



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
ZARAGOZA

AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE LAS
SUSTANCIAS ANTIMICROBIANAS DE LA
ESPONJA MARINA Aplysina sp.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :
MA. DEL CARMEN DAMAZO DEL RIO

MEXICO, D. F.

1984



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

C O N T E N I D O

I	INTRODUCCION	1
II	FUNDAMENTACION DEL TEMA	3
III	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
IV	OBJETIVOS	21
V	HIPOTESIS	22
VI	MATERIAL Y METODO	23
VII	DESARROLLO DEL TRABAJO	26
VIII	RESULTADOS Y DISCUSION	31
IX	CONCLUSIONES	35
X	BIBLIOGRAFIA	36

ESTA TESIS SE REALIZO EN EL INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y -
LIMNOLOGIA Y EN EL INSTITUTO DE QUIMICA DE LA UNIVERSIDAD NA-
CIONAL AUTOMOMA DE MEXICO, BAJO LA DIRECCION DE LOS DOCTORES
GERARDO GREEN MACIAS Y TIRSO RIOS CASTILLO.

INTRODUCCION

Durante muchos años el hombre ha pretendido utilizar varias clases de organismos marinos como agentes medicinales, - debido a que han sido utilizados desde tiempos ancestrales como fuentes de fármacos y excipientes farmacéuticos. En comparación con el gran número de productos quimioterapéuticos obtenidos directa o indirectamente de organismos terrestres, -- muy pocos provienen de fuentes marinas y probablemente no más de una docena se utilizan en la terapia cotidiana. Sin embargo ha surgido el interés por los océanos como fuente poten-- cial de nuevos fármacos, lo cual ha estimulado la actividad - en el campo de la investigación y la clínica. El desarrollo de la química, la farmacología y las ciencias marinas han fa- cilitado la investigación del hasta ahora no utilizado oceáno como fuente de nuevos fármacos. Sin embargo apesar de este - desarrollo, la gran potencialidad de los océanos como fuente natural de nuevos fármacos no ha sido considerada en el ámbi- to industrial. Existen varias razones que provocan esta si-- tuación, éstas incluyen los problemas de colecta, almacena-- miento y aislamiento de constituyentes activos de los organis

mos, así como su evaluación clínica y procesamiento, los cuales carecen de un financiamiento adecuado.

Dentro de la potencialidad de los océanos como fuente de fármacos, debemos considerar el amplio panorama de los metabolitos químicos presentes en las aguas del mar y organismos marinos, tales como los antimicrobianos, antitumorales, anticoagulantes y antivirales (los cuales se han obtenido principalmente de algunas algas y esponjas marinas), antiulcerosas, -- hemolíticos, analgésicos, agentes antihiperlipémicos y cardioinhibidores, estimulantes, depresores y varios fungicidas e insecticidas, que se han aislado de organismos marinos tales como las gorgonias, anélidos y moluscos, así como algunos adyuvantes y estabilizadores farmacéuticos. ^{12, 46} Cuya concentración y distribución en los océanos varía de un lugar a --- otro y está determinada por la flora y la fauna residente del lugar.

FUNDAMENTACION DEL TEMA

Se han reportado alrededor de cien compuestos organobromados de origen natural y solamente uno de estos no ha sido aislado de organismos marinos. Estos compuestos pertenecen a diversas clases químicas tales como: fenoles, pirroles, indoles, sesquiterpenos, diterpenos y heterociclos polinucleares; los cuales parecen ser característicos del ambiente marino y han sido encontrados principalmente en algas.³⁷ Varios monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos bromados han sido aislados de la glándula digestiva de moluscos del género -----
Aplysia¹⁷, pero algunos experimentos han revelado que la presencia de estos compuestos se debe a que este molusco se alimenta de algas. Otro grupo de organismos marinos que junto con las algas son ricos en compuestos bromados son las esponjas.^{37, 45}

Las esponjas de la familia Aplysinidae han proporcionado una serie de compuestos con propiedades antimicrobianas, los cuales pueden ser considerados como metabolitos de la 3,5-dibromotirosina.³³ En la figura 1 se muestran las estructuras.

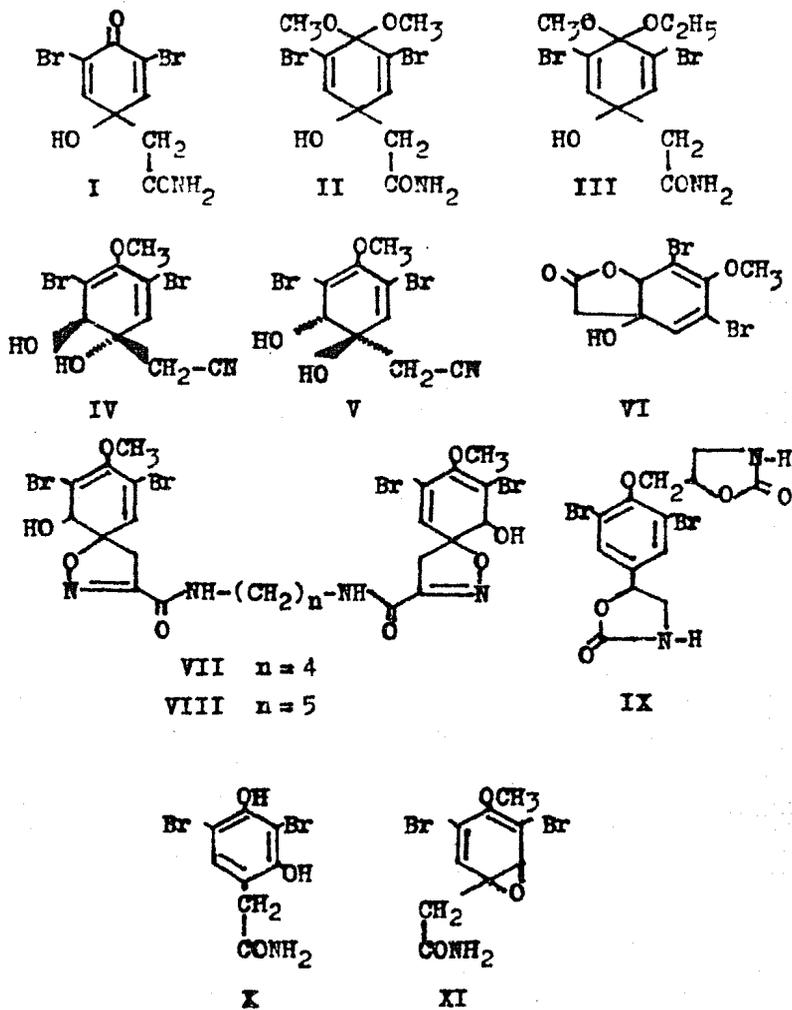


Figura 1. Bromocompuestos derivados de la tirosina.

