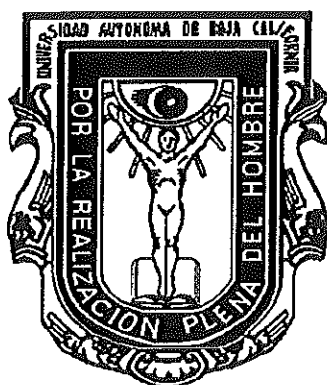


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS



“AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE COMPUESTOS
BIOACTIVOS DE LA ESPONJA MARINA *Geodia* sp.”

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
OCEANÓLOGO
PRESENTA:
ALEJANDRA PRIETO DAVÓ

ENSENADA, B.C., JULIO 2000

AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS DE LA
 ESPONJA MARINA *Geodia* sp.

TESIS
 QUE PRESENTA:

ALEJANDRA PRIETO DAVÓ

APROBADA POR:



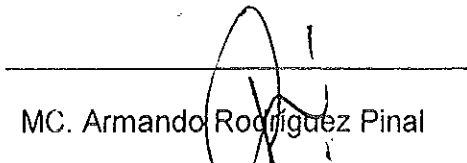
MC. Irma Esthela Soria Mercado

PRESIDENTE DEL JURADO



Dr. José Vinicio Macías Zamora

SINODAL PROPIETARIO



MC. Armando Rodríguez Pinal

SINODAL PROPIETARIO

ÍNDICE

	Página
Resumen	i
Dedicatoria	ii
Agradecimientos	iii
Introducción	I
Antecedentes	1
Justificación	3
Hipótesis	6
Objetivo	6
Método	6
Resultados	9
Discusión	12
Conclusiones	19
Literatura citada	23

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla I	
Porcentaje de mortandad de <i>Artemia salina</i> en tres diferentes extractos (hexano, diclorometano y acetato de etilo) a tres diferentes concentraciones	18
Tabla II	
Porcentaje de mortandad de <i>Artemia salina</i> de cinco fracciones obtenidas a partir del extracto de acetato de etilo	18

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Zona de Estudio	9
Figura 2. Espectro Infrarrojo	14
Figura 3. Espectro de Masas	15
Figura 4. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear	17
Figura 5. Estructura propuesta para el compuesto obtenido de la esponja marina <i>Geodia</i> sp	21
Figura 6. Geodisterol, A	21

RESUMEN

En la naturaleza existe un gran número de compuestos orgánicos dentro de los cuales encontramos algunos con propiedades químicas útiles para combatir enfermedades. Por mucho tiempo, la búsqueda de estos compuestos estaba limitada a organismos terrestres, sin embargo, en los últimos años se ha decidido explotar lo que se considera el recurso más grande e impredecible de nuestro planeta: el mar.

Dentro de los organismos marinos importantes para la farmacología encontramos a las esponjas marinas, las cuales debido a que carecen de defensas estructurales y físicas, son consideradas como una posible fuente importante de compuestos orgánicos bioactivos que utilizan para su defensa.

En el período de septiembre de 1998 a octubre de 1999 se colectó de playa Santispac en Bahía Concepción, B.C.S. la esponja marina *Geodia* sp. la cual, en estudios anteriores, presentó un alto índice de valor biológico y cuyo extracto etanólico demostró tener un alto grado de citotoxicidad contra *Artemia salina*. Para obtener el compuesto bioactivo presente en esta esponja se realizó una separación con solventes empleando un gradiente creciente de polaridad. Una vez obtenida la fracción bioactiva, se separaron sus compuestos por cromatografía en capa delgada, empleando como adsorbente gel de sílice GF 254 y como eluyente cloroformo. El compuesto bioactivo se purificó haciendo una separación por columna HPLC en fase normal, a partir de la cual se aisló un esteroide polioxigenado, el cual presentó una concentración letal media de $63 \mu\text{g ml}^{-1}$ contra células cancerígenas HCT-116.

A mis padres, que me han apoyado hasta en mis más grandes locuras.

A Tito y Ma. Fer. Siempre seguirán conmigo.

AGRADECIMIENTOS

A Irma E. Soria, gracias maestra por todos sus consejos y su ejemplo, siempre la recordaré con cariño.

Al Dr. Vinicio Macías y al MC. Armando Rodríguez por sus valiosos comentarios.

Al Dr. William Fenical y a todos los del laboratorio en Scripps, gracias por su ayuda y por dejar de hacer sus cosas para ayudarme con las mías.

Al Dr. Gerardo Aguirre por su ayuda con la elucidación de la estructura.

A CONACyT y Telmex, por su apoyo económico durante la carrera.

A mis tíos, Gloria y Joe por su apoyo y cariño.

A todas las familias que desde que llegué me ofrecieron su casa y me hicieron sentirme como en la mía: Velasco Sosa, Garin Walthers, Romaña y Leboreiro Ferro.

A mi familia postiza, todas mis tías Hernández, gracias por su cariño, por los bailes y por todas las invitaciones a comer.

A mis "Cachunes": Lalo, Gisela, Yoli, Tona, Zack, Asunción, Clarissa, Leo, Lucía, Lydia, Diego, Rafa, Luis y Sam. Gracias por su amistad incondicional y por tan buenos reventones.

A todos los π niP₂, por tantas aventuras compartidas.

Gracias Luis por aguantar mis histerias.

Gracias Sam por hacerme reír tanto.

A Tona por ayudarme con las figuras.

A Lalo por ayudarme con la computadora, como siempre.

A todos los buenos maestros, porque gracias a ellos seguimos estudiando.

A todos los que de alguna manera me han apoyado y me han alentado a seguir adelante.

GRACIAS... ¡¡TOTALES!!

INTRODUCCIÓN

Desde la antigüedad, la medicina folklórica ha usado extractos de diversas plantas y animales para curar todo tipo de enfermedades. En la actualidad se ha reconocido que estos extractos tienen propiedades biológicas importantes y se ha descubierto que los responsables de estas propiedades son compuestos orgánicos. Hoy en día a estos compuestos se les conoce como metabolitos secundarios (Fenical, 1982). Los metabolitos secundarios representan un evento evolutivo que lleva a los organismos a la producción de compuestos biológicamente activos. Entre ellos se encuentran los organismos bentónicos sésiles, quienes de esta manera aseguran la sobrevivencia de la especie al evitar la depredación y minimizar el daño hecho por organismos móviles (Fenical, 1982; Thompson *et al.*, 1985).

