



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGIA
COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES**

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL

Y DE POSGRADO

PROYECTO ACADEMICO

ESPECIALIZACION, MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DEL MAR

**AISLAMIENTO Y ELUCIDACION DE LAS
ESTRUCTURAS MOLECULARES DE METABOLITOS
SECUNDARIOS DE LA ESPONJA MARINA**

**Aplysina sp (Porifera: Aplysinidae) DE PUERTO
ESCONDIDO, OAXACA.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS DEL MAR
(OCEANOGRAFIA BIOLÓGICA Y PESQUERA)**

**P R E S E N T A :
FRANCISCO CRUZ SOSA**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

México, D. F.

1988



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.

CONTENIDO

RESUMEN.....	i
ABSTRACT.....	ii
I. INTRODUCCION.....	1
II. GENERALIDADES.....	6
III. ANTECEDENTES.....	11
IV. AREA DE ESTUDIO.....	26
V. MATERIAL Y METODO.....	28
VI. RESULTADOS Y DISCUSION.....	38
VII. CONCLUSIONES.....	64
VIII. AGRADECIMIENTOS.....	66
IX. LITERATURA CITADA.....	67

RESUMEN

Hay un gran interés mundial por descubrir compuestos químicos con utilidad farmacológica de origen marino, por ejemplo, a las prostaglandinas se les encuentra en los corales blandos en cantidades de hasta el 1.3% de su peso seco o la tetrodotoxina, una de las sustancias no proteicas más tóxicas que se conoce aislada de peces como el "botete". México cuenta con amplios recursos renovables y puede contribuir con sustancias bioactivas marinas. Entre los organismos marinos que proporcionan metabolitos secundarios se encuentran las esponjas pertenecientes al orden Verongida. Estas esponjas, además de producir ácidos grasos, esteroides, aminoácidos, carbonotenoides y derivados de la quinolina, también sintetizan una gran variedad de metabolitos halogenados. Tales productos han sido estudiados desde el punto de vista químico y de su actividad antimicrobiana.

La búsqueda de nuevos metabolitos con propiedades antibacterianas condujeron al estudio de una esponja del Pacífico Mexicano. Los especímenes de *Aplysina* sp colectados en el fondo rocoso de la Bahía de Puerto Escondido, Oaxaca, resultaron contener 11 metabolitos bromados, un esteroide y una mezcla de ácidos grasos. Se obtuvieron dos extractos: uno acuoso y otro orgánico, el extracto metanólico proporcionó cuatro nuevos compuestos bromados cuyas estructuras se elucidaron con base en sus datos espectroscópicos, a los que se nombró *Aplysinólida*, *Aplysinimina* y dos cetales mixtos *Aplysincetal "A"* y *Aplysincetal "B"*.

Además de los cuatro nuevos compuestos bromados, se aislaron de *Aplysina* sp siete metabolitos bromados conocidos que incluyen a la 2,6-dibromo-4-hidroxi-4-metilencarbomoxiciclohexadienona, 2,6-dibromo-4-hidroxi-4-metilencarbomoxiciclohexadienona, *Aeropylsina-1*, *Aeropylsina-2*, 3,5-dibromo-2-hidroxi-4-metoxifenil acetamida, 2,6-dibromo-4-acetamido-4-hidroxiciclohexadienona y el derivado bis-oxalidona. La esponja también contiene al β -sitosterol y a los ésteres metílicos de los ácidos palmítico, esteárico y oleico. La identificación se basó en el análisis espectroscópico y en su comparación con los datos publicados en la literatura correspondiente.

A los extractos acuoso y metanólico, así como a todos los compuestos bromados aislados, se les probó su capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias patógenas (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Shigella sonnei* y *Salmonella typhi*). Los dos extractos: el acuoso y el orgánico y tres de los compuestos aislados presentaron actividad antimicrobiana, estos son la 2,6-dibromo-4-hidroxi-4-metilencarbomoxiciclohexadienona, la *Aeropylsina-1* y la 2,6-dibromo-4-acetamido-4-hidroxiciclohexadienona. Sin embargo, los nuevos compuestos bromados no descritos en la literatura, no tuvieron actividad antimicrobiana sobre las bacterias probadas.

ABSTRACT

There is worldwide concern in discovering chemicals of medical importance from the sea, for example, prostaglandins are found in soft corals in quantities up to 1.3% of the dry weight or tetrodotoxin, one of the most toxic nonprotein substances known isolated from puffer fish. Mexico has a lot of a marine living resources and it can contribute with marine bioactive substances. Among the marine organisms affording secondary metabolites, a special position is occupied by marine sponges belonging to the order Verongida. In fact, such sponges, besides producing unusual fatty acids, sterols, free amino acids, carotenoids and quinoline derivatives, also give a wide variety of halogenated metabolites. Such products have been studied from both the antimicrobial activity and the chemical points of view.

In the course of a research for novel antimicrobial metabolites from a Central Eastern Pacific member of the Verongida, specimens of the demosponge *Aplysina* sp. collected from the rocky bottom at Puerto Escondido Bay, Oaxaca, are resulted to contain 11 brominated metabolites, one sterol and some fatty acids. Two extracts were obtained: aqueous and organic. The methanolic extract of the sponge afforded four novel bromo-compounds, on the basis of the spectral evidence structures were assigned to Aplysinolide, Aplysinimine and two mixed ketals Aplysinketal "A" and Aplysinketal "B".

Besides the four new brominated compounds, seven known brominated metabolites including 2,6-dibromo-4-hydroxy-4-methylenecarbomethoxycyclohexadienone, 2,6-dibromo-4-hydroxy-4-methylenecarboxycyclohexadienone, Aeroplysinine-1, Aeroplysinine-2, 3,5-dibromo-2-hydroxy-4-methoxyphenylacetamide, 2,6-dibromo-4-acetamide-4-hydroxycyclohexadienone and bis-oxazolidone derivative, were isolated from *Aplysina* sp. The sponge is shown to contain as well the known β -sitosterol and the fatty acids methyl esters palmitic, stearic and oleic. The identifications were based on the analysis of spectra and in their comparison with reported spectral data.

Aqueous extract, crude methanolic extract and all bromo-compounds were tested for suppression of bacterial growth (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Shigella sonnei* and *Salmonella typhi*). Antimicrobial activity was found in aqueous and organic extracts and in three pure compounds: 2,6-dibromo-4-hydroxy-4-methylenecarbomethoxycyclohexadienone, Aeroplysinine-1 and 2,6-dibromo-4-acetamide-4-hydroxycyclohexadienone. However, new bromo-compounds were inactive in all test.

INTRODUCCION

México es uno de los países que cuenta con una gran extensión de litorales en los que la amplia diversidad de organismos vivos por investigar es un reto dado el escaso conocimiento de sus recursos bióticos. La costa rocosa de Oaxaca es un campo virgen para la investigación, particularmente sobre esponjas, debido a que no existen estudios sobre los porifera de esta región; el presente trabajo pretende contribuir al estudio de la fauna marina de esta parte del Pacífico Mexicano por medio del estudio de la esponja marina Aplysina (Nardo, 1833) que se colectó en el fondo rocoso de la Bahía de Puerto Escondido en la costa de Oaxaca; esta esponja pertenece a la clase Demospongia, a la familia Aplysinidae (Hyatt, 1877) y a una especie que no se ha descrito en la literatura. Las esponjas del género Aplysina (= Verongia, Bowerbank, 1845) se caracterizan por poseer sustancias biológicamente activas, estos compuestos muestran actividad antimicrobiana, citotóxica y antineoplásica⁽¹⁾.

Aproximadamente diez especies de Aplysina⁽²⁾ han sido motivo de estudio desde hace 20 años y de ellas se han obtenido ácidos grasos, diversos esteroides, sustancias nitrogenadas, carotenoides, algunos aminoácidos y una serie de compuestos halogenados no descritos en la literatura hasta antes del año de 1967, año en el que empezaron a aparecer trabajos acerca de este tipo de compuestos⁽³⁾; en la actualidad las expectativas siguen siendo interesantes debido a que se han determinado un buen número de sustancias nuevas que potencialmente pueden funcionar como fármacos.

Un rasgo significativo de todos los organismos es que no sólo las características básicas de producción de energía son muy similares sino que los constituyentes fundamentales como son proteínas, aminoácidos, azúcares, grasas, purinas y pirimidinas son también los mismos y además sus rutas de biosíntesis tienen una muy cercana semejanza de organismo a organismo. Metabolitos como estos que ocurren y tienen un comportamiento muy similar en todas las formas

de materia viva, se les conoce como metabolitos primarios. En comparación con los intermediarios ubicuos del metabolismo primario, un número mucho más grande de sustancias naturales como son los alcaloides, terpenos y fenoles entre otros más, ocurren esporádicamente en la naturaleza, sin embargo, estas sustancias parece que no tienen un papel explícito en el organismo que las produce. Las sustancias que caen en esta segunda categoría debido a su papel aparentemente secundario, se les conoce como metabolitos secundarios y ellos expresan la individualidad de las especies en términos químicos⁽⁴⁾.

El estudio de las sustancias que se encuentran en los organismos marinos no solo ha enriquecido a la química orgánica al aportar compuestos con estructuras poco comunes y novedosas sino que ha contribuido al desarrollo de otras áreas científicas. En este sentido la farmacología marina, la ecología química marina, la taxonomía química y recientemente la biotecnología marina, históricamente se han desarrollado a partir del descubrimiento de nuevos compuestos químicos de origen marino, así como de estudios relacionados con la salud, como los que incluyen a las toxinas producidas por animales marinos⁽⁵⁾.

El interés del presente trabajo es encontrar nuevos compuestos químicos de origen marino con actividad antimicrobiana. El aislamiento de los constituyentes químicos de la esponja *Aplysina* sp por medio de disolventes polares y la liofilización de los residuos de los extractos, permite la purificación por cromatografía de los metabolitos secundarios de la esponja, de los cuales, en esta etapa es posible obtener espectros con técnicas analíticas que permiten la elucidación de sus estructuras moleculares. La búsqueda de sustancias antimicrobianas provenientes del mar puede proporcionar elementos que coadyuven al tratamiento de padecimientos, que son malignos para el organismo humano.

De esta manera el aislamiento de nuevos metabolitos secundarios de una esponja, incrementa la cantidad de información química disponible concerniente a los compuestos químicos de origen marino.

que se puede utilizar para esclarecer preguntas que caen dentro de otros ámbitos del conocimiento, como es la Biología. Asimismo como un aporte al potencial de las sustancias antimicrobianas provenientes del mar, susceptibles de utilizarse como medicamentos tal como son o modificados químicamente.

La tesis consta de siete capítulos y pretende informar al lector interesado en el tema, tanto al especialista como al no iniciado en la química de los compuestos de esponjas marinas, acerca del desarrollo, aplicación y futuro de esta rama de la ciencia, en la que han estado trabajando durante varios años un gran número de investigadores, de los cuales, desgraciadamente pocos son mexicanos.

El capítulo 1 constituye una introducción al trabajo de investigación realizado, indicando el porque del estudio y la importancia que tiene para otras áreas afines. Además se menciona la importancia de las técnicas analíticas que han hecho posible la identificación de las estructuras de las moléculas nuevas o confirmar las ya establecidas, estas son: espectroscopías en el ultravioleta y en el infrarrojo, espectrometría de masas, resonancia magnética nuclear y más recientemente la cristalografía de rayos X, con la cual es posible obtener imágenes tridimensionales de una molécula. También incluye la conveniencia de realizar pruebas de antibiología con los metabolitos y los extractos de la esponja con el fin de evaluar la actividad antimicrobiana de los mismos.

En el capítulo 2 se discute la importancia que ha adquirido el aislamiento y la elucidación estructural de los compuestos químicos como una base para otros estudios sobre esponjas como son los de toxicidad, actividad antimicrobiana y de efectos ecológicos.

En el capítulo 3 se presentan los antecedentes de la química de las esponjas del género Aplysina (=Verongia) desde el descubrimiento de los primeros compuesto bromados, hasta los más recientes.

Otro tipo de metabolitos que se han aislado se presentan en este mismo capítulo, estos comprenden a los esteroides, a los carotenoides y a los derivados nitrogenados.

En el capítulo 4 se describe el área de estudio, se justifica la elección del sitio de colecta y lo que se considera de importancia para ubicar la localidad de muestreo.

En el capítulo 5 se analiza la metodología y el material biológico utilizado para el aislamiento y la purificación de los metabolitos secundarios de la esponja. Se describen los instrumentos empleados en la obtención de los datos espectroscópicos. La técnica del ultravioleta indica si las sustancias contienen grupos o porciones llamados cromóforos; en la zona del infrarrojo se obtienen espectros que dan información estructural más detallada como son los grupos funcionales que contiene la molécula; la espectrometría de masas permite la determinación no solo del peso molecular sino de la composición y distribución de porciones estructurales; la resonancia magnética nuclear es una técnica espectroscópica que ha revolucionado a la química ya que permite establecer detalles estructurales muy finos, como son por ejemplo, el tipo de protones que contiene la molécula y la cristalografía de rayos X que es una técnica auxiliada por la computación con la que se obtienen datos de difracción, solución de estructuras y presentación de resultados que permiten determinar casi cualquier estructura cristalina. Por otra parte se describe como se realizaron las pruebas de antibiología y el porque se seleccionaron las cepas de microorganismos de prueba utilizadas.

En el capítulo 6 se discuten los resultados y su significado. Al principio se presentan los argumentos de el porque se dejó como Aplysina sp. En seguida se explican las acciones que se llevaron a cabo para resolver los problemas que presentó el agua salada que contenía la esponja durante los procesos de extracción y de purificación de los constituyentes químicos. En este capítulo de la tesis se interpretan las señales de los espectros de las téc-

nicas analíticas utilizadas para la elucidación de las estructuras moleculares de los metabolitos secundarios aislados de la esponja, tanto de los nuevos como de los conocidos. Se discute el origen de los compuestos bromados en las esponjas del género Aplysina (= Verongia) tomando en cuenta los precursores propuestos por varios autores y los compuestos aislados en este trabajo. Al final del capítulo se presentan los resultados de las pruebas de antibiósisis, por medio de las cuales se identificaron las sustancias con actividad antibacteriana que contenía la esponja.

Finalmente en el capítulo 7 se presentan las conclusiones, que tratan del estado en que se dejó el trabajo de investigación, después de confrontar los resultados con los antecedentes en la discusión.

GENERALIDADES

Las esponjas evolutivamente representan a los primeros metazoarios que al parecer no dieron origen a otro grupo de seres vivos, comprendiendo aproximadamente 5000 especies descritas^{6}. Estos organismos sésiles habitan principalmente sobre sustratos duros en aguas someras, teniendo mayor diversidad y abundancia en los arrecifes coralinos. A semejanza de otros organismos marinos sedentarios las esponjas han desarrollado adaptaciones químicas y físicas que les han permitido sobrevivir en el medio marino a través del tiempo^{7}.

De diferentes especies de esponjas se ha aislado, purificado y caracterizado la estructura molecular de diferentes metabolitos secundarios^{8} y aunque parte de estos presentan algún tipo de actividad biológica poco se conoce acerca del papel ecológico de estos compuestos.

Toxicidad en Esponjas

La toxicidad en las esponjas marinas varía con la latitud. En el hemisferio norte los resultados de una investigación indican que la toxicidad en las esponjas se incrementa cuando la latitud disminuye y que la mayoría de las esponjas tóxicas están expuestas a la interacción con los peces^{9}.

Algunos estudios de laboratorio han mostrado la toxicidad de ciertos metabolitos aislados de esponjas. Tal es el caso de la halitoxina (I) extraída de tres diferentes especies de Haliclona^{10}; del sesquiterpeno 9-isocianopukeanano (II), aislado de Hymenacion sp que es letal a ciertos peces^{11} y de la isodysidenina (III), un metabolito hexaclorado producido por Dysidea herbacea que es tóxico al pez de agua dulce Lobistes reticulatus^{12}

Algunos metabolitos de esponjas han mostrado ser tóxicos a otras formas de vida marina. De la esponja Spongia idia se aislaron

varios sesterterpenos (IV) que son tóxicos a la estrella de mar Pisaster giganteus en una concentración de 5 mg/ml y al crustáceo Artemia sp a 10 mg/ml; además estos compuestos inmovilizan a las larvas del molusco Haliotis rufescens a una concentración de 1 mg/ml en agua de mar⁽¹³⁾. Los nakafuranos-8 y 9 (V), dos furanosesquiterpenos aislados de Dysidea fragilis muestran ser sustancias que evitan la depredación por parte de peces arrecifales del género Chaetodon⁽¹⁴⁾.

Algunas esponjas, a pesar de que contienen sustancias tóxicas son consumidas por moluscos específicos. Se ha mostrado que el nudibranquio Phyllidia varicosa acumula toxinas adquiridas a través de su dieta, esto es, al depredar a la esponja Hymenacidion sp incorpora en su cuerpo sustancias que contiene la esponja y posteriormente lo concentra en el mucus que rodea a su cuerpo, esta secreción le sirve al molusco a manera de defensa, ya que es letal para ciertos peces y crustáceos⁽¹⁵⁾.

Actividad Antimicrobiana en Esponjas

Algunos extractos de esponjas que viven en aguas tropicales y templadas han mostrado poseer actividad antimicrobiana⁽¹⁶⁾. Recientemente del phylum Porifera se ha informado el aislamiento de nuevos compuestos antimicrobianos, estos incluyen diferentes tipos de estructuras moleculares, tales como terpenoides: la puupehenona (VI)⁽¹⁷⁾, la acanthellina (VII)⁽¹⁸⁾, la manoalida (VIII)⁽¹⁹⁾ y los siphonodictyales A y B (IX)⁽²⁰⁾; polifenoles (X)⁽²¹⁾; derivados de lípidos como la plakortina (XI)⁽²²⁾ y peróxidos relacionados (XII)⁽²³⁾; derivados de la isouquinolina como la renierona (XIII)⁽²⁴⁾; derivados de la guanidina como las acarnidinas (XIV)⁽²⁵⁾; derivados de la triptamina como la 5,6-dibromo-N,N-dimetiltriptamina (XV)⁽²⁶⁾ y derivados bromados de la tirosina como la 2,6-dibromo-4-acetamido-4-hidroxyciclohexadienona (XVI)⁽²⁷⁾.