Los primeros dos miembros de la serie fueron aislados -- del extracto metanólico de las esponjas marinas Aplysina ----- fistularis y Aplysina cauliformis por Sharma y Bur-kholder, -- ^{39, 40} (1967). La imposibilidad de convertir (I) en (II) por -- reacción con metanol bajo varias condiciones permitió a los in- vestigadores considerar que el cetal (II) es un producto natu- ral y no un derivado del compuesto (I), generado durante el -- proceso de extracción. ⁴¹ Andersen y Faulkner (1973), aisla- ron del extracto de una especie no descrita del género ----- Aplysina la dienona (I) y el cetal (III), de este último se ob- tuvo finalmente una mezcla de diásteroisómeros. Esto sugiere que el cetal (III) no es un producto natural, por lo que di- -- chos investigadores proponen que la dienona (I), el dimetoxice- tal (II) y el cetal (III) pueden derivarse de un intermediario como el epóxido (XI), por adición 1,4 de agua, metanol o eta- -- nol durante el proceso de extracción.

La aeroplisinina-1 (IV), ¹⁶ fue el primer compuesto iso- mero dextrarrotatorio aislado de la esponja Aplysina ----- aerophoba, la cual también contiene la dienona I, la lactona - ³¹ VI ³⁴ y los demás complejos VII y VIII. Fulmer y colaborado

res (1970), aislaron de la esponja Ianthella ardis el enantiomero levogiro de la aeroplisinina-1, para la cual proponen la configuración absoluta V,¹⁹ en base a los datos químicos encontrados. La estructura y configuración absoluta de ambos enantiomeros ha quedado bien establecida por estudios de rayos X.

La aeroplisinina-1 (IV) posee propiedades antimicrobianas y actividad antitumoral, es el primer ejemplo de un 1,2-dihidroareno-1,2-diol que se presenta naturalmente y el cual puede ser biosintetizado por la ruta del epóxido.¹⁶

El sistema espiro de los metabolitos bromados más complejos (VII) y (VIII), aislados de la esponja Aplysina thiona por Moody (1972), pueden provenir de un ataque nucleofílico por una función oxima sobre el epóxido como se muestra en la figura 2.

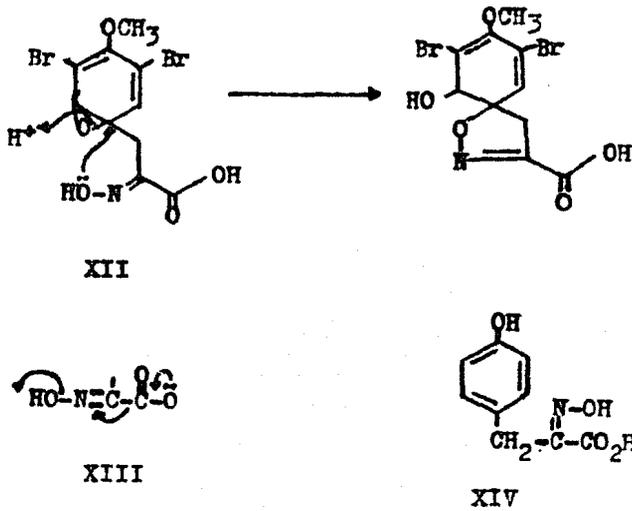
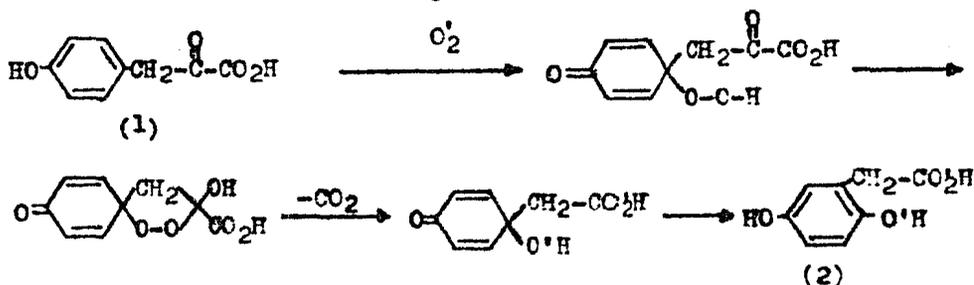


Figura 2. Hipótesis biogenética para la formación del sistema espiro en la aerotoinina y el nitrilo de la aeroplisinina-1.

Esto sugiere que los nitrilos pueden derivarse in vivo de α -aminoácidos vía α -ceto y α -oximinocidos. Cimino (1975), propone que el ácido α -oximinico (XII) puede ser también un probable precursor del nitrilo de la aeroplisinina-1 (IV y V), como se indica en (XIII), además sostiene esta hipótesis por el aislamiento de ácido oximinopirúvico (XIV) de la

esponja Hymeniacidon sanguinea.

El compuesto (IX) de la figura 1 ha sido aislado de la esponja Aplysina lacunosa, es el primer bromocompuesto constituido por dos anillos de oxazolidona obtenido de un organismo marino. ⁴ Rinehart (1975), aisló de la esponja marina ----- Aplysina aurea el compuesto (X), de acuerdo a las estructuras de los metabolitos bromados de las esponjas de la familia ---- Aplysinidae, se observa que la cadena alifática aparece en posición para con respecto al grupo hidroxilo flanqueado por los átomos de bromo. Una analogía de este arreglo al esqueleto de la tirosina, se aprecia en la conversión del ácido 4-hidroxifenilpirúvico al ácido 2,5-dihidroxifenilacético (ácido homogentísico), catalizada por la enzima parahidroxifenilpiruvato hidroxilasa de acuerdo al siguiente esquema.