El estudio de la función biológica de estos compuestos estuvo muy limitado durante muchos años; fue hasta el desarrollo del área interdisciplinaria de la Ecología Química que se propuso como hipótesis el que los metabolitos secundarios tuvieran una función defensiva. Esto es ya que, por la complejidad de las estructuras y las concentraciones en las que los encontramos, su síntesis es metabólicamente costosa y, debido a que los organismos bentónicos sésiles no presentan mecanismos físicos (o estructurales) de defensa, es necesaria la presencia de compuestos químicos complejos en sus tejidos para evitar el ser depredados, o bien para competir por espacio o territorio (Pawlik, 1993).

Las esponjas marinas pertenecen al Phylum Porifera. Estos organismos se caracterizan por tener una estructura compuesta ya sea de fibras proteínicas de espongina o de espículas calcáreas o silíceas (Barnes,1969). Como se mencionó anteriormente, al carecer de una protección estructural o física así como de órganos internos, es altamente probable encontrar compuestos químicos dentro de sus tejidos, con alguna acción característica determinada.

Las esponjas de la clase Demospongiae son las más comunes, de mayor diversidad, abundancia y distribución, lo que las convierte en organismos importantes para el estudio químico y bioquímico. En los últimos años, se han investigado alrededor de cien especies de esponjas pertenecientes a esta clase, lo que ha llevado a descubrir más de doscientos nuevos compuestos con características estructurales únicas y sin fuentes terrestres paralelas (Scheuer, 1978).

Existen dos alternativas al papel que pueden jugar los compuestos encontrados en esponjas marinas: el de inhibición de crecimiento de organismos epífitos y el de protección contra rayos ultra violeta (Pawlik,1993). Una hipótesis más acerca de la presencia de estos compuestos, sugiere que no tienen función alguna dentro del organismo, y que están presentes por haber jugado un papel ecológico en el pasado, es decir, contra predadores ya extintos (Haslam, 1986 en Pawlik, 1993), sin embargo, la esponja los sigue produciendo debido a que su síntesis está atada a la de un metabolito aún funcional (Hay *et al.*, 1992 en Pawlik, 1993).

ANTECEDENTES

La primera toxina utilizada en procesos farmacológicos fue la tetrodoxina, obtenida por primera vez de un pez del orden Tetraodontidae (Fuhrman, 1981), esta toxina, al igual que la saxitoxina de los dinoflagelados del género *Gonyaulax*, bloquea específicamente el aumento de la permeabilidad del sodio en las membranas celulares excitables (Narahashi, *et al.*; en Fuhrman, 1981) y han sido herramientas indispensables para el estudio fisiológico de los canales de sodio (Cai y Jordan, 1990 en Proksch, 1994). Por otra parte, el primer ejemplo de un producto natural marino usado como prototipo para sintetizar fármacos nuevos es la nereisotoxina del anélido *Lumbriconereis heteropoda* (Fuhrman, 1981). Más reciente, es el descubrimiento de las prostaglandinas provenientes del gorgonio *Plexaura homomalla*, las cuales a pesar de tener una configuración química inactiva fueron la base de la síntesis de las prostaglandinas ahora activas (Weinheimer 1974 en Fuhrman, 1981).

La naturaleza química de los metabolitos aislados de esponjas marinas ha sido extensamente estudiada por varios autores (Burkholder, 1973; Baker y Murphy, 1976,1981, Faulkner, 1977 en McCaffrey y Endean, 1985). Existen alrededor de 5000 especies de esponjas, la mayoría marinas, de las cuales se han obtenido un amplio espectro de compuestos citotóxicos contra células humanas KB (carcinoma oral), células de tumores y células infectadas con leucemia linfocítica (Cecil, *et al.*, Baslow, *et al.*, Sigel *et al.*, en Ruggieri, 1976). Un ejemplo es el de la esponja *Cryptotethya crypta* la cual contiene una gran cantidad de arabinosil nucleósidos libres conocidos como arabinosil timina y arabinosil uracilo. Estos compuestos sirvieron como modelo para sintetizar los agentes antivirales y antitumorales D-arabinosil citosina (citarabina) y D-arabinosil adenina (araA) (Cohen 1977 en Fuhrman, 1981).

De todos los compuestos bioactivos estudiados desde 1950 en las esponjas marinas, sobresale el aislamiento de algunos como la sponguridina proveniente de la esponja *Tethya crypta*, el cual dio lugar al fármaco ara-C usado clínicamente contra el linfoma de Hodgkins y la leucemia mielocítica (North y Cohen, 1979). En los años 70's se dio el aislamiento de la 1-metil-iguanosina proveniente de la esponja *Tedania digitata*, la cual funciona como relajante muscular, antiinflamatorio y antialérgico (Quinn *et al.*, 1980). Unos de los metabolitos secundarios más interesantes en cuanto a su síntesis son los mycalamides (Perry *et al.*, 1988), como el micalamides B de la esponja *Mycale sp*, el cual, a pesar de mostrar actividad contra varias cepas de células cancerígenas, podría ser muy tóxico para uso clínico (Perry *et al.*, 1990).

Debido al alto costo de pruebas directas con células cancerígenas, es sumamente necesario realizar bioensayos económicos y simples, con los cuales sea posible dar importancia y sentido a este tipo de estudios,

El bioensayo más sencillo utilizado para detectar un amplio intervalo de actividades biológicas, dentro de las cuales está el probar la citotoxicidad de un compuesto, es el del crustáceo *Artemia salina* (McLaughlin, 1991). En él se usan larvas de este organismo en fase nauplio I y la actividad biológica se mide después de 24 horas de exposición. Si el bioensayo resulta positivo (i.e. un porcentaje considerable de *A. Salina*, muere), existe un 90% de probabilidad de que la sustancia utilizada tenga una actividad biológica hacia células cancerígenas (i.e. que las mate) (Meyer, *et al.*, 1985).

Dentro del Phylum Porifera se encuentra el género de esponjas *Geodia sp.* (clase Demospongiae, orden Tetractinellida, familia Geodidae). Del género *Geodia* se conocen estudios en los cuales se han obtenido diferentes compuestos. De la esponja *Geodia sp.* colectada en Bahía Macqueripe en Trinidad, se han obtenido compuestos que presentan actividad citotóxica contra algunas células cancerígenas humanas (ciclodepsipéptidos jaspamida y geodiamolidos A y B) y

algunos otros ciclodepsipéptidos (geodiamolidos H e I) que aún no han sido probados contra células cancerígenas (Tinto, *et al.*, 1998). Pettit *et al.*, (1981) encontraron tres compuestos (geodiatoxina1 y geodiastantinas 1 y 2) con actividad contra células 9KB (carcinoma nasofaríngeo) y contra leucemia linfocítica murina P388 (PS). Las geodiastantinas probablemente representan una nueva serie de biopolímeros de importancia biológica fundamental y deben estudiarse con mas detalle (Pettit *et al.*, 1981). Estos estudios confirman la presencia de metabolitos secundarios importantes dentro de esta especie, sin embargo, la citotoxicidad de los mismos es espacial y temporalmente variable (Kelly-Gutiérrez, *et al.*, En prep.). De igual manera, la metodología de extracción de compuestos influye en la obtención de estos compuestos, lo cual nos obliga a seguir haciendo estudios para asegurar que no se encuentren compuestos que hayan sido omitidos en estudios anteriores debido a la variabilidad espacio-temporal de la bioactividad de la especie.