Todavía no se conoce con certeza la función ecológica de los metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana en las esponjas. Se han propuesto dos hipótesis: la primera considera que las sustancias antimicrobianas les pueden servir a las esponjas para inactivar a sus presas microbianas para después ingerirlas como alimento^{28} y la segunda las considera como un mecanismo defensivo, al inhibir el crecimiento de las bacterias que pudieran causar daño al estar dentro de la esponja^{29}.

Actividad Antiepiplática en Esponjas

Los invertebrados marinos sésiles poseen mecanismos de resistencia contra el asentamiento epibéntico, esto sucede en algunas especies de algas^{30}, de esponjas^{31}, de gorgonidos^{32}, de briozoarios^{33} y de tunicados^{34}. Aunque no se conoce con precisión como funciona este mecanismo, se ha sugerido que los metabolitos secundarios que liberan estos organismos al medio son los causantes directos de que puedan mantener su superficie externa parcial o totalmente libre de otros invertebrados marinos.

Desarrollo de Esponjas en Sustratos Ocupados

En los arrecifes coralinos la competencia por espacio es muy intensa y algunos organismos pueden prevenir el crecimiento de sus vecinos, probablemente a través del uso de metabolitos; tal es el caso de la esponja Siphonodictyum coralliphagum que crece rodeada por corales pétreos vivos manteniendo a su alrededor una zona de 5 a 10 mm de coral muerto. La esponja esta cubierta por una mucosidad de la que se aislaron dos compuestos antimicrobianos: los siphonodictyales A y B (IX); no se determinó si estos compuestos eran los responsables de la inhibición en el crecimiento de los pólipos del coral^{20}. El mecanismo probable puede ser a través de la secreción de compuestos químicos que afecten de un modo dañino al organismo vecino, permitiendo a la esponja crecer en alguna fracción del sustrato, aunque este no éste disponible^{35}.

Las fórmulas de los metabolitos secundarios mencionados anteriormente (I a XV), se incluyen en la Tabla 1.

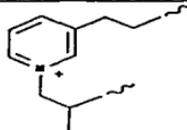
Asociaciones en Esponjas

Debido a su morfología y a su modo de alimentación, las esponjas proporcionan un hábitat temporal o permanente a macro y microorganismos, ya sea dentro de su cuerpo o sobre su superficie. Se ha observado que algunas esponjas presentan asociaciones con diferentes tipos de microorganismos, principalmente con bacterias y algas unicelulares⁽³⁶⁾. Un posible origen de las sustancias antimicrobianas aisladas de esponjas puede ser el que su síntesis sea efectuada por los abundantes microorganismos que viven dentro de la esponja y no por ella misma. No se ha detectado a los compuestos antimicrobianos en cultivos de bacterias aisladas de esponjas con actividad antibacteriana, a pesar de esto, no se puede afirmar que las bacterias o algas que viven dentro de los tejidos de las esponjas no estén involucradas en la biosíntesis de los metabolitos antimicrobianos, debido a que las condiciones de crecimiento no son las mismas⁽³⁷⁾.

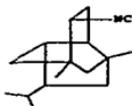
Esponjas en Farmacología Marina

Actualmente la búsqueda de compuestos químicos que puedan utilizarse como antibióticos viene prioridad debido a la aparición de cepas bacterianas patógenas resistentes a los antibióticos comerciales. Las investigaciones realizadas con los extractos y los metabolitos purificados de algunas esponjas han mostrado la presencia de sustancias poco comunes que pueden ser útiles como agentes antimicrobianos, al ser probados sobre bacterias y hongos; sin embargo hasta el presente, las esponjas no han proporcionado sustancias que potencialmente puedan funcionar como antibióticos. Además de las propiedades antimicrobianas, en las esponjas se ha detectado otras actividades farmacológicas, entre otras: antiviral, antitumoral, hipoténsica, citotóxica y factores de agregación⁽³⁸⁾.

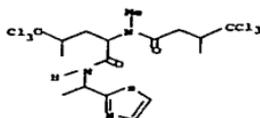
Tabla 1. Metabolitos Secundarios Bioactivos de Esponjas Marinas



(I) Halitoxina



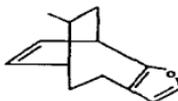
(II) 9-isocianopupukeanano



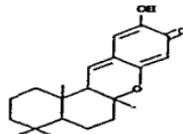
(III) Isodyaidenina



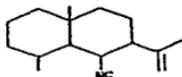
(IV) Furoepinulosina



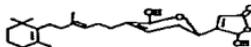
(V) Makafurano-8



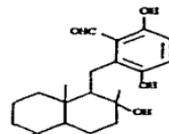
(VI) Pupukeanona



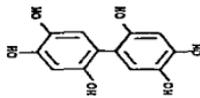
(VII) Acanthellina-1



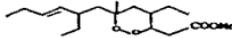
(VIII) Manoalida



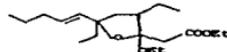
(IX) Siphonodictyal-A



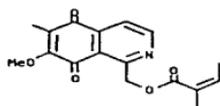
(X) 2,2',4,4',5,5'-hexahidroxi-bifenil



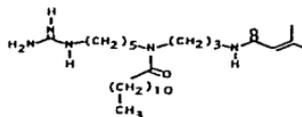
(XI) Plakortina



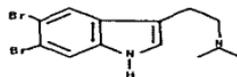
(XII) Derivado Catal



(XIII) Beniferona



(XIV) Acarnidina



(XV) 5,6-dibromo-N,N-dimetiltriptamina

ANTECEDENTES

Estudios recientes hechos con los compuestos químicos provenientes de plantas y animales marinos, basados en métodos de purificación por cromatografía y en combinación con técnicas espectroscópicas modernas han permitido aislar, identificar y establecer la estructura de nuevas sustancias con y sin actividad biológica.

La mayoría de los compuestos bromados encontrados en esponjas, han sido aislados de esponjas pertenecientes al género Aplysina ⁽³⁹⁾ y en menor cantidad de otros géneros ^{(40), (41)}. Algunas de estas sustancias bromadas poseen actividad antimicrobiana in vitro, pues inhiben el crecimiento de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, así como de hongos.

Los primeros compuestos bromados relacionados con la 3,5-dibromo tirosina fueron aislados cuando se investigaba la actividad antimicrobiana de los extractos metanólicos de las esponjas del Caribe Verongia fistularis y V. cauliformis. A dichos compuestos se les asignaron las estructuras (XVI) y (XVII) ⁽⁴²⁾.

Un compuesto análogo (XVIII) a las sustancias XVI y XVII fué aislado del extracto etanólico de una especie no descrita de Verongia. El etoximetoxicetal (XVIII) resultó ser una mezcla de diastereoisómeros, lo que sugirió que el cetal mixto pueda no provenir como tal de la esponja y condujo a los investigadores a proponer que los compuestos XVI, XVII y XVIII pueden derivarse de un precursor común ⁽⁴³⁾.

La aeroplysinina-1 (XIX) es otro compuesto bromado con actividad antibacteriana que fué extraído de la esponja Verongia (Aplysina) aerophoba que es común en el Mediterráneo, se aisló por primera vez como un isómero dextrorrotatorio ⁽⁴⁴⁾; anteriormente se había aislado la forma levorrotatoria de la aeroplysinina-1 (XIX) de la esponja Ianthella ardis ⁽⁴⁵⁾. Posteriormente mediante la difracción por rayos X se confirmó su configuración absoluta ⁽⁴⁶⁾. De la misma

esponja Verongia (Aplysina) aerophoba se aisló un segundo compuesto bromado: la aeroplysinina-2 (XX), esta dibromolactona se obtuvo en sus formas dextrógira y levógira, así como también su mezcla racémica^{47}.

Un reestudio de la esponja Verongia (Aplysina) aerophoba, así como de Verongia thiona colectada en La Jolla, Cal., proporcionó dos nuevos compuestos bromados con una estructura más compleja que las anteriormente descritas: la acrothionina (XXI) y la homoaerothionina (XXII), ambas sustancias muestran actividad óptica, son dextrorrotatorias. El componente tetrabromado que se encontró en mayor proporción fue la arothionina (XXI) y en menor cantidad la homoaerothionina (XXII)^{{48}, {49}}.

De un estudio realizado sobre la búsqueda de nuevos compuestos con actividad biológica de origen marino, se aisló la sustancia cristalina (XXIII) de la esponja Verongia lacunosa colectada en los litorales de Puerto Rico. Este compuesto tiene una estructura relacionada con los compuestos bromados con actividad antimicrobiana que se han aislado de esponjas de este mismo género, el metabolito XXIII desarrolló un débil halo de inhibición en las pruebas de antibiología, siendo este el primer compuesto bromado aislado de una Aplysina que contiene en su molécula a dos anillos de oxazolidona^{50}.

Al metabolito secundario con actividad antimicrobiana que se aisló de la esponja Verongia aurea colectada en las costas de Baja California, se le asignó la estructura (XXIV) que corresponde al 2,6-dibromo-4-hidroxi-3-acetamidofenol identificado con base en sus datos espectroscópicos^{51}. De los extractos de la esponja de las Islas Vírgenes Verongia archeri se aisló el compuesto (XXV), parecido al anterior XXIV junto con XIX y XX; lo que sugiere debido a sus estructuras similares, un origen común para estas sustancias^{52}.

Una serie de sustancias bioactivas se aislaron de la esponja Verongia aurea en 1977. Los compuestos con actividad bactericida son la 2,6-dibromoquinona (XXVI), la 2,6-dibromohidroquinona (XXVII) y el 2,6-dibromo-4-metoxifenol (XXVIII). Los fungicidas son el 2,6-dibromo-4-acetonitrilofenol (XXIX), el 3,5-dibromo-4-metoxifenacetoneitrilo (XXX) y el 2-bromo-4-acetonitrilofenol (XXXI) ^{53}.

Un nuevo compuesto dibromado con actividad adrenérgica se aisló de la esponja Verongia fistularis, su estructura (XXXII) se confirmó por medio de su síntesis a partir de la tiramina. Tanto por su fórmula molecular como por su actividad biológica se le puede considerar como un híbrido farmacológico de la epinefrina y de la acetilcolina ^{54}.

Los especímenes de Aplysina fistularis forma fulva colectados en las Islas Vírgenes proporcionaron tres metabolitos de alto peso molecular relacionados con la dibromotirosina. Los resultados del estudio químico mostraron que la fistularina-1 (XXXIII), la fistularina-2 (XXXIV) y la fistularina-3 (XXXV) se pueden considerar como combinaciones de la aerotionina (XXI) y del derivado bis-oxazolidona (XXIII). Los compuestos XXXIII y XXXV presentaron actividad citotóxica ^{55}.

En un estudio comparativo entre dos especies diferentes de Verongia de las costas de Brasil y del Mar Mediterráneo, se encontró que los especímenes del Atlántico Sur no sintetizan metabolitos bromados a diferencia de las esponjas colectadas en la Bahía de Nápoles que sí contienen compuestos bromados derivados de la tirosina. Los resultados mostraron que la esponja Verongia aerophoba de Nápoles produjo dos nuevos compuestos bromados que corresponden a las estructuras (XXXVI) y (XXXVII), determinadas por correlaciones químicas y datos espectroscópicos ^{56}.

Dos especies de esponjas del género Verongia se encuentran ampliamente distribuidas a lo largo de las costas italianas: Verongia aerophoba (= Aplysina aerophoba Schmidt, 1862) y Verongia cavernicola Vacelet, 1959 (= Aplysina cavernicola) de las que se han obtenido metabolitos halogenados interesantes. En la Bahía de Nápoles se colectó Aplysina (= Verongia) cavernicola de la que se aislaron en un principio dos dibromolactamas epiméricas: la cavernicolina-1 y la cavernicolina-2 (XXXVIII)⁽⁵⁷⁾. De Verongia aerophoba se informó que contiene tres nuevos compuestos bromados junto con otros metabolitos previamente aislados de Verongia cavernicola: la isofistularina-3 (XXXIX), la aerophobina-1 (XL) y la aerophobina-2 (XLI). La isofistularina-3 (XXXIX) es un isómero de la fistularina-3 (XXXV) y presenta actividad citotóxica sobre cultivos de células cancerígenas⁽⁵⁸⁾.

Un estudio más a fondo de la Aplysina (= Verongia) cavernicola mostró que contiene compuestos clorados y bromados o con ambos halógenos, todos ellos con actividad antimicrobiana. El dicloroverongiaquinol o 2,6-dibromo-4-acetamido-4-hidroxiciclohexa-2,5-dienona (XLII) fue el primer compuesto orgánico que contiene cloro en ser aislado de todas las especies que se han estudiado de Aplysina y por lo tanto el primer compuesto clorado derivado de la tirosina⁽⁵⁹⁾. El (+) 3-bromo-5-cloroverongiaquinol (XLIII), la 7B y 7a-bromo-5-clorocavernicolina (XLIV) y la 5-bromo-7B y 7a-clorocavernicolina (XLV) son los compuestos que contienen al cloro y al bromo a la vez; el 3-bromoverongiaquinol (XLVI) y la 5-bromo-cavernicolina (XLVII), son las sustancias bromadas y la 5-cloro-cavernicolina (XLVIII), es el compuesto monoclorado⁽⁶⁰⁾,⁽⁶¹⁾.

En el Instituto de Química de la UNAM se realizó el estudio químico de una especie no descrita de Aplysina colectada en la Bahía de Zihuatanejo, Gro., en 1982. De esta esponja se aisló la 2,6-dibromo-4-acetamido-4-hidroxiciclohexadienona ((XVI) que se identificó con base en sus datos espectroscópicos informados. La dienona XVI presentó actividad antimicrobiana in vitro sobre bacterias Gram-positivas y Gram-negativas⁽⁶²⁾.

Un nuevo compuesto con escasa actividad antimicrobiana, la 7-bromo cavernicolenona (XLIX) se aisló recientemente de la esponja del Mediterráneo Aplysina (Verongia) cavernicola, su estructura se estableció con base en su análisis por rayos X y de resonancia magnética nuclear y en la observación de que su acetilación produce dos monoacetatos ^{6³}.

En la Tabla 2 se presenta una serie de cuadros con los compuestos bromados (XVI a XLIX) que se han aislado e identificado de esponjas del género Aplysina (= Verongia), descritos en la literatura desde 1967 hasta 1986. En esta revisión bibliográfica se proporcionan las estructuras químicas y algunas características propias de dichas sustancias.

Además de los compuestos halogenados derivados de la tirosina, de las esponjas del género Aplysina se han extraído otros tipos de compuestos químicos que incluyen a los esteroides: Tabla 3, fórmulas L a LVII; a los carotenoides: Tabla 4, fórmulas LVIII a LXIX; y a los derivados nitrogenados: Tabla 5, fórmulas LXVII a LXIX.

Esteroides de Esponjas del Género Aplysina

De la familia Aplysinidae se han extraído esteroides que se pueden considerar como derivados del colesterol, la diferencia radica en que la cadena lateral tiene nuevos tipos de alquilación. El 8-sitosterol (L) fue el primero de una serie de esteroides aislados de esponjas del género Aplysina, se obtuvo por primera vez de la esponja del Caribe Verongia fistularis ^{4²}.

De la esponja Aplysina (= Verongia) aerophoba se obtuvieron dos nuevos esteroides: el aplysterol (LI) y el 24,28-didehidroaplysterol (LII) que se caracterizan por incluir alquilaciones adicionales en los carbonos 24 y 26, lo que parece indicar que sucedió una bioalquilación en la cadena lateral del colesterol ^{6⁴}.

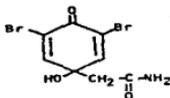
De la esponja del Caribe Verongia cauliformis se aislaron otros esteroides con la cadena lateral extendida: el verongulasterol (LIII) y el 25,26-dehidroaplysterol (LIV)^{65}. Más tarde, de la misma especie de Verongia se caracterizaron otros esteroides, los que incluyen al 24 (R+S)-isopropenilcolesterol (LV), al 24 (R+S)-metilcolesta-5,25-dien-3 β -ol (LVI) y al 24 (R+S)-metilcolesta-7,25-dien-3 β -ol (LVII)^{66}

Carotenoides de Esponjas del Género Aplysina

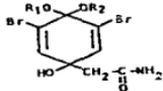
La esponja Verongia aerophoba del Mar Adriático proporcionó una serie de carotenoides, los que incluyen al β -caroteno (LVIII), al γ -caroteno (LIX), la isozeaxantina (LX), la violoxantina (LXI), la neoxantina (LXII), la astaxantina (LXIII), el astaceno (LXIV), la zeaxantina (LXV) y la luteína (LXVI)^{67}

Derivados Nitrogenados de Esponjas del Género Aplysina

Tres derivados nitrogenados han sido caracterizados de esponjas del género Aplysina. De la fracción soluble en agua del concentrado metanólico de la esponja Aplysina (= Verongia) aerophoba se aisló al ácido 3,4-dihidroxiquinolina-2-carboxílico (LXVII)^{68}. La N,N-dimetilhistamina (LXVIII) es un compuesto con actividad cardiotónica, que se obtuvo de Verongia fistularis^{69} y aplysinopina (LXIX), un antineoplásico aislado de Verongia spengelii^{70}.

