente y como eluente, una mezcla de éter de petróleo:diclorometano (3:7) .

Este compuesto producto de la metilación, al cual llamaremos DR<sub>6pm</sub>; fue sometido a los mismos métodos espectroscópicos que el compuesto original con el fin de obtener datos para la elucidación de su estructura química.

## **2.4.2 ESPECTROSCOPIA INFRARROJO**

Se obtuvieron los espectros de IR para DR<sub>6p</sub> y DR<sub>6pm</sub>, en un espectrofotometro IR Perkin Elmer FT-IR modelo 1750 . El compuesto DR<sub>6p</sub> por ser sólido se preparó en forma de pastilla con bromuro de potasio, mientras el compuesto DR<sub>6pm</sub> se disolvió en diclorometano y se preparó en película.

## **2.4.3 RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR H<sup>1</sup> Y C<sup>13</sup>.**

Para la obtención de los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de H<sup>1</sup> se utilizaron dos equipos: para el compuesto DR<sub>6p</sub> se utilizó un espectrofotómetro Varian Gemini de 400 MHz Oxford Ciyomaghet; y para el compuesto DR<sub>6pm</sub> se utilizo un Varian Gemini de 200 MHz mismo que fue utilizado para la obtención del espectro de RMN de C<sup>13</sup>. El compuesto DR<sub>6p</sub> se disolvió en metanol deuterado y el compuesto DR<sub>6pm</sub> fue disuelto en cloroformo deuterado.

## **2.4.4 ESPECTROMETRIA DE MASAS.**

Para la obtención de los espectros de masas se utilizaron dos equipos: para el compuesto DR<sub>6p</sub> se utilizó un Cromatógrafo de líquidos con detector de masas Hewlett Packard 1100 MSD con bomba acuaflo serie II y columna C-18 RP, el compuesto se analizó en solución con metanol grado HPLC a una concentración de 0.1 mg.ml<sup>-1</sup>. Para el compuesto DR<sub>6pm</sub> se utilizó un equipo LC/MSD Trap. 1100 series, Agilent Technologies.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

#### 3.1 IDENTIFICACIÓN DEL ORGANISMO Y EXTRACCIÓN

La esponja colectada fue identificada como *Delaubenfelsia raromicrosclera* por la Bióloga Patricia Gómez López del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la Universidad Autónoma de México.

Los organismos colectados tenían una masa de 3.4 Kg; después de limpiarlos completamente se obtuvo una masa de 2.8 Kg que fueron sometidos a la extracción etanólica; el extracto obtenido después de dos extracciones fue de 152 gramos.

#### 3.2 SEPARACIÓN Y ENSAYO CITOTÓXICO.

Del extracto crudo sometido a una separación mediante cromatografía en columna fase inversa C-18 se obtuvieron trece fracciones; cada fracción fue concentrada por rotavaporación y secada al vacío. La masa de extracto crudo utilizada para cada separación fue de 10 gramos. Las fracciones DR<sub>1</sub> y DR<sub>2</sub> se extrajeron con agua al 100% y se obtuvieron 2.9075 y 0.8506 gramos de fracción seca respectivamente; la fracción DR<sub>3</sub> se extrajo con H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>OH 3:1 y se obtuvieron 0.4 gramos; la fracción DR<sub>4</sub> se extrajo con H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>OH 3:2 y se obtuvo una masa de 0.0945 gramos; la fracción DR<sub>5</sub> se extrajo con H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>OH 2:3 y se obtuvo una masa de 0.093 gramos; la fracción DR<sub>6</sub> se extrajo con H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>OH 1:4 y se obtuvieron 0.1157 gramos; la fracción DR<sub>7</sub> se extrajo con H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>OH 1:9 y se obtuvo una masa de 0.25 gramos; la fracción DR<sub>8</sub> se extrajo con CH<sub>3</sub>OH puro y se obtuvieron 0.2507 gramos; la fracción DR<sub>9</sub> se extrajo con CH<sub>3</sub>OH:CH<sub>2</sub>-Cl<sub>2</sub> 9:1 y se obtuvo una masa de 0.1952 gramos; la fracción DR<sub>10</sub> se extrajo con CH<sub>3</sub>OH:CH<sub>2</sub>-Cl<sub>2</sub> 3:1 y se obtuvo una

masa de 0.0497 gramos; la fracción DR<sub>11</sub> se extrajo con CH<sub>3</sub>OH- CH<sub>2</sub>-Cl<sub>2</sub> 1:1 7 y se obtuvo una masa de 0.0279 gramos; la fracción DR<sub>12</sub> se extrajo con CH<sub>2</sub>:Cl<sub>2</sub> al 100 % y se obtuvo una masa de 0.0259 gramos; por último, la fracción DR<sub>13</sub> se extrajo con H<sub>2</sub>O:CH<sub>2</sub>-Cl<sub>2</sub> 1:1 y se obtuvieron 0.0608 gramos. En la tabla IV se indica la masa que se obtuvo de cada fracción.

Las fracciones obtenidas fueron sometidas al ensayo citotóxico para células cancerosas de colon humano HCT-116. Los resultados obtenidos muestran que las fracciones DR<sub>1</sub>, DR<sub>2</sub>, DR<sub>3</sub>, DR<sub>12</sub> y DR<sub>13</sub> no presentan actividad contra células de cáncer de colon, mientras el resto de las fracciones mostraron una actividad (DL<sub>50</sub>) que fluctuó entre 0.98 y 81 µg ml<sup>-1</sup>, siendo los valores de actividad mas altas para las fracciones DR<sub>5</sub>, DR<sub>6</sub> y DR<sub>7</sub> con valores de DL<sub>50</sub> de 3.8, 0.98 y 3.1 µg ml<sup>-1</sup> respectivamente. Los resultados del ensayo se muestran en la tabla V.

Tabla V. Actividad contra células de cáncer de colon HCT-116 de las 13 fracciones obtenidas por cromatografía. Se remarcan en negro las fracciones que presentaron mayor actividad. (NA= No activo)

Fracción	Actividad DL <sub>50</sub> (µg/ml)
DR <sub>1</sub>	NA
DR <sub>2</sub>	NA
DR <sub>3</sub>	NA
DR <sub>4</sub>	28.2
<b>DR<sub>5</sub></b>	<b>3.80</b>
<b>DR<sub>6</sub></b>	<b>0.98</b>
<b>DR<sub>7</sub></b>	<b>3.10</b>
DR <sub>8</sub>	17.0
DR <sub>9</sub>	52.0
DR <sub>10</sub>	10.7
DR <sub>11</sub>	81.0
DR <sub>12</sub>	NA
DR <sub>13</sub>	NA

Dada la actividad mostrada por las fracciones, se eligieron las fracciones DR<sub>5</sub> , DR<sub>6</sub> y DR<sub>7</sub> para continuar con la separación. Debido a que las tres fracciones presentaron mucha similitud tanto en sus espectros de resonancia magnética nuclear H<sup>+</sup> como en el valor de sus relaciones frontales presentadas en cromatografía en capa delgada (ccd), se juntaron en una sola a la que a continuación le llamaremos solamente DR<sub>6</sub>.

Al tratar de disolver la fracción DR<sub>6</sub> en metanol, se encontró con que se formaba un precipitado café, el cual fue separado y nombrado como DR<sub>6p</sub>; la masa de esta fracción equivale al 57 % de la masa de DR<sub>6</sub>; mientras que la parte soluble se nombro DR<sub>6s</sub>.

La fracción DR<sub>6s</sub> fue separada mediante un cromatógrafo HPLC preparativo Waters mod. DSC serie #98DSC238M con gases He y N<sub>2</sub>; y una mezcla de agua-acetonitrilo 60:40 como eluente. De esta separación se obtuvieron 4 subfracciones, las cuales al igual que la fracción DR<sub>6p</sub> fueron sometidas a el ensayo citotóxico de células de cáncer de colon HCT-116. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla VI, en la cual se observan valores de DL<sub>50</sub> de 72.2, 52.3, 28.7 y 45.6 µg ml<sup>-1</sup> para las cuatro subfracciones provenientes de la fracción DR<sub>6s</sub> (DR<sub>6s</sub>-1, DR<sub>6s</sub>-2, DR<sub>6s</sub>-3 y DR<sub>6s</sub>-4 respectivamente), mientras que para el precipitado DR<sub>6p</sub> se observa una DL<sub>50</sub> = 0.085 µg ml<sup>-1</sup>. Como se puede observar en la tabla V, las fracciones que presentan la mas alta actividad (DR<sub>5</sub>, DR<sub>6</sub> y DR<sub>7</sub>) tienen valores de DL<sub>50</sub> de 3.8, 0.98 y 3.1 µg ml<sup>-1</sup> respectivamente, esto sugiere que el compuesto responsable de la actividad encontrada en estas fracciones es el precipitado DR<sub>6p</sub>, por lo cual se procederá a su elucidación estructural.