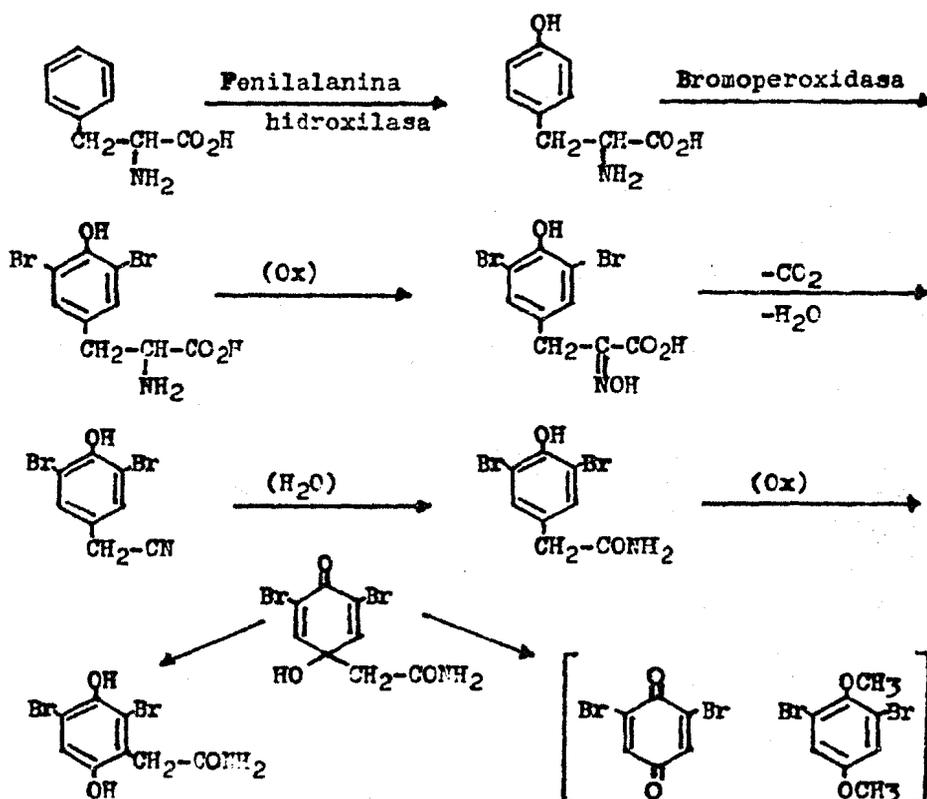
Esquema que muestra la conversión del ácido 4-hidroxifenilpirúvico (1) al ácido homogentísico (2).

Esta vía biosintética ofrece una explicación plausible - para la formación de la dienona (I) de la figura 1.

Todos los metabolitos bromados de las aplysinas parecen ser biosintetizados a partir de la 3,5-dibromotirosina, la --- cual se ha encontrado en las proteínas de las esponjas. ²³ -- Probablemente las cadenas centrales metilénicas de la aerotio- nina (VII) y la homoaerotionina (VIII) se derivan de los amino ácidos ornitina y lisina, respectivamente. ^{15, 41}

De Rosa (1975), suministró (U-¹⁴C)-L-tirosina radiactiva a la esponja Aplysina aerophoba con el fin de incorporarla a los compuestos derivados de la 3,5-dibromotirosina, sin lograr su objetivo. Se intentó también incorporar (U-¹⁴C)-L_ornitina y (CH₃-¹⁴C)-metionina, obteniéndose los mismos resultados, ya que finalmente se encontró que estos aminoácidos marcados eran utilizados por la esponja para la síntesis de ácidos grasos. - Posteriormente Tymiak y Kenneth (1981), demostraron que estos bromocompuestos sí provienen de la dibromotirosina, para ello utilizaron fenilalanina y tirosina marcadas, las cuales fueron

encapsuladas en liposomas, y observaron su conversión a la dienosina (I), así como el arreglo para la formación de dibromohomogentisamida de acuerdo al siguiente esquema:



Ruta biosintética para la formación de fenoles y quinonas bromadas en la esponja *Aplysina fistularis*.

Respecto a estos bromocompuestos también se ha propuesto un origen dietético. Chantraine (1973), aisló los ésteres bromados (XV) y (XVa) del extracto de la alga roja Halopytis incurvus. Esto pone en evidencia la posibilidad de que los compuestos bromados aislados de las esponjas, fueran originalmente producidas por las algas. Además, se debe enfatizar que las esponjas marinas alojan simbióticamente bacterias y algas en su interior. Green (1977), propone una función dual ofensiva y defensiva de las sustancias antimicrobianas en la vida de las esponjas; el mecanismo ofensivo que ayuda en la nutrición, inactivando las bacterias antes de ser ingeridas; y el mecanismo defensivo controlando las infecciones microbianas.

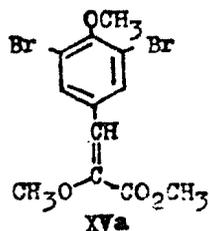
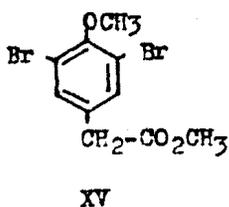


Figura 3. Bromocompuestos aislados del alga roja Halopytis incurvus.

Cimino (1975), clasificó los compuestos provenientes de ciertas esponjas en base a sus características moleculares como: A) bromocompuestos relacionados con la 3,5-dibromotirosina; B) furano terpenos lineales y C) derivados bromopirrolidicos. También encontró que la ocurrencia de cada grupo de compuestos biosintéticamente relacionados, especialmente los dos primeros, están restringidos a una serie de especies taxonómicamente relacionadas.⁶

Los compuestos bromados relacionados con la 3,5-dibromotirosina parecen estar relacionados con la familia Aplysinidae y el género Ianthella, como se puede observar en la tabla 1, - en la cual se muestra la distribución de los tres tipos de compuestos. Los compuestos del tipo B se encontraron principalmente en las esponjas de las familias Spongidae a Aplysillidae. Mientras que los compuestos del tipo C se presentan en las esponjas de las familias Agelasidae y Axinellidae.

Compuestos del Tipo

	A	B	C
Orden Dictyoceratida			
Familia Aplysinidae			
<u>Aplysina aerophoba</u>	+		
<u>Aplysina archeri</u>	+		
<u>Aplysina cauliformis</u>	+		
<u>Aplysina fistularis</u>	+		
<u>Aplysina thiona</u>	+		
Familia Dysideidae			
<u>Ianthella ardis</u>	+		
<u>Ianthella sp.</u>	+		
<u>Dysidea avara</u>			
<u>Dysidea pallescens</u>		+	
Familia Spongidae			
<u>Spongia nitens</u>		+	
<u>Spongia officinalis</u>		+	
<u>Spongia agaricina</u>		+	
<u>Hippospongia communis</u>		+	
<u>Ircinia fasciculata</u>		+	
<u>Ircinia oros</u>		+	
<u>Ircinia spinosula</u>		+	
<u>Ircinia variabilis</u>		+	
Familia Aplysillidae			
<u>Pleraplysilla spinifera</u>		+	
Orden Poecilosclerida			
Familia Agelasidae			
<u>Agelas oroides</u>			+
<u>Agelas sp.</u>			+
Orden Axinellida			
Familia Axinellidae			
<u>Phakellia flabellata</u>			+
<u>Axinella damicornis</u>			+

Tabla 1. Distribución de compuestos del tipo A, B y C - en esponjas marinas. (Cimino 1975)⁶

Los compuestos bromopirrólicos aislados de las esponjas Agelas y Axinella se muestran en la figura 4.