Tabla 2. Compuestos Bromados de especies de *Aplysina* (=Verongia)

(XVI) 4,6-dibromo-4-acetamido-4-hidroxyciclohexadienona
 Esponja: *Verongia fistularis*, *V. cauliformis*
 F. Mol.: $C_8H_7NO_3Br_2$ P.M.: 327 p. f. = 193-195°C
 Actividad Biológica: Antimicrobiano
 Referencia: (27), (28)



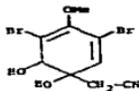
XVII = R₁, R₂ = Me

XVIII = R₁ = Me

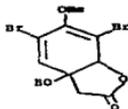
= R₂ = Et

(XVII) 3,5-dibromo-1-acetamido-1-hidroxyciclohexadienona
 Esponja: *Verongia fistularis* F. Mol.: $C_{10}H_{13}NO_4Br_2$ P.M.: 373
 Actividad Biológica: Antimicrobiano p. f. = 191°C
 Referencia: (28)

(XVIII) 3,5-dibromo-1-acetamido-1-hidroxyciclohexadienona
 Esponja: *Verongia* sp F. Mol.: $C_{12}H_{17}NO_4Br_2$ P.M.: 352
 Actividad Biológica: Antimicrobiano
 Referencia: (28)

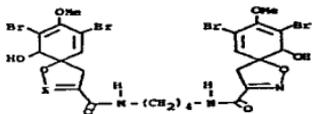


(XIX) Aeropylsinina-1
 Esponja: *Verongia aerophoba*
 F. Emp.: $C_9H_9NO_3Br_2$ F. M.: 337 p. f. = 120-122°C
 Rotación Óptica: + 186° (MeOH)
 Actividad Biológica: Antimicrobiano
 Referencia: (28)



(XX) Aeropylsinina-2
 Esponja: *Aplysina* (*Verongia*) *aerophoba*
 F. Emp.: $C_{12}H_9O_4Br_2$ P. M.: 338 p. f.: 127-128° (±)
 Rotación Óptica: + 22° (c 3, MeOH) 106-108° (+)
 Referencia: (27)

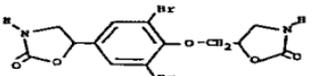
Tabla 2. continuación



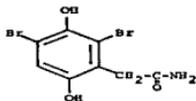
(XXI) Aerothericinas
 Esponja: Allylsina (Verongia) aerophoba, V. thiona
 F. Esp.: $C_{24}H_{26}N_4O_8Br_2$ P. M.: 814 p. f.: 134-137*
 Rotación Óptica: + 252° (Acetona)
 Referencia: (1*)



(XXII) Homoaerothericinas
 Esponja: Allylsina (Verongia) aerophoba, V. thiona
 F. Esp.: $C_{25}H_{28}N_4O_8Br_2$ P. M.: 828 p. f.: ---
 Referencia: (1*)

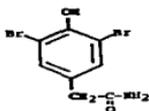


(XXIII) Derivado bis-oxazolidona
 Esponja: Verongia lacunosa
 F. Esp.: $C_{13}H_{12}N_2O_5Br_2$ P. M.: 434 p. f.: 222-229
 Rotación Óptica: + 8.9° (c, 0.876 NaOH)
 Actividad Biológica: leve antimicrobiano
 Referencia: (1*)



(XXIV) 2,6-dibromo-4-hidroxi-3-acetamidofenol
 Esponja: Verongia aurea
 F. Esp.: $C_8H_7NO_3Br_2$ P. M.: 325 p. f.: 170-172*
 Actividad Biológica: Antimicrobiano (dec)
 Referencia: (1*)

Tabla 2. continuación



(XXV) 2,6-dibromo-4-acetamidofenol

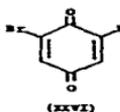
Especie: Varonia archeri

F. Emp.: $C_9H_7NO_2Br_2$ P. M.: 307

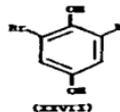
p. f. = 190-191°

Actividad Biológica: Antimicrobiano

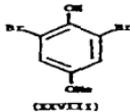
Referencia: (52)



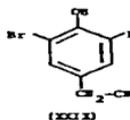
(XXVI)



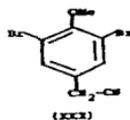
(XXVII)



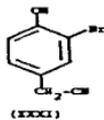
(XXVIII)



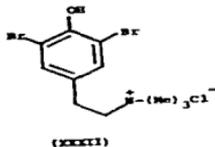
(XXIX)



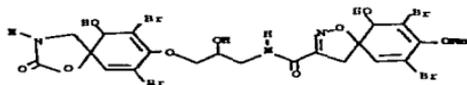
(XXX)



(XXXI)



(XXXII)



(XXXIII) Fistularina-1

Especie: Aplysina fistularis forma fulva

F. Emp.: $C_{22}H_{21}N_3O_4Br_4$

P. M.: 771

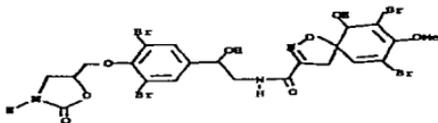
p. f.: ----

Rotación Óptica: +92.5 (l.2, MeOH)

Actividad Biológica: Citotóxico

Referencia: (55)

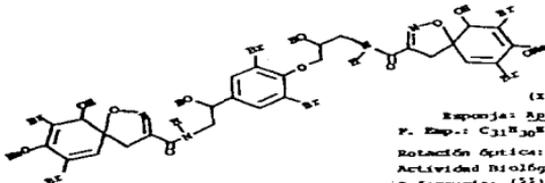
Tabla 2. continuación



(XXXIV) Fistularina-2

Esponja: *Aplysina fistularis* forma fulvaF. Exp.: $C_{21}H_{20}N_2O_4Br_4$ P. M.: 758 p. f. ---

Referencia: [55]



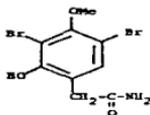
(XXXV) Fistularina-3

Esponja: *Aplysina fistularis* forma fulvaF. Exp.: $C_{31}H_{30}N_2O_{11}Br_6$ P. M.: 1108 p. f. ---

Rotación Óptica: +104.2° (1.67, MeOH)

Actividad Biológica: Citotóxica

Referencia: [55]

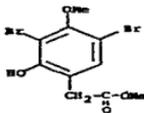


(XXXVI) 3,5-dibromo-2-hidroxi-4-metoxifenilacetamida

Esponja: *Verongia serripoda*F. Exp.: $C_{12}H_{10}O_3Br_2$ P. M.: 337 p. f. = 164-167°

Rotación Óptica: 0.0° (c= 4.66, MeOH) 174-176°

Referencia: [54]

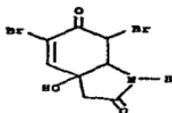


(XXXVII) 3,5-dibromo-2-hidroxi-4-metoxifenilacetato de metilo

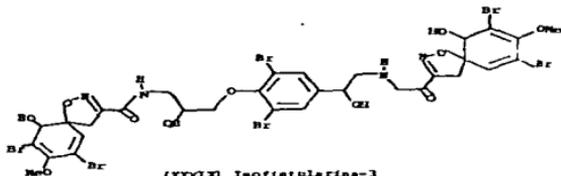
Esponja: *Verongia serripoda*F. Exp.: $C_{10}H_{10}O_4Br_2$ P. M.: 352 p. f. = 68-70°Rotación Óptica: 0.0° (c= 3.94, CHCl₃)

Referencia: [54]

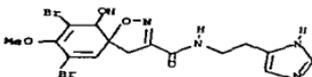
Tabla 2. continuación



(XXVII) Cavernicolina-1 y 2
 Esponja: Splysium (Verongia) cavernicola
 F. Esp.: $C_{28}H_{30}O_3Br_2$ P. M.: 327 p. f.: ---
 Rotación Óptica: 0.0°
 Referencia: (37)

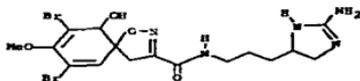


(XXXIX) Isostictularina-3
 Esponja: Verongia serophoba
 F. Esp.: $C_{31}H_{30}O_{11}Br_6$ P. M.: 792 p. f.: ---
 Rotación Óptica: $+108^\circ$ (2.75, MeOH)
 Actividad Biológica: Citotóxico
 Referencia: (31)



(XL) Serophobina-1
 Esponja: Verongia serophoba
 F. Esp.: $C_{15}H_{16}N_4O_4Br_2$ P. M.: 474 p. f.: ---
 Rotación Óptica: $+187^\circ$ (2.0, MeOH)
 Referencia: (38)

Tabla 2. continuación



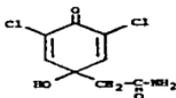
(XLI) Aerophobina-2

Esponja: Verongia aerophobaF. Exp.: $C_{16}H_{13}N_2O_4Br_2$ P. M.: 503

p. f. = ---

Rotación Óptica: $+139^\circ$ (L.9, MeOH)

Referencia: (51)



(XLII) Dichloroverongiaquinol

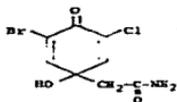
Esponja: Aplysina (Verongia) cavernicolaF. Exp.: $C_{16}H_{10}Cl_2$

P. M.: 237

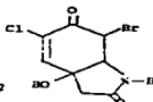
p. f. = 162-163°

Actividad Biológica: Antimicrobiano

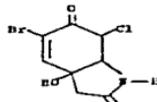
Referencia: (52)



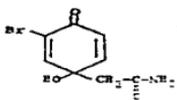
(XLIII)



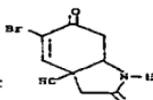
(XLIV)



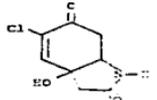
(XLV)



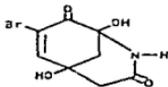
(XLVI)



(XLVII)



(XLVIII)



(XLIX) 7-bromocavernicolona

Esponja: Aplysina (Verongia) cavernicolaF. Mol.: $C_{17}H_{12}NO_3Br$

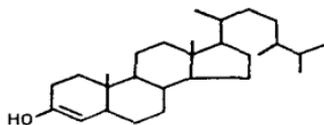
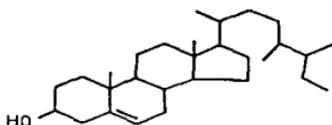
P. M.: 246

p. f. = 165°C

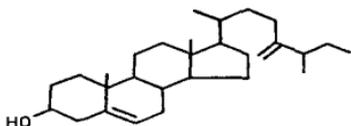
Rotación Óptica: $c_D^{20} = 0.23$, MeOH

Actividad Biológica: leve antimicrobiano

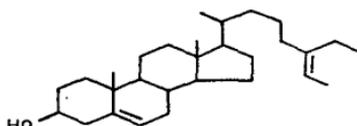
Referencia: (53)

Tabla 3. Esteroles de Especies de *Aplysina* (Verongia)(L) β -sitosterol

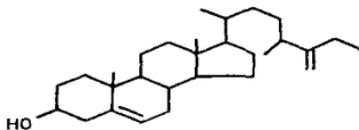
(LI) Aplysterol



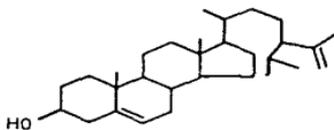
(LII) 24,28-didehidroaplysterol



(LIII) Verongulasterol



(LIV) 25,26 dehidroaplysterol



(LV) 24(R+S)isopropenilcolesterol

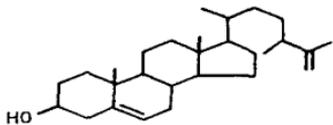
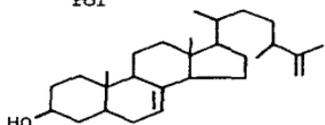
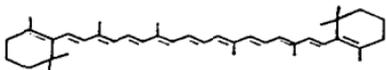
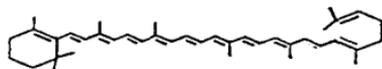
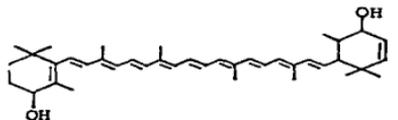
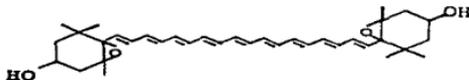
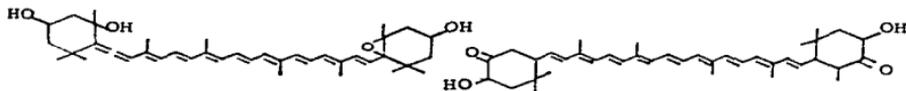
(LVI) 24(R+S)metilcolesta-5,25-dien-3 β -ol(LVII) 24(R+S)metilcolesta-7,25-dien-3 β -ol

Tabla 4. Carotenoides de *Verongia aerophoba* (63)(LVIII) β -caroteno(LIX) γ -caroteno

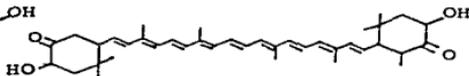
(LX) Isozeaxantina



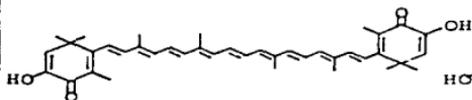
(LXI) Violoxantina



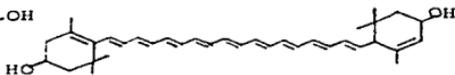
(LXII) Neoxantina



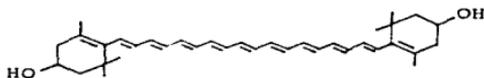
(LXIII) Astaxantina



(LXIV) Astaceno

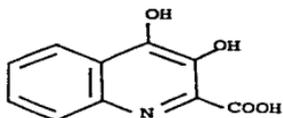


(LXV) Zeaxantina

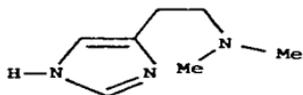


(LXVI) Luteina

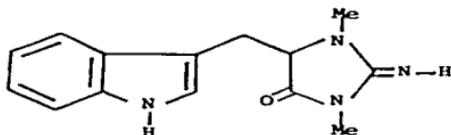
Tabla 5. Derivados Nitrogenados de Especies de Aplysina (Verongia)



(LXVII) Acido 3,4-dihidroxi-quinolina-2-carboxilico.



(LXVIII) N,N-dimetil histamina.



(LXIX) Aplysinopsina

AREA DE ESTUDIO

La costa del Pacífico Mexicano se caracteriza por sus grandes extensiones rocosas. Los estudios de las poblaciones de invertebrados que habitan este sustrato son escasos, la mayoría se han realizado en el Golfo de California, reduciéndose su número conforme desciende la latitud⁽⁷¹⁾.

El área de estudio se encuentra en la costa del Estado de Oaxaca que se caracteriza por tener una plataforma continental sumamente angosta, se ensancha solamente en el Golfo de Tehuantepec donde la plataforma tiene aproximadamente 100 Km de longitud como máximo; presenta una serie de bahías de diversos tamaños en las que parte del litoral y del fondo, es rocoso.

La costa del Estado de Oaxaca es una región donde el aprovechamiento de la fauna y flora marina es mínimo, no obstante de poseer 500 Km de litoral; esto se debe en parte, al escaso conocimiento de las comunidades biológicas que habitan en su ambiente marino. Considerando lo anterior, el laboratorio de Farmacología Marina del ICMYL convino en localizar sitios en esta zona en donde las condiciones ambientales y de servicios fueran las adecuadas para la colecta de organismos bénticos que se desarrollen sobre sustrato rocoso, tal como las esponjas, para su posterior estudio fármaco-químico.

El trabajo de campo se desarrolló de diciembre de 1983 a mayo de 1985, durante cuatro visitas a la costa de Oaxaca. En diciembre de 1983 se realizaron muestreos de reconocimiento en varias localidades, comprendidas desde Punta Maldonado, Gro. hasta Salina Cruz, Oax., seleccionándose como sitios de colecta la Bahía de Puerto Escondido, la Bahía de Puerto Angel y las Bahías de Huatulco (Fig. 1).

Descripción del Sitio de Colecta

La esponja objeto del presente estudio, únicamente se le encontró

en la Bahía de Puerto Escondido. El sitio de colecta se encuentra ubicado dentro de la bahía, a una distancia aproximada de 100 m del faro (Fig. 2). El lugar donde se localizó a las esponjas está constituido por un conjunto de rocas rodeado por arena; en su parte central que es la más somera tiene una profundidad de 20 m y en sus bordes, donde limita con la arena, tiene una profundidad de 30 m, excediéndola en ciertas partes. Este roquerío tiene un diámetro aproximado de 50 m.

Entre el sitio de colecta y el faro se localiza un canal, el que por sus características geológicas como son tipo de paredes inclinadas, secciones en forma de "V" y rocas saliendo de sus paredes se le puede considerar como un pequeño cañón submarino. Este canal tiene una profundidad aproximada de 60 m entre el lugar donde se colectó y el faro. La máxima profundidad que se logró registrar fue de 100 m, que continúa aumentando por la estrecha plataforma continental de la zona (Fig. 2).

Se realizaron tres colectas en dos épocas del año. La primera fue en noviembre de 1984, la segunda y la tercera en mayo y diciembre de 1985, respectivamente. Las condiciones de temperatura y de visibilidad en agua de mar encontradas en las inmersiones cambiaron entre la primera y las siguientes colectas; en la inicial la temperatura fue de 30°C y la visibilidad de 10 m; en las posteriores la temperatura descendió a 20°C y la visibilidad a 3 m.

Periodicamente en la Bahía de Puerto Escondido, las autoridades municipales abren una compuerta para descargar aguas pluviales y urbanas, que se mezclan con el agua de mar afectando su transparencia. Las tablas de mareas para los puertos del Pacífico Mexicano no incluyen a Puerto Escondido. El puerto más cercano para el que se tienen datos es Puerto Angel, Oax. para el que se informa que la marea tiene una amplitud promedio de 0.85 m, siendo de tipo mixta semidiurna. La temperatura promedio anual del agua de mar es de 28.9°C y la salinidad promedio anual es de 34.3 ‰^{72}.