Tabla VI. Actividad contra células de cáncer de colon HCT-116 de las 4 subfracciones de la fracción DR<sub>6s</sub> y de la fracción DR<sub>6p</sub>

Fracción	Actividad DL <sub>50</sub> (µg/ml)
DR <sub>6s</sub> -1	72.2
DR <sub>6s</sub> -2	52.3
DR <sub>6s</sub> -3	28.7
DR <sub>6s</sub> -4	45.6
<b>DR<sub>6p</sub></b>	<b>0.085</b>

### 3.3 ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DEL COMPUESTO DR<sub>6p</sub>

El compuesto DR<sub>6p</sub> es soluble en sulfóxido de dimetilo, poco soluble en metanol e insoluble en solventes de menor polaridad que éste. En el espectro de Infrarrojo se observó una banda típica de el grupo OH<sup>-</sup>, por lo que se consideró necesario realizar una reacción de metilación con el fin de eliminar los grupos hidroxilos (OH<sup>-</sup>) presentes en el compuesto y sustituirlos por grupos metilos (CH<sub>3</sub>-) y disminuir así su polaridad para hacer mas manejable la muestra.



En la reacción de metilación se hicieron reaccionar 40 mg del compuesto DR<sub>6p</sub> y se obtuvieron alrededor de 15 mg de producto; tanto el producto (nombrado DR<sub>6pm</sub>) como el compuesto original (DR<sub>6p</sub>) se sometieron a Espectroscopía de Absorción Infrarroja, Resonancia Magnética Nuclear de H<sup>1</sup> y C<sup>13</sup>, así como a Espectrometría de masas, de los cuales a continuación se muestran los resultados. Las asignaciones de las señales encontradas en los diferentes espectros se hicieron según las tablas de elucidación estructural de Prestch et al , 1983 y Crews et al, 1998.

### 3.3.1 ESPECTROSCOPIA INFRARROJO.

En las figuras 5 y 6 se muestran los espectros de infrarrojo de los compuestos DR<sub>6p</sub> y DR<sub>6pm</sub> (compuesto hidroxilado y compuesto metilado respectivamente).

Las señales que se pueden apreciar en el espectro de el compuesto DR<sub>6p</sub> son las siguientes: una banda intensa en 3291 cm<sup>-1</sup> que corresponde a la vibración longitudinal del enlace O-H de los alcoholes y los ácidos carboxílicos; y al enlace N-H de aminas y amidas; una banda mediana en 2944 cm<sup>-1</sup> asignada a la vibración del enlace C-H de los alcanos; una banda intensa aguda en 1657 cm<sup>-1</sup> característica de vibraciones C=O de los ácidos carboxílicos; una banda intensa en 1528 cm<sup>-1</sup> que corresponde a la deflexión N-H de las amidas monosustituidas; y, una serie de bandas de 1454 a 1074 cm<sup>-1</sup> cuya asignación es menos específica, ya que pueden ser asignadas a alcanos, alcoholes y grupos aromáticos.

En el espectro del compuesto DR<sub>6pm</sub> se observan 3 bandas agudas intensas alrededor de 2900 cm<sup>-1</sup> que corresponden a la vibración C-H de los

alcanos; una banda aguda intensa en  $1735\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la vibración C=O de los ésteres; y, una banda entre  $1100\text{ cm}^{-1}$  característica de los éteres.

En la tabla VII se muestran las principales señales y asignaciones de los dos espectros; en ella se pueden ver las semejanzas y las diferencias que presentan ambos compuestos. Lo importante aquí es resaltar las diferencias que hay antes y después de la metilación: se observa que el compuesto original presenta una banda típica de grupos oxhidrilo ( $3291\text{ cm}^{-1}$ ) que desaparece después de la metilación; se observa también que la banda características de grupos carbonilos de ácidos carboxílicos ( $1657\text{ cm}^{-1}$ ) se desplazo ligeramente hacia la región en la que aparecen los grupos carbonilos de los ésteres ( $1735\text{ cm}^{-1}$ ), se observa también que desaparece la señal asignada a una amida monosustituida ( $1528\text{ cm}^{-1}$ ); y, por último se observa que aparece una señal en  $1100\text{ cm}^{-1}$  típica de los éteres que no se encontraba definida en el compuesto original.

De lo anterior se puede concluir que el compuesto original contiene en su estructura a un grupo ácido, una amida monosustituida cuya señal característica en  $3400\text{ cm}^{-1}$  puede estar oculta tras la banda ancha del grupo oxhidrilo y probablemente a grupos alcohol, mismos que dieron lugar respectivamente a un grupo éster, una amida terciaria, cuya señal desaparece al desaparecer el enlace N-H, y a un grupo éter .