La esponja marina *Geodia* sp. fue encontrada durante todo un ciclo anual en Playa Santispac, BCS. Esta especie presentó los mas altos índices de valor biológico (IVB) en esa localidad (Kelly-Gutiérrez, *et al.*, En prep.). Este índice indica la importancia biológica de una especie con respecto a su presencia en la zona de estudio (Sanders, 1960). Esta esponja es además, altamente citotóxica contra *Artemia salina* (Kelly-Gutiérrez, 1999). La esponja se encuentra con fauna incrustante de muchos tipos, lo que hace suponer que los compuestos que ha sintetizado presentan ventajas adaptativas por competencia de espacio y permanencia en el medio, así como defensa contra predadores mayores (Kelly-Gutiérrez, *et al.*, En prep.).

Debido a los pocos estudios que se han hecho acerca de la constitución química de esta especie (Pettit, 1981), y a la gran abundancia de la esponja en una de las Playas más frecuentadas de Baja California Sur (Playa Santispac), se decidió colectarla para hacer estudios acerca de la actividad biológica presente en sus compuestos (metabolitos secundarios).

JUSTIFICACIÓN

La necesidad de combatir el alto índice de problemas relacionados con el cáncer ha llevado a los investigadores a una búsqueda exhaustiva de nuevos compuestos con propiedades farmacológicas. En los últimos años los estudios de la química de compuestos naturales han concentrado su atención en el ecosistema marino. Las estructuras encontradas en plantas y animales terrestres no han sido suficientes para resolver los problemas de salud a nivel mundial. El descubrimiento de nuevas estructuras generadas por rutas metabólicas específicas de animales marinos han logrado que el medio marino sea aceptado como una fuente importante de recursos farmacológicamente activos (Kaul, 1981; Bergquist y Berford, 1978).

El presente trabajo se desarrolló dentro del proyecto de investigación: "Ecología Química del Medio Ambiente Marino: Organismos bentónicos" apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), y tiene como finalidad hacer una investigación acerca de la actividad citotóxica de los compuestos que contiene la esponja marina *Geodia* sp. la más abundante encontrada en la playa de Santispac BCS, durante un ciclo anual.

HIPÓTESIS

Geodia sp contiene compuestos bioactivos contra células cancerosas humanas.

OBJETIVO

Llevar a cabo el aislamiento y la purificación de compuestos con actividad citotóxica, presentes en la esponja marina *Geodia* sp., así como una aproximación a su estructura.

MÉTODO

Localización del área de colecta:

La esponja se colectó mediante buceo libre en Playa Santispac, B.C.S. ubicada a los 111°53' de longitud Oeste y a los 22°56' de latitud Norte (figura 1), durante los meses de agosto y octubre de 1998 y octubre de 1999.

Preservación de la especie:

Las esponjas colectadas fueron colocadas dentro de bolsas de plástico y preservadas en hielo hasta su arribo al laboratorio en la Facultad de Ciencias Marinas de la UABC, en Ensenada, BC. Una porción de la especie se conservó en congelación para su identificación taxonómica, la cual se realizó en el Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM, por la Biol. Patricia Gómez López.

Preparación de extractos crudos:

La esponja fue limpiada quitando arena, partículas no deseadas, fauna y flora incrustante y se cortó en trozos de aproximadamente dos centímetros cuadrados. Fue cubierta con etanol absoluto y se mantuvo así por 10 días. Esta extracción se repitió una vez más. Al cabo de este tiempo los extractos fueron filtrados y concentrados mediante destilación a presión reducida cuidando que la temperatura no excediera los 45°C.

Preparación selectiva de extractos:

El extracto concentrado fue sometido a una extracción con disolventes mediante embudos de separación en un orden creciente de polaridad, empleando como disolventes hexano, diclorometano y acetato de etilo. Cada uno de estos extractos fue también concentrado mediante destilación a presión reducida bajo las mismas condiciones anteriores.