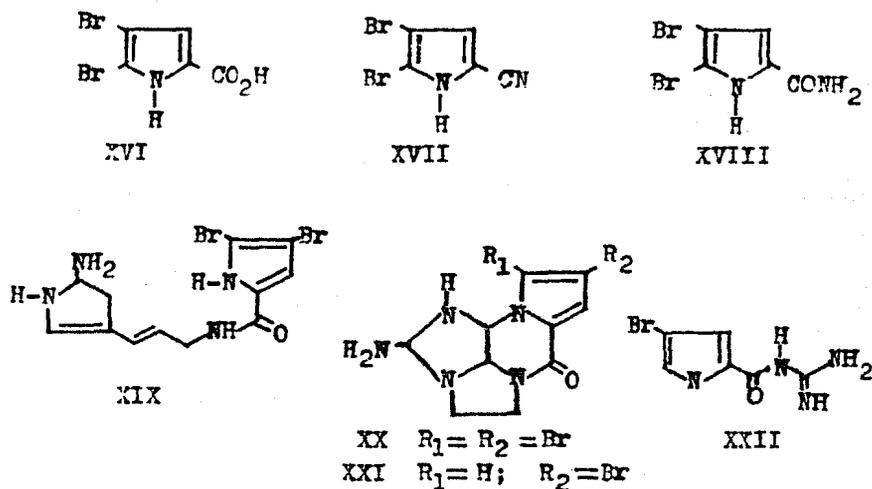


Figura 4. Bromopirroles aislados de las esponjas marinas Agelas y Axinella.

Forenza (1971), aisló los bromopirroles (XVI), (XVII) y (XVIII), de la esponja Agelas oroides, la cual también contiene grandes cantidades de oroidina (XIX). La oroidina también

se ha encontrado en las esponjas del género Axinella, siendo dos especies las más representativas A. damicornis y A. verrucosa. Sharma y Burkholder (1971), aislaron la dibromopaquelina (XX) y la 4-bromopaquelina (XXI) de la esponja Phakellia flabellata, estos compuestos presentaron actividad antimicrobiana contra una gran variedad de microorganismos. Stempien (1972), aisló la 4-bromopirrol-2-carbonil guanidina (XXII) de una especie no identificada del género Agelas. La presencia de estos bromopirroles en las esponjas de los géneros Agelas y Axinella, hacen suponer una relación entre ellas.

Sharma (1972), aisló dos fenoxifenoles bromados (XXIII) y (XXIV) figura 5, activos contra bacterias gram positivas y negativas, de la esponja Dysidea herbacea. Van Lear (1973), aisló dos bromopirroles (XXV) y (XXVI) figura 5, con actividad antimicrobiana de la esponja Polyfibrospongia maynardii.

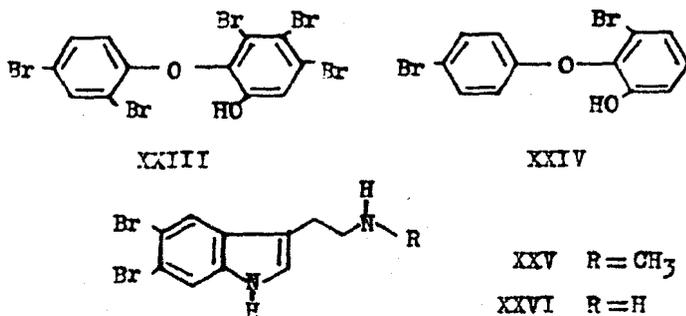
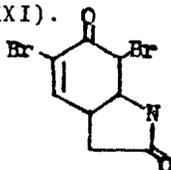


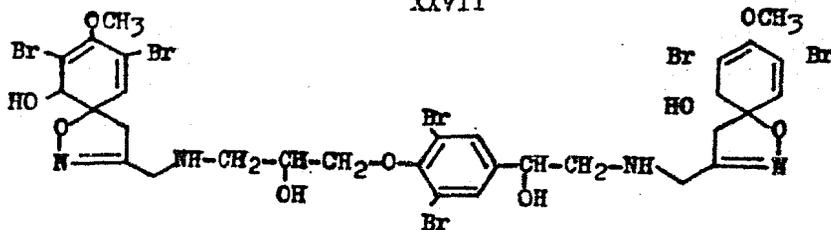
Figura 5. Bromocompuestos aislados de las esponjas -----
Dysidea herbacea y Polyfibrospongia maynardii.

D'Ambrosio (1982), reportó el aislamiento de la carnico-
lina-1 y -2 (XXVII) figura 6, una mezcla recémica de bromocom-
puestos con una lactama lateral, de la esponja Aplysina -----
cavernicola. Cimino (1983), reportó tres nuevos compuestos --
(XXVIII), (XXIX) y (XXX) figura 6, aislados de la esponja ----
Aplysina aerophoba. La isofistularina-3 (XXVIII) presentó ac-
tividad citotóxica in vitro en células KB, siendo la dosis ---

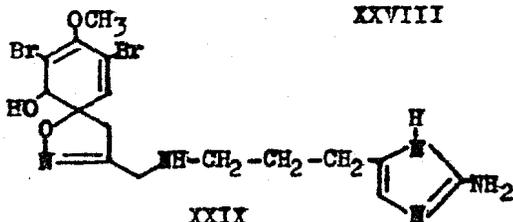
efectiva de 4 mcg/ml. La hidrolisis ácida de la aerofobina-1 (XXX) dá histamina (XXXI).



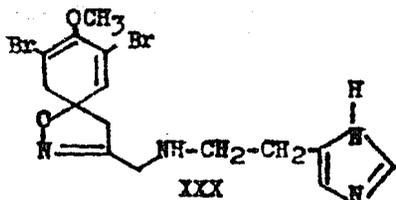
XXVII



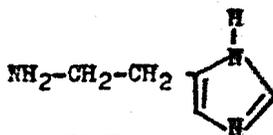
XXVIII



XXIX



XXX



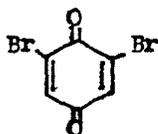
XXXI

Figura 6. Bromocompuestos aislados de la esponja marina Aplysina aerophoba (Cimino 1983).