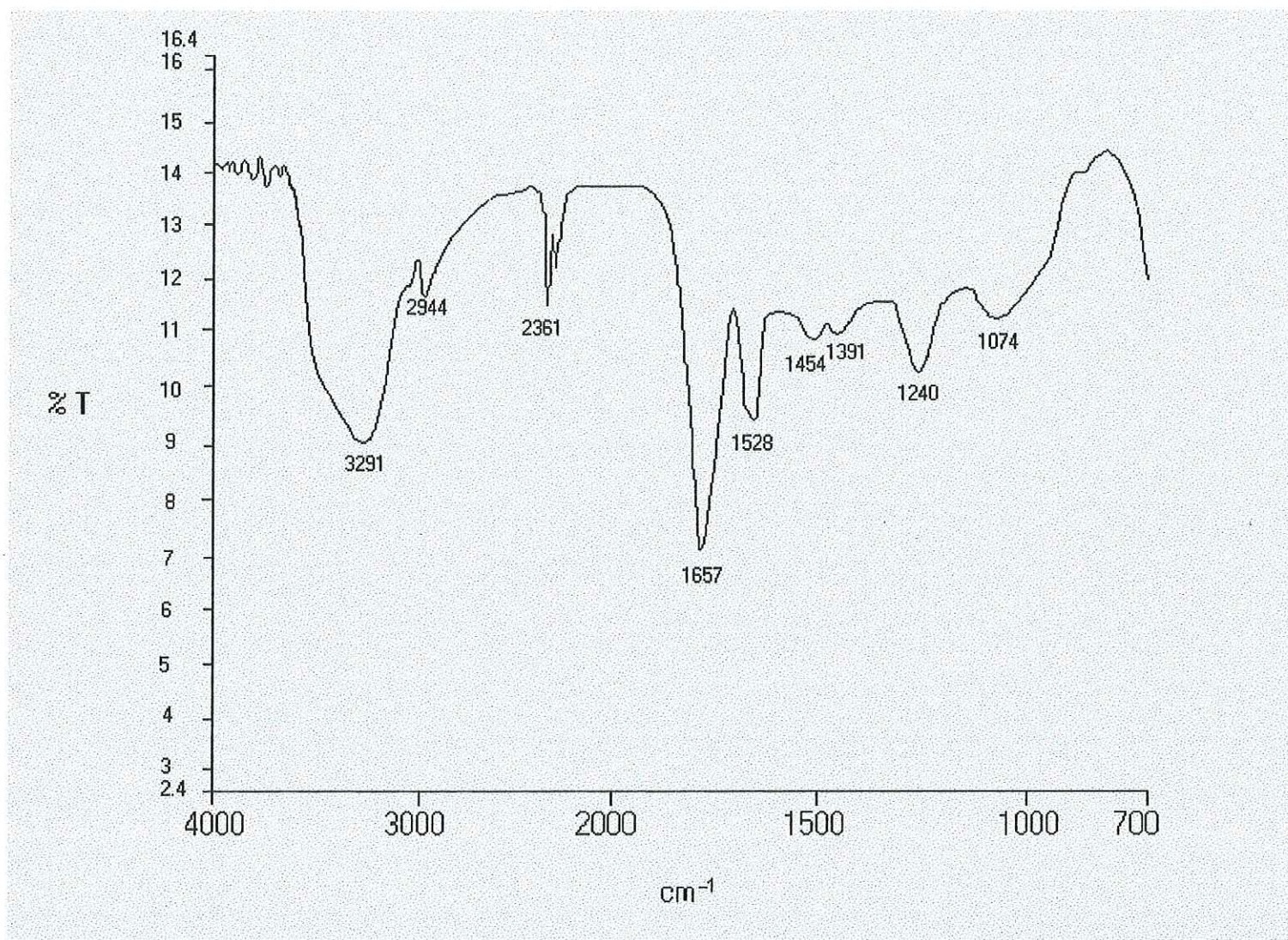


Figura No. 5.- Espectro de absorción infrarrojo del compuesto DR<sub>6p</sub>

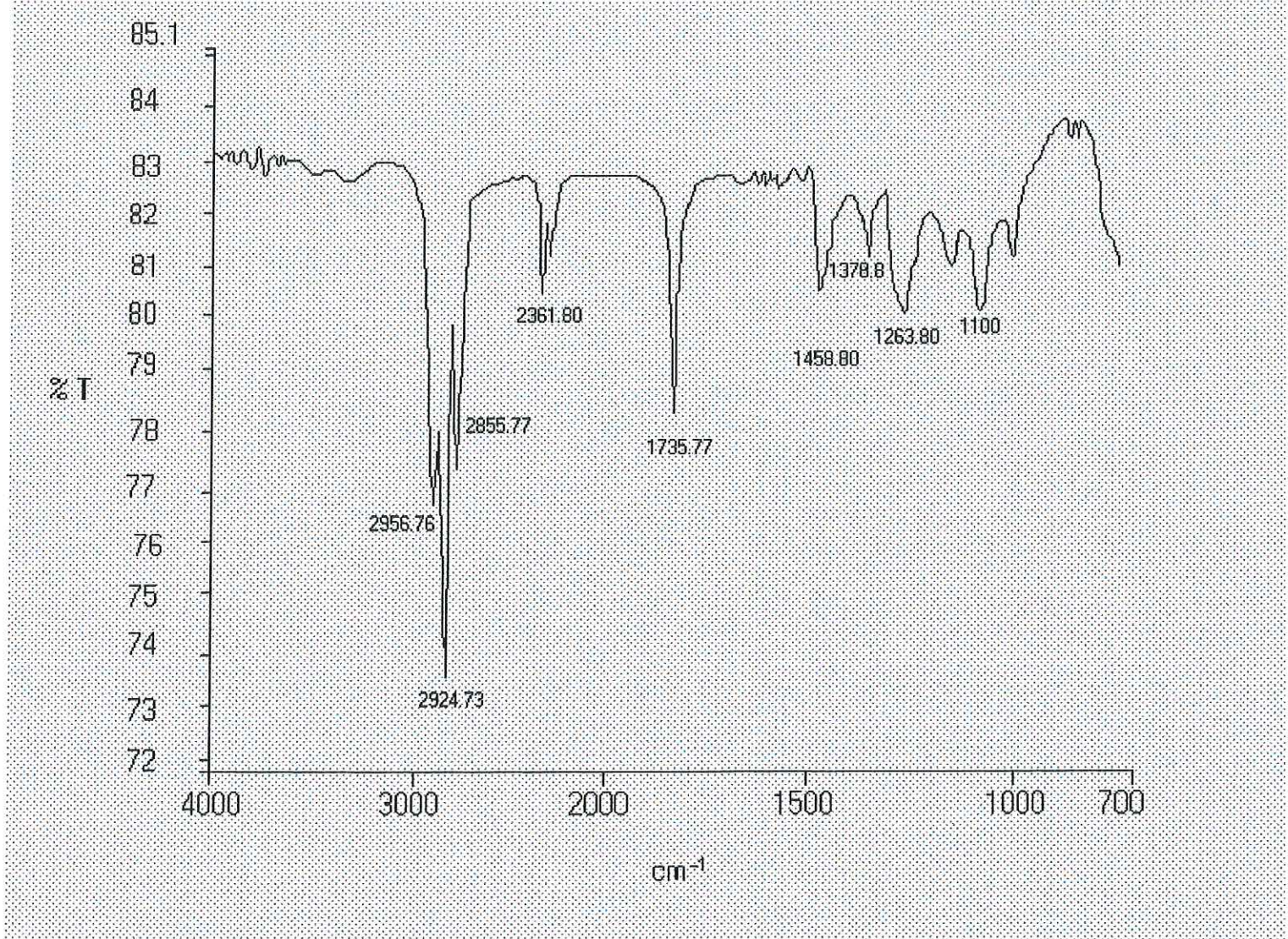


Figura No. 6.- Espectro de absorción infrarrojo del compuesto DR<sub>6</sub>pm

TABLA VII. Principales señales y asignaciones de espectroscopia infrarroja de los compuestos DR6p y DR6pm. ( $\nu$  = número de onda)

DR6p			DR6pm		
$\nu$ ( $cm^{-1}$ )	asignación		$\nu$ ( $cm^{-1}$ )	asignación	
3291	O-H	Alcohol Acido			
2944	C-H	Alifático	2924	C-H	Alifático
1657	C=O	Acido	1735	C=O	Ester
1528	N-H	Amida monosustituida			
			1100	C-O	Eter

### 3.3.2 RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR $H^1$ (RMNH<sup>1</sup>)

Las figuras 7 y 8 muestran los espectros de RMNH<sup>1</sup> del compuesto DR6p y DR6pm respectivamente.

El espectro del compuesto DR6p muestra un triplete en 2.1 ppm que integra para tres protones que pueden ser asignados a un grupo metilo alifático; un singulete en 2.9 ppm que integra para tres protones asignable a un grupo metilo desplazado a campo bajo probablemente debido a la cercanía con un átomo de oxígeno, nitrógeno o a un carbono terciario; en 3.5 ppm se observa un singulete ancho que integra para dos protones que se puede atribuir a un metileno desprotegido por la influencia de un átomo de oxígeno o nitrógeno; un singulete en 3.7 ppm que integra para dos protones que corresponden a un grupo amino; en 4.0 ppm se observa un singulete ancho que integra para un protón y que se puede asignar a un CH- desprotegido por un elemento electronegativo o bien por un anillo aromático; en 4.4 ppm se

observa un singulete que integra para un protón que se atribuye a el hidrógeno de un oxhidrilo; se observa un singulete ancho en 6.63 ppm que integra para un protón y que corresponde al hidrógeno de un grupo amida; se observa un multiplete centrado en 7.12 que integra para cuatro protones que se puede atribuir a un anillo aromático disustituido en posición orto; dos dobletes centrados en 7.46 y 7.76 ppm, que integran para dos protones cada uno, y que corresponden a un anillo aromático con sustitución para.

Las señales observadas entre 0 y 2 ppm no se pueden atribuir a nada en específico, es probable que correspondan a una cadena alifática (grasas) lo cual es común en productos naturales.

En el espectro del compuesto DR6pm se observa un triplete en 2.2 ppm que integra para tres protones que se atribuyen a un grupo metilo alifático; en 3.2 ppm se observa una singulete que integra para tres protones que corresponden a un grupo metilo desprotegido por el efecto de un átomo de nitrógeno, oxígeno o a un carbono terciario; en 3.6 ppm se observa un singulete ancho que integra para dos protones que corresponden a un grupo metileno probablemente unido a un átomo de oxígeno o nitrógeno; en 3.92 y 3.95 ppm se observan dos singuletes que juntos integran para nueve protones correspondientes a grupos metilos unidos a átomos de nitrógeno; en 4.15 y 4.19 ppm se observan dos singuletes que juntos integran para seis protones y que se atribuyen a grupos metilo unidos a átomos de oxígeno; se observa un multiplete centrado en 7.24 ppm que integra para cuatro protones correspondientes a un anillo aromático disustituido en posición para; centradas en 7.48 y 7.66 ppm se observan dos señales dobles de dobles que integran

para dos protones cada una y que según su patrón de acoplamiento corresponden a un anillo aromático disustituido en posición orto.

En la tabla VIII se muestran las semejanzas y diferencias que hay en el compuesto aislado antes y después de haber sido sometido a la metilación. Se puede observar que se mantienen las señales correspondientes a los anillos aromáticos así como los que fueron atribuidos a grupos metilo y metileno en campo bajo (2.1, 2.9 y 3.5 ppm); es necesario mencionar que ambos espectros se obtuvieron en instrumentos diferentes y fueron disueltos en solventes diferentes, lo que podría explicar que las señales atribuidas a los mismos átomos se encuentren ligeramente desplazadas de un espectro a otro.

