

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

ZARAGOZA

Obtención de un extracto con actividad biológica de la esponja marina

Desmapsamma anchorata

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

GÓMEZ FLORES NORMA

DIRECTOR: DR. MANUEL JIMÉNEZ ESTRADA

ASESOR: QFB. EVANGELINA MERCADO MARÍN

MÉXICO D.F.

2008



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.

ÍNDICE GENERAL

-RESUMEN.....	i
-LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	ii
-ÍNDICE GENERAL.....	iv
-CONTENIDO.....	iv
-LISTA DE ESTRUCTURAS DE COMPUESTOS QUÍMICOS.....	vi
-LISTA DE TABLAS.....	viii
-LISTA DE FIGURAS.....	ix
- LISTA DE ESPECTROS.....	xi
-GLOSARIO.....	xii

CONTENIDO

ÍNDICE	Páginas
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	1
2.1 ESPONJAS MARINAS	2
2.1.1 Taxonomía	2
2.1.2 Morfología y fisiología	3
2.1.3 Distribución	5
2.1.4 Estudio químico	5
2.1.5 Estudio biológico	10
2.2 ESPONJAS MARINAS QUE PRESENTAN COMPUESTOS CON ACTIVIDAD CITOTÓXICA.	14
2.3 <i>Desmapsamma anchorata</i>	23
2.3.1 Taxonomía	23
2.3.2 Morfología y fisiología	23
2.3.3 Distribución	24
2.3.4 Estudio químico	24
2.4 CROMATOGRAFÍA	28
2.4.1 Definición	28

2.4.2	Fundamento	28
2.4.3	Clasificación	28
2.4.3.1	Cromatografía en columna	31
2.4.3.2	Cromatografía plana	33
3.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	37
4.	OBJETIVOS	38
4.1	Objetivo general	38
4.2	Objetivos particulares	38
5.	HIPÓTESIS	38
6.	METODOLOGÍA	39
6.1	OBTENCIÓN DE EXTRACTOS	40
6.1.1	Colecta de la esponja	40
6.1.2	Liofilización	40
6.1.3	Extracciones	42
6.1.4	Fracciones	42
6.1.4.1	Fraccionamiento del extracto crudo de Hexano	44
6.1.4.2	Fraccionamiento del extracto crudo de Diclorometano	44
6.1.4.3	Fraccionamiento del extracto crudo de Metanol	44
6.1.4.3.1	Fracción de Diclorometano	44
6.1.4.3.2	Fracción de Metanol	45
6.1.4.3.3	Fracción de Agua	45
6.1.4.4	Extracto crudo de Etanol:agua (80:20)	45
6.1.4.5	Extracto crudo de agua	45
6.2	PRUEBA BIOLÓGICA: CITOTOXICIDAD	47
7.	RESULTADOS	49
7.1	Estudio químico	49
7.2	Estudio de citotoxicidad	60
8.	DISCUSIÓN	63
8.1	Estudio químico	63
8.2	Estudio de citotoxicidad	81
9.	CONCLUSIONES	85
10.	RECOMENDACIONES	86
11.	REFERENCIAS	87
12.	ANEXOS	93

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

CONAPESCA	Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.
INEGI	Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática
OMS	Organización Mundial de la Salud
CO₂	Dióxido de carbono (hielo seco)
CCF	Cromatografía en Capa Fina
CC	Cromatografía en Columna
CPP	Cromatografía en Placa Preparativa
CCFC	Cromatografía en Capa Fina Centrífuga
CCen	Cromatografía Centrífuga
CLAR	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
HPLC	High Performace Liquid Chromatography
TLC	Thin-layer chromatography
Hex	Hexano
CH₂Cl₂	Diclorometano
CHCl₃	Cloroformo
AcOEt	Acetato de etilo
MeOH	Metanol
EtOH	Etanol
H₂O	Agua
SiO₂	Gel de sílice
H₂SO₄	Ácido sulfúrico
SRB	Sulforodamina B
v/v	Volúmen/volúmen
p. f.	Punto de fusión
UV	Ultravioleta
IR	Infrarrojo
RMN	Resonancia Magnética Nuclear

EM	Espectrometría de Masas
CLAR/EM	Cromatografía Líquida de Alta resolución acoplado a Espectrometría de Masas
CG/EM	Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas
TMS	Tetrametilsilano
mbar	Milibar
nm	Nanómetros
rpm	Revoluciones por minuto
MHz	Mega Hertz
m/z	Relación masa/carga
δ	Desplazamiento químico
s	Singulete
d	Doblete
t	Triplete
c	Cuadruplete
dd	Doble de doble
m	Multiplete
cm⁻¹	Número de onda, frecuencia
%IC	Por ciento de Inhibición de Crecimiento
IC₅₀	Inhibición de Crecimiento al 50% (concentración que causa una inhibición o reducción del 50%)
LD₅₀	Lethal dose to 50 (dosis letal a 50)
EDTA	Ácido etilendiaminetetraacético
SNC	Sistema Nervioso Central

LISTA DE ESTRUCTURAS DE COMPUESTOS QUÍMICOS

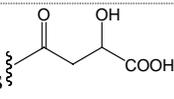
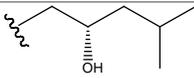
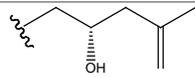
No.	Nombre	Pág.
1	Ácido 4,8,12-trimetiltridecanoico	6
2	Ácido 12,12-dimetiltridecanoico	6
3	Ácido (15,19,23-tiemetiltetracosa-5,9,17-trienoico	6
4	2,3-dihidroxipropil hidrogen-2-(metilamino) etilenfosfanato	6
5	Ciclopentanoperhidrofenantreno	7
5a	Colesterol	7
5b	22-dehidrocolesterol	7
5c	Campesterol	7
5d	Clionasterol	7
5e	Petrosterol	7
5f	Dihidrocalisterol	7
6	9-11-secoesterol	8
7	Discorhabdin P	8
8	Exiguamida	8
9	Hexahidroxantena polibromado	8
10	Polimastianida	9
11	Epoxi esterol	9
12	Sulfato de halistanona	9
13	Swenhosterol A (4-metilen secosteroide)	9
14	Agosterol A	10
15	24-isopropil colesterol	10
16	Ácido amfímico	10
17	Ácido 9,13-dimetiltetradecanoico	10
18	Halistanol	11
19	1- <i>O</i> -(3' <i>Z</i> -octadecenil)- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoclolina	11
20	Oceanapisida	11
21	Plakortone G	11
22	Clatriol	11
23	Clathesterol	12
24	Depsipeptido ciclico	12
25	Neamfamida A	12
26	Ácido 3,5,15,trimetil-7-metilen haxadeca-2,10,12-trienoico	12
27	Ácido 6,8,10,13-tetrametil pentadeca-2,4,6,8,12,14 -hexaenoico	12
28	Ácido 7,9,14-trimetil hexadeca-2,4,8,10-tetranoico	12
29	Esterol sestriterpeno	13
30	Ciclo (6-bromo triptofan) arginina	13
31	Hamacanthin	13
32	Deositopsentin	13
33	Estructura base del Chondropsin.	14
33a	Chondropsin A	14
33b	Chondropsin C	14
33c	Pocillastrins B	14
33d	Pocillastrins C	14
34	Chondropsin D	15

35	Poecillantín A	16
36	Pirrol carboxaldehidos	16
	36a Micalazal-12	16
	36b Micalazal-3, micalazal-7 y micalazal-10	16
37	4-sulfato esfingosina	17
38	Triterpenos monosacáridos	17
	38a Esteletin ribosida	17
	38b Esteletin A	18
	38c Esteletin B	18
39	Exiguamida	18
40	12- <i>O</i> -deacetilnorscalaral B	18
41	Norsesterterpeno	19
42	Mimosamycin	19
43	Topsentolida	20
44	Feroxosidas	20
	44a Feroxosida A	20
	44b Feroxosida B	20
45	Isoquinolinas	21
	45a N-formil-1,2-dihidrorenierona	21
	45b O-demetilrenierona	21
	45c Mimosamicin	21
46	Ciclonellin	21
47	Psammaplin A	22
48	Hyrtinadina A	22
49	Ácidos grasos, Carballeira <i>et. all.</i> (1988)	25
	49a 7-metil-8-hexadecenoico	25
	49b 14-metil-8-hexadecenoico	25
	49c 3-metilheptadecanoico	25
50	Ácidos grasos, Carballeira <i>et. all.</i> (1994)	26
	50a ácido 5, 13- eicosadienoico	26
	50b 7-metil-6(E)-hexadecenoico	26
	50c 7-metil-6(Z)-hexadecenoico	26
51	Monoéter alquil de glicerol	26
52	Alquinos pirrol carboxaldehidos	27
	52a 5-(13-metil tetradecil)-1-pirrol-2-carbaldehido	27
	52b 5- (heneicos-12-en-il)-1-pirrol-2-carbaldehido	27
	52c 5-(alquil nitrilo)-1-pirrol-2-carbaldehido	27
53	Dotriacont-16-eno	70
54	Ácido tetracosanoico	77
55	Ácido tricosanoico	77
56	Ácido heptadecanoico	77
57	Ácido palmítico	77
58	Mono glicérido	82
59	Estructura base de ácido graso	82
60	Ácido (5Z,9Z)-14-metil-5,9-pentadecadienoico	83
61	Ácido metil-6,9,12-trimetiltetradeca-2,4,8,10-tetraenoico	82
62	Ácido metil-4,6-dimetilhexadeca-2,4-dienoico	83

LISTA DE TABLAS

Tabla	Pág.
1 Compuestos aislados de diferentes esponjas	8
2 Compuestos con actividad biológica, aislados de esponjas marinas.	11
3 Clasificación de los métodos cromatográficos en columna.	31
4 Características físicas del extracto (1) .	49
5 Características físicas de la muestra 1a-1 .	49
6 Características físicas de las muestras 1a-3, 1a-4 y 1a-5 .	50
7 Comparación de datos de RMN de ¹³ C obtenidos de la muestra 1a-4 , con reportados en el catálogo SADTLER (1985)	51
8 Características de la muestra 1b-1 .	51
9 Punto de fusión de los sólidos precipitados de 1b-1 .	52
10 Características físicas del extracto con CH ₂ Cl ₂ (2) .	53
11 Características de la muestra 2-1 .	53
12 Características de la muestra de la fracción de CH ₂ Cl ₂ (3a) , obtenida del extracto crudo de metanol (3) .	54
13 Características físicas de la fracción 3a-III (obtenida de la fracción de CH ₂ Cl ₂ (3a)).	55
14 Características físicas de las muestras obtenidas del fraccionamiento de 3a por CCen.	55
15 Características de la fracción de metanol 3b , obtenida del extracto crudo de metanol (3) .	57
16 Características físicas de las muestras (3b-VI, 3b-VIII y 3b-IX) obtenidas del fraccionamiento de 3b por CPP.	57
17 Características de la muestra soluble en metanol, 4b .	58
18 Características físicas de las muestras sólidas de las fracciones 3, 4 y 5 .	59
19 Citotoxicidad del extracto de metanol (3b) expresado en %IC.	60
20 Citotoxicidad de la fracción 3b-VI expresado en %IC.	60
21 Citotoxicidad del extracto 3a-III .	61
22 Citotoxicidad de las fracciones 3a-C, 3a-K y 3a-P .	61
23 Citotoxicidad del extracto 1b-1 .	62
24 Diámetro de inhibición de los compuestos aislados de <i>S. aureus</i> y <i>B. subtilis</i> .	84