En base a las características morfológicas de las esponjas de la familia Aplysinidae Wiedenmayer (1977) y Van Soest (1978) se hicieron una clasificación de esta familia en tres géneros: Aplysina (Nardo), Verongula (Verrill) y Aiolochoiria (Wiedenmayer). Posteriormente Makarieva (1981), trató de establecer diferencias en cuanto a la composición química de los extractos de las especies de estos géneros, pero no encontró diferencias en el contenido de derivados bromados de la tirosina entre las esponjas de los géneros Verongula y Aiolochoiria, sin embargo no todas las esponjas del género Aplysina presentaron aeroplisinina-1, lo que hace suponer que existen variaciones en la composición química entre especies similares o la misma especie, como resultado de los factores ecológicos.

Kanakapura (1982), encontró que la 2,6-dibromobenzoquinona (XXXII) figura 7, aislada de la esponja Aplysina fistularis (Krejcarek 1975), inhibía la actividad de la RNA polimerasa II del germen de trigo, y pone en evidencia que la dibromobenzoquinona efectúa esta inhibición previniendo la --

iniciación de la síntesis de la cadena de RNA, pero no su ---
elongación.



XXXII

Figura 7. 2,6-dibromobenzoquinona aislada de la esponja *Aplysina fistularis*.

Estudios recientes realizados por Gorshkov (1982), muestra que los bromocompuestos aislados de esponjas de la familia Aplysinidae inhiben la actividad ATPasa de la bomba de sodio-potasio y que esta inhibición depende de la concentración y la estructura química de los compuestos empleados, por lo que pueden considerarse una herramienta valiosa en el estudio de los mecanismos de transporte a través de membrana.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La búsqueda de nuevos compuestos con actividad antimicrobiana ha adquirido relevancia en la actualidad, debido a que los fármacos presentes en el mercado se han utilizado indiscriminadamente, creando resistencia en las poblaciones microbianas. Ante tales consecuencias se ha hecho necesario el descubrimiento de nuevos compuestos de este tipo.

Las esponjas marinas alojan una gran cantidad de bacterias en sus canales y se ha visto que no son atacadas por estas últimas, lo cual hace pensar que poseen ciertos mecanismos de defensa. Ante tales evidencias se propone el estudio químico de los metabolitos con actividad antimicrobiana de la esponja marina Aplysina sp., con el fin de contribuir al conocimiento de las sustancias químicas potencialmente útiles como agentes antimicrobianos de origen marino.

OBJETIVOS

El presente trabajo pretende contribuir al conocimiento de nuevos compuestos de origen marino con actividad farmacológica, específicamente antimicrobianos, que se han detectado en forma cualitativa en trabajos preliminares realizados por Cruz (1984) y Green y colaboradores (1984), desglosándose en los siguientes aspectos:

- 1) Aislamiento y purificación de las sustancias antimicrobianas de la esponja Aplysina sp.
- 2) Identificación de las sustancias antimicrobianas de la esponja Aplysina sp.
- 3) Ensayos de actividad antimicrobiana a los compuestos obtenidos.

HIPOTESIS

De acuerdo a los reportes de Minale (1976) y Faulkner -- (1977), los compuestos químicos aislados de las esponjas de -- la familia Aplysinidae son principalmente derivados bromados de la tirosina y esteroides.

Kelecom (1979), encontró que mientras los bromocompues-- tos derivados de la tirosina representan alrededor del 25% -- del extracto crudo total de la esponja Aplysina aerophoba, co-- lectada en el Mediterraneo, las especies del Brasil carecen -- de tales metabolitos bromados. Varias esponjas del género -- Aplysina de Brasil fueron colectadas en diferentes lugares y periodos de tiempo, sin presentar estos metabolitos

Por las evidencias presentes se espera que los compues-- tos químicos con actividad antimicrobiana de la esponja ----- Aplysina sp., sean bromolactonas o bromocompuestos derivados de la tirosina, ya que se ha visto que las aplysinas del Cari-- be también presentan compuestos de este tipo.

MATERIAL Y METODO

1) Descripción de la esponja Aplysina sp.

Esponja incrustante o masiva con varias proyecciones lobulares, con una longitud de 7 a 18 mm. Su color en vivo es amarillo ocre, preservada en alcohol se torna morado oscuro. Su consistencia es poco compresible y compacta. Presenta una superficie lisa en partes y finamente canulosa en otras. Sus ósculos son muy aparentes y están situados en el extremo superior de cada lóbulo de la esponja. Su esqueleto está compuesto por fibras de espongina de color ámbar, las cuales tienen una médula en el centro.

Se colectó en Mazatlán, Sinaloa y Zahuatanejo, Guerrero, en el mes de marzo de 1982.

2) Preparación del extracto crudo de la esponja.

Se maceró la esponja con 200 ml de metanol, en un homogenizador Waring Commercial de una velocidad durante 20 minutos.

Al homogenizado se le adicionó suficiente metanol para completar un volumen de 3.0 l. y se dejó reposar 72 horas a temperatura ambiente en un matraz Erlenmeyer de 5.0 l. Se centrifugó en una centrifuga DYNAC a 4,000 rpm durante 15 minutos. El sólido fue lavado posteriormente 8 veces con 200 ml de metanol. Se hizo un extracto crudo concentrando la totalidad de los sobrenadantes a presión reducida.

3) Pruebas de antibiosis.

Los ensayos de actividad antimicrobiana se hicieron por difusión en placa utilizando medio de cultivo Mueller Hinton (Bioxon). Se utilizaron placas de 10x2 cm y 10 ml de medio esterilizado a 121° y 15 libras de presión durante 15 minutos. Las pruebas se realizaron impregnando discos estériles de papel filtro Whatman # 42 de 6 mm de diámetro con 0.1 ml de extracto. Los microorganismos de prueba fueron: -----
Staphylococcus aureus, Salmonella typhimurium, Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli y Trychophyllum mentagrophites.

4) Cromatografía del extracto.

El extracto crudo se colocó en una columna cromatográfica de 2.5 cm de diámetro por 80.0 cm de altura, empacada con 120 g de gel de sílice de 60 a 200 mallas (Merck); utilizando como eluyentes, hexano, benceno, eter, acetato de etilo y metanol, en orden creciente de polaridad.