También se observa que las señales que aparecen a 3.7, 4.42 y 6.63 ppm en el compuesto DR6p, no se observan en el compuesto DR6pm, y que en este último aparecen señales características de grupos  $\text{CH}_3\text{-N}$  y  $\text{CH}_3\text{-O}$  (3.9 y 4.2 ppm) que no se observan en el compuesto original. Estas señales que integran para quince protones indican la adición de cinco grupos metilo al compuesto DR6p durante la reacción con el complejo trifluoruro de boro:metanol.

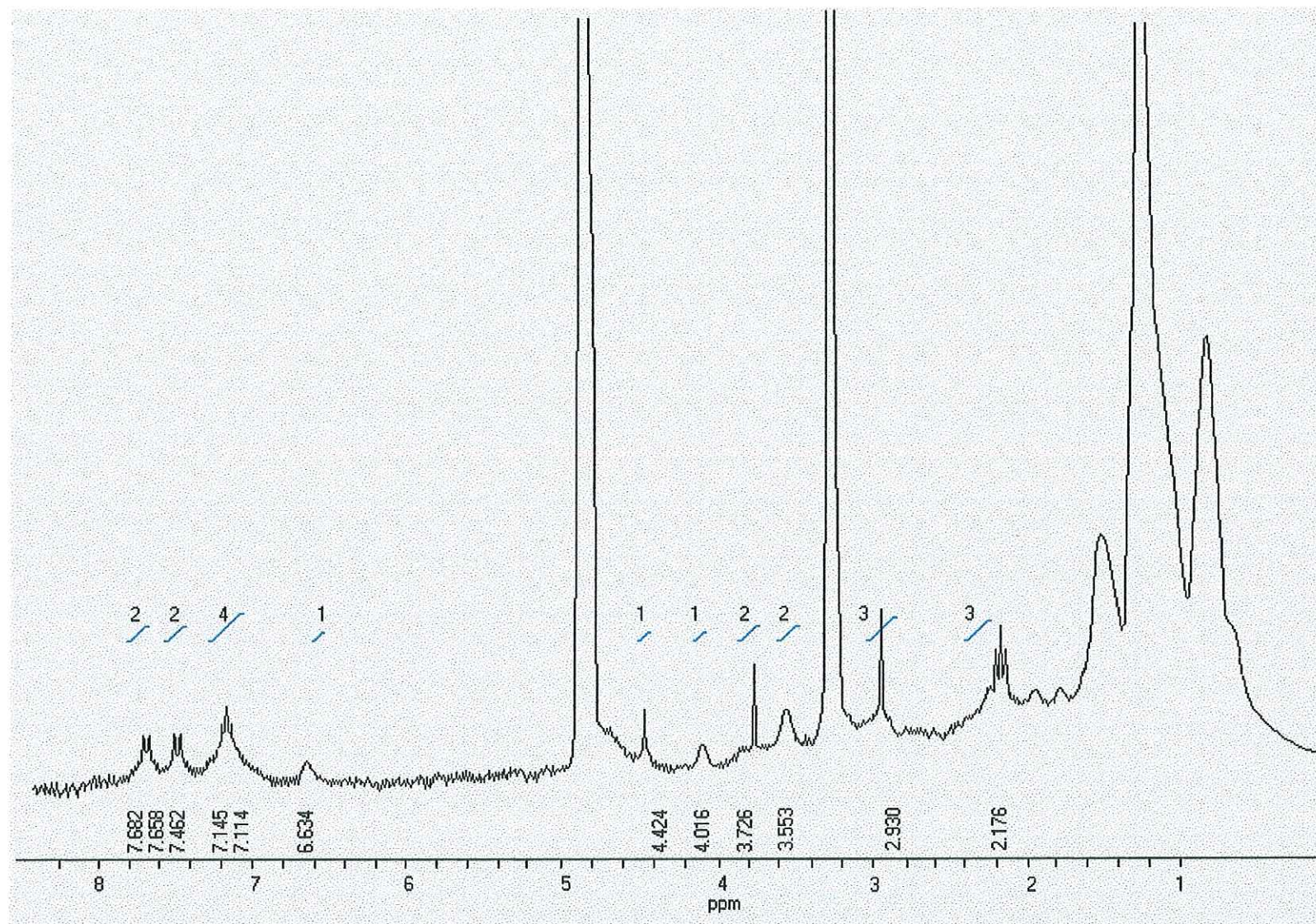


Figura No. 7.- Espectro de Resonancia Magnética Nuclear-  $\text{H}^1$  del compuesto DR

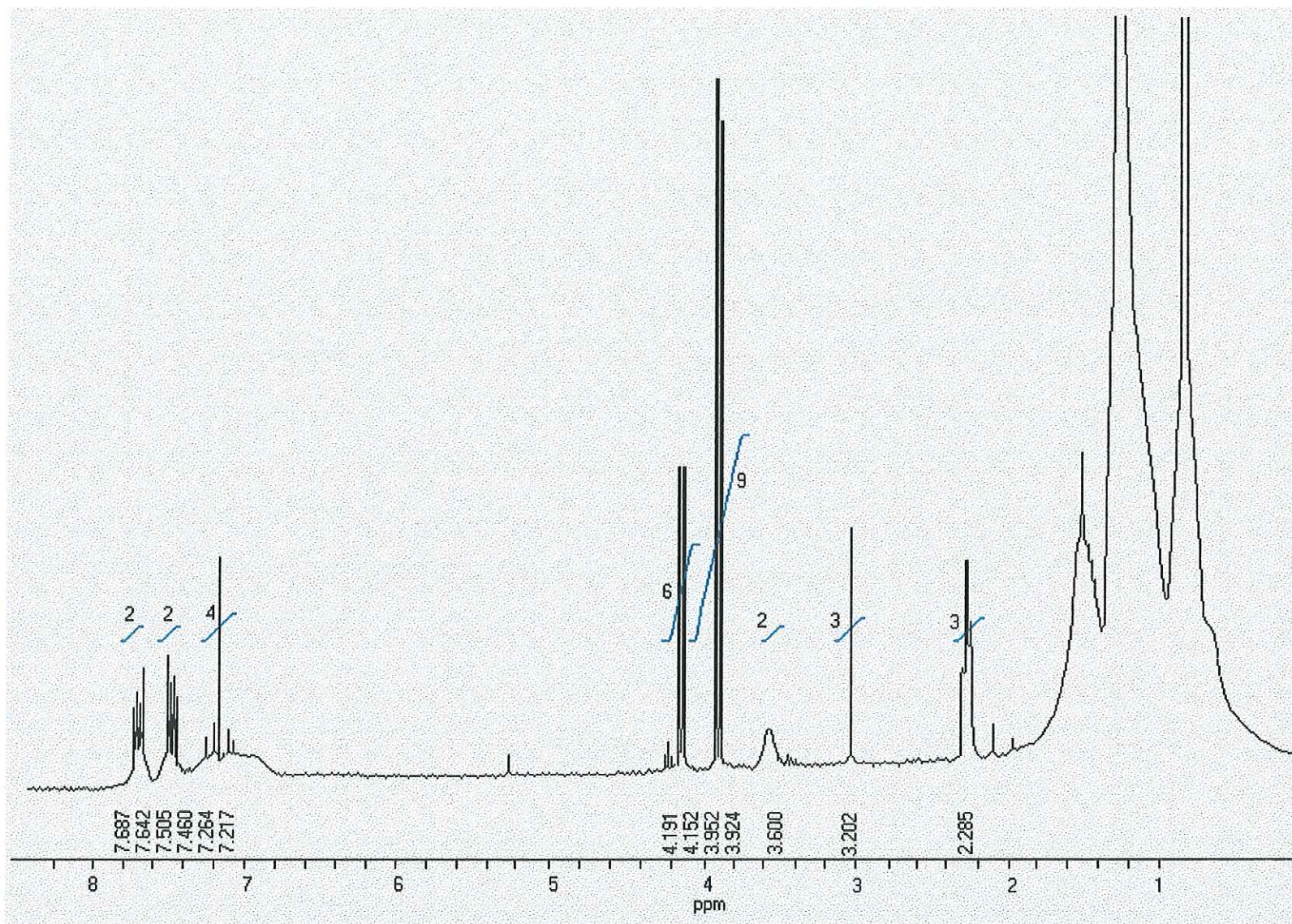


Figura No. 8.- Espectro de Resonancia Magnética Nuclear- $\text{H}^1$  del compuesto DR<sub>6</sub>pm

TABLA VIII.- Comparación de las principales señales y asignaciones de los espectros de  $\text{RMNH}^+$  de los compuestos DR6p y DR6pm. (ppm= partes por millón; M= multiplicidad; s=singulete; d=doblete; t=triplete; sa=singulete ancho; m=multiplete; dd=doble de dobles