LISTA DE FIGURAS

Figura		Pág.
1	Diferentes tipos de espículas que se encuentran en las esponjas marinas (Imagen obtenida de la página web http://www.biblioweb.dgsca.unam.mx/cienciasdelmar/anales_i/ins_inx.htm)	2
2	Estructura de las esponjas, de acuerdo al tipo de organización. (Imagen obtenida de la página web http://www.uco.es/dptos/zoologia/zoolobiolo_archivos/practicas/practica_3/poriferos_botton.htm)	3
3	Morfología de la esponja marina, de organización ascon. (Imagen obtenida en la página web http://www.naturenotes.org/notes/dbiologia/biologia_poliferos.htm).	4
4	Estructura de algunos ácidos grasos presentes en las esponjas.	6
5	Estructura del fosfolípido reportado en las esponjas marinas	6
6	Estructura de algunos esteroides reportado en esponjas marinas.	7
7	Estructura base del Chondropsin.	14
8	Estructura del chondropsin D, donde R es 	15
9	Estructura del poecillantín A	16
10	Compuesto con actividad citotóxica aislado de <i>M. cecilia</i> . 36a compuesto con mayor actividad. 36b derivados, donde n (CH ₂) varía de 8, 10 y 12.	16
11	4-sulfato esfingosina, aislada de la esponja <i>S. abata</i> .	17
12	Compuestos Triterpenos monosacárido (<i>Stelliferin</i>).	14
13	Exiguamide (donde R= -NHCHO, -NHCO ₂ CH ₃ , -NHCO ₂ CH ₂ N(CH ₃)CH ₂ COOCH ₃ , NC).	14
14	Estructura del 12- <i>O</i> -deacetilnorscalaral B.	14
15	Estructura del norsesterterpeno.	19
16	Estructura del mimosamicin	19
17	Estructura del topsentolide.	20
18	Estructura del feroxosidas, donde R es  feroxosida A (44a) y R es  para feroxosida B (45b).	20
19	Estructura de isoquinolinas (45a N-formil-1,2-dihidrorenierona, 45b O-demetilrenierona, 45c mimosamicin).	21
20	Estructura del ciclonellin	21
21	Estructura de psammaplín A.	22
22	Estructura del hyrtinadina A.	22
23	<i>Desmapsamma anchorata</i> (Fotos obtenidas de la página web http://acd.ufrj.br/labpor/5-Imagens/Bahia/Pgsa02eh.htm)	24
24	Estructura de ácidos grasos reportados por Carballeira, 1988.	25
25	Estructura de ácidos grasos reportado por Carballeira, 1994.	26
26	Estructura del monoéter alquil de glicerol, donde n = CH ₂ varía desde 13 hasta 20 (Quijano, 1994).	26
27	5-(13-metil tetradecil)-1-pirrol-2-carbaldehído (5a), 5-(heneicos-12-en-il)-1-pirrol-2-carbaldehído (5b) <i>D. anchorata</i> . 5-(alquil nitrilo)-1-pirrol-2-carboldehído (5c) <i>M. microsignatosa</i> .	27
28	Técnica de cromatografía en placa preparativa, CPP.	34
29	Chromatotron (Imagen obtenida de la página web http://www.harrisonresearch.com/chromatotron/specs.html .)	35
30	Teoría de operación de la cromatografía de capa fina centrífuga. (Imagen obtenida de la página web http://www.harrisonresearch.com/chromatotron/specs.html .)	35
31	Lugar de muestreo de la esponja: Sistema arrecifal Veracruzano, arrecife de Santiaguillo	41
32	Obtención de extractos crudos y fracciones de la esponja <i>D. anchorata</i> .	43
33	Fraccionamiento de extracto de metanol 3a .	46

34	Comparación de un estándar de colesterol (Col) con los sólidos obtenidos del fraccionamiento del extracto de hexano. Fase móvil = AcOEt:Hex (1:1). Rx= 1 (colesterol).	52
35	Fraciones (2-1 a la 2-16) obtenidas del fraccionamiento del extracto crudo de CH ₂ Cl ₂ (2) por CC. Fase móvil AcOEt:Hex (1:1)	54
36	Cromatograma de la fracción del metanol, 3a-III .	55
37	Cromatograma de la fracción 3a-C .	56
38	Espectros de colesterol, 38a (A) : catalogo SADTLER, 38b (B) : muestra 1a-4 .	64
39	Espectro de RMN ¹ H de la muestra 1b-1. (C)	66
40	Espectro de RMN ¹³ C de la muestra 1b-1. (D)	67
41	Espectro de IR de la muestra 1b-1. (E)	68
42	Espectro de EM de la muestra 1b-1. (F)	69
43	Estructura del dotriacont-16-eno	70
44	Espectro de RMN- ¹ H de la muestra 3a-C. (G)	73
45	Espectro de RMN- ¹³ C de la muestra 3a-C. (H)	74
46	Espectro de IR de la muestra 3a-C. (I)	75
47	Espectro de EM de la muestra 3a-C. (J)	76
48	Estructura de ácidos carboxílicos lineales aislados de <i>D. anchorata</i> .	77
49	Estructura base del mono glicérido, aislado de <i>Ibervillea sonarae</i> .	82
50	Estructura base de ácido graso, aislado de <i>Ibervillea sonarae</i> .	82
51	Estructura del ácido graso aislado, (5Z,9Z)-14-metil-5,9-pentadecadienoico de <i>Eunicea succinea</i> .	82
52	Estructura de ácidos grasos, aislados de las esponjas <i>Nudospongilla</i> sp. <i>Ephydatia syriaca</i> , <i>Cortispongilla barroisi</i> .	83
53	Espectro de RMN de ¹ H de la muestra 2-1. (K)	93
54	Espectro de IR de la muestra 2-1. (L)	94
55	Espectro de EM de la muestra 2-1. (M)	95

LISTA DE ESPECTROS

Espectros		Pág.
A	Espectros de colesterol, 38a : muestra 1a-4 .	64
B	Espectros de colesterol, catalogo SADTLER, 38b :	64
C	Espectro de RMN ^1H de la muestra 1b-1 .	66
D	Espectro de RMN ^{13}C de la muestra 1b-1 .	67
E	Espectro de IR de la muestra 1b-1 .	68
F	Espectro de EM de la muestra 1b-1 .	69
G	Espectro de RMN- ^1H de la muestra 3a-C .	73
H	Espectro de RMN- ^{13}C de la muestra 3a-C .	74
I	Espectro de IR de la muestra 3a-C .	75
J	Espectro de EM de la muestra 3a-C .	76
K	Espectro de RMN de ^1H de la muestra 2-1 .	93
L	Espectro de IR de la muestra 2-1 .	94
M	Espectro de EM de la muestra 2-1 .	95

GLOSARIO

Ascon.	Nivel básico de organización corporal de una esponja.
Atrio.	Poros que desembocan en la cavidad interior, (el espongocele o atrio), que a su vez se abre al exterior a través del ósculo , una amplia abertura situada en el extremo superior del tubo
Citotóxico.	(<i>Cito</i> = célula; <i>toxicum</i> = veneno). Que posee la acción de una citotóxina (sustancia que produce la disgregación o disolución de determinados elementos celulares).
Corales.	Individuos marinos pertenecientes a los cnidarios clase anthozoa, en los cuales domina la forma de pólipo (<i>poli</i> = muchos y <i>pos</i> = pies) aislados o grandes colonias, algunos con exoesqueleto tubiforme de carbonato de calcio, cavidad gastrovascular dividida por septos radiales.
Cnidarios.	Animales invertebrados marinos, pertenecen al grupo de los <i>Phylum</i> . Sus células se han especializado, por lo que disponen ya de células musculares, sensoriales y nerviosas; posee una cavidad gastro-vascular (digestión extracelular), por ejemplo las hidras, medusas, corales o anémonas (<i>cnidos</i> hace referencia a su poder urticante).
Coanocítica.	Célula provista de un collar en forma de embudo que rodea la base de un flagelo.
Competitivas.	Relación entre dos organismos que tienen que recurrir a uno o más intermediarios para poder abordar a sus huéspedes, depredando sus competidores y enemigos.
Espículas.	Esqueleto que sostiene a las esponjas evitando el cierre de canalículos y las cámaras.
Gorgonias.	Animal invertebrado marino que pertenece al grupo de los cnidarios (<i>phylum</i>), tiene aspecto de arbusto, cada colonia de pólipos (<i>poli</i> = muchos y <i>pos</i> = pies) viven sobre una estructura córnea flexible de forma arborescente e irregular que ellos mismos segregan y que, en algunos casos, llega a tener un metro de alto por uno de ancho.
Hidrozoos.	Animales marinos que integran los cnidarios de <i>phylum</i> , su pequeñísimo tamaño (desde unos pocos milímetros, de los individuos más pequeños, a poco más de diez centímetros de los más grandes), los hace los cnidarios menos conocidos.
Leucon.	Grado más alto de complejidad estructural de las esponjas, los canales radiales se pliegan para formar cámaras.
Mesohilo	Estructura que se encuentra debajo del pinacodermo formado por una matriz gelatinosa de proteína que contiene material esquelético y células ameboides.
Metazoos.	Organismos pluricelulares, móviles y heterótrofos que pasan por un estado de blástula en el curso de su desarrollo embrionario.
Mutualísticas.	Servicio mutuos entre dos organismos que se pueden separar. Mutuos beneficios para ambas especies.
Ósculo.	Orificios que conduce hacia el exterior el agua que penetra.
Ostos.	Abertura de la pared corporal por la que penetra el agua.
Oxas.	Espículas con un solo eje de crecimiento dos radios y ambos extremos afilados o engrosados.
Pinacodermo	La superficie exterior cubierta por células aplanadas, denominadas pinacocitos, que segregan el material que fija la esponja al sustrato.
Rayos.	Puntas de las espículas.
Sésil.	Se usa en zoología para referirse a un organismo acuático que crece adherido, agarrado o arraigado en su sustrato, del que no se separa y sobre el que no se desplaza (del latín <i>sessilis</i> , apto para sentarse).
Sicon.	Primeras etapas de plegamiento de la pared corporal de las esponjas.
Simbiontes.	Organismo que al obtener benéficos de otro organismo, ninguno de ellos se perjudica, estos ya no pueden recuperar su autonomía.

RESUMEN

El estudio alrededor del mundo, de las esponjas marinas permitió conocer las distintas actividades biológicas de los metabolitos secundarios aislados de las mismas, consideradas actualmente como recurso potencial de compuestos con actividad biológica. Para la esponja *Desmapsamma anchorata* no se encontraron estudios sobre la bioactividad de sus metabolitos, y dado que se encuentra distribuida en México (arrecife de Veracruz), se propuso como posible fuente de metabolitos citotóxicos. El estudio realizado a esta esponja describe la caracterización química de los extractos, por medio de estudios espectroscópicos, como son RMN, IR y EM; también se realizó la evaluación citotóxica en líneas celulares de sistema nervioso, SNC (U251), próstata (PC-3), leucemia (K562), colon (HCT-15), mama (MCF-7) y pulmón (SDLU-1), de los extractos metanólicos aislados.

Se obtuvieron como componentes químicos orgánicos esteroides, ácidos grasos, compuestos oxigenados y nitrogenados; también se encontraron hidrocarburos exógenos (contaminantes del hábitat de la esponja, por actividades portuarias); así como elementos inorgánicos (del cuerpo rígido de la esponja: espículas). Los compuestos con actividad citotóxica resultaron ser una mezcla de ácidos grasos, tanto saturados, como insaturados. Aunque no se reportan, en esponjas marinas, ácidos grasos con efecto citotóxico en líneas celulares; si se encuentran estudios de ácidos grasos, aislados de algas, contra algunos tipos de cáncer, como la leucemia ($IC_{50} > 25 \mu\text{g/mL}$), pero con baja actividad. Además, los ácidos grasos han sido evaluados en otras actividades biológicas, entre las que se tiene el efecto hipoglucemiante, de la mezcla de ácidos aislados de tubérculos (“wereque”); otra actividad es la de antibacteriano, en ácidos obtenidos de Gorgonias y también de esponjas marinas.