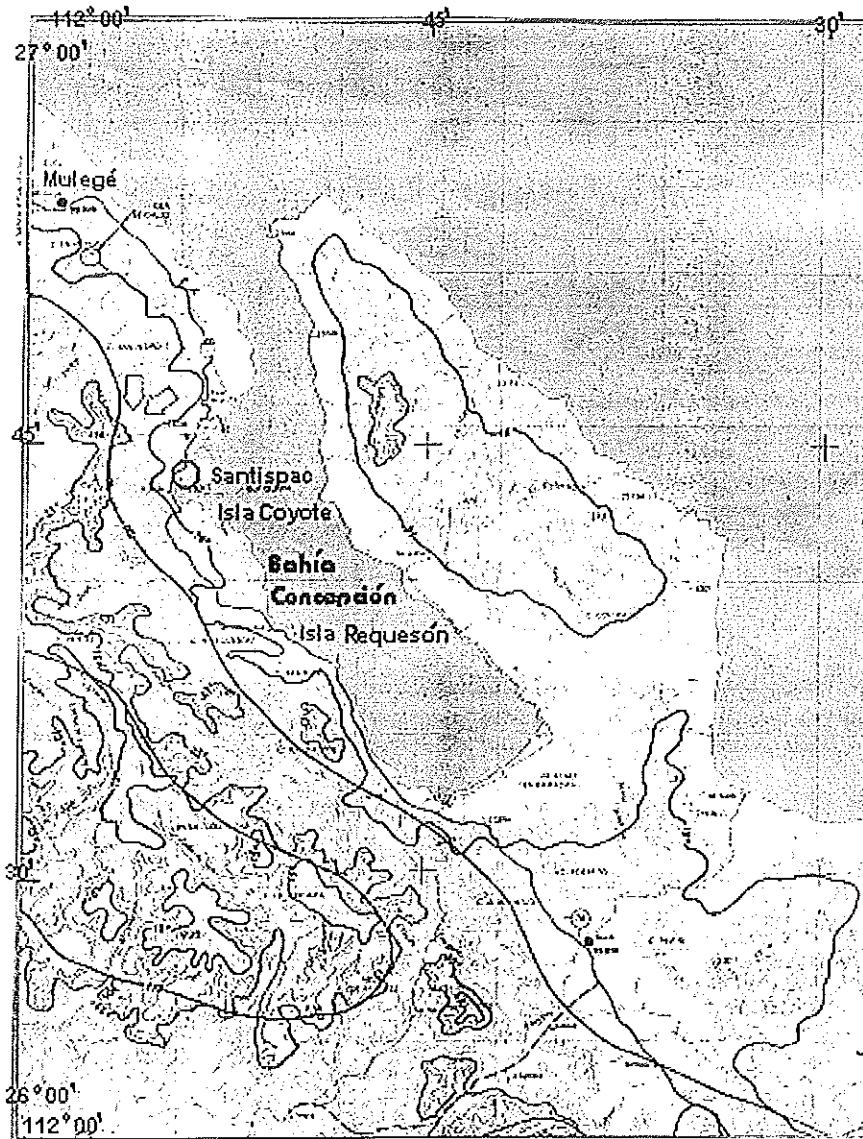


Figura 1. Zona de Estudio

Pruebas de Bioactividad:

Tanto el extracto crudo como los extractos hexánico, diclorometánico y de acetato de etilo se sometieron a un bioensayo empleando como organismo de prueba al crustáceo *Artemia salina* (Meyer *et al.*, 1982 en McLaughlin, 1991). En ellos se midió el porcentaje de mortandad de estos organismos a tres diferentes concentraciones de extracto (10 mg ml^{-1} , 1 mg ml^{-1} , 0.1 mg ml^{-1} , control con etanol y agua de mar filtrada y pasada por luz UV como blanco) y por quintuplicado. Para ello se realizaron diluciones con agua de mar filtrada y pasada por luz UV a un volumen total de 1 ml con 15 artemias, lo que dio un total de 25 viales por muestra. Como respuesta se contó el porcentaje de mortandad a las 24 horas de exposición con los compuestos. De esta manera, se determinó la mínima concentración para el máximo porcentaje de mortandad.

Además se hicieron pruebas de citotoxicidad contra células cancerígenas de colon HCT-116. En este bioensayo se hicieron diluciones a partir de una concentración inicial de 10 mg ml^{-1} , estas diluciones se prueban en plantillas con 99 orificios en los cuales se ponen las células cancerígenas que están diluidas a una concentración final de $2.5 \times 10^4 \text{ células ml}^{-1}$. Se prueban las diferentes concentraciones y por medio de métodos espectrofotométricos, a una longitud de onda de 490 nm, se lee la cantidad de células cancerígenas que se destruyeron. Con estas lecturas se hace una curva y se obtiene la concentración letal media (LC_{50}). También se realizaron pruebas antivirales contra el virus del herpes HSV-1, antibióticas contra *Staphylococcus aureus* y *C. xerosis* y antifungales contra *Candida albicans* las cuales, al igual que las anticancerígenas, se llevaron a cabo en el Center of Marine Biotechnology and Biomedicine de SCRIPPS Institute of Oceanography en La Joya, Ca., E.U.A. Las metodologías usadas en estos bioensayos fueron las propuestas por el grupo de trabajo de este laboratorio dirigido por el doctor William Fenical, director de dicha Institución.

Separación, aislamiento y purificación de compuestos:

Los extractos que presentaron bioactividad se separaron mediante cromatografía en capa delgada con gel de sílice GF 254 como adsorbente y cloroformo como eluyente. Como reveladores se usaron luz ultravioleta y agentes oxidantes fuertes (sulfato cérico al 1 % en ácido sulfúrico 2 N). Los compuestos obtenidos se recuperaron mediante raspado de la placa y posterior extracción con diclorometano.

Cada uno de los compuestos purificados fueron probados de nuevo contra *Artemia salina*. Los compuestos que resultaron bioactivos se separaron una vez más usando cromatografía en gel de sílice para asegurarse que estuvieran completamente puros. Los que no lo estuvieron, fueron separados una vez más pero en este caso usando cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) en fase normal con columna Dynamax semipreparativa C-18 de 60 amstrongs y de 10 X 250 mm.

Una vez realizadas estas separaciones, se hicieron estudios espectroscópicos de Infrarrojo, Resonancia Magnética Nuclear y Espectrometría de Masas.

Los espectros de infrarrojo se obtuvieron con un Espectrofotómetro Perkin-Elmer modelo 1330, con el cual se hizo un barrido de la muestra diluida en diclorometano a concentraciones de 10 y 15 mg ml⁻¹.

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear se obtuvieron con un espectrofotómetro Varian de 300 MHz para H¹ y como disolvente se usó cloroformo deuterado.

La Espectrometría de Masas fue por inyección directa con un cromatógrafo líquido con detector de masas Hewlett Packard S-1100., para la elucidación de su estructura.

RESULTADOS

Las fracciones obtenidas a partir del primer extracto etanólico se presentan en la tabla número 1.

Con la fracción de acetato de etilo se hizo una separación por cromatografía en capa fina, en la cual se obtuvieron alrededor de 12 bandas visibles con luz UV. Se separaron las 5 bandas más abundantes dentro de las cuales existían varios compuestos y se probó su actividad en *A. salina*, resultados que se muestran en la tabla número 2.

En las siguientes cromatografías se buscó separar la banda C, o la tercera de arriba hacia abajo, de las 5 bandas que se observaban en la placa corrida en cloroformo. Esta banda presentó la más alta actividad con menor concentración.

De esta banda se obtuvieron dos compuestos. Uno de ellos se separó usando una columna de gel de sílice de fase normal. De esta separación se obtuvieron varios compuestos activos contra *A. salina*, sin embargo, al obtener los datos de resonancia magnética nuclear se encontró que la fracción separada en la columna se encontraba contaminada con el compuesto ftalato de etilo, el cual es un contaminante que proviene de plásticos disueltos en solventes, por lo que esta fracción y los compuestos provenientes de ella no se siguieron tratando.

Del segundo compuestos obtenido de la banda C, se obtuvieron 14.9 mg. Debido a la poca cantidad de muestra se realizó una separación mediante HPLC pre-preparativo para separar los compuestos presentes. De la HPLC se obtuvieron 3 compuestos: A1, A2 y A3, de los cuales el A2 fue el menos polar. Este compuesto se cristalizó con éter etílico.

La bioactividad del compuesto A2 fue probada con los siguientes bioensayos: Anticancerígenos contra células de colon HCT-116.