DR6p				DR6pm			
ppm	M	$H^1_j$	asignación	ppm	M	$H^1_j$	asignación
2.1	t	3	$\text{CH}_3\text{-CH}_2$	2.2	t	3	$\text{CH}_3\text{-CH}_2$
2.9	s	3	$\text{CH}_3\text{-C}_{\text{terc}}$ $\text{CH}_3\text{-O}$ $\text{CH}_3\text{-N}$	3.2	s	3	$\text{CH}_3\text{-C}_{\text{terc}}$ $\text{CH}_3\text{-O}$ $\text{CH}_3\text{-N}$
3.5	sa	2	$\text{-CH}_2\text{-O}$ $\text{-CH}_2\text{-N}$	3.6	sa	2	$\text{-CH}_2\text{-O}$ $\text{-CH}_2\text{-N}$
3.7	s	2	$\text{C-NH}_2$				
4.0	sa	1	$\text{CH-N}$ $\text{CH-O}$ $\text{CH-Ar}$				
				3.92	s	3	$\text{CH}_3\text{-N}$
				3.95	s	6	$\text{CH}_3\text{-N}$
				4.15	s	3	$\text{CH}_3\text{-O}$
				4.19	s	3	$\text{CH}_3\text{-O}$
4.4	s	1	$\text{-OH}$				
6.6	sa	1	$\text{O=C-NH-}$				
7.12	t	4 12.4	o-Ar	7.24	m	4 10.8	p-Ar
7.46	d	2 9.6	p-Ar	7.48	dd	2 9.0	o-Ar
7.67	d	2 9.6	p-Ar	7.66	dd	2 9.0	o-Ar

### 3.3.3 RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR $^{13}\text{C}$ (RMN $^{13}\text{C}$ )

En la figura 9 se muestra el espectro de RMN $^{13}\text{C}$  del compuesto DR6pm. Debido a la baja solubilidad del compuesto DR6p y a que la RMN $^{13}\text{C}$  requiere de una mayor cantidad de muestra (aproximadamente 20 mg), no fue posible obtener el espectro de RMN $^{13}\text{C}$  del compuesto original.

Las señales observadas entre 0 y 25 ppm no fueron asignadas y se atribuyen a la cadena alifática ya mencionada en los espectros de RMN  $\text{H}^1$ .

El espectro del compuesto DR6pm muestra lo siguiente: una señal a 28.9 ppm que se atribuye a el carbono de un grupo metilo alifático; una señal a 29.7 que corresponde a el carbono de un grupo metilo probablemente unido a un carbono terciario; 3 señales a 29.8, 30.4 y 31.9 ppm asignadas a carbonos de grupos metilos que pueden estar unidos a átomos de nitrógeno; una señal a 34 ppm atribuida a un carbono de un grupo metileno que puede encontrarse unido a un átomo de nitrógeno; una señal a 38.7 ppm asignada a un carbono secundario unido a un átomo de nitrógeno; 2 señales a 66.8 y 68.1 ppm que se atribuyen a carbonos de grupos metoxilo; 4 señales a 128.8, 130, 130.8 y 132.4 ppm correspondientes a carbonos de anillos aromáticos; una señal a 169 ppm asignada a un carbonilo de un grupo amida; y, una señal a 173.5 ppm atribuida a un carbonilo de un grupo éster.

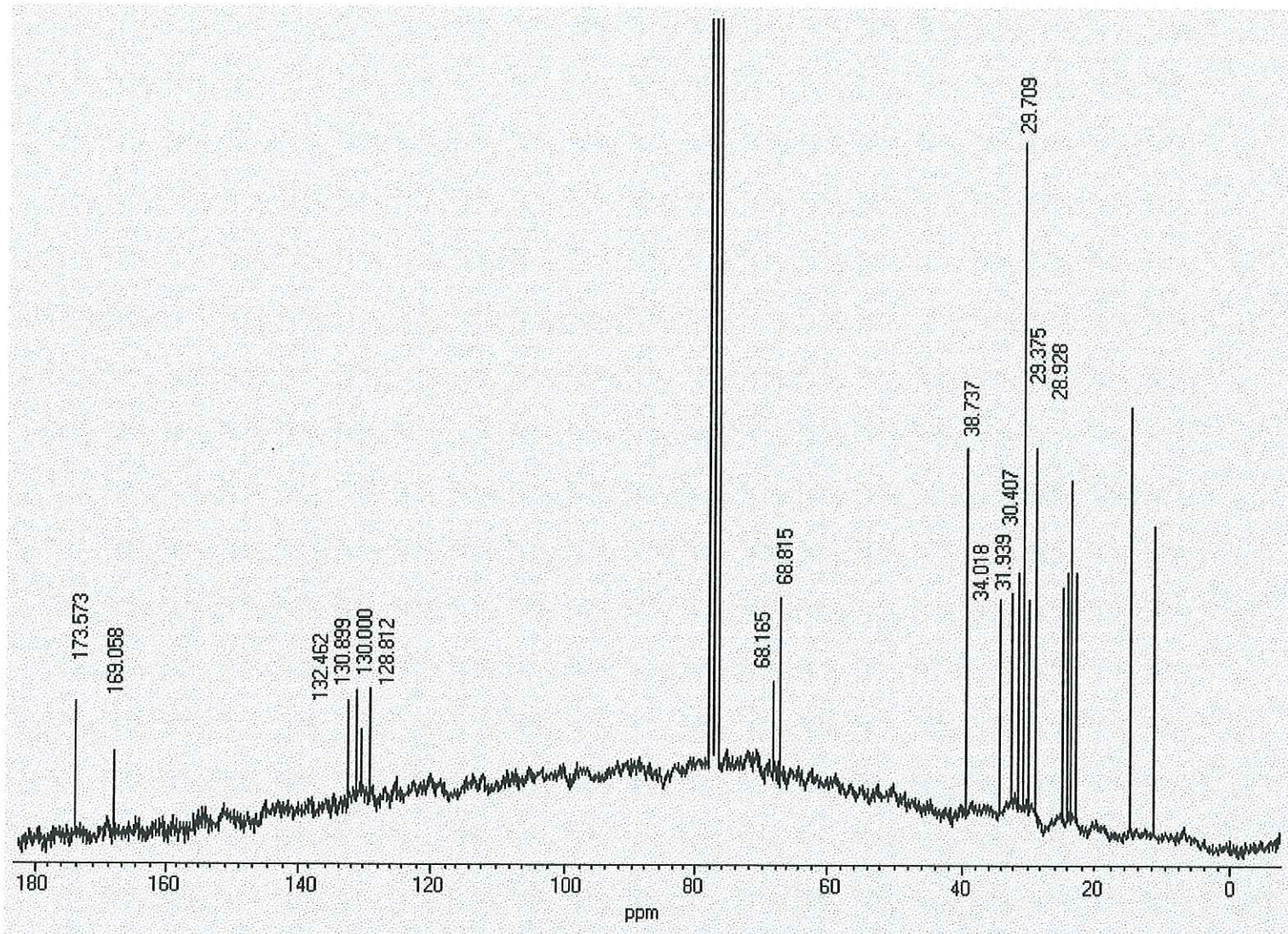


Figura No. 9.- Espectro de Resonancia Magnética Nuclear- $\text{C}^{13}$  del compuesto DR<sub>6</sub>pm

En la tabla IX se muestran las principales señales de RMN<sup>13</sup>C del compuesto DR6pm. En ella se confirma la presencia de dos carbonos de grupos metilo en el compuesto original (señales en 28.9 y 29.7 ppm); así como un carbono de un metileno unido a un átomo de nitrógeno (34 ppm); un CH unido a un átomo de nitrógeno (38.7 ppm) y un grupo amida (169 ppm), mismos que ya habían sido asignados en el espectro de RMNH<sup>1</sup>.

Se confirma la presencia de cinco carbonos de grupos metilo (29.8, 30.4, 31.9, 66.8 y 68.1 ppm) adicionados a la molécula durante la reacción de metilación y se observa además la presencia de un grupo éster (173.5 ppm) que puede ser producto de la metilación de un ácido carboxílico que ya se había detectado en el espectro infrarrojo pero no se observa en RMNH<sup>1</sup>, probablemente debido a que el protón del ácido carboxílico se intercambia con bastante rapidez con los protones de los solventes polares como el metanol y puede no observarse en el espectro (Crews et al 1998).

Se observa también que solo se detectan 4 átomos de carbono de los dos anillos aromáticos, esto se debe a que los anillos aromáticos tienen cierta simetría y además la cantidad de muestra utilizada no fue suficiente para detectar a todos los átomos de carbono, sobre todo los cuaternarios.