5) Purificación e identificación de las fracciones activas.

La purificación del producto se realizó por sublimación. Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher --- Johns y no están corregidos. Los espectros de I. R., se determinaron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer, modelo 337 ó 21, en película. Los espectros de R.M.N., se determinaron en un espectrofotómetro analítico Varian A-60A y HA-100, en DMSO. Los desplazamientos químicos (δ) están dados en ppm, referidos al tetrametilsilano. Los espectros de masas se determinaron en un espectrómetro Hitachi Perkin-Elmer, modelo RMU-6D.

DESARROLLO

1) Desarrollo del trabajo.

a) Preparación del extracto crudo de la esponja.

Se limpió la esponja para eliminar los organismos que se alojan en los canales y la superficie. Una vez limpia, se procedió a cortarla en pequeños trozos.

Se suspendieron 306.2 g de esponja húmeda con 3.0 l de metanol y se dejó en maceración 72 horas. Se eliminó el disolvente del extracto a sequedad, obteniéndose un residuo pastoso de color café, cuyo peso fue de 29.2 g. Este residuo fue resuspendido en 200 ml de agua y extraído con hexano, cloroformo y acetato de etilo, sucesivamente. A cada uno de los extractos obtenidos se les eliminó el disolvente a sequedad, obteniéndose unos residuos pastosos de color café claro.

b) Pruebas de antibiosis.

Las pruebas de antibiosis se hicieron sobre microorganismos en medio sólido, por medio de sensidiscos.

Para efectuar la prueba se procedió de la siguiente manera:

i) En los discos de papel filtro se concentraron 0.1 ml de cada uno de los extractos, y se dejaron secar a temperatura ambiente.

ii) A cada uno de los discos se le agregaron 5 gotas de cloroformo para evitar su contaminación microbiana. Se dejó evaporar el cloroformo.

iii) En el medio sólido en cajas de petri se sembraron los microorganismos de prueba con un hisopo estéril, por estría cerrada.

iv) Se colocaron los discos, separados de tal manera -- que en caso de haber inhibición, ésta fuera percibida claramente y no se presentara sobreposición de los halos (máximo 4 discos en cajas de 10x2 cm).

v) Se utilizó un testigo el cual llevaba solamente disolvente y cloroformo evaporado.

vi) Las cajas de petri se colocaron en el refrigerador durante 90 minutos, con el fin de retardar el crecimiento bacteriano, mientras la sustancia impregnada en el disco se difundía en el agar.

vii) Posteriormente las cajas petri se ~~metieron~~ a la incubadora a 37° y se observaron los resultados a las 24 horas.

c) Cromatografía del extracto

Los extractos hexánico, clorofórmico y el de acetato de etilo, presentaron actividad antimicrobiana, por lo cual se juntaron. El residuo anterior de 7.059 g se fraccionó en una columna cromatográfica de 2.5 cm de diámetro y 80.0 cm de longitud con 120 g de gel de sílice de 60 a 200 mallas; utilizando como eluyentes hexano, benceno, eter, acetato de etilo y metanol, en orden creciente de polaridad.

d) Fracciones con actividad antimicrobiana.

De las fracciones eluidas con benceno-eter (20:80) se obtuvieron 57.3 mg de sólido con punto de fusión de 180 a 184°, del cual una parte se purificó por sublimación y resultó ser la 2,6-dibromo-4-acetamido-4-hidroxiciclohexadienona (I), identificada por espectroscopía de masas y por comparación de su espectro de I.R. con el reportado por Sharma y Burkholder (1967).

e) Acetilación de la 2,6-dibromo-4-acetamido-4-hidroxiciclohexadienona (I).

Del sólido obtenido con punto de fusión de 180 a 184°, una parte se acetiló con anhídrido acético en piridina. La reacción se dejó a temperatura ambiente durante 24 horas siguiendo su curso por cromatografía en capa fina. Una vez concluida la reacción se purificó lavando con diclorometano y posteriormente con acetona. El filtrado de diclorometano, formó cristales incoloros que funden de 120 a 124° y en contacto con el ambiente se tornan amarillos. El análisis espectroscópico

de estos cristales no se realizó, debido a que la cantidad fué insuficiente.

Del producto de la reacción insoluble en diclorometano - se aisló un sólido con punto de fusión de 182 a 185°, que resultó ser el acetato de la 2,6-dibromo-4-acetamido-4-hidroxici clohexadienona, identificado por comparación de su punto de fu sión y espectro de I.R., con los reportados por Sharma y Burkholder (1967).

RESULTADOS Y DISCUSION

- a) Aislamiento de fracciones con actividad antimicrobiana.

Los ensayos bacteriológicos realizados con los extractos hexánico, clorofórmico y el de acetato de etilo, presentaron actividad antimicrobiana como se muestra en la tabla I.

T A B L A I

Extracto	Diámetro de Inhibición (cm)		
	<u>Corynebacterium</u> sp.	<u>S. typhimurium</u>	<u>S. aureus</u>
Hexánico	2.0	2.0	2.0
Clorofórmico	2.0	2.1	2.1
Acetato de etilo	1.5	2.3	2.1

Se decidió juntar los tres extractos para tener solamente uno y fraccionarlo posteriormente en una columna cromatográfica de los disolventes hexano, benceno, eter, acetato de etilo y metanol; usando proporciones de éstos de tal manera que se fuera incrementando progresivamente la polaridad.

La tabla II muestra la actividad antimicrobiana de algunas de las fracciones obtenidas del extracto metanólico de la esponja marina Aplysina sp. Las demás fracciones que se omitieron, eluidas con hexano, benceno, eter, acetato de etilo y metanol, en orden creciente de polaridad, no presentaron actividad antimicrobiana.

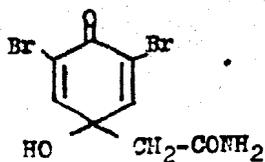
T A B L A I I

Fraccion	Eluyente	<u>S. aureus</u>	<u>K. pneumoniae</u>	<u>S. typhimurium</u>	<u>E. coli</u>	<u>T. mentagrophites</u>
1	benceno	-	-	-	-	-
2	ben/eter 80:20	-	-	-	-	-
3	ben/eter 60:40	2.9	2.1	2.0	2.1	-
4	ben/eter 20:80	1.8	1.5	1.5	1.5	-
5	eter	1.2	0.8	0.6	0.9	-
6	eter/AcOet 60:40	-	-	-	-	-
7	Acetato de etilo	-	-	-	-	-

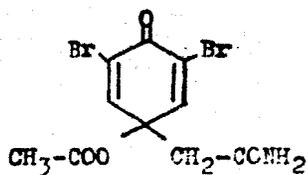
b) Identificación de los compuestos activos por espectroscopia.