Antibióticos contra *S. Aureus* y *C. xerosis*

Antifúngicos contra *C. albicans*.

Antivirales contra el virus del herpes HSV-1.

La actividad más importante encontrada en este compuesto fue la de anticancerígeno contra células de colon HCT-116, con una concentración letal media de $63 \mu\text{g ml}^{-1}$.

De este compuesto se obtuvo la siguiente información espectroscópica:

Infrarrojo (figura 2):

Señales débiles a 3400 cm^{-1} y medias a 1350 y 1250 cm^{-1} características de grupos alcoholes (OH).

Señales débiles a 3080 cm^{-1} correspondientes a insaturaciones y a 690 cm^{-1} , 850 - 900 cm^{-1} correspondientes a flexiones de cis-alquenos.

Señales intensas a 2940 cm^{-1} y media a 1460 cm^{-1} correspondientes a los estiramientos C-H y flexiones de grupos $-\text{CH}_2-$.

Señales medias a 1720 cm^{-1} correspondientes a grupos carbonilo ($-\text{C}=\text{O}$).

Señales intensas a 1660 cm^{-1} correspondientes a dobles enlaces carbono-carbono ($-\text{C}=\text{C}-$)

Señales medias a 1370 cm^{-1} correspondientes a gem-dimetilo.

Espectrometría de Masas (figura 3): Se encontró que el ion molecular (M^+) (0.4%) es de 447, así como señales a m/e 284 (0.4 %) correspondiente a la pérdida de la cadena lateral ($\text{M}^+ - 162$), en m/e 256 (0.5 %) correspondiente a la pérdida del grupo carbonilo ($\text{M}^+ - 162 - 28$). En m/e 213 (0.4 %), un fragmento correspondiente al resto del esteroide después de la fragmentación anterior. En m/e 131 (33.8 %) correspondiente al anillo A aromático más 3 carbonos del anillo B (ver figura 3 para referencia de anillos). El pico base se encontró a m/e 69 (100 %) correspondiente a un formato de sodio substituido en el carbono 20 de la cadena lateral

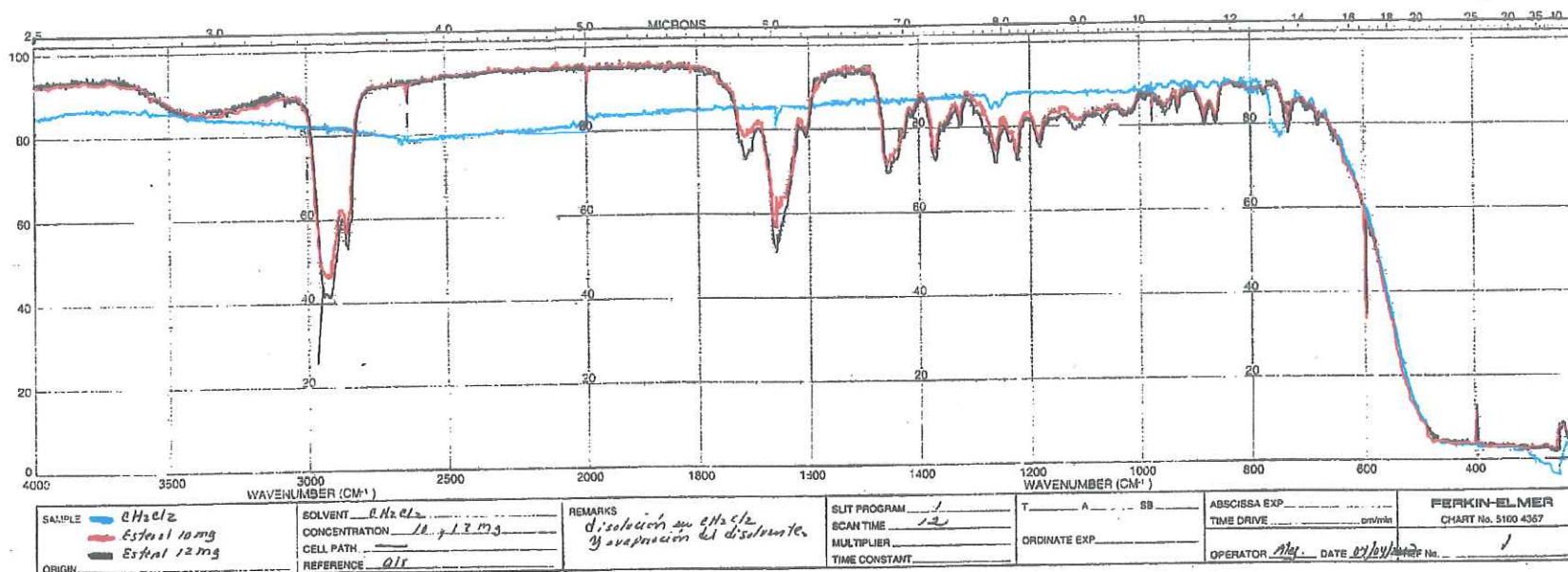


Figura 2. Espectro infrarojo.

Determinado mediante dilución en diclorometano en un espectrofotómetro Perkin-Elmer modelo 1330.