Tabla IX. Principales señales observadas en el espectro de RMN<sup>13</sup>C del compuesto DR6pm y sus asignaciones.

Ppm	Asignación
28.9	CH <sub>3</sub> -C
29.7	CH <sub>3</sub> -N
29.8	
30.4	
31.9	
34.0	C-CH <sub>2</sub> -N
38.7	-CH-N
66.8	CH <sub>3</sub> -O
68.1	
128.8	Anillos Aromáticos
130.0	
130.8	
132.4	
169.0	O=C-N
173.5	-COOC-

### 3.3.4 ESPECTROMETRÍA DE MASAS.

En las figuras 10 y 11 se muestran los espectros de masas de los compuestos DR6p y DR6pm respectivamente.

En el espectro de masas del compuesto DR6p se asignaron las siguientes señales: el ion molecular  $M^+$  m/e 341; una señal que corresponde al pico base a m/e 323 que corresponde a el fragmento  $[M^+-18]$  debido a la pérdida de agua característica de los alcoholes; y una señal a m/e 313 que corresponde a el fragmento  $[M^+-28]$  por la pérdida de C=O.

En el espectro de masas del compuesto DR6pm se observa la señal del ion molecular a m/e 413. La técnica utilizada para la obtención de este espectro fue EIMS (Electrospray Ionization Mass Spectrometry); cuando se utiliza esta técnica de ionización, la masa obtenida para el ion molecular es  $[M+1]$ , por lo que se considera que la masa del compuesto DR6pm es 412; una de las características de esta técnica de ionización es la producción de pocos fragmentos, debido a que es una técnica de ionización suave; en este caso se observan señales a m/e 301, 189, 171 y 153; las cuales no se asignaron a ningún fragmento en específico.