1. INTRODUCCIÓN

Las esponjas son animales invertebrados que pertenecen a los metazoos, grupo *Phylum* y a la clase *polifer* (*puros* = poro y *ferre* = para soportar). Son organismos filtradores, que dependen completamente de la circulación del agua para abastecerse de nutrientes, para el intercambio gaseoso y para remover materia orgánica y metabolitos de desecho. Se encuentran principalmente en arrecifes, en asociación con otros invertebrados (gorgonias, corales, hidrozooos, cnidarios, entre otros), la reproducción de estos organismos puede ser sexual o asexual, por fragmentación.

La complejidad de las esponjas marinas despertó el interés de científicos alrededor del mundo; primero, estudiando su composición química, extrayendo metabolitos secundarios; después, realizando pruebas sobre sus actividad biológica, con resultados importantes. Desde entonces se han considerado como un recurso potencial de diversos compuestos con actividad biológica, entre los que se encuentran: antifúngico, antimicrobiano, inhibidor de la síntesis de colesterol, antiinflamatorio, inhibidor de VIH y de citotoxicidad en células cancerígenas humanas, éste último, de interés en este trabajo.

Sin embargo, no a todas las esponjas se les ha evaluado la actividad biológica de sus componentes químicos, como es el caso de la esponja marina *Desmapsamma anchorata* (Carter, 1882), de la cual se han aislado lípidos en extractos metanólicos y clorofórmicos (Carballeira, 1988, 1994); esteroides y derivados de glicerol en extractos de metanol y acetato de etilo (Quijano, 1994). Otro compuesto aislado son los derivados de pirrol carboxaldehído, cuya evaluación fue de actividad anti-*Leshmania* resultando inactiva (Compagnone, 1999). Los compuestos aislados no han sido evaluados en estudios biológicos de citotoxicidad. Esta esponja se encuentra distribuida en áreas subtropicales y tropicales. En México se localiza, principalmente, en el área arrecifal de Veracruz, Golfo de México. La describió morfológicamente Green (1986).

Puesto que el cáncer ocupa el tercer lugar de mortandad en México (según el INEGI), y el cuarto lugar de acuerdo a la OMS; la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos con actividad citotóxica en células cancerígenas ha ido en aumento, sobre todo de origen natural (por ejemplo en plantas). Ha resultado de particular interés la actividad antitumoral reportada para algunos de los compuestos aislados de las esponjas marinas, por lo que, en el presente trabajo se evalúa la actividad citotóxica de alguno de los extractos obtenidos de *D. anchorata* en células cancerígenas humanas: del sistema nervioso central (U251), próstata (PC-3), leucemia (K562), colon (HCT-15), mama (MCF-7) y pulmón (SKLU-1).

2. ANTECEDENTES

2.1. ESPONJAS MARINAS

Las esponjas son animales multicelulares formadas por masas de células encajadas en una matriz gelatinosa. La matriz está limitada por la espina, estructurada de **espículas** de calcio, silicona y las fibras orgánicas esponjosas llamadas espongin. (Dembitsky, 2003)

Las esponjas son animales primitivos que carecen de órganos, pero tienen un tejido conjuntivo bien desarrollado, en el que las células llevan a cabo un variedad de funciones. Comparadas con las de otros **metazoos**, las células de las esponjas muestran un alto grado de independencia con el cuerpo de las mismas. Las esponjas están especializadas en ser sésiles y en tener un modelo corporal inusual, sin simetría bilateral, ningún eje anterior / posterior claro, la diferenciación limitada de tejidos finos en órganos y ningún sistema nervioso; construido alrededor de un sistema de canales acuíferos. (Barnes, 1995)

2.1.1. Taxonomía

Las esponjas marinas son animales marinos invertebrados, que pertenecen *Phylum*, Clase *polifer* (del latín *puros* “poro”; y, *ferre* “para soportar”). La clasificación de *Polifera* se ha definido en cuatro clases, de acuerdo a su esqueleto interno: *Calcárea*, *Hexactinellida*, *Demospongiae*, y *Sclerospongiae*, esta última, incluye aquellas especies que producen un sólido, calcáreo, de matriz rocosa en la cual el animal vivo crece. La clase *Sclerospongiae*, desapareció y fue incluida dentro de las clases *Calcárea* y *Demospongiae*. Se utiliza la anatomía de las **espículas**, para su clasificación taxonómica (**Figura 1**) así como el estudio de su embriología, bioquímica, histología y citología. (Brusca, 2003)

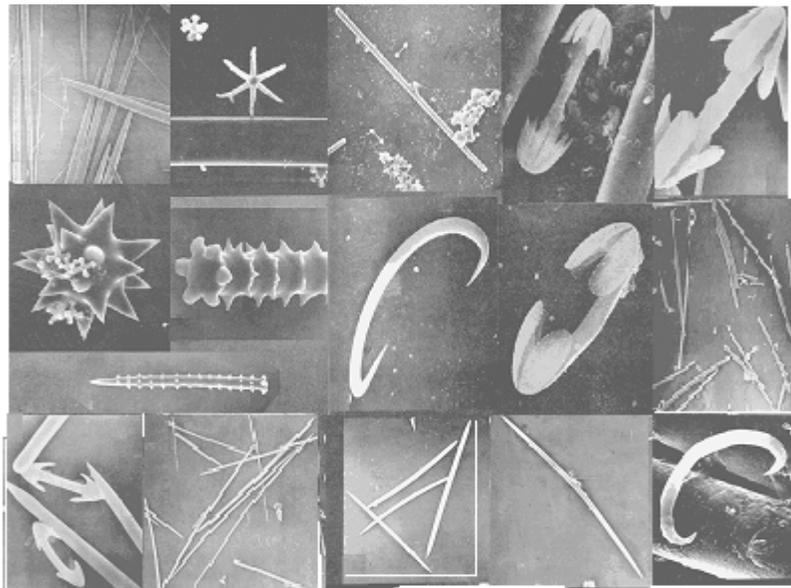


Figura 1. Diferentes tipos de espículas que se encuentran en las esponjas marinas. (Imagen obtenida de la página web http://www.biblioweb.dgsca.unam.mx/cienciasdelmar/anales_i/ins_inx.htm)

Actualmente se clasifican en tres clases:

2.1.1.1. Clase *Calcárea*. Esponjas calcáreas. Espículas del esqueleto mineral integrado enteramente por el carbonato de calcio colocado como calcita; elementos esqueléticos no distinguidos a menudo en megascleres y microscleres; los espículas generalmente son de 1, 3 o 4 puntas; cuerpo **ascon**, **sycon** o **leucon**.; todas son marinas.

2.1.1.2. Clase *Hexactinellida*. Esponjas de cristal. Espículas de silíceo y básicamente de 6 puntas; megascleres y microscleres siempre presentes; pared del cuerpo cavernosa, con la red tubecular; pinacoderma externo ausente y substituido por una membrana cutánea unicelular; la capa del coanocito puede ser sincitial; exclusivamente marina; sobre todo de aguas profundas. Se divide en: subclase *Amphidiscophoro* y subclase *Hexaterophora*.

2.1.1.3. Clase *Desmospongiae*. Demoesponjas. Con espículas silíceas; los espículas son de 6 puntas; los espículas esqueléticos se pueden suplir o substituir por una red colagenosa orgánica (“spongin”); esponjas marinas, salobres, o de agua dulce, se encuentran en todas las profundidades. Se divide en tres subclases: *Homoscleromorpha*, *Tetractinomorpha* y *Ceractinomorpha*.

2.1.2. Morfología y Fisiología

Estos organismos dependen completamente de la circulación del agua a través de los **ostios** —canales inhalantes o aferentes—, cámaras **coanocíticas** —canales exhalantes o eferentes—, **ósculo** (sistema acuífero), para abastecerse de nutrientes, para el intercambio gaseoso y para remover materia orgánica y metabolitos de desecho; por lo que existen diferentes tipos de organización (**Figura 2**), siendo el más sencillo la organización **ascon** (**2a**), seguido del **sycon** (**2b**) (simple y complejo) y por último el **leucon** (**2c**). (Vázquez, 1998).

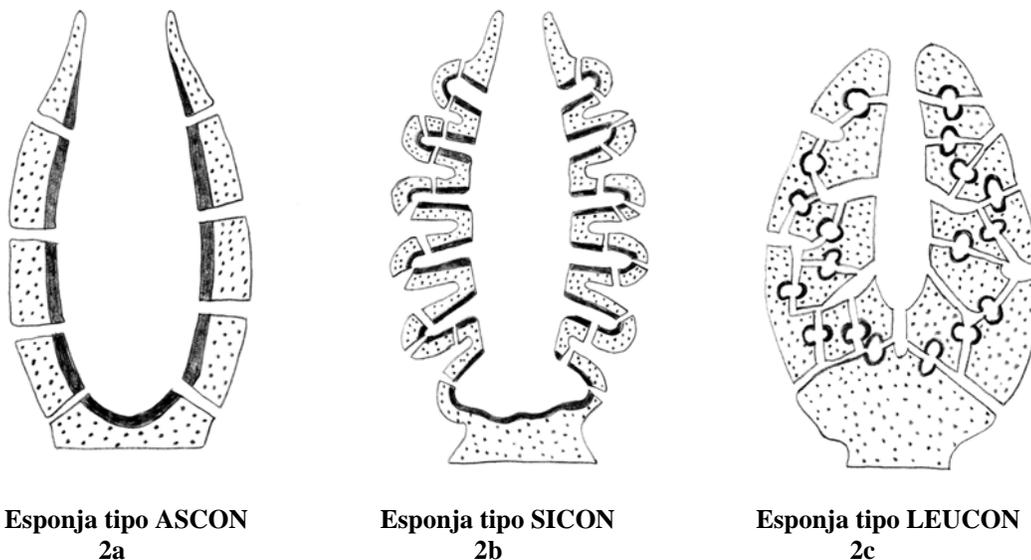


Figura 2. Estructura de las esponjas, de acuerdo al tipo de organización. (Imagen obtenida de la página web http://www.uco.es/dptos/zoologia/zoolobiolo_archivos/practicasypractica_3/poriferos_botton.htm)

Las esponjas son de tamaño muy variado. Algunas esponjas calcáreas tienen las dimensiones de un grano de arroz, pero hay una especie que excede el metro de altura y diámetro. Algunas son radialmente simétricas, pero la mayoría son irregulares y exhiben formas de crecimiento masivas, erectas, incrustantes o ramificadas. La estructura de las esponjas es única porque está construida en torno a un sistema de canales de agua.