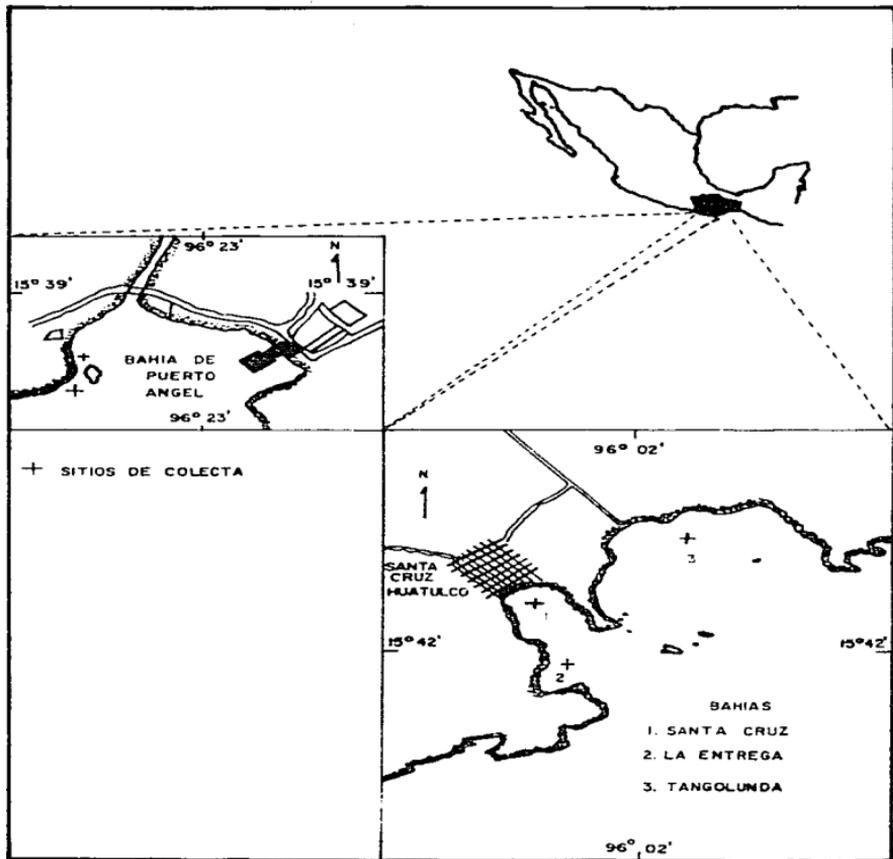


FIGURA 1. LOCALIDADES DE MUESTREO DE ESPONJAS MARINAS

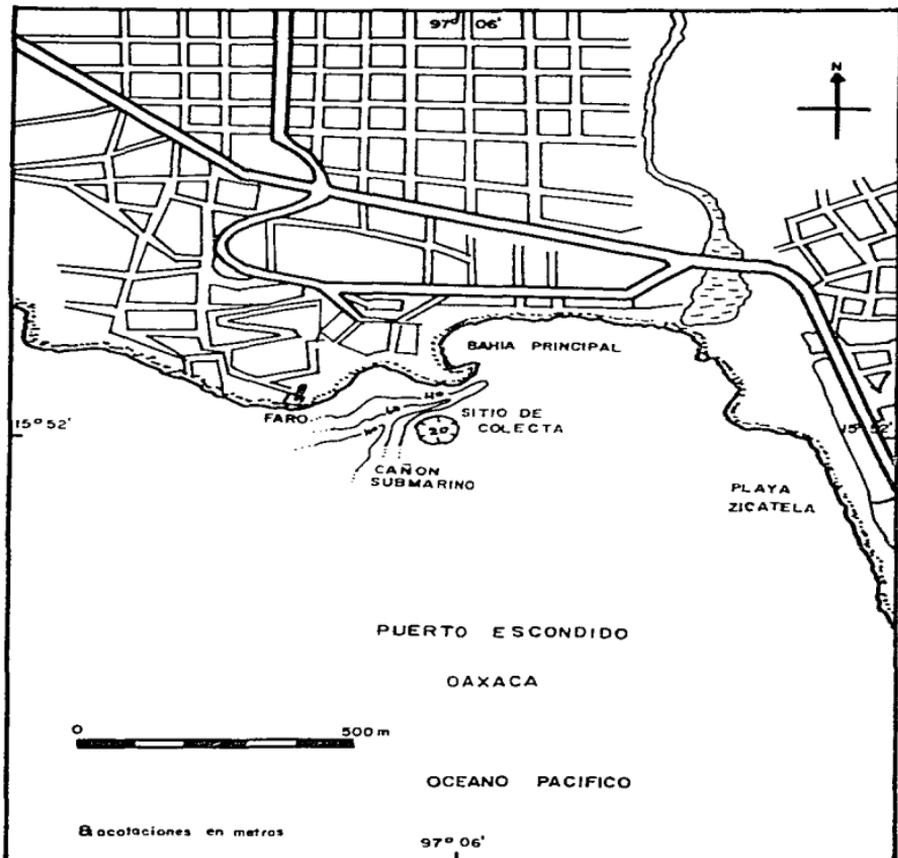


FIGURA 2. SITIO DE COLECTA DE LA ESPONJA MARINA *Aplysina* sp

MATERIAL Y METODO

El material biológico utilizado se colectó por medio de buceo autónomo a una profundidad de 20 m. Los organismos bénticos se colocaron en bolsas de plástico y fueron congelados con hielo seco. Una vez en el laboratorio, el material se mantuvo en congelación a -5°C para su preservación.

El material biológico forma parte de la colección de invertebrados marinos del laboratorio de Farmacología Marina del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología.

Material de Cromatografía

Las cromatografías se efectuaron en cromatoplasmas de sílica gel Merck 60 F₂₅₄ de 5 X 10 cm y de 0.25 mm de espesor y sílica gel para cromatografía en columna (malla de 10 a 40 μm). La pureza de los productos y el desarrollo de las reacciones se siguió mediante cromatoplasmas de sílica gel Merck 60 F₂₅₄ de 0.25 mm de espesor, usando como revelador sulfato cérico al 1% en ácido sulfúrico 2 N y vapores de yodo metálico.

Instrumentos Utilizados en la Obtención de los Datos Espectroscópicos.

La determinación de las estructuras moleculares de los metabolitos secundarios aislados y purificados, se hizo mediante la interpretación de sus espectros en el Ultravioleta, en el Infrarrojo, de Espectrometría de Masas y de Resonancia Magnética Nuclear. Cuando hubo las condiciones se utilizó la Difracción por Rayos X.

Los espectros en el Ultravioleta (UV) se determinaron en un Espectrofotómetro Perkin-Elmer modelo 552, en solución de metanol.

Los espectros en el Infrarrojo (IR) se determinaron en un Espectrofotómetro Perkin-Elmer modelo 283-B y en un Nicolet modelo FT-55X, en solución de cloroformo o en pastilla de KBr.

Los espectros de masas se determinaron en un Espectrómetro Hewlett-Packard modelo 5985, por impacto electrónico (EMIE) y/o ionización química (EMIQ).

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear Protónica (RMN¹H) se determinaron en un Espectrómetro analítico Varian modelo FT-80 en solución de deuterocloroformo, acetona deuterada o mezcla de deuterocloroformo-dimetilsulfoxido. Los desplazamientos químicos (δ) están expresados en partes por millón (ppm), referidos al tetrametilsilano como referencia interna.

Los esquemas del esqueleto de las moléculas se determinaron por difracción de rayos X, en un difractor automático Nicolet modelo R3m.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Jones y no están corregidos.

Aislamiento y Purificación de los Metabolitos Secundarios

Extracto Acuoso

A los especímenes de Aplysina sp descongelados con un peso húmedo de 4.0 Kg, se cortaron en trozos pequeños y fueron exprimidos para obtener la mayor cantidad posible de agua. La parte acuosa que se obtuvo de la esponja se liofilizó; del residuo pulverizado se obtuvieron 140 g de un sólido gris, el que se empacó en una columna y se fraccionó con disolventes de polaridad creciente, iniciando con hexano, diclorometano, acetato de etilo y terminando con metanol. Se obtuvieron 23 fracciones de 250 ml cada una.

Se reunieron las fracciones 6 a la 20 que contenían un compuesto poco polar y se cromatografiaron en una columna empleando sílica gel (40.0 g) como adsorbente y eluyendo con hexano, acetato de etilo y mezclas de hexano-acetato de etilo. De las fracciones

eluidas con hexano-acetato de etilo 95:5, se logró aislar un sólido cristalino con punto de fusión de 130°C, que fue identificado por sus constantes físicas y datos espectroscópicos como β -sitosterol^{42}.

Aislamiento de la Aeroplysinina-2 (XX)

De las fracciones eluidas con hexano-acetato de etilo 1:1, se obtuvo un material viscoso que se purificó por cromatografía en placa fina, en placas preparativas desarrolladas en un sistema compuesto de diclorometano-acetona 1:1. Se aisló un sólido amorfo que no se logró cristalizar y que resultó ser la aeroplysinina-2 (XX), identificada por comparación de sus datos espectroscópicos con los publicados en la literatura^{47}

Extracto Metanólico

La esponja fragmentada y después de exprimida se homogeneizó en una licuadora con 4.0 l de metanol, el extracto metanólico se filtró y los filtrados se concentraron por destilación a presión reducida, obteniéndose 81 g de un residuo café-rojizo, los cuales se suspendieron en 200 ml de agua destilada y fueron extraídos 5 veces con 5.0 l de acetato de etilo (1.0 l cada vez), la capa acuosa se separó y descartó y la capa de acetato de etilo se le eliminó el agua con sulfato de sodio anhidro, después se filtró y se le concentró eliminando el disolvente por destilación al vacío, obteniéndose un residuo aceitoso café-rojizo cuyo peso fue de 22.0 g. Este último residuo se disolvió en diclorometano y se cromatografió sobre una columna previamente empacada con 200 g de sílica gel, usando como eluyentes hexano, mezclas de hexano-acetato de etilo, acetato de etilo y metanol, se obtuvieron 187 fracciones de 250 ml cada una.

De las primeras fracciones eluidas de la columna anterior con

hexano-acetato de etilo 98:2, se obtuvo un aceite amarillo claro que después de someterse a metilación con diazometano resultó ser una mezcla de ésteres metílicos de ácidos grasos con cadena de más de 10 átomos de carbono, por comparación por cromatografía de gases con muestras auténticas de ésteres metílicos de ácidos grasos conocidos. De las fracciones eluidas con una mezcla de hexano acetato de etilo 95:5, se obtuvieron 3.65 g de un sólido cristalino que resultó ser idéntico por sus constantes físicas y datos espectroscópicos al compuesto identificado como β -sitosterol (L), aislado previamente de la fracción acuosa.

Aislamiento de la Aplysinólida (LXX)

De las fracciones eluidas con una mezcla de hexano-acetato de etilo 95:5, se obtuvieron 15 mg de un sólido cristalino amarillo con punto de fusión 142-144°C, la sustancia resultó ser un nuevo compuesto dibromado al que se le dió el nombre de Aplysinólida (LXX). Sus datos espectroscópicos son los siguientes:

IR $\nu_{\text{máx.}}$ (CHCl₃): 3028 (C-H, Ar), 2942 (C-H, Alif.), 1780 (C=O) cm^{-1}

UV $\lambda_{\text{máx.}}$ (MeOH): 207 nm ($\epsilon=25700$), 260 nm ($\epsilon=9820$), 290 nm ($\epsilon=6717$)
327 nm ($\epsilon=3732$)

EMIE m/e: 360, 362, 364 M⁺, M⁺², M⁺⁴ C₁₂H₁₀O₃Br₂ (49%, 100%, 48%)
345, 347, 349 (C₁₁H₇O₃Br₂)⁺ (15%, 25%, 14%)
331, 333, 335 (C₁₁H₉O₂Br₂)⁺ (5%, 9%, 4%)
317, 319, 321 (C₁₀H₇O₂Br₂)⁺ (36%, 70%, 35%)

RMN¹H (CDCl₃): 2.37 ppm (s, 3H), 2.57 ppm (s, 3H), 3.90 ppm (s, 3H),
7.61 ppm (s, 1H)

Aislamiento de la Aplysinimina (LXXI)

Se reunieron las fracciones eluidas con hexano-acetato de etilo 90:10 y se recromatografiaron en una columna de 3 cm de diámetro

empacada con sílica-gel, obteniéndose de las fracciones eluidas con hexano-acetato de etilo 90:10 6.0 mg de un sólido amorfo que presentó un punto de fusión de 146°, el compuesto fue identificado como otro nuevo metabolito dibromado al que se nombró Aplysinimina (LXXI). Sus datos espectroscópicos son los siguientes:

IR $\nu_{\text{máx.}}$ (CHCl₃): 3500 cm⁻¹ (N-H, imina)

UV $\lambda_{\text{máx.}}$ (MeOH): 206 nm ($\epsilon=30173$), 289 nm ($\epsilon=1742$)

EMIE m/e: 319, 321, 323 M⁺, M⁺², M⁺⁴ C₉H₇NO₂Br₂ (30%, 61%, 31%)
 304, 306, 308 (C₉H₆O₂Br₂)⁺ (52%, 100%, 46%)
 292, 294, 296 (C₈H₆O₂Br₂)⁺ (8%, 15%, 8%)
 278, 280, 282 (C₇H₃O₂Br₂)⁺ (2%, 4%, 2%)

RMN¹H (CDCl₃): 3.67 ppm (s, 2H), 3.85 ppm (s, 3H), 5.82 ppm (s, 1H),
 7.48 ppm (s, 1H)

Aislamiento de la 2,6-dibromo-4-hidroxi-4-metilencarbometoxiciclohexadienona (LXXII) y de la 2,6-dibromo-4-hidroxi-4-metilencarboxi ciclohexadienona (LXXIII)

De las fracciones eluidas con hexano-acetato de etilo 90:10 de la recromatografía anterior, se obtuvieron otros dos compuestos de polaridad muy semejante y que se pudieron separar por cromatografía en capa fina, utilizando cromatoplasmas de sílica-gel de 5 X 10 cm y de 0.25 mm de espesor, desarrolladas con diclorometano 100%. De la fracción menos polar se obtuvieron 20 mg de un sólido cristalino LXXII con punto de fusión de 58-59°C. De la fracción menos polar se obtuvieron 10 mg de un sólido amorfo con punto de fusión de 196-198°C LXXIII. Las dos sustancias se identificaron como la 2,6-dibromo-4-hidroxi-4-metilencarbometoxiciclohexadienona (LXXII) y la 2,6-dibromo-4-hidroxi-4-metilencarboxiciclohexadienona (LXXIII) al comparar sus datos espectroscópicos con los informados en la publicación respectiva⁽⁴²⁾.

Aislamiento de la Aeroplysinina-1 (XIX)

Las fracciones eluidas con hexano-acetato de etilo 80:20 y 70:30 se reunieron y el residuo se purificó por cromatografía en placa fina en cromatoplasas de sílica-gel de 5 X 10 cm y de 0.25 mm de espesor, que se desarrollaron en un sistema de diclorometano-acetona 95:5, dos veces. Se obtuvieron 12 mg de un aceite rojizo que no se logró cristalizar y que se identificó como la Aeroplysinina-1 (XIX) por comparación de sus datos espectroscópicos con los publicados^{4}.

Aislamiento de la 3,5-dibromo-2-hidroxi-4-metoxifenilacetamida (XXXVI)

Las primeras fracciones eluidas con hexano-acetato de etilo 50:50 se reunieron y se recromatografiaron en una columna empacada con sílica-gel. De las fracciones eluidas con hexano-acetato de etilo 70:30 se obtuvieron 30 mg de un sólido cristalino con un punto de fusión de 178°C, que resultó ser el compuesto XXXVI ya descrito y el cual fue identificado al confrontar sus datos espectroscópicos con los informados en la literatura^{56}.

Aislamiento del Aplysincetal "A" (LXXIV) y de la 2,6-dibromo-4-acetamido-4-hidroxiciclohexadienona (XVI).

De las últimas fracciones eluidas con hexano-acetato de etilo 50:50 se obtuvo 60 mg de un sólido amorfo que resultó ser una mezcla de dos sustancias. Los compuestos se separaron por cromatografía en placa fina, usando como sistema de elución diclorometano-acetona 9:1 y desarrollando la placa tres veces. El compuesto de mayor polaridad se aisló como un sólido cristalino con punto de fusión de 189-190°C (40.0 mg), el que se identificó como la dienona XVI al comparar sus constantes físicas y datos espectroscópicos con los publicados para esta sustancia^{42}. El compuesto de menor polaridad se obtuvo como un sólido cristalino con punto de fusión de 194-195°C (15.0 mg) y resultó ser un nuevo

compuesto dibromado, al cual se le dió el nombre de Aplysincetal "A" (LXXIV) y se identificó como el 3,5-dibromo-1-acetamido-1-hidroxi-4-butoxi-4-metoxiciclohexadieno. Sus datos espectroscópicos son los siguientes:

IR $\nu_{\text{máx.}}$ (KBr): 3410 (OH, ter.), 3200 (N-H, amida), 1660 (C=O, amida) cm^{-1}

UV $\lambda_{\text{máx.}}$ (MeOH): 204 nm ($\epsilon=9912$)

EMIE m/e: 411, 413, 415 M^+ , M^{+2} , M^{+4} (No Observado) $\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{NO}_4\text{Br}_2$
 380, 382, 384 ($\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{NO}_3\text{Br}_2$)⁺ (8%, 14%, 8%)
 353, 355, 357 ($\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{O}_3\text{Br}_2$)⁺ (2%, 3%, 2%)
 333, 340, 342 ($\text{C}_9\text{H}_{10}\text{NO}_3\text{Br}_2$)⁺ (40%, 78%, 39%)
 306, 308, 310 ($\text{C}_8\text{H}_6\text{NO}_3\text{Br}_2$)⁺ (14%, 27%, 18%)

RMN¹H (CD_3)₂CO: 0.98 ppm (t, 3H), 1.50 ppm (m, 4H), 2.68 ppm (s, 2H)
 3.07 ppm (s, 3H), 3.25 ppm (t, 2H), 5.85 ppm (s, 1H)
 6.60 ppm (s, 1H), 6.75 ppm (s, 2H), 7.15 ppm (s, 1H)

Aislamiento del Aplysincetal "B" (LXXV)

De las fracciones eluidas con hexano-acetato de etilo 40:60, se obtuvo un aceite café que se recromatografió en una columna de sílica-gel utilizando como eluyente mezclas de hexano-acetato de etilo, obteniéndose de las fracciones eluidas con hexano-acetato de etilo 70:30, 10.0 mg de un sólido blanco amorfo con un punto de fusión de 166-168°C que resultó ser un nuevo compuesto dibromado semejante al anteriormente descrito. Sus datos espectroscópicos son los siguientes:

IR $\nu_{\text{máx.}}$ (KBr): 3390 (OH, ter.), 3185 (N-H, amida), 1668 (C=O, amida) cm^{-1}

UV λ_{max} . (MeOH): 203 nm ($\epsilon=12134$)

EMIE m/e: 425, 427, 429 M^+ , M^{+2} , M^{+4} (No observado) $C_{14}H_{21}NO_4Br_2$
 394, 396, 398 $(C_{13}H_{18}NO_3Br_2)^+$ (0.9%, 1.5%, 0.9%)
 380, 382, 384 $(C_{13}H_{18}O_3Br_2)^+$ (4%, 11%, 5%)
 338, 340, 342 $(C_9H_{10}NO_2Br_2)^+$ (21%, 40%, 20%)
 306, 308, 310 $(C_8H_6NO_2Br_2)^+$ (12.5%, 25%, 13%)

RMN¹H $(CD_3)_2CO$: 0.98 ppm (t, 3H), 1.50 ppm (m, 6H), 2.57 ppm (s, 2H)
 3.10 ppm (s, 3H), 3.22 ppm (t, 2H), 5.85 ppm (s, 1H)
 6.65 ppm (s, 1H), 6.76 ppm (s, 2H), 7.14 ppm (s, 1H)

Aislamiento del Derivado Bis-Oxazolidona (XXIII)

Las fracciones obtenidas al eluir la columna con acetato de etilo 100% se reunieron debido a que mostraron tener el mismo constituyente al compararlas en cromatoplasacas de sílica gel de 0.25 mm de espesor, corridas en diclorometano-acetona 1:1 dos veces. El material reunido se purificó en una columna empacada con sílica gel que se eluyó con mezclas de hexano-acetato de etilo; de las fracciones eluidas con hexano-acetato de etilo 70:30 y 60:40 se obtuvo un sólido cristalino con punto de fusión de 214-215°C, al que se identificó como el derivado bis-oxazolidona (XXIII) por comparación de sus datos espectroscópicos con los publicados para este compuesto^{50}.