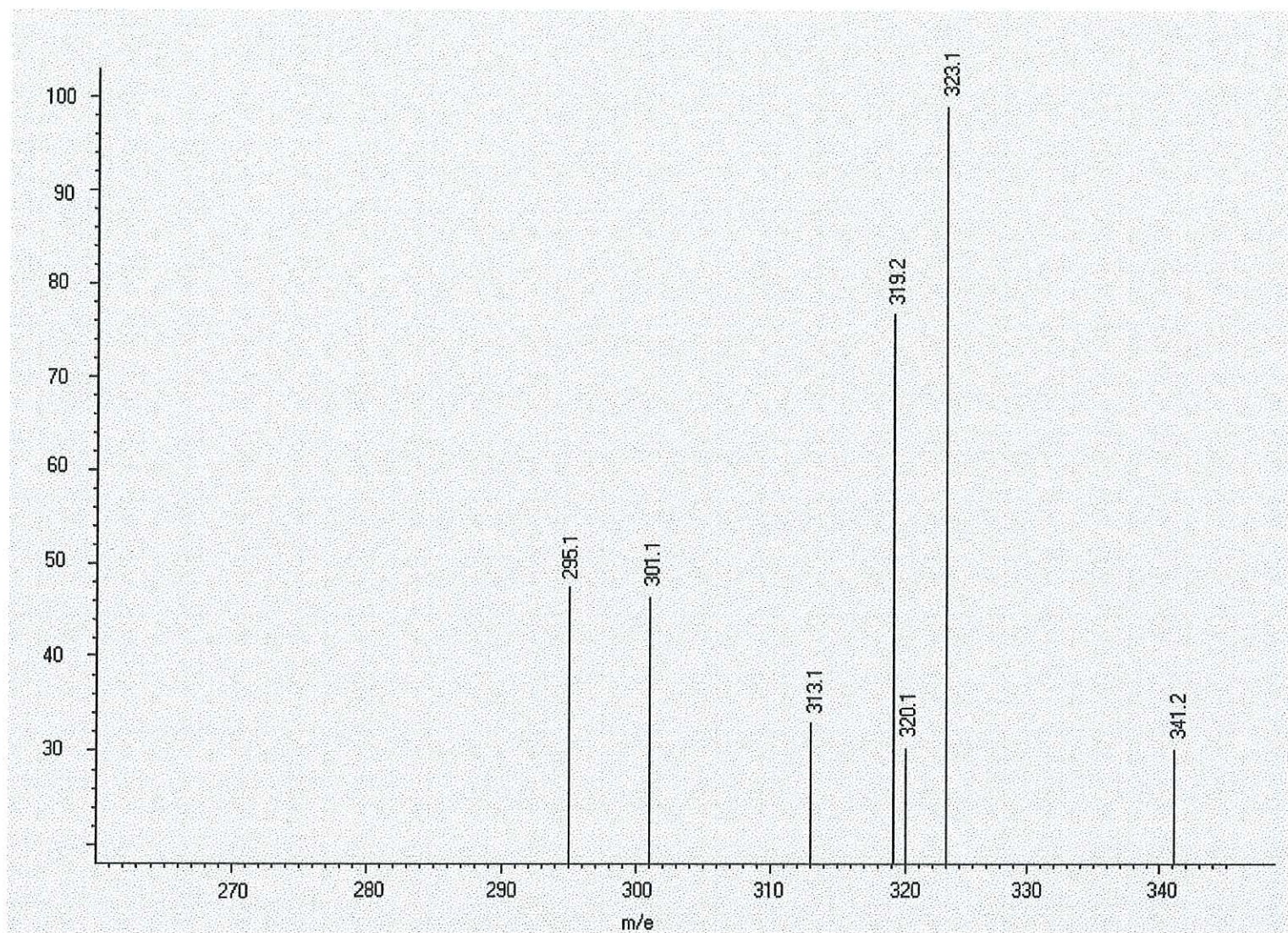


Figura No. 10.- Espectro de masas del compuesto DR<sub>6</sub>p

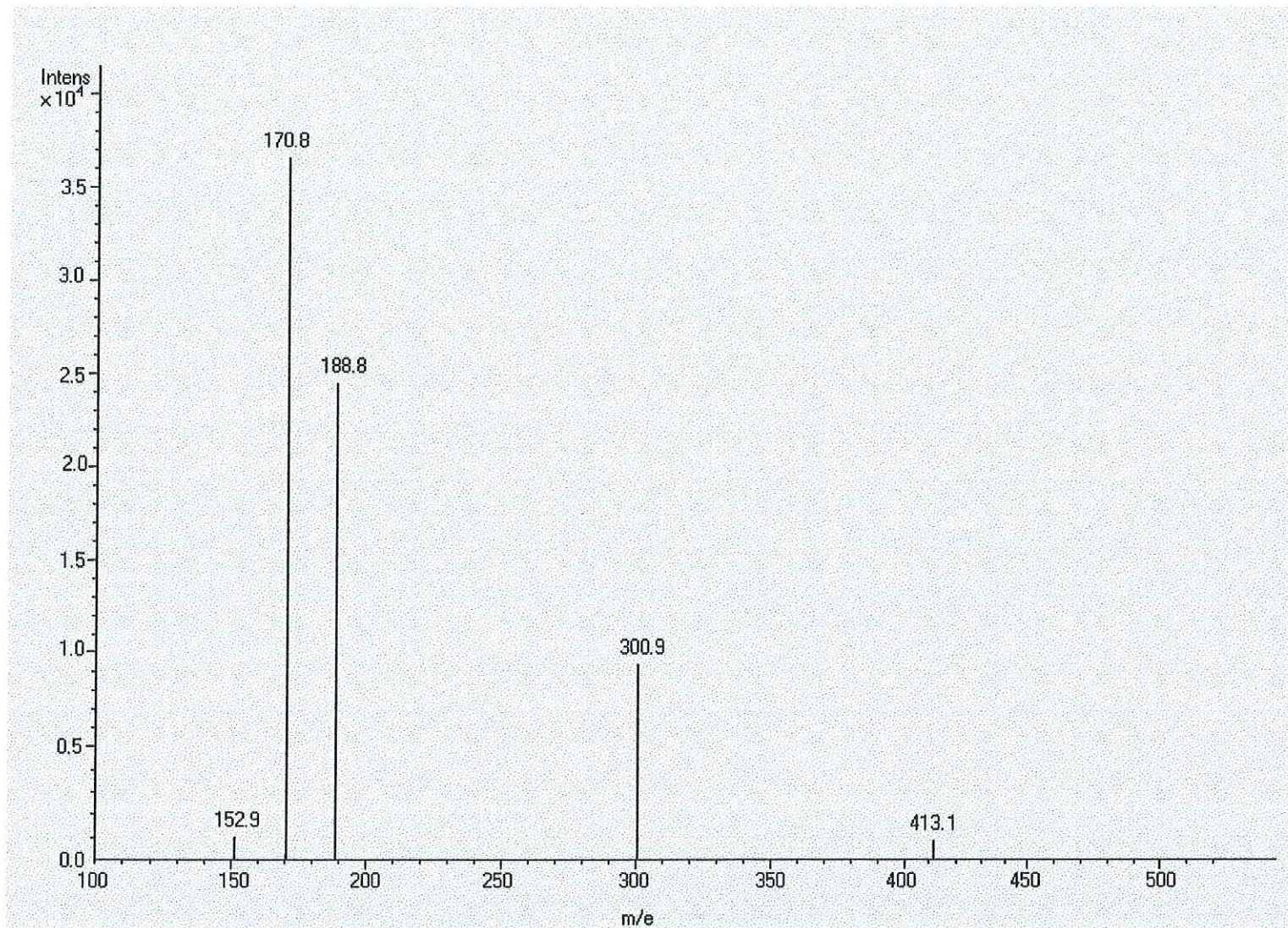


Figura No. 11.- Espectro de masas del compuesto DR<sub>6</sub>pm

### 3.3.5 DETERMINACIÓN DE LA FÓRMULA MOLECULAR DEL COMPUESTO

DR6pm.

La información obtenida de los espectros realizados indica lo siguiente:

En el espectro de  $\text{RMNH}^1$  se integraron un total de 32 átomos de hidrógeno (Tabla VIII).

En el espectro de  $\text{RMN}^{13}\text{C}$  se observaron 15 señales (Tabla IX); considerando que por  $\text{RMNH}^1$  se detectaron dos anillos de los cuales por  $\text{RMN}^{13}\text{C}$  solo se observan 4 átomos de carbono, se suman 8 átomos mas para acompletar los 12 átomos de los dos anillos. También por  $\text{RMNH}^1$  se detectó la presencia de un protón unido a un carbono terciario cuya señal no se observó por  $\text{RMN}^{13}\text{C}$ , sumando éste a los anteriores, se tienen un total de 24 átomos de carbono presentes en la molécula.

Tanto por IR como por  $\text{RMNH}^+$  y  $\text{RMN}^{13}\text{C}$  se detectó la presencia de átomos de nitrógeno. En la tabla IX se observan 6 señales en las que están involucradas átomos de nitrógeno (29.7, 29.8, 30.4, 31.9, 34.0 y 38.7), sin embargo varias de ellas pueden referirse al mismo átomo. Por IR se determinó la presencia de una amida monosustituida en el compuesto original, misma que desaparece después de la metilación. Basándonos en esto, se considera que 3 señales de la tabla IX corresponden a un solo átomo de nitrógeno, estas son las del grupo amida (169 ppm), la del metileno (34 ppm) y uno de los metilos adicionados en la reacción de metilación (29.7 a 31.9 ppm). Las otras tres señales deben ser del mismo átomo de nitrógeno el cual corresponde a una amina en el compuesto original al que se le adicionaron dos grupos metilos durante la metilación; esto concuerda con la regla del nitrógeno que dice que

un compuesto de masa par debe contener un número de átomos par de nitrógeno; se considera así, que la molécula tiene dos átomos de nitrógeno en su estructura.

Se sabe también que en la molécula hay átomos de oxígeno que se pueden distribuir de la siguiente manera: dos átomos en el grupo éster, uno en el grupo amida y uno más en el grupo alcohol que dio lugar a uno de los grupos metoxilos formados en la metilación (señales a 66.8 y 68.1 ppm en RMN<sup>13</sup>C) lo que da un total de cuatro átomos de oxígeno presentes en la molécula. Aunque en la tabla IX se presentan dos grupos metoxilos, uno de ellos corresponde al grupo éster del cual ya se habían considerado los dos átomos de oxígeno.

En resumen la fórmula molecular propuesta para el compuesto DR6pm es :



De masa molecular de 412, tal como fue detectada por espectrometría de masas.

### 3.3.6 DETERMINACIÓN DE LA FÓRMULA MOLECULAR DEL COMPUESTO

DR6p.

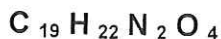
La información obtenida en los espectros realizados indica lo siguiente:

En el espectro de RMNH<sup>1</sup> se integraron 21 átomos de hidrógeno (tabla VIII) a los cuales se suma un átomo mas correspondiente a un ácido carboxílico cuya presencia se detectó en el espectro de infrarrojo y fue confirmada por RMN<sup>13</sup>C del compuesto metilado, dando un total de 22 átomos de hidrogeno presentes en la molécula.

No se cuenta con el espectro de RMN<sup>13</sup>C del compuesto DR6p, sin embargo se sabe que en la reacción de metilación se adicionaron 5 grupos metilo; de tal manera que restando estos 5 átomos a los 24 que contiene el producto metilado, nos da un total de 19 átomos de carbono presentes en la molécula.

En cuanto a los átomos de nitrógeno y oxígeno, no se consideran variaciones con respecto al compuesto metilado, lo que nos indica 2 átomos de nitrógeno y 4 átomos de oxígeno en la molécula.

En resumen la fórmula molecular propuesta para el compuesto DR6p es:



Con una masa molecular de 342. La masa obtenida por espectrometría de masas para este compuesto es de 341; se considera entonces que este valor obtenido corresponde a el ion [M<sup>+</sup> - 1]; lo cual es común en los compuestos que tienen grupos oxhidrilo, o tal vez se deba a la pérdida del protón del ácido carboxílico al disociarse en metanol.

### 3.3.7 ESTRUCTURA QUÍMICA PROPUESTA PARA EL COMPUESTO

DR6pm.

De el análisis hecho hasta el momento se pueden identificar las siguientes subestructuras del compuesto:

- Un anillo aromático disustituido en posición orto



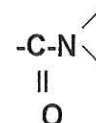
- Un anillo aromático disustituido en posición para



- Un grupo éster



- Una amida disustituida



- Un grupo metoxilo



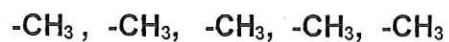
- Un grupo metileno



- Un grupo amina



- Cinco grupos metilo



- Un carbono cuaternario



Se calculó el número de insaturación con la fórmula:

$$\text{No. Insat.} = \frac{(2C + 2) - (H + N)}{2}$$

Esto nos da un valor de 10 insaturaciones según su fórmula molecular, las cuales corresponden a los dos anillos aromáticos (4 insaturaciones cada uno) y los 2 grupos carbonilos, por lo que no hay cabida para ninguna formación anular extra.

Por todo lo anterior se propone la siguiente estructura para el compuesto DR6pm (figura 12).

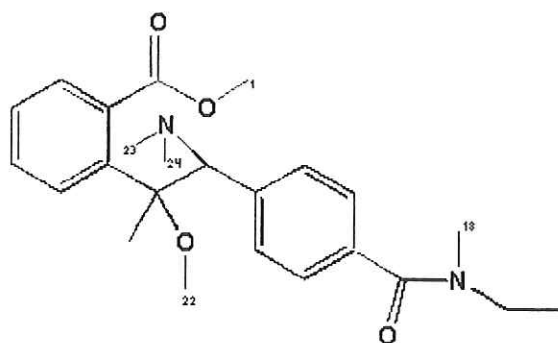


Figura 12. Estructura química propuesta para el compuesto DR<sub>6</sub>pm

Los carbonos 1, 18, 22, 23 y 24 corresponden a los metilos adicionados en la reacción con trifluoruro de boro:metanol.

### 3.3.8 ESTRUCTURA QUÍMICA DEL COMPUESTO DR6p.

Del análisis hecho hasta el momento se pueden identificar las siguientes subestructuras del compuesto:

- Un anillo aromático disustituido en posición orto



- Un anillo aromático disustituido en posición para



- Un grupo ácido



- Una amida



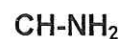
- Un grupo alcohol



- Un grupo metileno



- Un grupo amina



- Un carbono cuaternario



La estructura propuesta para el compuesto DR6p se muestra en la figura 13.

Esta estructura es la misma que se obtiene al eliminar los grupos metilos del compuesto DR6p adicionados en la metilación y sustituyéndolos por átomos de hidrógeno.