La mejor manera de comprender la estructura básica y la histología de las esponjas es comenzar con las formas radiales más simples. Dichas esponjas se denominan asconoides, un término estructural y no taxonómico. La superficie de una esponja **ascon** tiene muchos orificios pequeños denominados **ostiolos** (o poros inhalantes). Dichos poros desembocan en la cavidad interior; el **atrio**, que a su vez se abre al exterior a través del **ósculo**, una amplia abertura situada en el extremo superior del tubo. Una corriente constante de agua pasa a través de los poros inhalantes hacia el **espongocelo** y sale por el **ósculo**. (Figura 3)

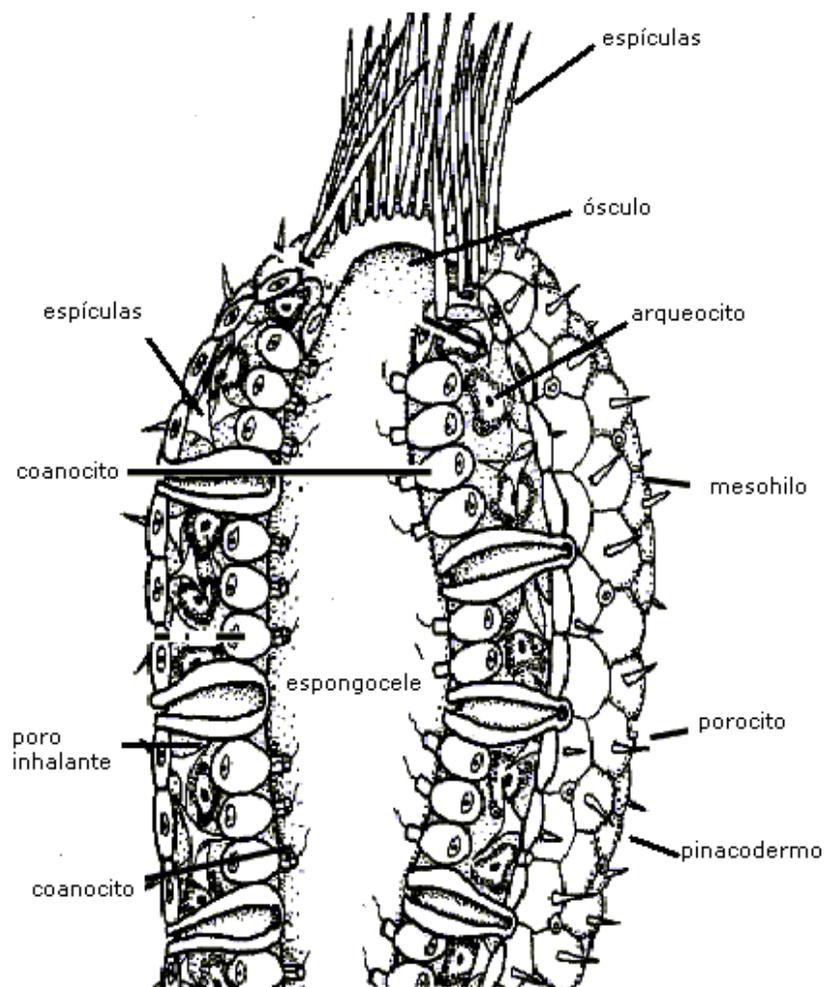


Figura 3. Morfología de la esponja marina, de organización ascon

(Imagen obtenida en la página web http://www.naturenotes.org/notes/dbiologia/biologia_poliferos.htm).

La pared del cuerpo es relativamente simple. La superficie exterior está cubierta por células aplanadas, denominadas pinacocitos, que constituyen el **pinacodermo**. Los pinacocitos

basales segregan el material que fija la esponja al sustrato. El orificio, o luz, del porocito forma el poro inhalente, u **ostiolo**, que se abre o cierra por contracción.

Los elementos del esqueleto de la esponja es de dos tipos: orgánica e inorgánica, (Brusca, 2003). El esqueleto es relativamente complejo y proporciona una estructura de soporte a las células vivas del animal. Puede constar de espículas calcáreas, espículas silíceas, fibras de espongina protónica o una combinación de estas dos últimas. Las espículas, son importantes para la identificación y la clasificación de las especies. El sufijo –axón se refiere al número de ejes que tiene una **espícula**, mientras que –actina denota el número de radios o puntas.

Muchas esponjas también poseen un esqueleto de fibras gruesas que se conectan entre sí, las fibras están formadas por espongina, una proteína fibrosa parecida al colágeno. La fisiología de una esponja depende en gran medida de la corriente de agua que fluye a través del cuerpo, el agua lleva oxígeno y alimento a las células y elimina sus desechos. Incluso los óvulos y los espermatozoides entran y salen de las esponjas con las corrientes de agua. (Barnes, 1995)

Las esponjas son animales filtradores y dependen de la corriente de agua que pasa a través del cuerpo como fuente de alimento. Estas se alimentan de partículas orgánicas sumamente finas. Las excreciones y desechos nitrogenados (amoníaco) salen del cuerpo con las corrientes de agua. El intercambio gaseoso se realiza por difusión simple entre la corriente de agua y las células situadas a su paso.

Muchas esponjas tienen un poder de regeneración destacable. Las células separadas se reorganizan rápidamente por asociación progresiva de células similares rodeadas por pinacocitos, formando así varias esponjas nuevas (reproducción asexual). También es necesario iones de calcio y magnesio y algunas macromoléculas en la superficie celular. En la reproducción sexual, de esponjas hermafroditas salen los espermatozoides por medio de las corrientes de agua exhalante y entran en otras esponjas por la corriente inhalente. (Barnes, 1995)

Muchas esponjas producen metabolitos capaces de impedir que otros organismos se establezcan en sus superficies, o de rechazar a algunos depredadores potenciales. Algunas resultan tóxicas para los peces. (Barnes, 1995). Las esponjas marinas y de agua dulce contienen una variedad amplia de **simbiontes** microbianos, a menudo con muchos diversos **simbiontes** en la misma especie y algunos **simbiontes** bacterianos. (Dembitsky, 2003)

2.1.3. Distribución

Abundan en todos los mares y donde quiera que haya rocas, conchas, maderos sumergidos o corales que les sirvan de sustrato. Incluso algunas especies viven en fondos blandos arenosos y fangosos. Casi todas las esponjas prefieren las aguas más bien superficiales, aunque algunos grupos, incluyendo la mayor parte de las esponjas vítreas, viven en aguas profundas. (Barnes, 1995)

2.1.4. Estudios químicos

De las esponjas marinas se han aislado gran cantidad de metabolitos secundarios, entre los que se incluyen lípidos, ácidos grasos y esteroides, tal y como lo reporta Dembitsky (2003); en un estudio donde describe el aislamiento de este tipo de compuestos, en 28 esponjas de la clase *Demospongiae* (Orden: *Haplosclerida*, Familia: *Spongillidae*).

Indica la existencia de 72 ácidos grasos de cadena larga (C₂₄-C₃₈); la presencia de estos compuestos en las esponjas puede deberse a la composición de la membrana de sus células (las esponjas son animales multicelulares que poseen biomembranas únicas). Entre los diferentes ácidos grasos se tienen los siguientes:

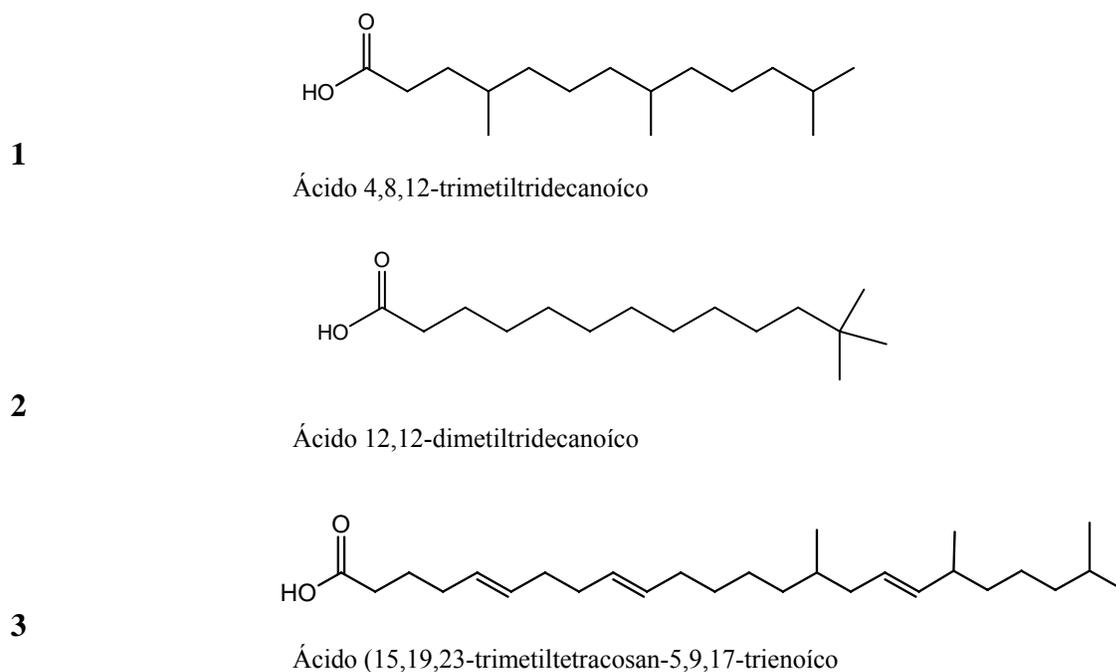


Figura 4. Estructura de algunos ácidos grasos presentes en las esponjas.

Los lípidos de esponjas, así como en invertebrados de agua dulce y marinas, consisten en compuestos saponificables, tales como glicéridos, junto con algunos lípidos insaponificables, (el autor reporta 20 tipos diferentes de lípidos). Se han encontrado muchos derivados de glicofosfolípidos (**figura 5**) importantes en la función bioquímica de la esponja. (Dembitsky, 2003).

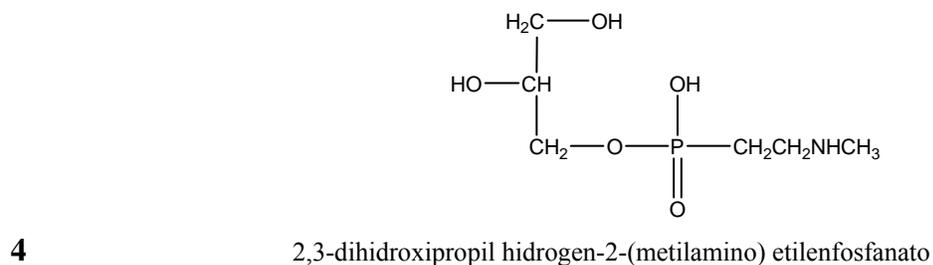


Figura 5. Estructura del fosfolípido reportado en las esponjas marinas

En cuanto a los esteroides reportados que se encuentran en las esponjas, se tiene al menos 21 tipos. Los esteroides se encuentran entre los metabolitos secundarios que producen las esponjas, teniendo al colesterol (**figura 6**), como principal esteroide. Generalmente las esponjas que tienen proporción media a alta de lípidos, tienen bajo contenido de esteroides.