Pruebas de Antibiósis de los Extractos y de los Compuestos Aislados de la Esponja

La prueba de inhibición en placa para microorganismos se realizó en medio sólido (BIOXON), por medio de sensibilizadores de papel filtro Whatman # 42, con diámetro de 5.5 mm y esterilizados.

Cuando se utilizaba el extracto acuoso o metanólico crudo de la esponja, se concentraba por goteo en cada disco 1 ml del extracto, preparado a partir de 10 g de la esponja homogeneizado en 10 ml de metanol. Cuando se utilizaba algún metabolito purificado, éste se disolvía en metanol de tal manera que la dilución mantuviera una concentración dada y se concentraba por goteo los ml necesarios en cada disco para obtenerlos impregnados con dosis del orden de los $\mu\text{g/ml}$. Se impregnó el número necesario de discos como para poder realizar dos veces la misma prueba y comparar los resultados de inhibición de un mismo extracto o de un mismo compuesto. También se colocaron controles de papel filtro Whatman # 42 esterilizado, impregnados solamente con metanol.

Todos estos discos se dejaron secar perfectamente a temperatura ambiente, posteriormente se colocaron en cajas de petri previamente inoculadas con el microorganismo correspondiente sobre una placa de agar nutritivo o el medio adecuado para el desarrollo de la bacteria. Estas cajas se inocularon homogéneamente con una asa bacteriológica.

Una vez colocados los discos en el medio de cultivo, se dejaron reposar durante 90 min. a temperatura ambiente con el fin de permitir la difusión del extracto o de la sustancia sobre la placa. Después de este período se incubaron las cajas de petri a 37°C durante 24 horas. Cuando se cumplió el tiempo de incubación, se procedió a observar en cuales medios se había presentado halo de inhibición microbiana y en caso de que lo hubiera, se midió el diámetro en mm. La presencia del halo de inhibición, indica que la prueba de antibiósis es positiva y que los extractos o los

metabolitos presentan actividad antimicrobiana, los cuales al difundirse sobre el medio de cultivo alrededor del disco, impedían el desarrollo de los microorganismos.

Microorganismos de Prueba

Las cuatro cepas de microorganismos seleccionadas para este estudio fueron proporcionadas por el cepario de la Facultad de Química de la UNAM. Staphylococcus aureus, Salmonella typhi y Shigella sonnei fueron resembradas en agar nutritivo y Streptococcus pyogenes se resembró en agar bacteriológico e infusión de cerebro corazón, presentando todas las cepas un excelente desarrollo después del período de incubación a 37°C durante 24 horas. Se realizaron resiembras de estas cepas microbianas cada cuatro semanas.

Las cuatro cepas microbianas utilizadas en las pruebas de inhibición en placa con los extractos o los metabolitos de la esponja, son microorganismos de interés médico, son nocivas para el ser humano cuando las condiciones les son propicias y en ocasiones pueden desarrollar resistencia a los antibióticos de uso común.

Staphylococcus aureus y Streptococcus pyogenes son bacterias Gram-positivas y Salmonella typhi y Shigella sonnei son Gram-negativas.

RESULTADOS Y DISCUSION

Aplysina sp

La Aplysina sp (Porifera: Aplysinidae) es una esponja marina que se colectó en noviembre de 1984, por primera y única vez en la Bahía de Puerto Escondido, Oaxaca; en dos ocasiones posteriores (mayo y diciembre de 1985) se intentó recolectar más Aplysina sp en la misma localidad, pero ya no se le encontró y en su lugar dominaba una población de otra esponja del género Niphates. Tal sucesión puede deberse a los cambios estacionales en los parámetros de temperatura y turbiedad, pues cuando se colectó a las Aplysina, la columna de agua era cálida y transparente y cuando posteriormente se regresó, esta era fría y turbia.

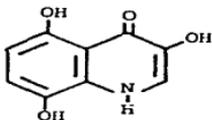
Esta nueva especie de Aplysina se caracteriza por ser una esponja masiva incrustante muy cavernosa, su color en vivo es amarillocre, secada o preservada en alcohol se torna morado-oscuro o negro. Su consistencia es muy compresible pero firme, es muy elástica. Su superficie presenta numerosas rugosidades que se engrosan en sus extremos. Sus fibras son ámbar-rojizo y son meduladas.

Durante la búsqueda en la literatura de las especies registradas para este género en el Pacífico Oriental, únicamente se encontraron dos: Verongia aurea y V. thiona y las descripciones de los autores sobre ambas especies no concuerdan con el espécimen colectado en Puerto Escondido. Como las características del género sí se apegan a las del ejemplar objeto del presente estudio, se optó entonces por dejarlo solo como Aplysina sp.

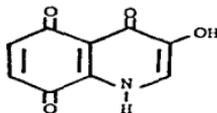
A finales de 1985, durante una visita a la Universidad del Sur de California se revisó la colección de esponjas de esta institución, que es la más completa para el Pacífico, con el objeto de comparar la Aplysina de Puerto Escondido con las especies de la región;

no se le encontró entre las especies de la colección. Esta especie de Aplysina continúa en estudio en el laboratorio de Farmacología Marina del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM, donde después se publicará la descripción de la especie.

Como ya se señaló las esponjas del género Aplysina se caracterizan por poseer un color amarillo-ocre, el cual se torna negro cuando la esponja se expone al aire. Fue recientemente cuando por fin se logró identificar químicamente al zocromo responsable del cambio de color en la Aplysina acrophoba, su estructura se estableció como la 3,5,8-trihidroxí-4-quinolona (LXXVI). Este es un pigmento que fácilmente se oxida a una quinona azul inestable (LXXVII) que a la vez rápidamente se convierte en un material negro insoluble⁽⁷³⁾.



(LXXVI) 3,5,8-trihidroxí-4-quinolona



(LXXVII) 3-hidroxí-4,5,8-trioxoquinolona

A veces el problema en la obtención de compuestos químicos de esponjas y en general de organismos marinos, no lo es tanto la elucidación de la estructura de las sustancias sino la determinación taxonómica del material biológico, puesto que los especialistas a menudo no logran llegar hasta la especie o aún al género.

Cuando se realiza el estudio químico de un organismo marino, además de los problemas taxonómicos, se tiene otra limitante, el obtener a los especímenes marinos en la abundancia adecuada puesto que las

esponjas marinas contienen metabolitos secundarios en cantidades mínimas, del orden de mg por Kg de peso húmedo. Con los 4 Kg de Aplysina sp que se sometieron a extracción y purificación, de algunos compuestos se obtuvo solo la cantidad necesaria para realizar las pruebas de antibiósisis y obtener los espectros de UV, IR, EM y RMN'H. Tal es el caso de la Aeroplysinina-2 (XX), de la Aplysinimina (LXXI), del ácido carboxílico (LXXIII) y del Aplysin cetal "B" (LXXV).

Las pruebas de antibiósisis hechas con los extractos acuoso y metanólico, mostraron los siguientes halos de inhibición:

Extracto	Inhibición en mm de diámetro			
	<u>S. aureus</u>	<u>S. pyogenes</u>	<u>S. typhi</u>	<u>S. sonnei</u>
Acuoso	16	14	15	15
Metanólico	18	15	15	16

Con base en los resultados positivos de las pruebas de antibiósisis anteriores y a la abundancia del material biológico disponible, se procedió a la purificación por cromatografía en columna y en placa fina de los dos extractos.

En la purificación por cromatografía en columna, es imprescindible que los extractos contengan la menor cantidad de agua posible debido a que es un líquido muy polar, desactiva la sílica gel y puede ocasionar reacciones no deseadas. Las esponjas marinas por lo general contienen un volumen apreciable de agua salada que debe de eliminarse por métodos físicos y/o químicos. En este caso, después de que la esponja con un peso húmedo de 4 Kg fue exprimida, liofilizada, extraída con metanol y filtrada bajo succión, el peso seco fue de 140 g para el liofilizado y de 400 g para el residuo de la esponja del extracto metanólico filtrado.

Elucidación de las Estructuras Moleculares de los Metabolitos Secundarios de Aplysina sp

La Química de organismos marinos es interesante por sí misma. Cada estructura nueva encontrada entre los compuestos químicos de origen marino puede contener arreglos poco comunes de grupos funcionales y considerarse como modelos para síntesis. El impacto real de los metabolitos secundarios marinos radica en sus estructuras químicas que han estimulado la investigación fundamental en Química Orgánica.

Aunque el descubrimiento de una sustancia nueva es a menudo una amplia recompensa para el trabajo en el área de productos naturales, las investigaciones en el medio marino ofrecen otras oportunidades para combinar la elucidación estructural con estudios más pragmáticos, tal como la búsqueda de nuevos fármacos.

Elucidación de la Estructura Molecular de la Aplysinólida (LXX)

De las fracciones menos polares de la cromatografía del extracto metanólico de la esponja, se aisló un nuevo compuesto bromado como un sólido cristalino amarillo de punto de fusión de 142-144°, al cual se le dió el nombre de Aplysinólida (LXX). Su peso molecular de 360 obtenido por Espectrometría de Masas (EMIE) está de acuerdo para fórmula molecular $C_{12}H_{10}O_3Br_2$.

Su espectro en el Ultravioleta mostró absorciones a 207 nm ($\epsilon = 25700$), 260 nm ($\epsilon = 9820$), 290 nm ($\epsilon = 6717$) y 327 nm ($\epsilon = 3732$) que indican que el compuesto contiene insaturaciones, así como una parte aromática en la molécula. Su espectro en el Infrarrojo exhibe bandas de absorción para enlaces carbono-carbono olefínico en 3028 cm^{-1} , así como para carbono-carbono saturado en 2942 cm^{-1} ; en 1728 cm^{-1} se observó también la banda de absorción para el grupo carbonilo de una γ -lactona α, β -no saturada.

El espectro de Resonancia Magnética Nuclear Protónica (RMN'H) del compuesto LXX exhibe solamente señales simples. En 2.37 ppm y en 2.57 ppm se observan dos señales ligeramente anchas correspondientes a 3 protones cada una, que por su desplazamiento químico y su multiplicidad se pueden asignar a dos metilos vinílicos en posición gem a la doble ligadura; en 3.90 ppm se observa otra señal simple aguda que corresponde a los tres protones de un grupo metoxilo; por último se observa una señal simple en la región del espectro en donde aparecen los protones aromáticos en 7.61 ppm correspondiente a un protón, lo que sugiere la presencia de un anillo aromático pentasustituido.

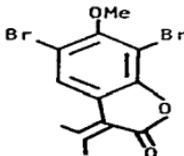
El espectro de masas del compuesto tiene la característica de presentar un ion molecular compuesto por tres picos de m/e 360, 362, 364 (M^+ , M^{+2} , M^{+4}) con una intensidad relativa de 1:2:1, lo que confirma la presencia de dos átomos de bromo en la molécula.

Aparte como es sabido, cuando un compuesto orgánico contiene átomos de bromo las abundancias relativas de los picos originados por las contribuciones isotópicas muestran un arreglo especial. Esto se debe al hecho de que el bromo existe en la naturaleza como una mezcla de dos isótopos estables ^{79}Br y ^{81}Br en una relación aproximada de 1:1. Así que cuando una molécula contiene un átomo de bromo se observan dos picos de intensidades relativas 1:1 (M^+ , M^{+2}). Cuando la molécula contiene dos átomos de bromo se observan tres picos de intensidades 1:2:1, etc., ya que la probabilidad sucesiva de obtener el número de picos sigue un arreglo binomial $(a + b)^n = 1$ donde n = número de átomos de bromo presentes en la molécula, que en el espectro se toma como M^+ , M^{+2} , M^{+4} , etc. ⁽⁷⁴⁾.

El espectro de masas del compuesto presentó además otros picos correspondientes a fragmentos que contienen dos átomos de bromo, como en m/e 345, 347, 349 (M-15) que se debe a la pérdida de un

metilo, en m/e 331, 333, 335 (M-29) debido a la pérdida de un grupo formilo y en m/e 317, 319, 321 (M-43) correspondiente a la pérdida de un grupo alquilo de tres átomos de carbono.

De acuerdo con todos los datos espectroscópicos anteriormente descritos, fue posible establecer la siguiente estructura LXX como la más probable para la Aplysinólida.



Aplysinólida (LXX)

Elucidación de la Estructura Molecular de la Aplysinimina (LXXI)

De las fracciones eluidas con hexano-acetato de etilo 90:10, se aisló otro nuevo metabolito bromado como un sólido amorfo al que se le dió el nombre de Aplysinimina (LXXI). Su peso molecular impar de 319 obtenido por Espectrometría de Masas, indica que la molécula contiene un átomo de nitrógeno y esta de acuerdo para la fórmula molecular $C_9H_7NO_2Br_2$.

Su espectro en el Ultravioleta presentó absorciones en 206 nm ($\epsilon = 30173$) y en 289 nm ($\epsilon = 1742$). La primera se debe a la presen-

cia de dobles ligaduras no conjugadas y la segunda a un cromóforo aromático.

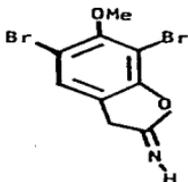
En el Infrarrojo mostró una banda de absorción en 3500 cm^{-1} que se asignó a la absorción del doble enlace de la imina.

El espectro de Resonancia Magnética Nuclear Protónica exhibió una señal simple en 3.67 ppm correspondiente a dos protones, lo que sugiere la existencia de un metileno aislado que por su desplazamiento químico puede asignarse a un metileno a a dos dobles enlaces; los protones de un metoxilo fueron puestos en evidencia por la presencia de una señal simple aguda en 3.85 ppm (3H); una señal simple en 5.82 ppm que desaparece al intercambiarse con agua deuterada sugiere la presencia del protón de la imina; el único protón aromático que contiene la molécula se detectó como una señal simple que aparece en 7.48 ppm.

Su espectro de masas mostró un ion molecular imoar que como en el caso de la Aplysinólida (LXX), se observó como tres picos en m/e 319, 321, 323 (M^+ , M^{+2} , M^{+4}) de intensidad relativa de 1:2:1 mismo que concuerda para un compuesto dibromado con fórmula molecular $C_9H_7NO_2Br_2$.

Además se observan otras series de picos de intensidades de 1:2:1 como en m/e 304, 306, 308 (M-15) que corresponde a la pérdida del N-H de la imina; en m/e 292, 294, 296 (M-16) debido a la pérdida de ácido cianhídrico y en m/e 278, 280, 282 (M-41) correspondiente al fragmento originado por la pérdida del metileno benéflico y a la imina como acetonitrilo.

Todos los datos espectroscópicos anteriores estuvieron de acuerdo con la siguiente estructura LXXI para la Aplysinimina.



Aplysinimina (LXXI)

Elucidación de la Estructura Molecular del Aplysincetal "A" (LXXIV)

De las fracciones eluidas con hexano-acetato de etilo 1:1 se aisló un sólido cristalino incoloro que resultó ser un nuevo cetal mixto dibromado LXXIV. El peso molecular del nuevo compuesto bromado no pudo ser determinado por Espectrometría de Masas, debido a que no se observó el ion molecular.

Su espectro en el Ultravioleta presentó un máximo de absorción a 204 nm ($\epsilon = 9912$) que se puede atribuir a la presencia del dieno homonuclear.

Su espectro en el Infrarrojo exhibe banda de absorción para grupo oxhidrilo en 3410 cm^{-1} ; para el grupo amida se observaron dos bandas de absorción: una en 3200 cm^{-1} que corresponde a la absorción de la amina y la otra en 1660 cm^{-1} debido al grupo carbonilo.

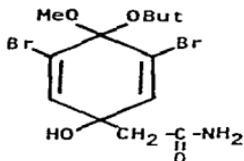
En el espectro de Resonancia Magnética Nuclear Protónica del compuesto LXXIV se puede inferir la presencia del cetil mixto metilo butilo por las señales que a continuación se describen: el grupo butoxilo mostró una señal triple en 0.98 ppm (3H) que confirma la presencia del metilo terminal, una señal múltiple en 1.50 ppm (4H) que se puede asignar a los cuatro protones de dos metilenos y un triplete en 3.25 ppm (2H) que se puede atribuir a los protones del metileno que soporta al oxígeno. La existencia de un metoxilo en la molécula es apoyada por la presencia de una señal simple aguda en 3.07 ppm (3H). Otra señal claramente apreciable en el espectro corresponde a los protones del metileno del grupo acetamido que se manifiesta como una señal simple aguda en 2.68 ppm , así como otra señal simple en 7.65 ppm (2H) que corresponde a los dos protones vinílicos equivalentes ya que la molécula tiene un plano de simetría. Por lo que respecta al protón del alcohol y los protones de la amida, estos se observaron como tres señales simples anchas en 5.85 ppm (1H), 6.60 ppm (1H) y 7.15 ppm (1H) que desaparecen al intercambiarse con agua deuterada.

El espectro de masas del compuesto LXXIV no presentó ion molecular, pero se observaron tres picos en m/e 380, 382, 384 (M^+ , M^{+2} , M^{+4}) de intensidad relativa 1:2:1 que confirman que se trata de una sustancia dibromada, estos fragmentos se pueden asignar a la pérdida de 31 unidades de masa de un grupo metoxilo, de esta manera se puede establecer indirectamente la fórmula molecular $C_{13}H_{19}NO_4Br_2$.

Se observaron picos en m/e 353, 355, 357 que corresponden a la pérdida del grupo acetamido ($M-58$); en m/e 338, 340, 342 y en m/e 306, 308, 310 se observan los picos correspondientes a los frag-

mentos originados por la pérdida del grupo butoxilo (M-73) y de ambos grupos metoxilo y butoxilo (M-105).

Finalmente la estructura LXXIV propuesta para el Aplysincetal "A" fue confirmada por Difracción de rayos X. Los datos obtenidos de mostraron que el anillo de ciclohexadieno y los dos átomos de bromo se encuentran en el mismo plano. Además indicaron que los dos grupos más voluminosos: el butoxilo y el acetamido se encuentran en posición anti; la misma situación se presenta con los dos grupos más pequeños: el metoxilo y el oxhidrilo, pero en sentido opuesto (Fig. 3).