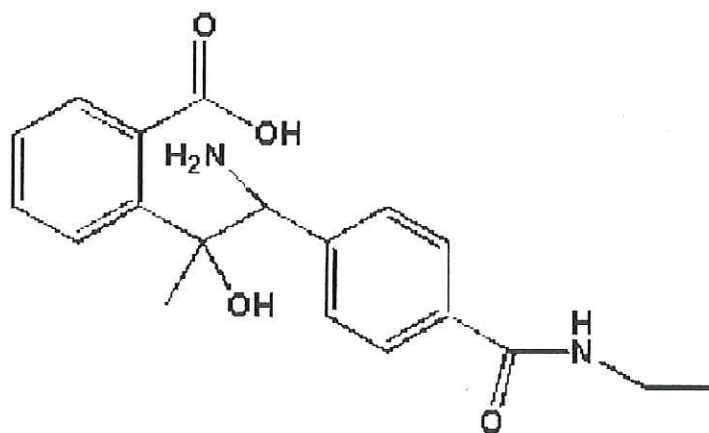


Figura 13. Estructura química propuesta para el compuesto DR6p.

Se realizó una búsqueda del compuesto según su peso molecular en la base de datos Antibase 2.0 en la Universidad de California en San Diego, en la cual se encontraron 43 compuestos con dicho peso molecular y ninguno de ellos corresponde a la estructura propuesta para el compuesto DR6p, lo que indica una alta probabilidad de que se trate de un compuesto nuevo.

#### 4. CONCLUSIONES

- 1.- Se logró el aislamiento de un compuesto activo contra células de cáncer de colon HCT-116 a partir de la esponja marina *Delaubenfelsia raromicrosclera*. La actividad del compuesto aislado es alta con un valor de  $LC_{50}=0.085 \mu\text{g/ml}$ .
- 2.- Se propone que el compuesto aislado puede ser el ácido orto- [isopropanolamina-(p-bencil-N-etilamida)]-benzoico.

#### 5. RECOMENDACIONES:

La fórmula propuesta para el compuesto aislado no se encuentra reportada y su actividad es alta (la mayoría de los compuestos tienen valores de  $LC_{50}$  en el orden de unidades y decenas de  $\mu\text{g/ml}$ ) se recomienda continuar con la investigación hasta llegar a obtener suficiente compuesto para confirmar la estructura exacta apoyándose en técnicas bidimensionales de Resonancia Magnética Nuclear. También se recomienda buscar las condiciones para cristalizar dicho compuesto para hacer los estudios de difracción de rayos x de monocristal.

## 6. LITERATURA CITADA

- Bergquist P.R, 1978, Sponges. University. of California Press, Berkeley and Los Angeles, pp 9-12 .
- Blunt J.W., Calder V.L., Fenwick G.D., Lake R.J., McCombs J.D., Munro M.H.G. and Perry N.B. 1987, 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.
- Burres N.S., Sazesh S., Gunawardana G.P., and Clement J.J. 1989. Antitumor activity and nucleic acid binding properties of dercitin, a new acridine alkaloid isolated from marine *Dercitus* species sponge. Cancer Research. Vol. 49, pp 5267-5274.
- Carte, B.K. 1996. Biomedical potential of marine natural products. Bioscience. Vol. 46, No. 4, pp 271-286.
- Cassady J.M., Baird W.M., and Chang C.J. 1990. Natural products as a source of potencial cancer chemotherapeutic and chemopreventive agents. Journal of natural Products. Vol. 53, No. 1, pp 23-41.
- Coll J.C. and Bowden B.F. 1986. The application of vacuum liquid chromatography to the separation of terpene mixture. Journal of Natural Products .Vol. 49, No. 5, pp 934-36.
- Crews P., Rodriguez J., and Jaspars M. 1998. Organic Structure Analysis. Oxford University Press.
- Cruz-Orozco, R., L. Godínez Orta, E. Nava Sánchez y S. Solis Núñez. 1991. Algunos aspectos geológicos de Bahía Concepción, BCS. En: *Oceanotas*, UABCS-Depto. De Geología Marina. 1 p.

- Dickinson M.G. 1945. Sponges of the Gulf of California. The University of Southern California Publications; Allan Hancock Pacific Expeditions. Vol. 11, No. 1, pp 33-35.
- Evans M.B., Dale A.D., and Little C.J. 1980. The preparation and Evaluation of Superior Bonded Phases for Reverse-Phase, High Performance Liquid Chromatography. *Chromatographia*. Vol. 13, No. 1, pp 5-10.
- Faulkner D.J., 1992. Biomedical uses for natural marine chemicals. *Oceanus* 29-35
- Fenical W., 1996. Marine biodiversity and the medicine gabinetete, the status of new drugs from marine organisms. *Oceanography*. Vol. 9, No. 1, pp 23-27
- Ferrigni N. R., and McLaughlin J. L., 1984. Use of potato disc and brine shrimp bioassays to detect activity and isolate piceatannol as the antileukemic principle from the seeds of *Euphorbia lagascae*. *Journal of Natural Products*, Vol. 47, No. 2 , pp 347-352.
- Fusetani N., Sugawara T., and Matsunaga S. 1992. Theopederins A-E, potent antitumor metabolites from a marine sponge, *theonella sp.* *Journal of Organic Chemistry*. Vol. 57, pp 3828-3832.
- Heywood V.H. and Watson R.T. 1995. *Global Biodiversity Assessment* Published for the United Nations. Environmental Program. Cambridge University Press. Pp 1140.
- Hickman C.P., Roberts L.S., y Hickman F.M. 1990. *Zoologia. Principios Integrales*. Editorial Interamericano. 1119 pp.
- Kelly Gutierrez L., 1999. *Detección y variación estacional de bioactividad en invertebrados bentónicos de Bahía Concepción, B.C.S., México*. Tesis Maestría, UABC. 15 pp.

- Long B.H., Carboni J.M., Wasserman A.J., Cornell L.A., Casazza A.M., Jensen P.R., Lindel T., Fenical W. and Fairchild C.R. 1998. Eleutherobin, a novel cytotoxic agent that induces tubulin polymerization, is similar to paclitaxel (Taxol). *Cancer Research*. Vol. 58, No. 6, pp 1111-1115.
- Magallanes O.V.R., 1992. Estudio del comportamiento de los procesos fisicoquímicos de estero Santispac en Baja California Sur, a través de una serie de 24 horas. Resumen IX Congreso Nacional Oceanografía, pp 21. En Castañeda Lopez O. Y Contreras Espinoza F. (compiladores). 1993. Serie Bibliografía comentada sobre ecosistemas costeros mexicanos. Vol 1: Baja California Norte y Sur. CONABIO/UAM-1/CDELM. pp 489.
- Marston A., Hostettmann K., 1991. Modern separation methods. *Natural Products Reports*. Vol. 8, pp 391-413.
- Mayer A.M.S., Jacobson P.B., Fenical W., Jacobs R.S. and Glaser K.B. 1998. Pharmacological characterization of the pseudoterpenes: novel anti-inflammatory natural products isolated from the caribbean soft coral, *Pseudopterogorgia elisabethae*. *Life Sciences*. Vol. 62, No. 26, pp 401
- Meyer B.N., Ferrigni N.R., Putnam J.E., Jacobsen L.B., Nichols D.E., and McLaughlin J.L., 1982. Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Journal of Medicinal Plant Research*, Vol. 45, pp 31-34.
- Pawlik R.J. 1993. Marine invertebrate chemical defenses. *Chemical Reviews*. Vol. 93, pp 1911-1922.
- Pellew R. 1996. La Evaluación Mundial de la Diversidad Biológica. Nuestro Planeta. Revista del Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente. Tomo 7, No. 5. Contraportada.

- Petit G.R., Collins J.C., Herald D.L., Doubek D.L., Boyd M.R., Schmidt J.M., Hooper D.L., and Tackett L.P., 1992. Isolation and structure of cribostatins 1 and 2 from blue marine sponge *Cribrochalina* sp. *Canadian Journal of Chemistry*. Vol. 70, pp 1170-1175.
- Pretsch E., Clerc T., Seibl J., and Simon W. 1983. Tables of spectral for structure determination of organic compounds. Ed. Alhambra, Germany.
- Proksch P. 1994. Defensive roles for secondary metabolites from marine sponges and sponge feeding nudibranchs . *Toxicon* Vol. 32, No. 6, pp 639-655.
- Ruggieri, G.D. 1976. Drugs from the sea. *Science* . Vol. 194, pp 491-497.
- Shu Y.Z. 1998. Recent natural products basen drug development: A pharmaceutical industry perspective. *Journal of Natural Products*. Vol. 61, pp 1053-1071.
- Waterman P.G. 1990. Searching for bioactive compounds: various strategies. *Journal of Natural Products*; Vol 53, No. 1, pp 13-22.