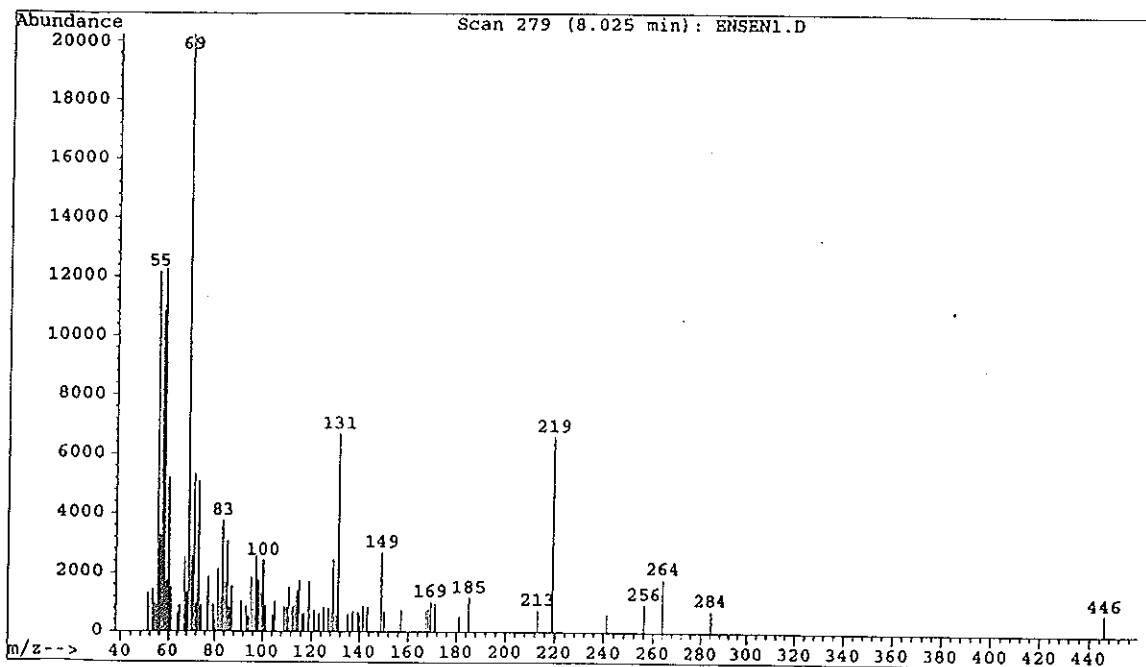


Figura 3. Espectro de Masas. Inyección directa con un cromatógrafo líquido con detector de masas Hewlett Packard S-100.

Resonancia Magnética Nuclear (figura 4):

Se presenta el patrón característico para esteroides con diversas bandas entre $\delta 3.0 - \delta 1.0$ ppm, debido a la gran cantidad de grupos CH_3 , $-\text{CH}_2-$, y CH del núcleo esteroidal.

Las señales encontradas son las siguientes:

A $\delta 1.2$ ppm, una banda simple, asignada a los protones del metilo del C_{18} , en $\delta 0.9$ ppm banda simple, asignada a los protones del metileno del C_{21} , en $\delta 0.88$ ppm, banda doble, asignada a los protones del metilo del C_{26} , en $\delta 5.72$ ppm una banda simple, asignada a protones vinílicos, en $\delta 4.69$ ppm una banda doble, asignada al protón de $^{\circ}\text{OH}$ en el C_3 , en $\delta 7.25$ ppm una banda simple, asignada a los protones aromáticos en los carbonos del anillo B del núcleo esteroidal. En $\delta 2.03$ ppm un multiplete asignado a los protones del $-\text{CH}_2$ del C_{15} y en $\delta 2.37$ ppm otra señal múltiple, asignada a los protones del CH_3 del C_{17} .

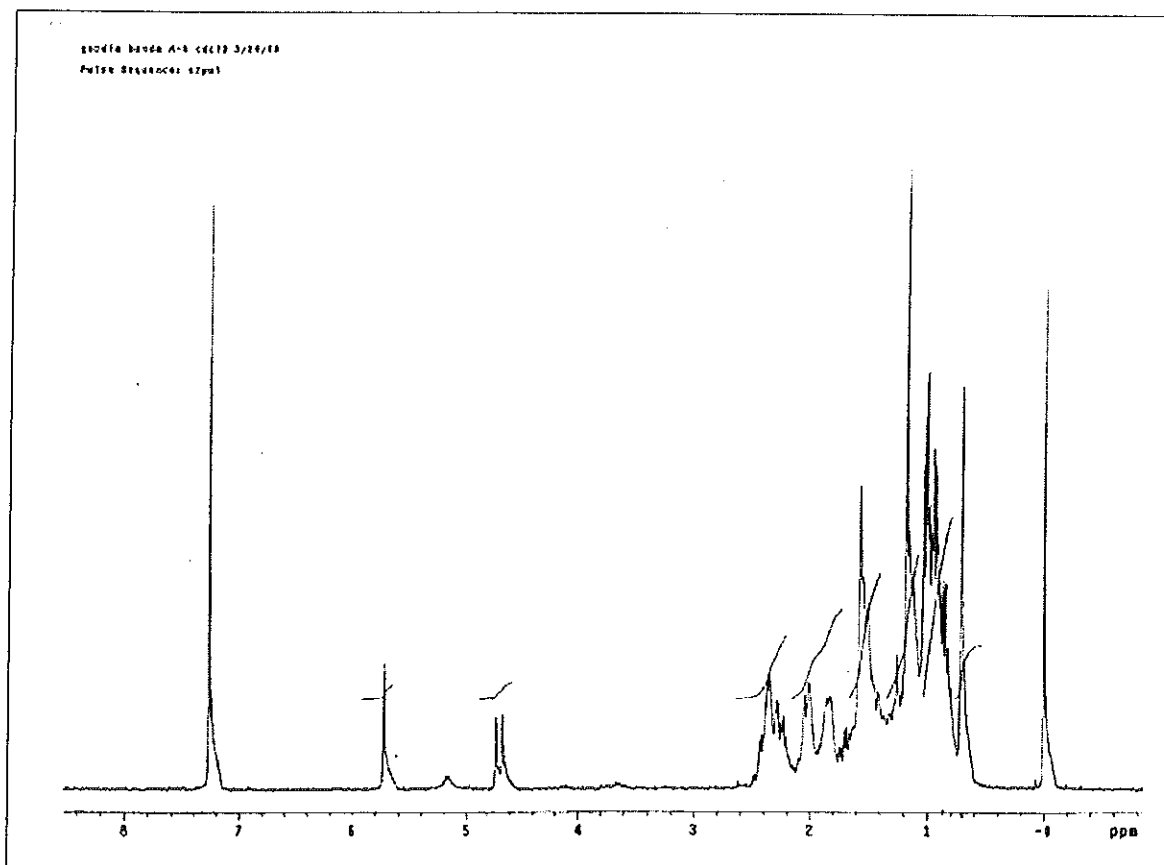


Figura 4. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear. Se utilizó cloroformo deuterado (CDCl_3) como disolvente en un espectrofotómetro Varian de 300 MHz.

TABLA I.

Porcentaje de mortandad de *Artemia salina* en tres diferentes extractos (Hexano, Diclorometano y Acetato de Etilo) a tres diferentes concentraciones.

Concentración	HEXANO % mortandad	DICLOROMETANO % mortandad	ACETATO DE ETILO % mortandad
10 mg ml ⁻¹	0	2.3	74.35
1 mg ml ⁻¹	2.0	2.3	1.9
0.1 mg ml ⁻¹	0	0	2.2

TABLA II.

Porcentaje de mortandad de *Artemia salina* de cinco fracciones obtenidos a partir del extracto de Acetato de Etilo.

BANDA	CONCENTRACIÓN mg ml ⁻¹	PORCENTAJE DE BIOACTIVIDAD %
Banda A	11.1	0
Banda B	2.5	28.5
Banda C	8	81.2
Banda D	10.7	60
Banda E	12.2	100

DISCUSIÓN

A pesar de la gran cantidad de fármacos existentes, aún es notable la escasez de tratamientos y medicamentos efectivos contra algunas enfermedades tales como la malaria, leucemia y tuberculosis (Garson, 1994).