(LXXIV) Aplysincetal "A"

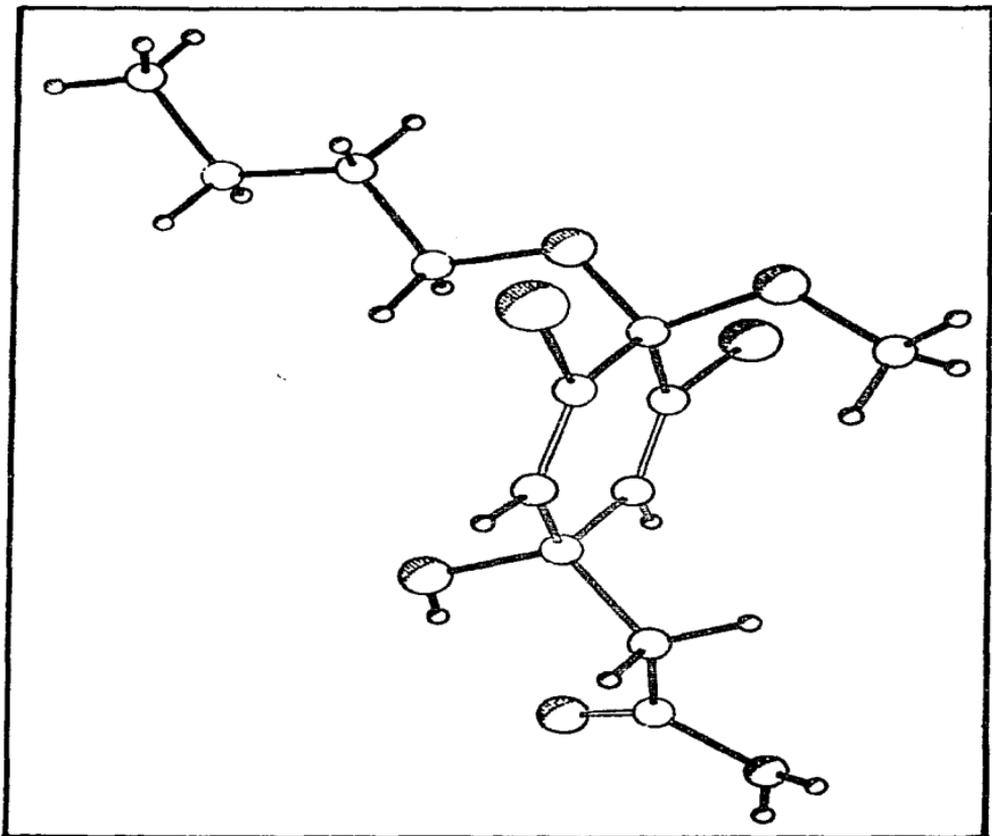


Fig. 3. Esquema de la Estructura Molecular del Aplysincetal "A",
obtenido por Difracción de Rayos X.

Elucidación de la Estructura Molecular del Aplysincetal "B" (LXXV)

De las fracciones eluidas con hexano-acetato de etilo 40:60 se aisló un sólido cristalino que resultó ser otro cetal mixto dibromado no descrito en la literatura, al que se nombró como Aplysincetal "B" (LXXV) y que de manera similar al Aplysincetal "A" (LXXIV), no presentó ion molecular en su espectro de masas.

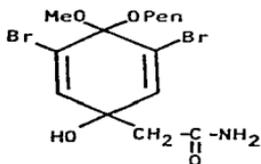
Su espectro en el Ultravioleta muestra una fuerte absorción en 203 nm ($\epsilon=12134$) que se debe a la presencia de dobles ligaduras no conjugadas en la molécula.

Su espectro en el Infrarrojo presentó una banda de absorción para un grupo oxhidrilo en 3390 cm^{-1} , así como dos bandas atribuidas a una amida: en 3185 cm^{-1} la parte que corresponde a la amina y en 1668 cm^{-1} la que corresponde al carbonilo.

En su espectro de Resonancia Magnética Nuclear Protónica se detectaron las señales correspondientes a la cadena alifática como un triplete en 0.98 ppm (3H), una señal múltiple en 1.50 ppm (6H) y un triplete en 3.25 ppm (2H) que se pueden asignar respectivamente a: los protones del metileno terminal, a los protones de los tres metilenos y del metileno unido al átomo de oxígeno. Se observa también una señal simple aguda en 3.07 ppm (3H) debida a los protones del grupo metoxilo. La señal simple en 2.68 ppm (2H) es característica para los protones de un metileno de un grupo acetamido, para este último grupo se tienen dos señales anchas en 6.60 ppm (1H) y en 7.15 ppm (1H) que corresponden a los dos protones del grupo amino, esto se verifica porque al intercambiar con agua deuterada estas señales desaparecen; lo mismo sucede con la señal simple en 5.88 ppm (1H) que fue asignada al protón del oxhidrilo. Finalmente en 6.76 ppm (2H) se tiene una señal simple que se debe a la presencia de dos protones vinflicos equivalentes en el ciclohexadieno hexasustituido.

Al igual que el Aplysincetal "A" (LXXIV), el Aplysincetal "B" (LXXV) en su espectro de masas no presenta ion molecular, sin embargo mostró picos significativos de intensidad 1:2:1 (M^+ , M^{+1} , M^{+4}) debidos a diferentes fragmentos bromados, como en m/e 394, 396, 398 (M-31) originado por la pérdida del grupo metoxilo que en este caso también indirectamente da la fórmula molecular $C_{14}H_{21}NO_4Br_2$. De m/e 380, 382, 384 (M-45) que se debe a la pérdida del grupo amida; en m/e 338, 340, 342 (M-87) que corresponde a la pérdida del grupo pentoxilo y en m/e 306, 308, 310 (M-114) que al aparecer en el espectro comprueba la presencia del cetil mixto metilo-pentilo.

Todos los datos espectroscópicos anteriores están de acuerdo con la siguiente estructura LXXV para el Aplysincetal "B".



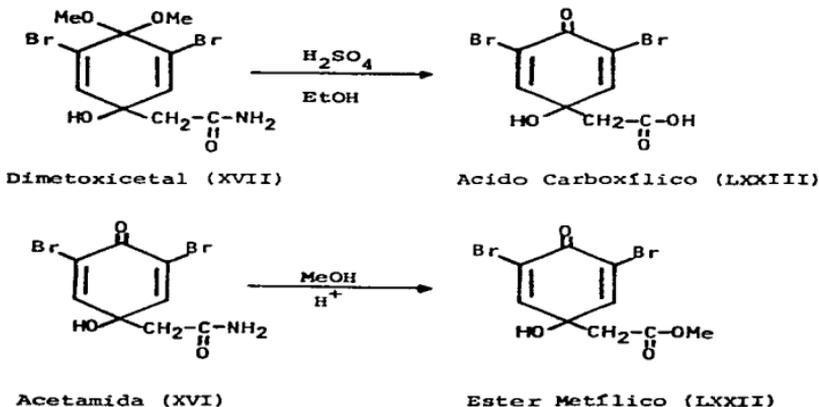
(LXXV) Aplysincetal "B"

Identificación de los Esteres Metilicos de los Acidos Grasos

De las fracciones menos polares de la cromatografía del extracto metanólico se eluyó una sustancia aceitosa que se caracterizó espectroscópicamente como una mezcla de ácidos grasos, la que se metiló con diazometano. El análisis de la mezcla de los ésteres metilicos por cromatografía de gases reveló la presencia de una serie de ácidos grasos con una cadena alifática de más de diez átomos de carbono, lográndose identificar a los ésteres metilicos de los ácidos palmítico, esteárico y oleico. Fueron los únicos identificados ya que no se tenían patrones para los demás ácidos grasos.

Identificación de la Estructura Molecular de la 2,6-dibromo-4-hidroxi-4-metilencarbometoxiciclohexadienona (LXXII) y de la 2,6-dibromo-4-hidroxi-4-metilencarboxiciclohexadienona (LXXIII).

De las fracciones eluidas con hexano-acetato de etilo 90:10, además de la Apysinimina (LXXI) se aislaron otros dos metabolitos secundarios ya descritos en la literatura y que se identificaron espectroscópicamente como dos ciclohexadienonas dibromadas de similar estructura, cuya diferencia radica en que mientras una es el ácido carboxílico LXXIII la otra es su correspondiente éster metílico LXXIII, esta es la primera vez que se aíslan como productos naturales. Las dos sustancias habían sido obtenidas como productos de síntesis a partir de otros compuestos aislados de esponjas, pero no directamente de estas. La 2,6-dibromo-4-hidroxi-4-metilencarboxiciclohexadienona (LXXIII) fué sintetizada utilizando como materia prima al dimetoxicetal (XVII) al someterlo a hidrólisis en medio ácido y la 2,6-dibromo-4-hidroxi-4-metilencarbometoxiciclohexadienona (LXXII) se obtuvo mediante la conversión de la acetamida (XVI) al éster metílico con metanol en medio ácido (42).



Identificación de la Estructura Molecular de la 3,5-dibromo-2-hidroxi-4-metoxifenilacetamida (XXXVI)

La 3,5-dibromo-2-hidroxi-4-metoxifenilacetamida (XXXVI) es otro metabolito dibromado aislado de la fase metanólica. Es una de las pocas sustancias dibromadas encontradas en esponjas del género Aplysina que también se han hallado en otros géneros de esponjas, su estructura se determinó por los métodos convencionales de espectroscopía y por Difracción de rayos X⁽⁵⁶⁾

Identificación de la Estructura Molecular de la 2,6-dibromo-4-acetamido-4-hidroxiciclohexadienona (XVI)

Este compuesto XVI fué la primera sustancia dibromada con actividad antimicrobiana que se obtuvo de una esponja del género Aplysina a partir de este, una serie de compuestos relacionados se han puesto en evidencia, con lo que se ha enriquecido el conocimiento químico y ecológico de los metabolitos secundarios en las esponjas⁽²⁷⁾.

Identificación de la Estructura Molecular del Derivado Bis-oxazolidona (XXIII)

De las fracciones más polares de la cromatografía del extracto metanólico que fueron eluidas con acetato de etilo 100%, se aisló un sólido cristalino muy polar que resultó ser una sustancia dibromada ya descrita en la literatura y que se caracteriza por ser el primer compuesto obtenido de una esponja que contiene dos anillos de oxazolidona, la estructura corresponde a la fórmula XXIII⁽⁵⁰⁾.

Identificación de la Estructura Molecular del β -sitosterol (L)

El esteroles que se encontró tanto en la fracción acuosa como en la fase metanólica, mostró tener el mismo punto de fusión de 130°C e idénticos datos espectroscópicos, por lo que se puede considerar que se trata de la misma sustancia. Su peso molecular obtenido por

Espectrometría de Masas fue de 414 y esta de acuerdo para la fórmula molecular $C_{29}H_{50}O$. Su espectro en el Infrarrojo muestra una banda de absorción en 3608 cm^{-1} que por su forma y posición se puede asignar a un grupo oxhidrilo. Su espectro de Resonancia Magnética Nuclear Protónica presenta las señales para los protones de carbonos saturados e insaturados propios de los esteróles. Por sus constantes físicas y datos espectroscópicos encontrados y comparados con los publicados, se concluyó que los más probable es que sea el β -sitosterol⁽⁴²⁾.

Identificación de la Estructura Molecular de la Aeroplysinina-2 (XX)

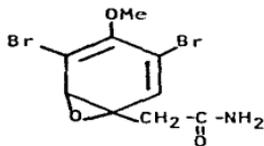
Del extracto acuoso se aisló una sustancia bromada que se identificó como la Aeroplysinina-2 (XX) al comparar sus constantes espectroscópicas con las publicadas⁽⁴⁷⁾. Este compuesto es la primera vez que se aísla de una esponja del Pacífico Oriental Central anteriormente se había aislado de esponjas del Mar Mediterráneo⁽⁵⁶⁾ y del Caribe⁽⁵²⁾.

Probable Origen de los Compuestos Bromados en las Esponjas

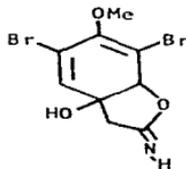
Las sustancias bromadas aisladas de organismos provenientes del mar, lo han sido de algas⁽⁷⁵⁾, de esponjas⁽⁷⁶⁾ y de moluscos⁽⁷⁷⁾. Se ha sugerido que la dibromotirosina es el precursor biosintético de la mayoría de los metabolitos secundarios aislados de esponjas del género Aplysina (=Verongia)⁽⁷⁸⁾. También se ha sugerido que las esponjas de manera similar a los nudibrancios pueden incorporar compuestos halogenados a partir de la ingestión de algas microscópicas⁽⁷⁹⁾. Las esponjas poseen un sistema de canales para la filtración de agua de mar que las capacita para extraer de ésta partículas orgánicas y microorganismos e incorporarlos en sus tejidos.

Se ha intentado esclarecer la hipótesis de que si son las propias esponjas o sus microorganismos asociados los productores de las sustancias antimicrobianas encontradas en éstas. Hasta el momento no se ha detectado a los compuestos antibacterianos en cultivos de microorganismos aislados de esponjas que dan pruebas de antibiología positiva, pero por ello se debe de deshechar la idea de que los microorganismos que viven en las esponjas puedan no estar involucrados en la biosíntesis de los metabolitos secundarios⁽³⁷⁾.

Con base en algunos datos experimentales se ha propuesto que la mayoría de los compuestos bromados obtenidos de esponjas del género Aplysina pueden derivarse de un precursor común, que puede ser el epóxido (LXXVIII) o la imina (LXXIX) ambos al reaccionar con nucleófilos o disolventes polares. Aunque hasta el momento no existen pruebas directas de la existencia de tales precursores el origen de algunos de los metabolitos bromados aislados en este estudio puede explicarse a través de ellos⁽⁴³⁾.

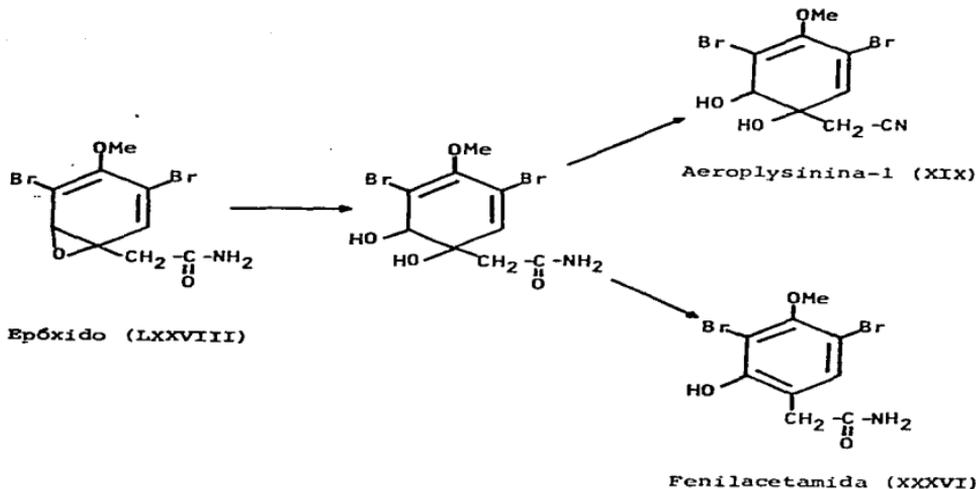


Epóxido (LXXVIII)

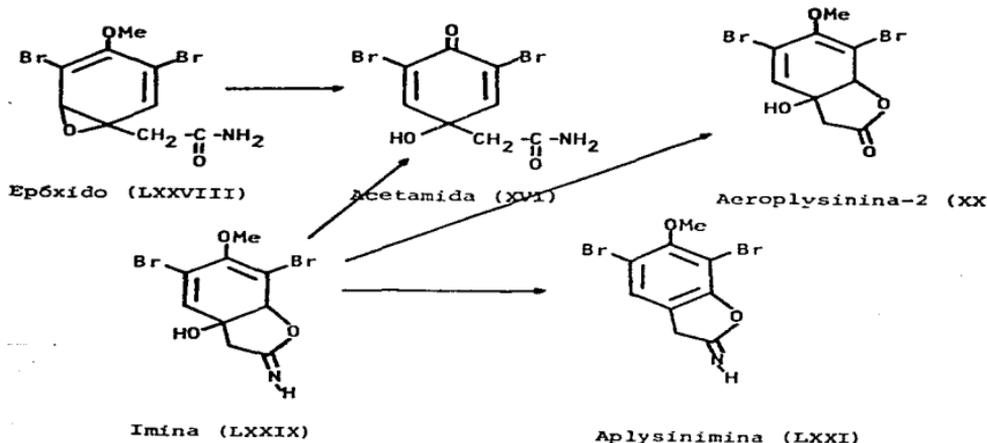


Imina (LXXIX)

La producción por parte de la esponja de la Aeroplysinina-1 (XIX) y de la 3,5-dibromo-2-hidroxi-4-metoxifenilacetamida (XXXVI), puede suceder si el epóxido LXXVIII reacciona nucleofílicamente en los carbonos uno o dos, seguido de la deshidratación del alcohol terciario para dar el compuesto aromático XXXVI⁽⁵⁶⁾.

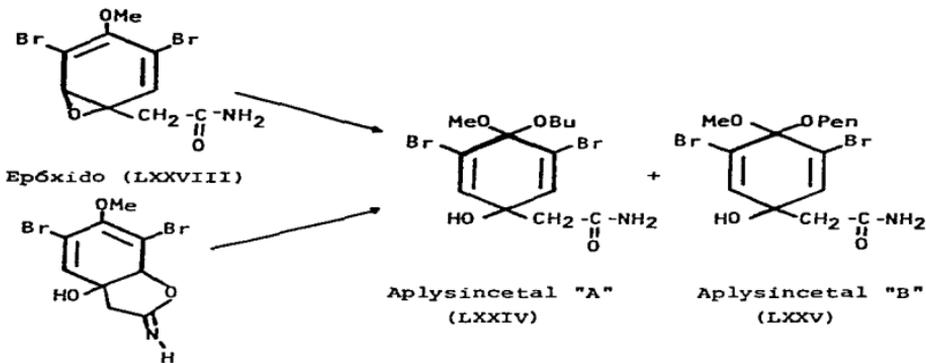


El epóxido propuesto LXXVIII se puede considerar como un posible precursor para otros metabolitos bromados ya que puede explicar la presencia de la 2,6-dibromo-4-acetamido-4-hidroxiciclohexadienona (XVI) en la Aplysina sp, mediante la ruptura de la función epóxido y la pérdida de un grupo metilo se puede llegar al compuesto XVI. La detección de la dienona XVI junto con la Aeroplysinina-2 (XX) en la esponja objeto del presente estudio, sugiere que la imina LXXIX también debe de considerarse como otro posible precursor para estos compuestos⁽⁴³⁾.