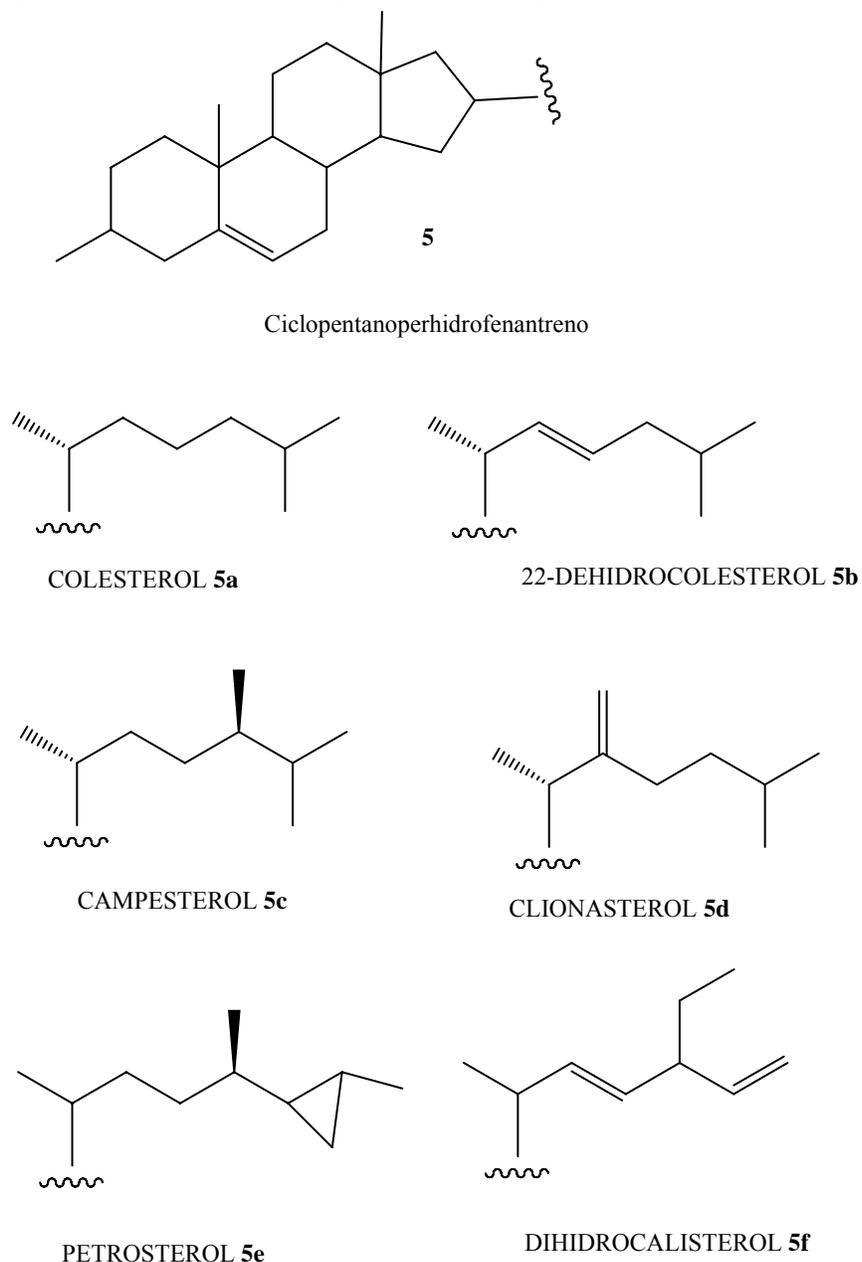


Figura 6. Estructura de algunos esteroides reportado en esponjas marinas.

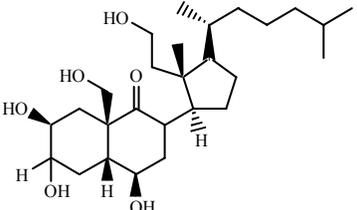
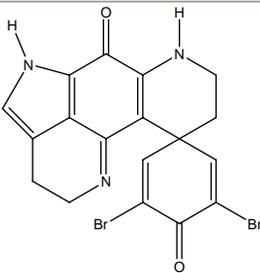
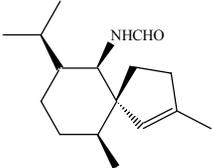
Otros esteroides aislados de diferentes esponjas son los siguientes, la polimastiamida B-F (esteroide conjugado a un amino ácido) obtenido de la esponja *Polymastia boletiformis*. (Kong, 1996); un epoxiesterol de *Ircinia fasciculata* (Venkateswarlu, 1996); el sulfato de halistanol (monosulfato de esteroide) aislado de la esponja *Haliclona* (Sperry, 1997); el

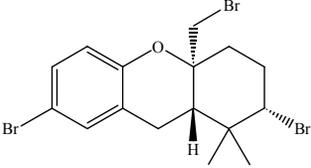
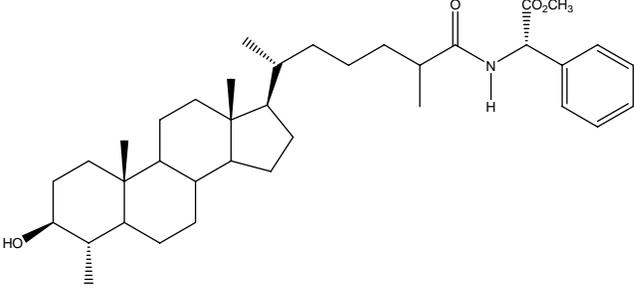
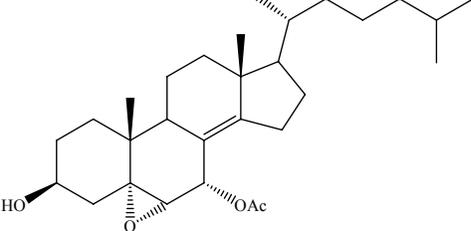
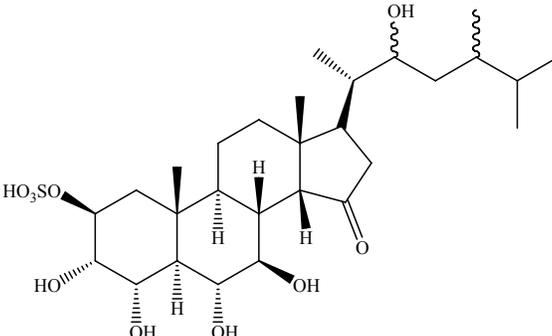
swinhoesteroles A-C (4-melinenesterol) de *Theonella swinhoei* (Umeyama, 1997); Agosterol A, aislado de la esponja *Spongia* sp. (Aoki, 1998); y, el 24-isopropilcolesterol obtenido de la esponja *Epipolasis* sp. (Umeyama, 2000). Las estructuras se encuentran en la **tabla 1** (estructuras **10** a **15**), al igual que otros ácidos grasos (estructuras **16** a **17**) reportado en las esponjas marinas *Calyx podatypa* (Nemoto, 1997) y *Amphimedon* sp. (Carballeira, 2000).

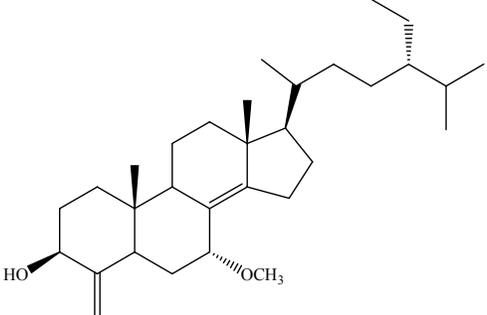
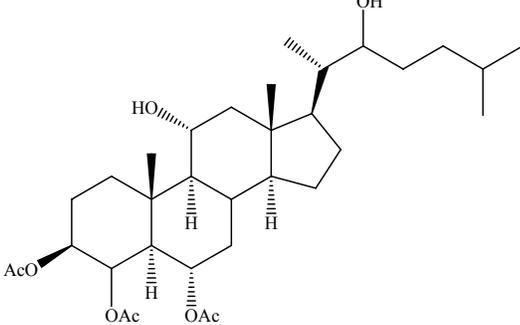
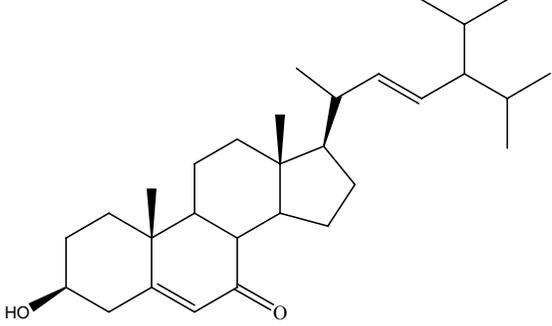
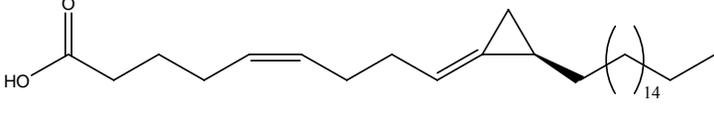
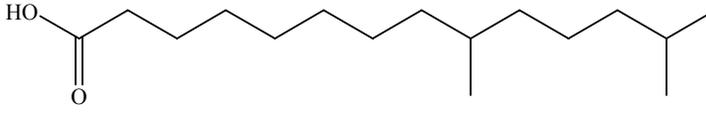
Las esponjas de agua dulce y marinas de la clase *Demospongiae*, contienen muchos compuestos comunes, como son los lípidos, los ácidos grasos y los esteroides; es razonable asumir que los ácidos grasos de cadena larga están implicados en la estructura de la membrana, al igual que los esteroides. (Dembitsky, 2003)

También se han encontrado compuestos diferentes a los antes mencionados (estructuras **6** a **9**), algunos de ellos se muestran en la tabla siguiente:

Tabla 1. Compuestos aislados de diferentes esponjas.

Esponja	Estructura	Referencia
<i>Euryspongia arenaria</i> (Australia)	 <p>9-11-secosterol (6)</p>	Altena, 1999
<i>Batzella</i> sp. (Bahamas)	 <p>Discorhabdin P (7)</p>	Gunasekara, 1999
<i>Geodia exigua</i> (Japón)	 <p>Exiguamida (8)</p>	Uy, 2003

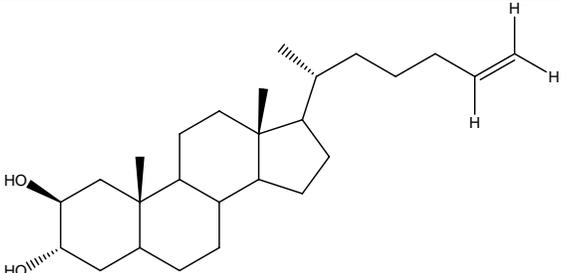
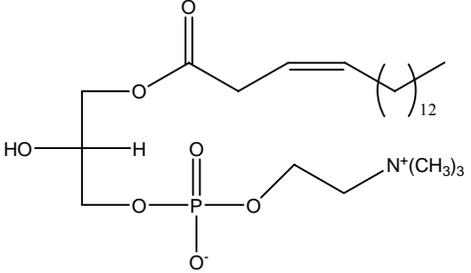
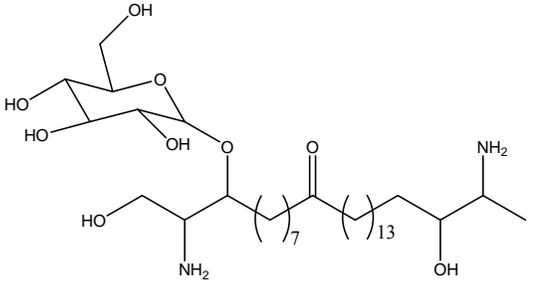
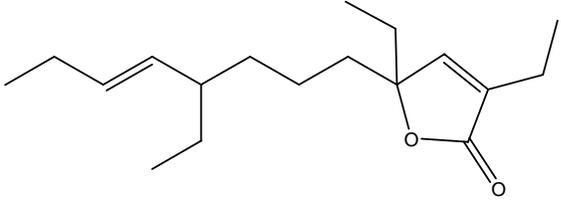
<p><i>Scalarispongia scalaris</i> (Croacia)</p>	 <p>Hexahidroantena polibromado (9)</p>	<p>Melcher, 2007</p>
<p><i>Polymastia boletiformis</i> (Canadá)</p>	 <p>Polimastianida (10)</p>	<p>Kong, 1996</p>
<p><i>Ircinia fasciculata</i> (India)</p>	 <p>Epoxi esterol (11)</p>	<p>Vankateswarlu, 1996</p>
<p><i>Haliclona</i> sp. (Malasia)</p>	 <p>Sulfato de halistanona(12)</p>	<p>Sperry, 1997</p>