La fracción eluida con benceno-eter 20:80, proporcionó un sólido amorfo de color amarillo claro que en contacto con la luz se torna café y tiene un punto de fusión de 180 a 184°. El espectro de I.R. en KBr muestra bandas de absorción importantes a: 3400 cm^{-1} ($2.94\ \mu\text{m}$) característica de la vibración N-H en la amina primaria; 1660 cm^{-1} ($6.07\ \mu\text{m}$) que muestra el alargamiento C-O del carbonilo perteneciente a la dienona y a 1670 cm^{-1} ($6.0\ \mu\text{m}$) el alargamiento C-O de la amida.

El derivado acetilado presentó un punto de fusión de 182 a 184°. El espectro de I.R. en KBr muestra las siguientes bandas importantes: a 3250 cm^{-1} ($2.60\ \mu\text{m}$) la vibración N-H de la amina primaria; a 1660 cm^{-1} ($6.07\ \mu\text{m}$) aparece la vibración C-O de la dienona; a 1680 cm^{-1} ($5.59\ \mu\text{m}$) el alargamiento C-O de la amida y a 1750 cm^{-1} ($5.7\ \mu\text{m}$) se observa la vibración C-O del acetato.



2,6-dibromo-4-acetamido-
4-hidroxiciclohexadienona



Acetato de la 2,6-dibromo-4-ace-
tamido-4-hidroxiciclohexadienona

CONCLUSIONES

1. De la esponja Aplysina sp. colectada en Mazatlán, -- sinaloa y Zihuatanejo, Guerrero se aisló la 2,6-dibromo-4- -- acetamido-4-hidroxiciclohexadienona y se preparó el derivado acetilado.

2. Tanto la dienona como su derivado acetilado presenta ron actividad antimicrobiana in vitro, contra bacterias Gram positivas y Gram negativas.

3. De los otros extractos que también presentaron actividad antimicrobiana, se aislaron pero no identificaron otros compuestos debido a que no se obtuvo una cantidad suficiente de material.

4. La actividad antimicrobiana de la esponja marina --- Aplysina sp., se conserva aún después de dos años de almacena miento en refrigeración. Lo cual no se ha observado en espon jas de otros géneros.

BIBLIOGRAFIA

1. Andersen, R.J. and Faulkner, D.J. (1973) A novel antibiotic from a Sponge of the genus Verongia. Tetrahedron --- Letters No. 14, pp. 1175-1178.
2. Bergquist, P. R., Bedford, J. J. (1978) The incidence of antibacterial activity in marine Demospongiae; sistematic and geographic considerations. Marine Biology Vol. 46, - pp. 215-221.
3. Bert N. La Du and Vincent G. Zannoni (1955) The tyrosine oxidation system of liver II. Oxidation of p-hydroxyphenylpyruvic acid to homogentistic acid. J. of Boil. Chem. - Vol. 217, pp. 777.
4. Borders, D. B., Morton, G. O. and Wetzel, E. R. (1974) -- Structure of a novel bromine compound isolated from a --- sponge. Tetrahedron Letters No. 31, pp. 2709-2712.
5. Burkholder, P. R. (1969) Antimicrobial agents from the -- sea. Lloydia Vol. 32, No. 4, pp. 467-483.
6. Cimino, G., De Stefano, S., Minale, L. and Sodano, G. --- (1975) Metabolism in Porifera-III. Chemical patterns and the classification of the Demospongiae. Comp. Biochem. - Physiol. Vol. 50B, pp. 279-285.
7. Cimino, G., De Stefano, S. and Minale, L. (1975) Ocurrence of 4-hydroxyphenylpyruvic acid oxime in the marine --- sponge Hymeniacidon sanguinea. Experientia Vol. 31, ---- pp. 756-757.
8. Cimino, G., de Rosa, S., De Stefano, S., Self, R. and --- Sodano, G. (1983) The bromocompounds of true sponge ----- Verongia aerophoba. Tetrahedron Letters Vol. 24, No. 29, pp. 3029-3032.
9. Cruz S. Francisco (1984) Sustancias antimicrobianas de la esponja Haliciona sp. Tesis de maestría, Unidad Académica de los ciclos profesional y de posgrado, Colegio de --

Ciencias y Humanidades UNAM 60 p.

10. Chantraine Jean-Marie, Combaut Georges el Teste Jean --- (1973) Phenols bromes d'une algue rouge, Halopytis incurvus: acides carboxyliques, Phytochemistry Vol. 12, pp. 1793.
11. D'Ambrosio, M., Guerreiro, A., Pietro, T. and Pietro, F. (1982) Cavernicolin-1 and cavernicolin-2, two epimeric dibromolactams from the Mediterranean sponge Aplysina -- (Verongia) cavernicola. Tetrahedron Letters Vol. 23, -- No. 42, pp. 4403-4406.
12. Der Marderosian, A. H. (1969) Current status of marine - biomedicalals. Lloydia Vol. 36, No. 4, pp. 439-465.
13. De Rosa, M., Minale, L. and Sodano, G. (1973) Metabolism in Porifera-I. Some studies on the biosynthesis of fatty acids. sterols and bromocompounds by the sponge ---- Verongia aerophoba. Comp. Biochem. Physiol. Vol. 45B, - pp. 883-893.
14. Fattorusso, E., Minale, L. and Sodano, G. (1970) Aeroply sinin-1, a new bromo-compound from Aplysina aerophoba J. Chem, Soc. Chem, Comm. pp. 751-752.
15. Fattorusso, E., Minale, L. and Sodano, G. (1970) Aerothio nin, a tetrabromo-compound from Aplysina aerophoba and - Verongia thiona. J. Chem. Soc. Chem. Comm. pp. 752-753.
16. Fattorusso, E., Minale, L. and Sodano, G. (1972) Aeroply sinin-1, an antibacterial bromo-compound from the sponge Verongia aerophoba. J. Chem. Soc. Perkin I pp. 16-17.
17. Faulker, D. J. (1977) Interesting aspects of marine natural products chemistry. Tetrahedron Vol. 33, pp. 1421-1443.
18. Forenza, S., Minale, L., Riccio, R. and Fattorusso, E. - (1971) New bromo-pyrrole derivatives from the sponge --- Agelas oroides. Chem. Comm. pp. 1129.