El que se haya obtenido al nuevo metabolito dibromado Aplysinimina (LXXI) en el presente estudio puede ser de gran interés puesto que apoyaría la hipótesis propuesta por Andersen y Faulkner, 1973 que sugieren que la imina LXXIX puede dar origen a varios de los compuestos dibromados obtenidos de las Aplysina^(4,3). La Aplysinimina (LXXI) podría provenir directamente del precursor hipotético LXXIX mediante una simple deshidratación del alcohol terciario para dar el anillo aromático.

Se puede visualizar que los nuevos cetales mixtos Aplysinicetal "A" (LXXIV) y Aplysinicetal "B" (LXXV) pueden derivarse de los precursores propuestos LXXVIII y LXXIX por la adición de n-butanol o n-pentanol durante su proceso de biosíntesis en la esponja o durante la extracción.



La Aeroplysinina-2 (XX) y el nuevo compuesto bromado al que se le llamó Aplysinólida (LXX) tienen en común el poseer dentro de su estructura el anillo de una γ -lactona; en el primer compuesto la γ -lactona esta saturada y en el segundo es α, β -no saturada. El origen de la Aeroplysinina-2 (XX) se puede explicar a partir del precursor hipotético imina LXXIX, si el grupo imino se sustituye por un carbonilo. No es posible hasta el momento dar una clara explicación sobre el origen del nuevo metabolito Aplysinólida (LXX) debido a que no existen antecedentes sobre compuestos bromados con dobles ligaduras exocíclicas en anillos lactónicos, por lo que su vía metabólica debe de ser diferente, al menos en su parte sustituida de la γ -lactona α, β -no saturada.

Actividad Antimicrobiana de los Compuestos Bromados

La resistencia de las esponjas a la descomposición bacteriana ha estimulado las investigaciones en búsqueda de posibles compuestos antimicrobianos. Dentro de la clase Demospongiae, la familia Aplysinidae se ha distinguido como de las que más tienen especies con actividad antimicrobiana, sus extractos regularmente inhiben el crecimiento de bacterias Gram-positivas, Gram-negativas y hongos; de los extractos crudos se ha logrado aislar, purificar y determinar la estructura molecular de los compuestos bioactivos.

De las esponjas del género Aplysina que se han estudiado químicamente los resultados revelan que la mayoría poseen metabolitos secundarios bromados, aunque existen ocasiones en las que no se logra aislar ningún tipo de compuesto halogenado como es el caso de Verongia sp de las costas de Brasil⁽⁵⁶⁾. Tal situación puede deberse a las variaciones estacionales que a veces afectan a los invertebrados bénticos; se ha propuesto que en ocasiones el grado de producción y actividad de los metabolitos secundarios dependen de las fluctuaciones estacionales en diferentes tiempos y lugares⁽⁸⁰⁾.

Los resultados de las pruebas de antibiología mostrados en la Tabla 6 indican que de los once compuestos dibromados aislados de Aplysina sp, solo tres mostraron tener la capacidad de inhibir el crecimiento de las bacterias patógenas bajo las condiciones experimentales del método del sensidisco utilizado. Estos compuestos que se encuentran descritos en la literatura son: la 2,6-dibromo-4-acetamido-4-hidroxiciclohexadienona (XVI), la 2,6-dibromo-4-hidroxi-4-metilencarbometoxiciclohexadienona (LXXII) y la Aeroplysinina-1 (XIX).

De las tres sustancias con actividad antimicrobiana, la acetamida XVI fue la que presentó la mayor actividad frente a las cuatro cepas: Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes, Salmonella typhi y

Shigella sonnei, a una concentración cuatro veces menor que la de los otros dos metabolitos XIX y LXXII. Estos dos últimos compuestos no fueron activos sobre S. pyogenes pero sí sobre las otras tres cepas de prueba; la aeroplysinina-1 (XIX) con una concentración idéntica a la del éster metílico (LXXII) de 200 µg/ml presentó mayores halos de inhibición que el compuesto dibromado LXXII.

Aunque ya han transcurrido algunos años desde que las sustancias antimicrobianas despertaron el interés de los investigadores, hasta el momento ninguna ha llegado a la etapa de uso clínico. Tal parece que es difícil su uso potencial como antibióticos debido a que químicamente estos compuestos como en el caso de Aplysina sp son ciclohexadienos bromados con grupos funcionales diversos tales como amidas, nitrilos, ésteres, lactonas, etc. los que poseen una toxicidad potencial para los humanos. Por otra parte aunque en las pruebas de inhibición en placa algunos metabolitos secundarios de esponjas son activos sobre una amplia variedad de microorganismos, estos no parecen tener una inhibición apreciable comparada con los antibióticos comerciales⁽⁸¹⁾.

A pesar del gran potencial que los océanos representan, la industria farmacéutica prefiere trabajar con materiales sintéticos, debido a que son más baratos de producir a nivel industrial y fáciles de patentar. La investigación, desarrollo y programas de pruebas clínicas necesarias para desarrollar un nuevo fármaco requiere un promedio de diez años y un alto costo de inversión. Es de suponer que la industria farmacéutica no va fácilmente a desarrollar nuevos medicamentos de origen marino debido en gran parte a los factores tiempo y presupuesto. El desarrollo de la Farmacología Marina probablemente será moderado, pero a pesar de todo, todavía se mantiene como un recurso para la obtención de sustancias bioactivas⁽⁸²⁾.

Tabla 6. Actividad Antimicrobiana de los Constituyentes Químicos aislados de *Aplysina* sp

Compuesto y Concentración	Microorganismo			
	<u>Staphylococcus aureus</u>	<u>Streptococcus pyogenes</u>	<u>Salmonella typhi</u>	<u>Shigella sonnei</u>
Acetamida (XVI)				
50 µg/ml	12	8	12	15
100 µg/ml	16	10	15	20
Aeroplysinina-1 (XIX)				
100 µg/ml	8	--	10	7
400 µg/ml	14	--	18	12
Aeroplysinina-2 (XX)				
400 µg/ml	--	--	--	--
Derivado bis-oxazolidona (XXIII)				
100 µg/ml	--	--	--	--
500 µg/ml	--	--	--	--
Fenilacetamida (XXXVI)				
100 µg/ml	--	--	--	--
500 µg/ml	--	--	--	--
Aplysinólida (LXX)				
100 µg/ml	--	--	--	--
500 µg/ml	--	--	--	--
Aplysinimina (LXXI)				
100 µg/ml	--	--	--	--
500 µg/ml	--	--	--	--
Ester Metílico (LXXXII)				
100 µg/ml	8	--	10	6
400 µg/ml	10	--	14	9
Acido Carboxílico (LXXXIII)				
100 µg/ml	--	--	--	--
400 µg/ml	--	--	--	--
Aplysincetal "A" (LXXXIV)				
100 µg/ml	--	--	--	--
400 µg/ml	--	--	--	--
Aplysincetal "B" (LXXXV)				
100 µg/ml	--	--	--	--
400 µg/ml	--	--	--	--

Probables Funciones Ecológicas de los Compuestos Bromados

Un aspecto positivo de la química de organismos marinos es el interés de determinar las funciones de los nuevos compuestos en el ambiente marino. Esto conduce a investigaciones interdisciplinarias que involucran a los Químicos, junto con los Biólogos y los Ecólogos Marinos, que al unir esfuerzos pueden fortalecer sus respectivas áreas del conocimiento.

Aplysina sp se encontró junto con dos especies del mismo género Aplysina sp 2 y Aplysina fistularis, las tres dominaban la comunidad de esponjas del fondo rocoso en esa parte de la Bahía de Puerto Escondido. Es importante resaltar que las tres especies de Aplysina crecían expuestas y sin señas de daño alguno, esta situación puede deberse a la producción de sustancias bioactivas que evitan o minimizan la perturbación que les pueden causar los depredadores móviles y/o a las defensas mecánicas de las mismas. Se ha puesto en evidencia que algunos metabolitos antibacterianos de esponjas ejercen efectos defensivos en contra de los organismos que se les acercan con fines alimenticios, las sustancias afectan a los depredadores en bajas concentraciones, al ser liberadas cuando son perturbadas las esponjas⁽⁶³⁾.

La exudación natural de sustancias antimicrobianas por parte de las esponjas marinas, se ha propuesto como un posible mecanismo para que las esponjas eviten el sobrecrecimiento de epibiontes y para prevenir el daño por parte de animales móviles; se ha observado que las esponjas que contienen compuestos antimicrobianos son las que soportan a pocos o ningún invertebrado marino⁽⁸⁴⁾. En concordancia con lo expuesto anteriormente, Aplysina sp que presentó actividad antimicrobiana, mostró tener su superficie externa libre de epibiontes, por lo que es posible considerar que los compuestos químicos aislados de la esponja podrían funcionar como sustancias antiepipíticas.

De igual manera, se ha propuesto que la exudación natural de sustancias químicas por parte de las esponjas puede ser el motivo por el que éstas puedan mantener zonas limpias a su alrededor^{85}. La propuesta anterior puede ser el posible mecanismo por el cual, en el momento de que se colectó a Aplysina sp del fondo rocoso de la Bahía de Puerto Escondido, ésta no estuviera rodeada por ningún otro invertebrado marino sésil.

CONCLUSIONES

1. Aplysina sp de Puerto Escondido, Oaxaca, a semejanza de la mayoría de las esponjas de este género, contiene compuestos bromados, los que manifiestan ser típicos del orden Verongidae.
2. Para el estudio de los constituyentes químicos de la esponja, se realizaron dos extractos: uno acuoso y otro metanólico. En total se aislaron once compuestos bromados, un estero^l y una mezcla de ácidos grasos.
3. Del extracto acuoso liofilizado se aisló únicamente un metabolito bromado, al que se identificó como la Aeroplysinina-2 (XX) que se caracteriza por tener dentro de su estructura el anillo de γ -lactona saturada, rasgo que se presenta en uno de los nuevos metabolitos bromados, la Aplysinólida (LXX).
4. El β -sitosterol se aisló tanto de la fase acuosa como de la metanólica. De todos los metabolitos aislados fue el más abundante con un peso de 3.65 g, es decir, aproximadamente 1000 veces más que el compuesto bromado más abundante que fue la 2,6-dibromo-4-acetamido-4-hidroxiciclohexadienona (XVI).
5. De la mezcla de ácidos grasos obtenidos de las fracciones no polares de la cromatografía del extracto metanólico, se logró identificar como ésteres metílicos a los pertenecientes a los ácidos palmítico, esteárico y oleico.
6. Del extracto metanólico de la esponja se aislaron la mayoría de los metabolitos secundarios, incluyendo a los nuevos compuestos bromados, los que se denominaron: Aplysinólida (LXX), Aplysinimina (LXXI), Aplysincetal "A" (LXXIV) y Aplysincetal (LXXV). De la cuatro sustancias dos son sólidos cristalinos: la Aplysinólida y el Aplysincetal "A"; el tamaño y el tipo del cristal del último compuesto permitieron confirmar su es

estructura como un cetal mixto por difracción de rayos X. El aislamiento de la Aplysínimina apoya la existencia del precursor propuesto imino-éter (LXXIX) que puede dar origen a varios de los compuestos extraídos de la Aplysina sp.

7. Del extracto metanólico se aislaron además las siguientes sustancias bromadas ya descritas en la literatura: 2,6-dibromo-4-hidroxi-4-metilencarbometoxiciclohexadienona (LXXII), 2,6-dibromo-4-hidroxi-4-metilencarboxiciclohexadienona (LXXIII), Aeroplysinina-1 (XIX), 3,5-dibromo-2-hidroxi-4-metoxifenilacetamida (XXXVI), 2,6-dibromo-4-acetamido-4-hidroxiciclohexadienona (XVI) y el derivado bis-oxazolidona (XXIII). El éster metílico (LXXII) y el ácido carboxílico (LXXIII) es la primera vez que se obtienen directamente de una esponja, anteriormente se habían aislado como productos de síntesis a partir de compuestos bromados extraídos de una Verongia. En cuanto al contenido en peso de los metabolitos bromados, la acetamida (XVI) fue la más abundante (40 mg) con respecto a las demás sustancias aisladas de la esponja; la presencia de éste último compuesto en la Aplysina junto con los demás metabolitos bromados, apoya la propuesta de que la 3,5-dibromotirosina puede ser el precursor biosintético de las sustancias bromadas que se han aislado de esponjas del género Aplysina (= Verongia).
8. Se evaluó la capacidad antimicrobiana de las sustancias aisladas de Aplysina sp con cepas de microorganismos patógenos. Se obtuvieron antibiogramas positivos en la inhibición de: Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes, Salmonella typhi y Shigella sonnei. Los resultados de los ensayos mostraron que la acetamida XVI, es el compuesto que presentó la mayor actividad sobre las cuatro cepas. La Aeroplysinina-1 (XIX) y el éster metílico LXXII no inhibieron el crecimiento de S. pyogenes, pero sí el de las otras tres; teniendo mayores halos de inhibición el compuesto XIX que el LXXII. La presencia de los metabolitos antimicrobianos en la Aplysina sp de Puerto Escondido, Oaxaca, puede ser la causa de que la esponja se colectará libre de epibiontes y sin señales de daños.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a las siguientes instituciones: Instituto de Ciencias del Mar y Limnología y al Instituto de Química, por su ayuda con sus instalaciones, material y equipo durante el transcurso de la presente investigación.

Quiero dar un especial reconocimiento a mi Profesor Dr. Gerardo Green (q.c.p.d.) por sus consejos y conducción de mis estudios de posgrado. Del mismo modo al Dr. Luis Soto y a la Dra. Guadalupe de la Lanza, por su cooperación durante la investigación. Al Dr. Artemio Gallegos y al Dr. Virgilio Arenas por sus sugerencias y comentarios al manuscrito, por lo mismo al Dr. Felipe Vázquez.

Este trabajo no hubiera sido posible sin la participación activa y directa del Dr. Tirso Ríos y del Dr. Leovigildo Quijano, que junto con los Drs. José Calderón y Federico Gómez-G. forman un equipo de trabajo en el Instituto de Química que es un ejemplo a seguir para los futuros investigadores.

A la Biól. Patricia Gómez, técnico académico del laboratorio de Farmacología Marina del ICMYL, por la identificación de las esponjas así como por la ayuda que siempre me ha brindado.

A los buzos Quím. Alfonso Mieres y P. Biól. Nestor López, por su ayuda en las salidas a campo y en la colecta del material biológico. Al Dr. Barbarin Arreguín del I.Q. por su ayuda instrumental.

A la Maestra Ruth Trejo, al M. en C. Ricardo Reyes, al QFB Edmundo Sierra y a la QB Cesiah Hernández, por su estímulo en la parte química experimental.

A mis compañeros del laboratorio de Farmacología Marina del ICMYL: Futuros Biólogos: Cruz Lozano, César Rodríguez, Gonzalo Sandoval, Luis Mitchell, J. Antonio Mercado, Ignacio González, Pedro Saucedo, Ma. Elena Barrón, Claudia Amaro y Betty Loiza.

Al M. en C. Raúl Gío-Arguez, coordinador del Proyecto Académico en Ciencias del Mar de la UACPyP del CCH y al M. en C. Arturo Contreras, auxiliar de la coordinación, por su atención en los trámites académico-administrativos.

LITERATURA CITADA

1. MINALE, L., 1976. Natural Product Chemistry of the Marine Sponges. Pure & Appl. Chem. 48: 7-23.
2. FAULKNER, D. J., 1984. Marine Natural Products: Metabolites of Marine Invertebrates. Natural Products Report 1(6): 551-598.
3. SHARMA, G. M. y P. R. BURKHOLDER, 1967. Studies on Antimicrobial Substances of Sponges. I. Isolation, Purification and Properties of a New Bromine-containing Antibacterial Substances. J. of Antibiotics, Ser. A. (Japan), 20(4): 200-205.
4. HASLAM, E., 1986. Secondary Metabolism- Fact o Fiction. Natural Products Report 3: 217-249.
5. BAKUS, G. J.; N. M. TARGETT y B. SCHULTE, 1986. Chemical Ecology of Marine Organisms: An overview. J. of Chemical Ecology 12(5): 951- 987.
6. BURKHOLDER, P. R. y K. RUETZLER, 1969. Antimicrobial Activity of Some Marine Sponges. Nature, Lond. 222: 983-984.
7. BAKUS, G. J., 1981. Chemical Defense Mechanisms and Fish Feeding Behavior on The Great Barrier Reef, Australia. Science 211: 497-499.
8. MAKARIEVA, T. N.; V. A. STONIK; P. A. ALCOLADO y Y. B. ELYAKOV, 1981. Comparative Study of the Halogenated Tyrosine Derivatives from Demospongiae (Porifera). Comp. Biochem. Physiol. 68B: 481-484.
9. GREEN, G., 1977. Ecology of Toxicity in Marine Sponges. Mar. Biol. 40: 207-215.
10. SCHMITZ, F. J.; K. H. HOLLENBEAK y D. C. CAMPBELL, 1978. Marine Natural Products: Halitoxin, a Toxic Complex of Several Marine Sponges of the Genus Haliclona. J. Org. Chem. 43: 3916-3922.
11. BURRESON, B. J.; P. J. SCHEUER; J. FINER y J. CLARDY, 1975. 9-isocyanopupekeanane, a Marine Invertebrate Allomone with a New Sesquiterpene Skeleton. J. Am. Chem Soc. 97: 4763- 4764.
12. CHARLES, C.; J. C. BREAKMAN; D. DALOZE; B. TURSCH y R. KARLSSON, 1978. Chemical Studies of Marine Invertebrates XXXII. Isodysidenin, a further Hexachlorinated Metabolite from the Sponge Dysidea herbacea. Tetrahedron Letters 1519-1520.
13. WALKER, R. P.; J. E. THOMPSON y D. J. FAULKNER, 1980. Sesterterpenes from Spongia idia. J. Org. Chem. 45(24): 4976-4979.