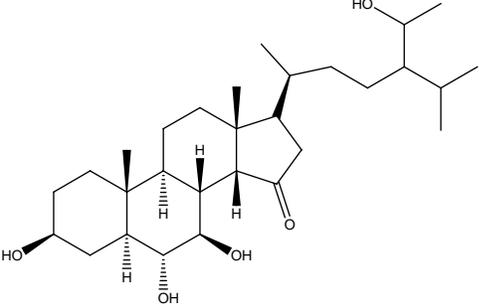
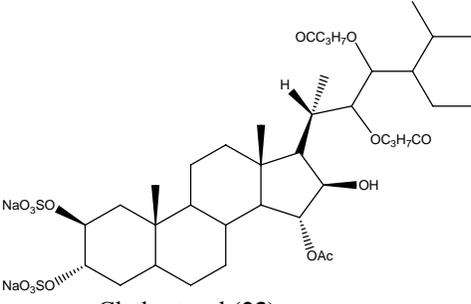
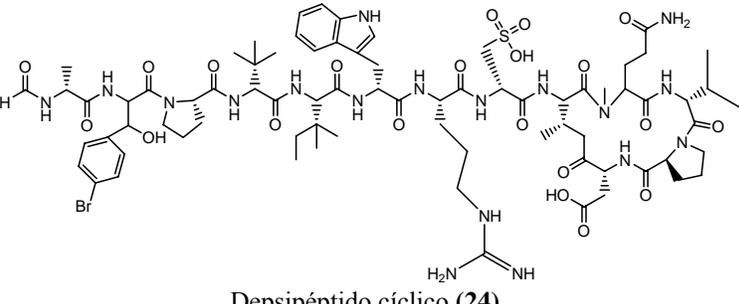
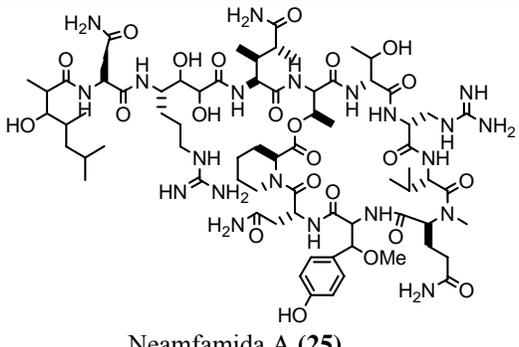
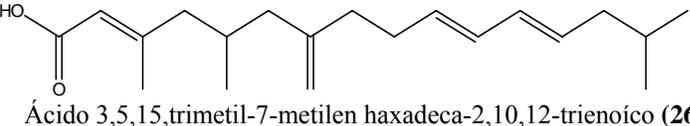
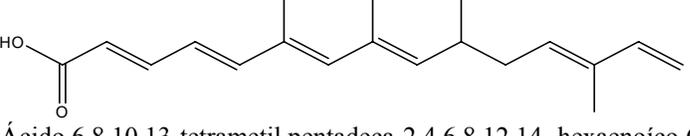
<p><i>Theonella swinhoei</i> (Japón)</p>	 <p>Swenhosterol A (4-metilen secosteroide) (13)</p>	<p>Umeyama, 1997</p>
<p><i>Spongia</i> sp. (Japón)</p>	 <p>Agosterol A (14)</p>	<p>Aoki, 1997</p>
<p><i>Epipolasis</i> sp. (Japón)</p>	 <p>24-isopropil colesterol (15)</p>	<p>Umeyama, 2000</p>
<p><i>Amphimedon</i> sp. (Australia)</p>	 <p>Ácido anfímico (16)</p>	<p>Nemoto, 1997</p>
<p><i>Calyx podatypa</i> (Puerto Rico)</p>	 <p>Ácido 9,13-dimetiltetradecanoico (17)</p>	<p>Carballeira, 2000</p>

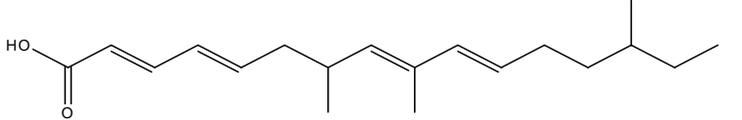
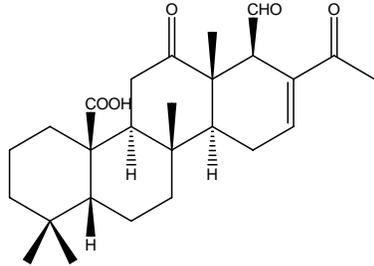
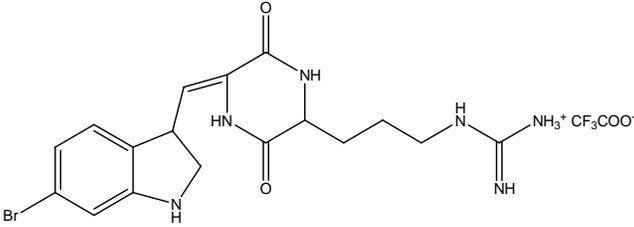
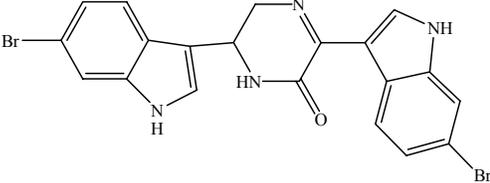
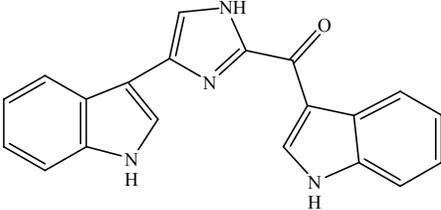
2.1.5. Estudio biológico

Las esponjas han resultado ser una fuente potencial de compuestos bioactivos, y recientemente el aislamiento de estos ha aumentado; por ejemplo, compuestos antimicrobianos, antiinflamatorios, antitumorales, citotóxicos, y anti-incrustantes. (Tabla 2). El descubrimiento de estos productos naturales en esponjas ha conducido un interés renovado en este grupo. (Brusca, 2003)

Tabla 2. Compuestos con actividad biológica, aislados de esponjas marinas.

Esponja	Tipo de compuesto	Actividad	Referencia
<i>Pachastrella</i> sp. (Sur África)	 <p>Halistanol (18)</p>	Inhibidor de la enzima endotelina (vasoconstrictor)	Patil, 1996
<i>Spirastrella abata</i> (Corea)	 <p>1-O-(3'Z-octadecenil)-sn-glicerol-3-fosfololina (19)</p>	Inhibidor de la síntesis de colesterol	Shin, 1999
<i>Oceanopia phillipnsis</i> (Australia)	 <p>Oceanapisida (20)</p>	Antifúngico	Nicholas, 1999
<i>Plakortis</i> sp. (Jamaica)	 <p>Plakortone G (21)</p>	Antimalaria	Gochefeld 2001

<p><i>Clathria lissosclera</i> (Nueva Zelanda)</p>	 <p>Clatriol (22)</p>	<p>Antiinflamatorio</p>	<p>Keyzers, 2002.</p>
<p><i>Clathria</i> sp. (Sur África)</p>	 <p>Clathesterol (23)</p>	<p>Anti-VIH</p>	<p>Rudi, 2001</p>
<p><i>Sidonops microspinosa</i> (Indonesia)</p>	 <p>Depsipeptido cíclico (24)</p>	<p>Anti-VIH</p>	<p>Rashid, 2001</p>
<p><i>Neamphius huxleyi</i> (Nueva Guinea)</p>	 <p>Neamfamida A (25)</p>	<p>Anti-VIH</p>	<p>Oku, 2004</p>
<p><i>Nudospongilla</i> sp.</p>	 <p>Ácido 3,5,15,trimetil-7-metilen haxadeca-2,10,12-trienoico (26)</p>	<p>Antibacteriano</p>	<p>Řezanka, 2002</p>
<p><i>Ephydatia syriaca</i>,</p>	 <p>Ácido 6,8,10,13-tetrametil pentadeca-2,4,6,8,12,14 -hexaenoico (27)</p>		

<p><i>Cortispongilla barroisi</i></p>	 <p>Ácido 7,9,14-trimetil hexadeca-2,4,8,10-tetraenoico (28)</p>		
<p><i>Lendenfeldia chondrodes</i> (Japón)</p>	 <p>Esterol sestriterpeno (29)</p>	<p>“antifouling” (anti-incrustante)</p>	<p>Sera, 1999</p>
<p><i>Geodia berretti</i> (Suecia)</p>	 <p>Ciclo (6-bromo triptofan) arginina (30)</p>	<p>“antifouling” (anti-incrustante)</p>	<p>Sjögren, 2004</p>
<p><i>Spongosorites</i> sp. (Corea)</p>	 <p>Hamacanthin (31)</p>	<p>Antifúngico</p>	<p>Oh, 2006</p>
	 <p>Deositopsentin (32)</p>	<p>Antimicrobiano</p>	
	<p>Citotóxico</p>		

Los compuestos aislados de esponjas marinas, que presentan actividad biológica de citotoxicidad, se mencionan en el siguiente capítulo.

2.2. ESPONJAS MARINAS QUE PRESENTAN COMPUESTOS CON ACTIVIDAD CITOTÓXICA.

Compuestos aislados de distintas esponjas presentan citotoxicidad, entre las que se encuentran la esponja *Chondropsis* sp (Australia); de la cual se aisló un compuesto que se denominó chondropsin A (**Figura 7, 33a**). Realizando extracciones al liofilizado (357 g) con agua a 4°C, se separó por centrifugación y el extracto crudo se colocó en CC, fase reversa (fase móvil, MeOH:H₂O, 2:1).

El material obtenido se separó nuevamente en CC (fase móvil, MeOH:H₂O, 7:3), las fracciones concentradas se purificaron por HPLC fase reversa, con un gradiente de MeOH:H₂O, 65:35-85:15, obteniendo el Chondropsin (2 mg). El bioensayo realizado, fue el de antiproliferación en células cancerígenas humanas de ovario (OVCAR-3) y melanoma (LOX), reporta un GI₅₀ de 2.4×10^{-8} , en un rango mayor de 10^{-3} . (Cantrell, 2000)

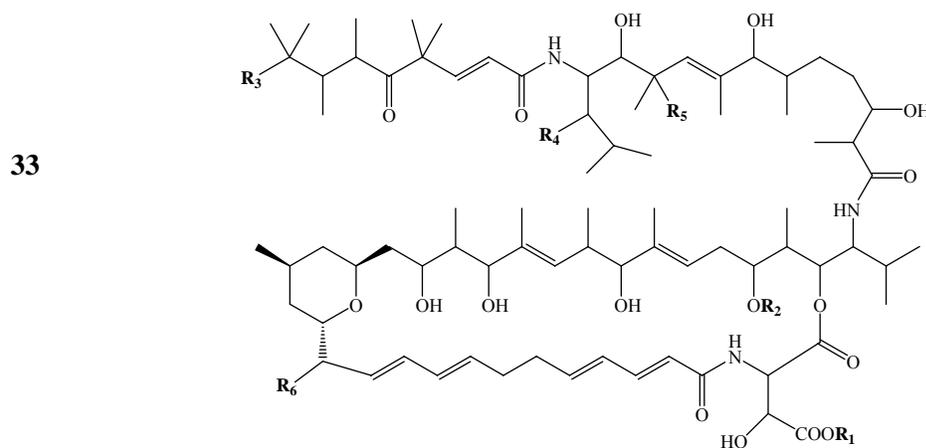
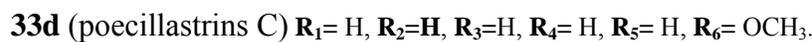
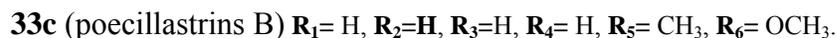
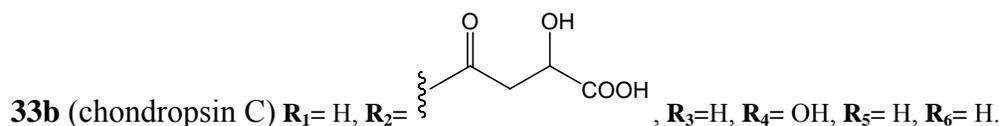
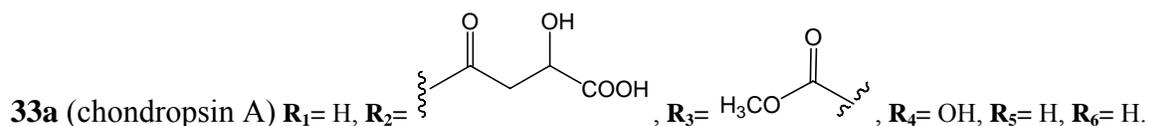
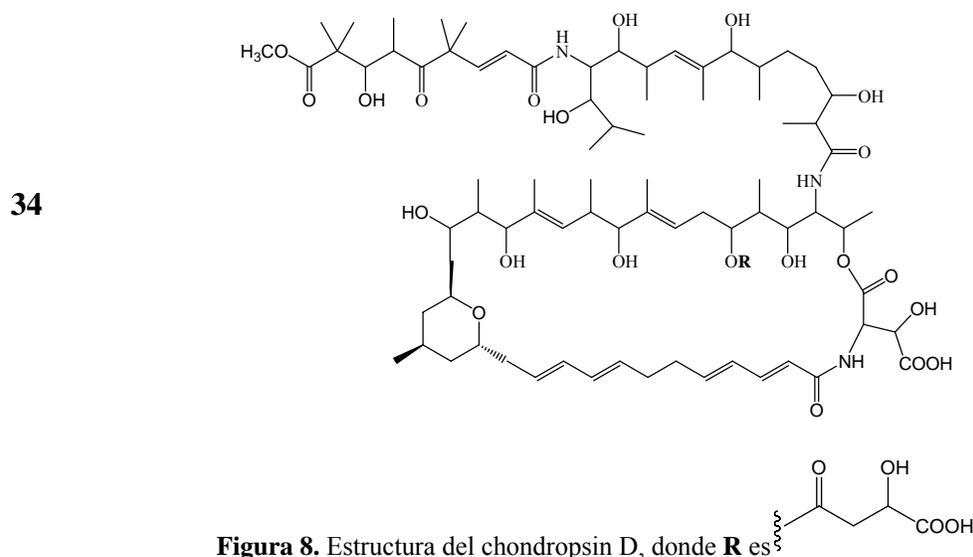