Debido a que las esponjas son organismos sésiles con probabilidades muy altas de descomposición y de pérdida de hábitat dentro del ambiente marino competitivo, necesitan desarrollar una forma química de defensa, esta es una de las razones por las que este Phylum contiene el intervalo más amplio de metabolitos secundarios reportados en cualquier Phylum marino (Garson, 1994). Ni los colenterados, algas marinas, tunicados, o los brozoarios, muestran la misma diversidad estructural de compuestos, que muestran las esponjas (Ireland *et al.*, 1994).

Como ya se mencionó en los antecedentes, existen varios trabajos en donde se han aislado compuestos bioactivos a partir de esponjas marinas. En ellos, se han encontrado desde compuestos antiinflamatorios hasta anticancerígenos.

De esta gran cantidad de compuestos, los provenientes de las esponjas del género *Geodia* han mostrado tener una gran variedad estructural. Entre ellos sobresalen compuestos como las geodiasinas 1 y 2 (Pettit *et al.*, 1981), los ciclodepsipéptidos geodiamolides H e I (Tinto *et al.*, 1998), geodiatoxinas 2-4 (Pettit *et al.*, 1990), geodiesterol A (Wang y Crews, 1996), y algunas cetonas esteroideas (Migliulo *et al.*, 1990), los cuales tienen propiedades farmacológicas del tipo antineoplásticas, antielmínticas, insecticidas y antifúngicas.

Varios productos obtenidos a partir de la fracción de acetato de etilo de la esponja marina *Geodia* sp. mostraron actividad citotóxica contra el crustáceo *Artemia salina*, lo cual significa que varios compuestos ya sea solos o en conjunto,

son bioactivos. Por cuestiones de tiempo, de esta gran cantidad de compuestos se seleccionaron los más activos para la fase de aislamiento. De las dos fracciones seleccionadas, solamente una fue útil para continuar el desarrollo de la investigación, ya que la otra se encontró contaminada con ftalato de etilo.

La fracción útil fue separada y se logró aislar un compuesto de tipo esteroide polioxigenado (figura 5) derivado del Geodisterol (Wang y Crews, 1996) (figura 6), en el cual no se presenta el grupo oxhidrilo del carbono 16 y cambia la cadena lateral con la sustitución de un formato de sodio en el carbono 19.

Esta estructura se apoya con los resultados obtenidos en las diferentes espectroscopías:

En infrarrojo se observan las bandas características de alcoholes, aromáticos, grupos alcanos, alquenos y el grupo carbonilo del formato de sodio.

En resonancia magnética nuclear, se observa el patrón característico de los compuestos esteroidales con una gran cantidad de señales simples entre 1 y 3 ppm. También notamos las señales características para los protones aromáticos del anillo A, las señales para los protones del metilo del carbono 17, 18 y 26, Las señales para los protones del metileno del carbono 21, las de los protones vinílicos, las del protón del grupo oxhidrilo del alcohol terciario del anillo A, así como las señales para los protones aromáticos en los carbonos del anillo A del núcleo esteroidal.

En el espectro de masas se observa una señal a m/e 446 que corresponde al ión molecular ($M^+ - 1$), ésto debido a que el oxhidrilo de este esteroide se encuentra en un carbón terciario y en estos casos el ion molecular se observa con un valor de -1 (Domínguez, 1979). El peso molecular propuesto para este compuesto es de 447 y concuerda con la fórmula molecular $C_{28}H_{40}O_2$.

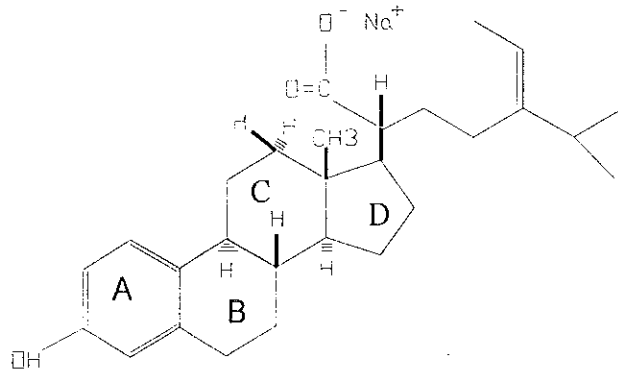


Figura 5. Estructura propuesta para el compuesto obtenido de la esponja marina *Geodia* sp.

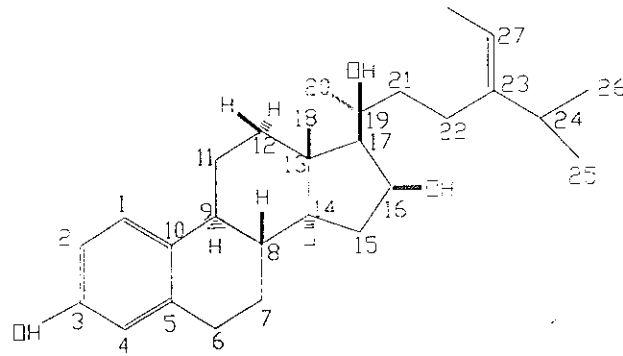


Figura 6. Geodisterol, A. Wang y Crews (1996).

Este compuesto presenta una estructura similar a la del Geodisterol aislado por Wang y Crews a partir de una esponja de este mismo género en el año de 1996.

También se observan las pérdidas del fragmento de la cadena lateral, así como las del grupo formato de sodio y la del anillo A del grupo esteroidal. Estas pérdidas se dan de manera lógica si se considera fragmentación común de los esteroides descrita por Domínguez en 1979.

Cabe aclarar que la estructura de este compuesto no queda perfectamente elucidada en el presente trabajo debido a que la cantidad de compuesto obtenido no fue suficiente para realizar el análisis elemental correspondiente, ni las reacciones químicas necesarias como lo son: la acetilación al grupo formato y al grupo oxhidrilo del esteroide, y la degradación alcalina del esteroide en general. Es necesario continuar con el aislamiento de una mayor cantidad de compuesto para llegar a la elucidación total y poder publicar la estructura. Sin embargo, nuestros resultados muestran una buena aproximación a la fórmula real y, debido a que las pruebas de bioactividad nos señalan un compuesto con una actividad citotóxica ($LD_{50} 63\mu\text{g ml}^{-1}$) contra células cancerígenas de colon HCT-116, es de primordial importancia continuar con los estudios tanto químicos como farmacológicos con la finalidad de ser aplicado como fármaco.