14. SCHULTE, G.; P. J. SCHEUER y O. J. McCONNELL, 1980. Two Furanosquiterpene Metabolites with Antifeedant Proprieties. Helv. Chim. Acta **63**: 2159-2167.
15. HAGADONE, M. R.; B. J. BURRENSEN; P. J. SCHEUER; J. FINER y J. CLARDY, 1979. Defense Allomones of the Nudibranch Phyllidia varicosa Lamarck 1801. Helv. Chim. Acta **62**: 2484-2494.
16. RINEHART, K. L.; P. D. SHAW; L. S. SHIELD; J. B. GLOER; G. C. HARBOUR; M. E. S. KOKER; D. SAMAIN; R. E. SCHWARTZ, A. A. TYMIAK; D. L. WELLER; G. T. CARTER; M. H. G. MUNRO; R. G. HUGHES; H. E. RENIS; E. B. SWYNENBERG, D. A. STRINGFELLOW; J. J. VAVRA; J. H. COATUS; G. E. ZURENKO; S. L. KUENTZEL; L. H. LI; G. J. BAKUS; R. C. BRUSCA; L. L. CRAFT; D. N. YOUNG y J. L. CONNOR, 1981. Marine Natural Products as Sources of Antiviral, Antimicrobial and Antineoplastic Agents. Pure & Appl. Chem. **53**: 795-817.
17. RAVI, B. N.; H. P. PERZANOWSKI; R. A. ROSS; T. R. ERDMAN; P. J. SCHEUER; J. FINER y J. CLARDY, 1979. Recent Research in Marine Natural Products: The Pupaenones. Pure & Appl. Chem. **51**: 1893-2000.
18. MINALE, L.; R. RICCIO y G. SODANO, 1974. Acanthellin-1, an Unique Isonitrile Sesquiterpene from the Sponge Acanthella acuta. Tetrahedron **30**: 1341-1343.
19. De SILVA, E. D. y P. J. SCHEUER, 1980. Manoalide, an Antibiotic Sesterterpenoid from the Marine Sponge Luffariella variabilis. Tetrahedron Letters 1611-1614.
20. SULLIVAN, B.; P. DJURA; D. E. McINTYRE y D. J. FAULKNER, 1981. Antimicrobial Constituents of the Sponge Siphonodictyon coralliphagum. Tetrahedron **37**: 979-982.
21. WRATTEN, S. J. y J. MEINWALD, 1981. Antimicrobial Metabolites of the Marine Sponge Axinella polycapella. Experientia **37**: 13-14.
22. HIGGS, M. D. y D. J. FAULKNER, 1978. Plakortin, an Antibiotic from Plakortis halichondrioides. J. Org. Chem. **43**:(18) 3454-3457.
23. STIERLE, D. B. y D. J. FAULKNER, 1979. Metabolites of the Marine Sponge Chondrosia collectrix. J. Org. Chem. **44**(6): 964-968.
24. McINTYRE, D. E.; D. J. FAULKNER; D. Van ENGEN y J. CLARDY, 1979. Renicrone, an Antimicrobial Metabolite from a Marine Sponge. Tetrahedron Letters 4163-4166.

25. CARTER, G. T. y K. L. RINEHART, 1978. Acarnidines, Novel Anti-viral Compounds from the Sponge Acarnus erithacus De Laubenfels. J. Am. Chem. Soc. 100(13): 4302-4304.
26. DJURA, P.; B. STIERLE; B. SULLIVAN; D. J. FAULKNER; E. ARNOLD y J. CLARDY, 1980. Some Metabolites of the Marine Sponges Smenospongia aurea and Smenospongia (Polyfibrospongia) echina. J. Org. Chem. 45(8): 1435-1441.
27. SHARMA, G. M. y P. R. BURKHOLDER, 1967. Studies on the Antimicrobial Substances of Sponges. II. Structure and Synthesis of a Bromine-containing Antibacterial Compound from a Marine Sponge. Tetrahedron Letters 42: 4147-4150.
28. BURKHOLDER, P. R., 1973. The Ecology of Marine Antibiotics and Coral Reefs. pp. 117-203. En: O. A. Jones y R. Endean (Eds.). Biology and Geology of Coral Reefs, Vol. II, Biology I. Academic Press, Nueva York.
29. Green, G., 1977. Antibiosis in Marine Sponges. FAQ, Fisheries Report 200: 199-205.
30. AL-OGILY, S. M. y E. W. KNIGHT-JONES, 1977. Antifouling Role of Antibiotics Produced by Marine Algae and Bryozoans. Nature 265: 728-729.
31. BAKUS, G. J.; B. SCHULTE; S. JHU; M. WRIGHT; G. GREEN y P. GOMEZ, 1986. Antibiosis and Antifouling in Marine Sponges: Laboratory vs Field Studies. 3d. International Conference on the Biology of Sponge. (En Prensa).
32. TARGETT, N. M.; S. S. BISHOP; O. J. McCONNELL y J. A. YODER, 1983. Antifouling Agents against the Marine Diatom Naviccola salinicula: Homarine from the Gorgonian Leptogorgia virgulata and L. setacea and analogs. J. Chem. Ecol. 9: 817-829.
33. JACKSON, J. B. C., 1977. Competition on Marine Hard Substrata: The Adaptive Significance of Solitary and Colonial Strategies. Am. Nat. 111: 743-767.
34. STOCKER, D., 1978. Resistance of a Tunicate to Fouling. Biol. Bull. 155: 615-626.
35. BUSS, L. W., 1976. Better Living Through Chemistry: The Relationship between Allelochemical Interactions and Competitive Networks. En: Aspects of Sponge Biology, F. W. Harrison (Ed.) pp. 315-318. Academic Press, Nueva York.
36. SARA, M. y J. VACELET, 1973. Ecologie des Démosponges. En: Traité de Zoologie, Anatomie, Systematique, Biology: Spongiaires, P. P. Grassé (Ed.) pp. 462-576, Masson Paris.

37. ALBERICCI, M.; J. C. BREAKMAN; D. DALOZE y B. TURSH, 1982. Chemical Studies of Marine Invertebrates. XLV. The Chemistry of Three Norsesterterpenes Peroxides from the Sponge Sigmosceptrella laevis. Tetrahedron 38: 1881-1890.
38. BASLOW, M. H., 1969. Marine Pharmacology. The Williams & Wilkins Co., Baltimore. pp. 86-99.
39. CIMINO, G.; S. De STEFANO; L. MINALE y G. SODANO, 1975. Metabolism in Porifera. III. Chemical Patterns and the Classification of the Demospongiae. Comp. Biochem. Physiol. 50B: 279-285.
40. KAZLAUSKAS, R.; R. O. LIDGARD; P. T. MURPHY y R. J. WELLS, 1980. Brominated Tyrosine-Derived Metabolites from the Sponge Ianthella basta. Tetrahedron Letters 21: 2277-2280.
41. CHANG, C. W. J. y A. J. WEINHEIMER, 1977. 2-hydroxy-3,5-dibromo-4-methoxyphenylacetamide. A Dibromotyrosine Metabolite from Psammoposilla purpurea. Tetrahedron Letters 4005-4008.
42. SHARMA, G. M.; B. VIG y P. R. BURKHOLDER, 1970. Antimicrobial Substances from Sponges. IV. Structure of a Bromine-containing Compound from a Marine Sponge. J. Org. Chem. 35(8): 2823-2826.
43. ANDERSEN, R. J. y D. J. FAULKNER, 1973. Novel Antibiotic from a Sponge of the Genus Verongia. Tetrahedron Letters 1175-1178.
44. FATTORUSSO, E.; L. MINALE y G. SODANO, 1972. Acroplysinin-1, An Antibacterial Bromo-Compound from the Sponge Verongia aerophoba. J. Chem. Soc. Perkin Trans. I. 16-18.
45. FULMOR, W.; G. E. Van LEAR; G. O. MORTON y R. O. MILLS, 1970. Isolation and Absolute Configuration of the Acroplysinin-1 Enantiomorphic Pair from Ianthella ardis. Tetrahedron Letters 4551-4552.
46. COSULICH, D. B. y F. M. LOVELL, 1971. An X-Ray Determination of an Antibacterial Compound from the Sponge Ianthella ardis. J. Chem. Soc. Chem. Comm. 397-398.
47. MINALE, L.; G. SODANO; R. W. CHAN y A. M. CHEN, 1972. Acroplysinin-2, a Dibromolactone from Marine Sponges Aplysina (Verongia) aerophoba and Ianthella sp. J. Chem. Soc. Chem. Comm. 674-675.
48. FATTORUSSO, E.; L. MINALE; G. SODANO; K. MOODY y R. H. THOMSON, 1970. Aerothionin, a Tetrabromo-compound from Aplysina aerophoba and Verongia thiona. J. Chem. Soc. Chem. Comm. 752-753.

49. MOODY, K.; R. H. THOMSON; E. FATTORUSSO; L. MINALE y G. SODANO, 1972. Aerothionin and Homoaerothionin: Two Tetrabromospiro-cyclohexadienylisoaxolols from Verongia sponges. J. Chem. Soc. Perkin Trans. I. 18-24.
50. BORDERS, D. B.; G. O. MORTON y E. R. WETZEL, 1974. Structure of a Novel Bromine Compound Isolated from Sponge. Tetrahedron Letters 2709-2712.
51. KREJCAREK, G. E.; R. H. WHITE; L. P. HAGER; W. O. McCLURE; R. D. JOHNSON; K. L. RINEHART; J. A. McMILLAN; J. C. PAUL; P. D. SHAW y R. C. BRUSCA, 1975. Rearranged Dibromotyrosine Metabolite from Verongia aurea. Tetrahedron Letters 597-510.
52. CHIB, J. S.; M. F. STEMPIEN; R. A. MIERZWA; G. D. RUGGIERI y R. F. NIGRELLI, 1978. Physiologically Active Substances from Sponges. V. Isolation of Physiologically Active Compounds from the Sponge Verongia archeri. J. Pharm. Sci. 67(2): 264-265.
53. GOO, Y. M. y K. L. RINEHART, 1977. Structure and Bioactivities of Verongia aurea Components. Drug-Food Sea Myth or Reality? (Int. Symp.) (Pub. 1978), pp. 107-115. Kaul, P. N. y C. J. Sindermann (Eds.), Univ. Oklahoma: Norman, Okla.
54. HOLLENBEAK, K. H.; F. J. SCHMITZ; P. N. KAUL y K. S. KULKARNI, 1977. A Dual Adrenergic Compound from the Sponge Verongia fistularis. Drugs-Food Sea Myth or Reality? (Inter. Symp.) (Pub. 1978) pp. 81-87. Kaul, P. N. y C. J. Sindermann (Eds.), Univ. Oklahoma: Norman, Okla.
55. GOPICHAND, Y. y F. J. SCHMITZ, 1979. Marine Natural Products: Fistularin 1, 2 and 3 from the Sponge Aplysina fistularis forma fulva. Tetrahedron Letters 3921-3924.
56. KELECOM, A. y G. J. KANNENGIESSER, 1979. Chemical Constituents of Verongia Sponges. II. Structure of Two Dibrominated Compounds Isolated from the Mediterranean Sponge Verongia aerophoba. An. Acad. Brasil. Cienc. 51(4): 638-642.
57. D'AMBROSIO, M.; A. GUERRIERO; P. TRALDI y F. PIETRA, 1982. Cavernicolin-1 and Cavernicolin-2, Two Epimeric Dibromolactams from the Mediterranean Sponge Aplysina (Verongia) cavernicola. Tetrahedron Letters 23: 4403-4406.
58. CIMINO, G.; S. De ROSA; S. De STEFANO; S. SELF y G. SODANO, 1983. The Bromo-Compounds of the True Sponge Verongia aerophoba. Tetrahedron Letters 24: 3029-3032.
59. D'AMBROSIO, M.; A. GUERREIRO; R. De CLAUSER; G. De STANCHINA y F. PIETRA, 1983. Dichloroverongiaquinol, a New Marine Antibacterial Compound from Aplysina cavernicola. Isolation and Synthesis. Experientia 39(10): 1091-1092.

60. D'AMBROSIO, M.; A. GUERREIRO y F. PIETRA, 1984. Novel, Racemic or Nearly-racemic Antibacterial Bromo and Chloroquinols and γ -lactams of the Verongiaquinol and the Cavernicolin type from the Marine Sponge Aplysina (Verongia) cavernicola. Helv. Chim. Acta **67**(6): 1484-1492.
61. GUERRIERO, A.; M. D'AMBROSIO; P. TRALDI y F. PIETRA, 1984. On the First Marine Natural Product Having Low Enantiomeric Purity. Naturwissenschaften **71**(8): 425-426.
62. DAMAZO Del RIO, M., 1984. Aislamiento e Identificación de las Sustancias Antimicrobianas de la Esponja Marina Aplysina sp. Tesis Profesional, ENEP-Zaragoza, UNAM.
63. D'AMBROSIO, M.; C. MEALLI; A. GUERREIRO y F. PIETRA, 1985. 7-bromocavernicolenone, a New α -bromocnone from the Mediterranean Sponge Aplysina (Verongia) cavernicola. Implied, Unprecedented Involvement of a Halogenated Dopa in the Biogenesis of a Natural Product. Helv. Chim. Acta **68**: 1453-1461.
64. De LUCA, P.; M. De ROSA; L. MINALE y G. SODANO, 1971. Marine Sterols with a New Pattern of Side-chain Alkylation from the Sponge Aplysina aerophoba. J. Chem. Soc. Perkin Trans. I. 2132-2135.
65. KOKKE, W. C. M. C.; W. FENICAL; C. S. PAK y C. DJERASSI. 1978. Minor and Trace Sterols in Marine Invertebrates. IX. Verongulasterol, a Marine Sterol with a Novel Side Chain Alkylation Pattern. Tetrahedron Letters 4373-4376.
66. KOKKE, W. C. M. C.; C. S. PAK; W. FENICAL y C. DJERASSI, 1979. Minor and Trace Sterols in Marine Invertebrates. XII. Occurrence of 24(R+S)-isopropenylcholesterol, 24(R+S)-methylcholesta-5-25-dien-3 β -ol and 24(R+S)-methylcholesta-7,25-dien-3 β -ol in Caribbean Sponge Verongia cauliformis. Helv. Chim. Acta **64**(4): 1310-1318.
67. CZECZUGA, B., 1971. Investigations of Carotenoids in Some Fauna of the Adriatic Sea. I. Verongia aerophoba. Mar. Biol. **10**(1): 254-257.
68. FATTORUSSO, E.; S. FORENZA; L. MINALE y G. SODANO, 1971. Isolation of 3,4-dihydroxyquinoline-2-carboxylic acid from Aplysina aerophoba. Gazz. Chim. Ital. **101**(1): 104-105.
69. HOLLENBEAK, K. H.; F. J. SCHMITZ y P. N. KAUL, 1974. Cardiotonic Agents from Marine Sponges. Isolation of Histamine and N-methylated Histamines. Food-Drugs Sea Proc. (Conf.) 4th (Pub. 1976) pp. 282-287, H. H. Weber y G. D. Ruggieri (Eds.). Mar. Technol. Soc., Washington, D.C.
70. HOLLENBEAK, K. H. y F. J. SCHMITZ, 1977. Aplysinopsin: Antineoplastic Tryptophan Derivative from the Marine Sponge Verongia spengelli. Lloydia **40**(5): 479-481.

71. SALCEDO, S. M., 1984. Estudio de las Comunidades Bénticas Asociadas a la facies rocosa en la Región de Zihuatanejo, Gro. Tesis de Maestría, UACPyP-CCh, UNAM. 242 pp.
72. GRIVEL-PIÑA, F., 1987. Calendario Gráfico de Mareas: Acapulco, Gro.; Puerto Angel, Oax.; Salina Cruz, Oax. y Puerto Madero, Chis. Instituto de Geofísica, UNAM.
73. CIMINO, G.; S. De ROSA; S. De STEFANO; A. SPINELLA y G. SODANO, 1984. The Zoochrome of the Sponge Verongia aerophoba: Uranidine. Tetrahedron Letters 25(27): 2925-2928.
74. BEYNON, J. H., 1960. Mass Spectrometry and its Applications to Organic Chemistry. Elsevier Publishing Co. Amsterdam.
75. FENICAL, W., 1981. Natural Halogenated Organics. En: Marine Organic Chemistry, E. K. Duursma y R. Dwason (Eds.). Elsevier Oceanographic Series. The Netherlands pp. 375-393.
76. TYMIK, A. A. y K. L. RINEHART, 1981. Biosynthesis of Dibromotyrosine Derived Antimicrobial Compounds by the Marine Sponge Aplysina fistularis (Verongia aurca). J. Amer. Chem. Soc. 103(22): 6763-6765.
77. STALLARD, M. O. y D. J. FAULKNER, 1974. Chemical Constituents of the Digestive Gland of the Sea Hare Aplysia californica II. Chemical Transformations. Comp. Biochem. Physiol. 49B: 37-41.
78. FAULKNER, D. J. y R. J. ANDERSEN, 1974. Natural Products Chemistry of the Marine Environment. pp. 679-714. En: The Sea E. Goldberg (ed.). vol. 5 cap. 19. John Wiley & Sons, Nueva York.
79. STALLARD, M. O. y D. J. FAULKNER, 1974. Chemical Constituents of the Digestive Gland of the Sea Hare Aplysia californica I. Importance of the Diet. Comp. Biochem. Physiol. 49B: 23-25.
80. BAKUS, G. J. y G. GREEN, 1974. Toxicity in Sponges and Holothurians: A Geographic Pattern. Science 185: 951-953.
81. YOUNGKEN, H. W. Jr. y Y. SHIMIZU, 1975. Marine Drugs: Chemical and Pharmacological Aspects. pp. 269-317. En: Chemical Oceanography, J. P. Riley y G. Skirrow (Eds.). vol. 4, cap. 23 2a. Edición. Academic Press Londres.
82. BARTON, R., 1980. The Ocean as a New Drug Source. pp. 190-191. En: The Oceans. Facts on File. Nueva York.
83. THOMPSON, J. E., R. P. WALKER y D. J. FAULKNER, 1985. Screening and Bioassays for Biologically-Active Substances from Forty Marine Sponges Species from San Diego, Cal. USA. Mar. Biol. 88: 11-21.

84. WALKER, R. P.; J. E. THOMPSON y D. J. FAULKNER, 1985. Exudation of Biologically-Active Metabolites of the Sponge Aplysina fistularis. II. Chemical Evidence. Mar. Biol. **88**: 27-32.
85. THOMPSON, J. E., 1985. Exudation of Biologically-Active Metabolites of the Sponge Aplysina fistularis. I. Biological Evidence. Mar. Biol. **88**: 23-26.