Figura 7. Estructura base del Chondropsin.

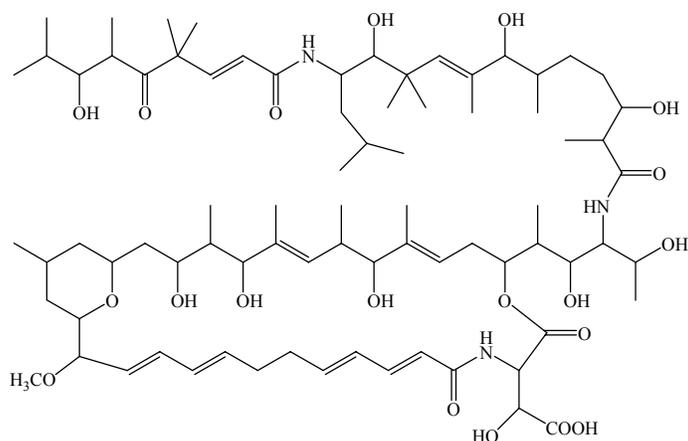


Otro derivado es el chondropsin C (**figura 7, 33b**), también presentan un IC_{50} de 0.8 y 0.2 ng/mL, en células cancerígenas de leucemia (LOX) y melanoma (MOLT-4). Dichos compuestos se obtuvieron a partir de extractos acuosos, de las esponjas Australianas *Ircinia* sp. e *Ircinia ramosa*, 27.5 g y 37.5 g, respectivamente. El fraccionamiento del extracto acuoso fue por HPLC fase reversa, la fase móvil fue CH_3CN en H_2O con 0.1% TFA. De las fracciones se obtuvieron el Chondropsin, 1 mg, (*Ircinia* sp.) y Chondropsin C (5 mg), de *Ircinia ramosa*; de este último se obtiene un derivado con acetonitrilo provisto de éster de metilo, el Chondropsin C (Rashid, 2001).

Rashid (2001), aisló un derivado del chondropsin, el chondropsin D (**figura 8, 34**), obtenido de la esponja Australiana *Chondropsis* sp. Se realizó una extracción acuosa a 357 g de esponja congelada, a dicho extracto se le eliminó el material sólido por centrifugación y posteriormente se liofilizó para obtener 44 g de extracto crudo. El fraccionamiento del extracto crudo fue por HPLC, fase reversa, así como su purificación; utilizando como fase móvil $CH_3CN:H_2O$ gradiente de 45:55 a 100:0 (por más de 30 min) obteniendo un total de 3.5 mg de Chondropsin D. Presentó actividad citotóxica y antiproliferación con un IC_{50} de 10 y 250 ng/mL contra células de melanoma (LOX) y leucemia (MOLT-4), respectivamente.



Un compuesto semejante al chondropsin es el poecillantín A (**Figura 9, 35**), aislado de la esponja *Poecillastra* sp. (Bahamas) a partir de los extractos acuosos (20g extracto crudo) y purificados por HPLC. Se obtuvieron 800 μg de compuesto puro. Se probó su actividad citotóxica y antiproliferación en células cancerígenas humanas de Melanoma (LOX), Pecho (A-549), Ovario (OVCAR-3) y Pulmón (SNB-19); resultando un potente antitumoral, en concentraciones entre 25 nM a 10000 nM. (Rashid, 2002).



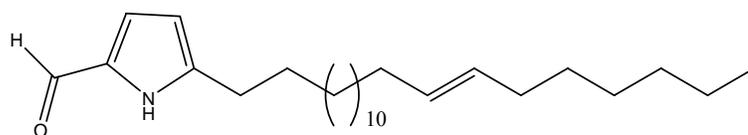
35

Figura 9. Estructura del poecillantín A

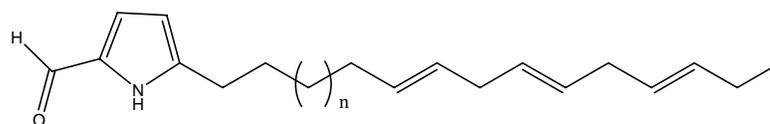
Los derivados, el poecillantín B y C (figura 7, 33c y 33d), se obtuvieron de la misma esponja Australiana, (*Poecillastra*) por un método de aislamiento criogénico, a partir de un extracto acuoso. Resultando potentes agentes citotóxicos en células cancerígenas humanas de melanoma (LOX), con un IC₅₀ de 1 µg/mL. (Takada, 2007).

Compuestos, con otro tipo de arreglo estructural a los antes mencionados, se han aislado de otras esponjas; así, de la esponja marina *Mycale cecilia* (Golfo de California, México), se obtuvo un derivado de pirrol carboxaldehído (micalazal-12) (figura 10, 36a), el cual presentó actividad antitumoral en células humanas cancerígenas de próstata, con un LC₅₀ de 0.2 µg/mL. Así mismo, se aislaron otros derivados, compuesto 36a con mayor actividad y derivados 36b, donde n (CH₂) varía de 8 (micalazal-3), 10 (micalazal-7) y 12 (micalazal-10). (figura 10, 36a y 36b).

El compuesto se obtuvo de la extracción con acetona del liofilizado, se agregó agua y se realizó una extracción con éter dietílico. El extracto orgánico se fraccionó por CC (fase móvil hexano:éter dietílico, 8:2; cloroformo:metanol, 8:2; y metanol). De las fracciones obtenidas se les realizó otra separación por HPLC (fase móvil acetonitrilo:metanol, 7:3). La purificación final fue por HPLC, fase reversa, usando mezcla de disolventes en varias proporciones: agua en metanol o agua en acetonitrilo. (Ortega, 2004)



36a



36b

Figura 10. Compuesto con actividad citotóxica aislado de *M. cecilia*. 36a (micalazal-12), compuesto con mayor actividad. 36b derivados de , donde n (CH₂) varía de 8 (micalazal-3), 10 (micalazal-7) y 12 (micalazal-10).

De otra esponja, *Spirastrella abata* (Corea), se aisló un compuesto, 4-sulfato esfingosina (**figura 11**), con un ED₅₀ de 0.3 µg/mL, activo sobre células tumorales de pulmón, ovario, piel, SNC y colon. (Alam, 2002)

La obtención de los compuestos fue a partir de la extracción con metanol, al extracto se le agregó agua, y a la solución obtenida, se les realizó extracciones con diclorometano. El fraccionamiento fue en CC (fase móvil metanol:agua, 33-100%), obteniendo siete fracciones; la fracción 3 se separó y purificó por HPLC, fase reversa (acetonitrilo:agua, 1:1).

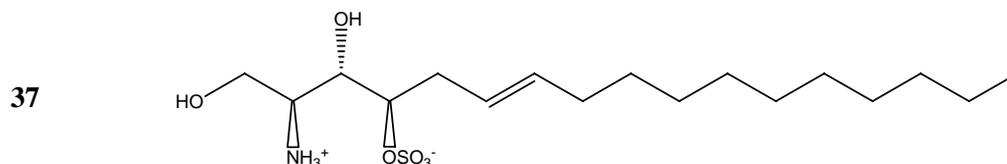
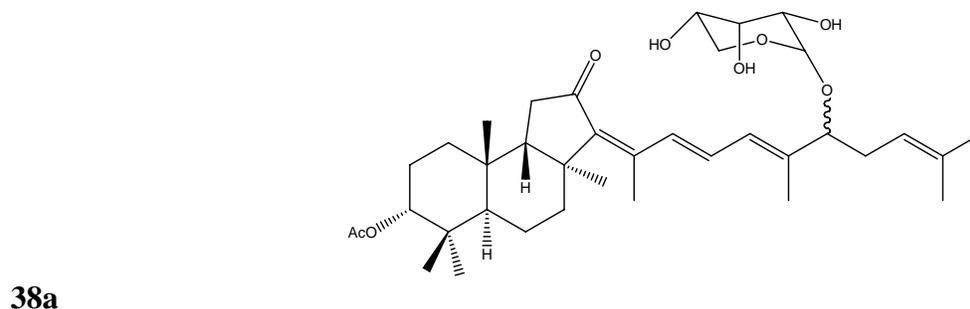
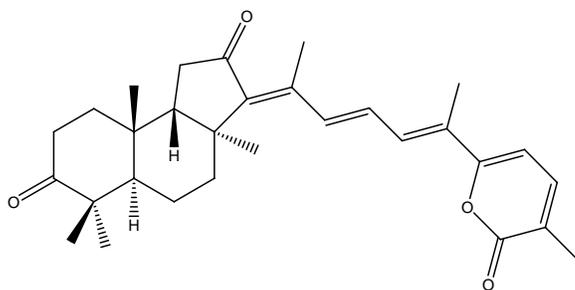


Figura 11. 4-sulfato esfingosina, aislada de la esponja *S. abata*.

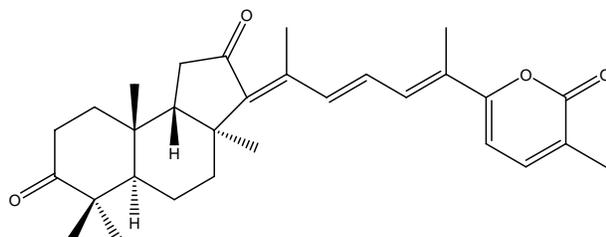
También se han aislado triterpenos monosacáridos (**figura 12**), de la esponja *Geodia globstellifer* (Reino Unido), los cuales el compuesto **38c** (Esteletin B, **figura 12**) resultó con mayor efectividad anticancerígena sobre células tumorales de ovario. Mientras que los compuestos **38a** (Esteletin ribosida) y **38b** (Esteletin A) resultan de moderada actividad. (Tabudravu, 2001)

Se obtuvieron a partir de la extracción con metanol:diclorometano, seguida de una extracción de partición (agua, diclorometano), el extracto obtenido de la fase orgánica (diclorometano), se le realizó otra extracción con hexano en metanol acuoso (10%). Al residuo orgánico se le realizó una última extracción con diclorometano; la purificación de los tres compuestos obtenidos fue por HPLC, fase reversa (metanol:diclorometano, 1:1).