19. Fulmor, W., Van Lear, G. E., Morton, G. O. and Mills, -- R. D. (1970) Isolation and absolute configuration of the aeroplysinin-1 enantiomorphic pair from Ianthella ardis. Tetrahedron Letters No. 52, pp. 4551-4552.
20. Gorshkov, B. A., Gorshkova, T. N., Makarieva, T. N. and Stonik, V. A. (1982) Inhibiting effect of cytotoxic ---- bromine-containing compounds from sponges (Aplysinidae) on $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase activity. Toxicon Vol. 20, No. 6. pp. 1092-1094.
21. Green, G. (1977) Antibiosis in marine sponges. FAO Fisheries report Vol. 200, pp. 199-205.
22. Halstead, B. W. (1969) Marine biotoxins: new source of - medicinals. Lloydia Vol. 32, No. 4, pp. 484-488.
23. Hunt, S. and Breuer, S. W. (1971) Isolation of a new naturally occurring halogenated amino acid: monochloromonobromotyrosine. Biochimica et Biophysica Acta Vol. 252, pp. 401.
24. Kanakapura V. Nagaraja and Paul D. Shaw (1982) Inhibition of wheat germ RNA polymerase II by 2,6-dibromobenzoquinone and related compounds from Aplysina fistularis Archives of Biochemistry and Biophysics Vol. 215, No. 2, pp. 544-550.
25. Kazlauskas, R. O., Lidgard, P. T. and Wells, R. J. (1980) Brominated tyrosine derived metabolites from the sponge Ianthella basta. Tetrahedron Letters Vol. 21, pp. 2277-2280.
26. Kelecom, A. and Kannengieser, G. S. (1979) Chemical constituents of Verongia sponges. I-A comparison between -- Brazilian and Mediterranean species. An. Acad. Brasil - Ciênc. Vol. 51, No. 4, pp. 633-637.
27. Kelecom, A. and Kannengieser, G. S. (1979) Chemical constituents of Verongia sponges. II- Structure of two dibrominated compounds isolated from the Mediterranean sponge

- Verongia aerophoba. An. Acad. Brasil Ciénc. Vol. 51, -- No. 4, pp. 639-642.
28. Krejcarek, G. E., White, R. H. (1975) A rearranged dibromotyrosine metabolite from Verongia aurea. Tetrahedron Letters No. 8, pp. 507-510.
29. Makarieva, T. N., Stonik, V. A., Alcolado, P. and Elyakov, Y. B. (1981) Comparative study of the halogenated tyrosine derivatives from Demospongiae (Porifera). Comp. Biochem. Physiol. Vol. 68B, pp. 481-484.
30. Mc. Cutcheon, R. D. (1968) Under consideration pharmacology problems. J. Am. Pharm. Assn. Vol. 8, pp. 237-241.
31. Minale, L. and Sodano, G. (1972) Aeroplysinin-2, a dibromolactone from marine sponges Aplysina (Verongia) aerophoba and Ianthella sp. J. Chem. Soc. Chem, Comm. - pp. 674-675.
32. Minale, L. (1976) Natural product chemistry of the marine sponges. Pure & Appl. Chem. Vol. 48, pp. 7-23.
33. Minale, L. Cimino, G., De Stefano, S. and Sodano, G. --- (1976) Natural products from Porifera. Chem. Org. Natur. Stoffe Vol. 33, pp. 1-72.
34. Moody, K. and Thomson, R. H. (1972) Aerothionin and homo-aerothionin: two tetrabromo spirocyclohexadienylisoxazoles from Verongia sponges. J. Chem. Soc. Perkin I pp. - 18-24.
35. Nigrelli, F. R. and Jakowska, S. (1960) Antimicrobial -- substances from sponges. Annals New York Academy of --- Sciences Vol. 90, pp. 913-916.
36. Reiner, A. M. and Hegeman, G. D. (1971) Metabolism of -- benzoic acid by bacteria. Accumulation of (-)-3,5-cyclohexadien-1,2-diolcarboxylic acid by a mutant strain - of Alcaligenes eutrophus. Biochem. Vol. 10, pp. 2530.
37. Ruggieri, O. G. (1976) Drugs from the sea, Science Vol. 194, pp. 491-497.

38. Saito, I., Yamane, M., Shimazu, H. and Matsuura, T. ---- (1975) Biogenetic type conversion of p-hydroxyphenylpyruvic acid into homogenistic acid. *Tetrahedron Letters* -- No. 9, pp. 641-644.
39. Sharma, G. M. and Burkholder, P. R. (1967) Studies on -- antimicrobial substances of sponges I. *J. of Antibiotics*, Ser. A Vol. 20, No. 4, pp. 200-203.
40. Sharma, G. M. and Burkholder, P. R. (1967) Studies on -- antimicrobial substances of sponges II. Structure and - synthesis of a bromine-containing antibacterial compound from a marine sponge. *Tetrahedron Letters* No. 42, pp. - 4147-4150.
41. Sharma, G. M., Vig, B. and Burkholder, P. R. (1970) Studies on the antimicrobial substances of sponges. IV. --- Structure of a bromine-containing compound from a marine sponge. *J. Org. Chem.* Vol. 35, No. 8, pp. 2823-2826.
42. Sharma, G. M. (1971) Structure of dibromo pakellin, a -- new bromo-containing alkaloid from the marine sponge --- Phakellia flabellata. *Chem. Comm.* pp. 151-152.
43. Sharma, G. M. and Vig, B. (1972) Studies on the antimicrobial substances of sponges VI. Structures of two antibacterial substances isolated from the marine sponge - Dysidea herbacea. *Tetrahedron Letters* No. 17, pp. 1715-1718.
44. Tymiak, A. A. and Rinehart, K. L. Jr. (1981) Biosynthesis of dibromotyrosine-derived antimicrobial compounds - by the marine sponge Aplysina fistularis (Verongia ----- aurea). *J. Am. Chem. Soc.* Vol. 103, No. 22, pp. 6763-6765.
45. Van Lear, G. E., Morton, G. O. and Fulmor, W. (1973) --- New antibacterial bromoindole metabolites from the marine sponge Polyfibrospongia maynardii. *Tetrahedron Lett.* No. 4, pp. 299-300

46. Youngken, H. W. Jr. (1969) The biological potential of - the oceans to provide biomedical materials. *Lloydia* Vol. 32, No. 4, pp. 407-417.