La mayoría de los productos nuevos son descubiertos como resultado de una colecta grande en programas de monitoreo que, generalmente, son costosos y poco efectivos. Una mejor manera de dirigir un programa de colecta de organismos es el que se utilizó para este trabajo: la colecta fue biológicamente razonada, es decir, se conocía la ecología del organismo; su distribución, su dominio y su índice de valor biológico dentro de la zona estudiada. Al tener esta información, es mucho más fácil decidir que organismos tienen el potencial biológico y farmacológico más importante.

CONCLUSIONES

1. La esponja marina *Geodia* sp. contiene diversos compuestos con actividad citotóxica contra el crustáceo *Artemia salina*.
2. La esponja marina *Geodia* sp. contiene compuestos bioactivos contra células cancerosas humanas.
3. El compuesto analizado espectroscópicamente de la esponja marina *Geodia* sp., además de la actividad contra *Artemia salina*, muestra actividad citotóxica contra células cancerígenas de colon HCT-116 con una concentración letal media (LC₅₀) de 63 µg ml⁻¹.
4. La estructura propuesta para el compuesto aislado se muestra en la figura 5.

LITERATURA CITADA

Barnes, D.R. 1969. Zoología de los Invertebrados. Ed. Interamericana. México. 761 pp.

Bergquist, R.P. 1979. Sponge chemistry, A Review. Págs. 383-392. *En: Colloques interaionaux du C.N.R.S. no 291 Biologie des spongiaries.*

Domínguez, X. 1979. Métodos de Investigación Fitoquímica. Ed. Limusa. México. 281 pp.

Fenical, W. 1982. Natural products chemistry in the marine environment. *Science*. 215(4535): 923-928.

Fhurman, A.F. 1981. Pharmacology of marine natural products. Symposium. Federation Proceedings. 40(1):7-9.

Garson, J.M. 1994. The biosynthesis of sponge secondary metabolites: Why it is important. Págs. 427-440. *En: van Soest, van Kempen y Braekman (eds). Sponges in Time and Space.*

Ireland, C.M., D.M. Roll, T.F. Molinski, T.C. McKee, T.M. Zabriske y J.C. Swersey. 1988. Uniqueness of the marine chemical environment: Categories of marine natural product from invertebrates. Págs. 41-57. *En: D.G. Fautin (ed.). Biomedical Importance of Marine Organisms. Californian Academy of Science. San Francisco.*

- Kaul, N.P. 1981. Marine pharmacology: drugs from the sea. Págs. 80-81. Symposium of the American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics.
- Kelly-Gutiérrez, L.D. 1999. Detección y variación de bioactividad de invertebrados bentónicos de Bahía Concepción, BCS, México. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Marinas. U.A.B.C.
- Kelly-Gutiérrez, Soria, I.E. Fernández, J.A. Gómez, P. En prep. Variación estacional de bioactividad en esponjas de Bahía Concepción BCS, México.
- McLaughlin, L.J. 1991. Crown Gall Tumors on Potato Discs and Brine Shrimp Lethality: Two Simple bioassays for Higher Plant Screening and Fractionation. Págs. 1-32. *En: Methods in Plant Biochemistry* vol. 6. Academic Press.
- Meyer, B. N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen L.B., Nichols D.E., McLaughlin J.L. 1985. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Journal of Medicinal Plant Research*. **45**: 31-34.
- McCaffrey, E.J. y R. Endean. 1985. Antimicrobial activity of tropical and subtropical sponges. *Marine Biology*. **89**: 1-8.
- Migliuolo, A., V. Piccialli, y D. Sica. 1990. Steroidal ketones from the sponge *Geodia cydonium*. *Journal of Natural Products*. **53**(5): 1262-1266.
- North, T.W. y S.S. Cohen. 1979. Aranucleosides and aranucleotides in viral chemotherapy. *Pharmaceutical Therapy*. **4**:81-108.
- Pawlik, R.J. 1993. Marine invertebrate chemical defenses. *Chemical Reviews*. **93**: 1911-1922.

- Perry, N.B., J.W. Blunt, M.H.G. Munro y L.K. Pannell. 1988. Mycalamide A, an antiviral compound from a New Zealand sponge of the genus *Mycale*. *Journal of the American Chemical Society*. **110**: 4850-4851.
- Perry, N.B., J.W. Blunt, M.H.G. Munro y A.M. Thompson. 1990. Antiviral and antitumor agents from a New Zealand sponge, *Mycale* sp. 2. Structures and solution conformations of mycalamides A and B. *Journal of Organic Chemistry*. **55**: 223-227.
- Pettit, R.G., J.A. Rideout y Hasler A.J. 1981. Isolation of Geodiastatins 1 and 2 from the marine sponge *Geodia mesotriaena*. *Journal of Natural Products*. **44** (5):588-592.
- Pettit, R.G., J.A. Rideout y A.J. Hasler. 1990. Isolation of Geodiatoxins 2-4 from the marine sponge *Geodia mesotriaena*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. **96**(2): 305-306.
- Proksch, P. 1994. Defensive roles for secondary metabolites from marine sponges and sponge feeding nudibranchs. *Toxicon*. **32**(6): 639-655.
- Quinn, F.J., R.P. Gregson, A. F. Cook y A. F. Bartlett. 1980. Isolation and synthesis of 1-methylisoguanosine, a potent pharmacologically active constituent from the marine sponge *Tedania digitata*. *Tetrahedron Letters*. **21**:567-568.
- Ruggieri, D.G. 1976. Drugs from the sea. *Science* **194**: 491-497
- Sanders, H.L. 1960. Benthic studies in Buzzard Bay. III. The structure of the soft coral community. *Limnology and Oceanography*. **5**: 138-153.

Scheuer, P. 1978. Chemistry of Marine Natural Products. Academic Press. New York. USA. 201 pp.

Tinto, F.W., A.J. Lough, S.McLean, W.F. Reynolds, M. Yu, y W.R. Chan 1998. Geodiamolides H and I, further cyclodepsipeptides from the marine sponge *Geodia* sp. *Tetrahedron* **54**: 4451-4458.

Thompson, J.E. R.P. Walker y D.J. Faulkner. 1985. Screening and bioassays for biologically-active substances from forty marine sponge species from San Diego, California, USA. *Marine Biology*. **88**:11-21.

Wang, S. y G P. Crews. 1996. Geodisterol, A novel polyoxygenated sterol with an aromatic A ring from the tropical marine sponge *Geodia* sp. *Tetrahedron Letters*. **37**(45): 8145-8146.