38b



38c

Figura 12. Compuestos Triterpenos monosacáridos (*Stelletins*).

De las esponjas, del género *Geodia*, se han aislado otro tipo de terpenos (**Figura 13**), como por ejemplo la exiguamida (**39**) extraída de la esponja *G. exigua* (Japón), a partir de una extracción con metanol; al residuo se agregó agua y se extrajo con hexano. La parte orgánica se fraccionó en CC, usando gradientes de metanol:agua; la purificación también fue por CC, usando como fase móvil acetato de etilo: hexano. (Uy, 2003)

39

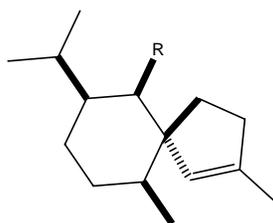


Figura 13. Exiguamida (donde R= -NHCHO, -NHCO₂CH₃, -NHCO₂CH₂N(CH₃)CH₂COOCH₃, NC).

Los terpenos son sin duda importantes agentes citotóxicos, como es el caso del 12-*O*-deacetilnorscalaral B (**figura 14**), con un GI₅₀ de 4.9, 4.5 y 4.2 μg/mL, contra adenocarcinomas de pecho, pulmón y colon, respectivamente.

40

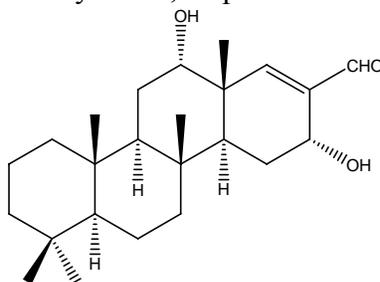


Figura 14. Estructura del 12-*O*-deacetilnorscalaral B.

Se obtuvo **40** de la esponja marina *Hyatella intestinalis* (México) a partir de una extracción del liofilizado con acetona:metanol (1:1). El residuo obtenido se le adicionó agua y se realizaron extracciones con éter dietílico; el fraccionamiento se llevó a cabo en CC, usando diferentes disolventes (en orden de polaridad creciente), hexano, éter dietílico, cloroformo:metanol (80:20) y metanol. El 12-*O*-deacetilnorscalaral B, se obtuvo de la fracción de cloroformo:metanol (99:1); purificado en HPLC, fase móvil metanol:agua (90:10); acetonitrilo:agua (80:20). Se obtuvieron otros derivados de las otras fracciones, pero con baja actividad citotóxica. (Hernández, 2006).

Un terpeno diferente **41**, se aisló de la esponja *Diacarnus levii* (Nueva Guinea), a partir de un extracto con diclorometano:metanol (1:1), el fraccionamiento se realizó por CC, usando un gradiente de acetato de etilo en hexano (15:85, 50:50, 100:0). Se obtuvieron cuatro fracciones, las dos primeras tuvieron una inhibición de 80% y 91%, respectivamente. La purificación se realizó pasando las fracciones por otra CC, con acetato de etilo en hexano (1:15 v/v). La estructura del compuesto aislado se muestra en la **figura 15**, la evaluación citotóxica permitió conocer la actividad en células cancerígenas de próstata y mama (DU145, PC-3 de próstata y MCF-7, MDA-MB-231, T47D de mama), con un IC₅₀ de 17.8 μM (MDA-MB-231) y 14.7 μM (T47D). (Dai, 2007)

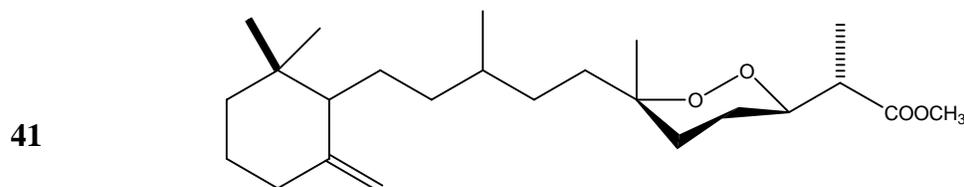


Figura 15. estructura del norsesterterpeno.

De otra esponja del género *Haliclona* sp. (Filipinas) se extrajo un compuesto con actividad citotóxica de 10 μg/mL, en células cancerígenas de ovario. Dicho compuesto llamado mimosamycin (**figura 16, 42**) se obtuvo con la extracción acuosa a la esponja, el extracto se centrifugó y se fraccionó por CC (fase móvil metanol:agua, en diferentes proporciones). El extracto de la fracción obtenida de la mezcla 9:1 se purificó por HPLC, fase móvil acetonitrilo:agua con 0.1% de TFA. (Rashid, 2001). La estructura del mimosamycin, es la que se muestra en la **figura 16**

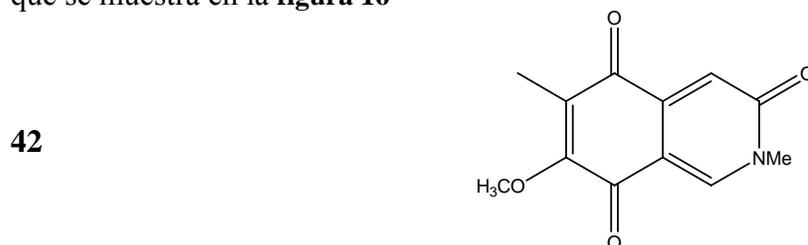


Figura 16. Estructura del mimosamycin

Una serie de compuestos denominados topsentolidas, se aislaron de la esponja *Topsentia* sp. (Corea) a partir del extracto metanólico, seguido de una extracción de partición con agua diclorometano. El extracto obtenido se fraccionó por HPLC, fase móvil metanol:agua, obteniendo 23 fracciones, la fracción 11 se purificó por HPLC. Dicho compuesto tuvo actividad citotóxica en células humanas de cáncer de colon (HCT-15), SCN (XF-498), ovario (SK-OV-3), pulmón (A549) y de piel (SK-MEL-2). (Luo, 2006).

43

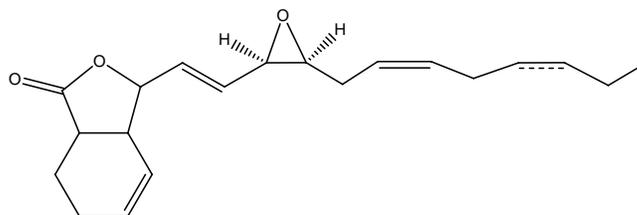


Figura 17. Estructura del topsentolida.

De la esponja *Ectyoplasia ferox* (Bahamas) se aisló un compuesto, feroxosidos A y B (**figura 18, 44a y 44b** respectivamente) con actividad citotóxica en células macrófagos monocitos murinos (J-774). IC_{50} fue de 19 $\mu\text{g/mL}$. La extracción se realizó con metanol, al residuo se le adicionó agua; se realizaron extracciones con tetracloruro de carbono, cloroformo y n-butanol. Las fracciones obtenidas, se purificaron por HPLC (fase reversa, metanol:agua, 7:3 v/v). (Campagnuolo, 2001)

44

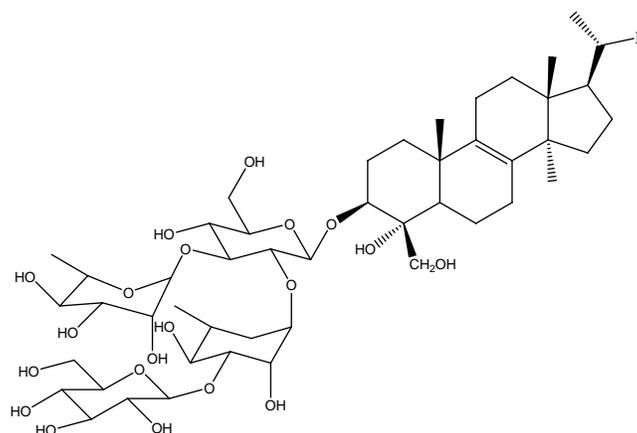
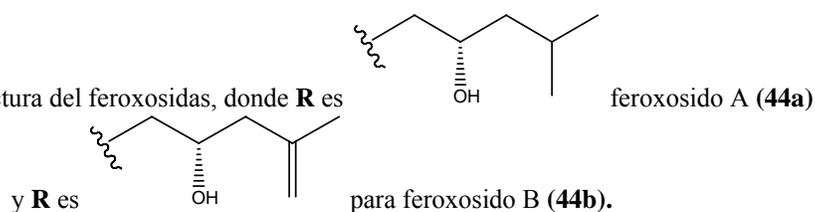


Figura18. Estructura del feroxosidas, donde **R** es



Tres compuestos (isoquinolinas) aislados de la esponja *Cribrochalina* sp. (Tailandia) presentaron actividad citotóxica en células humanas cancerígenas de mama (MCF-7) y cervical (HeLa). Se obtuvieron **45a**, **45b** y **45c** a partir de una extracción con metanol al liofilizado, seguida de una extracción con diclorometano, el residuo se fraccionó por CC utilizando como fase móvil metanol:diclorometano, en diferentes proporciones. La purificación se realizó por HPLC fase reversa, fase móvil acetonitrilo:agua. (Plubrokarn, 2003).

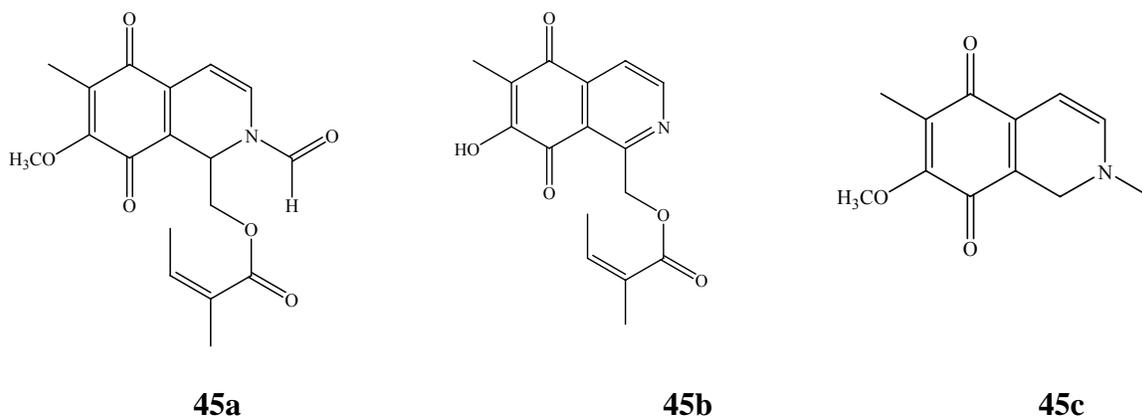


Figura 19. Estructura de isoquinolinas (**44a** N-formil-1,2-dihidrorenierona, **44b** O-demetilrenierona, **45c** mimosamicin).

El ciclonellin (**46**) (octapéptido cíclico), **figura 20**, se aisló de la esponja *Axinella canteri* (Indonesia), a partir de una extracción con agua, la separación y la purificación fue por HPLC. La fase móvil para la separación fue agua:metanol (1:0, 2:1, 1:2, 0:1), y para la purificación fue acetonitrilo en agua con 0.1% de TFA. La prueba de citotoxicidad fue contra células humanas de cáncer de colon (COLO-205) y ovario (OVCAR-3), resultando inactiva a 50 µg/mL. (Milanowski, 2004).

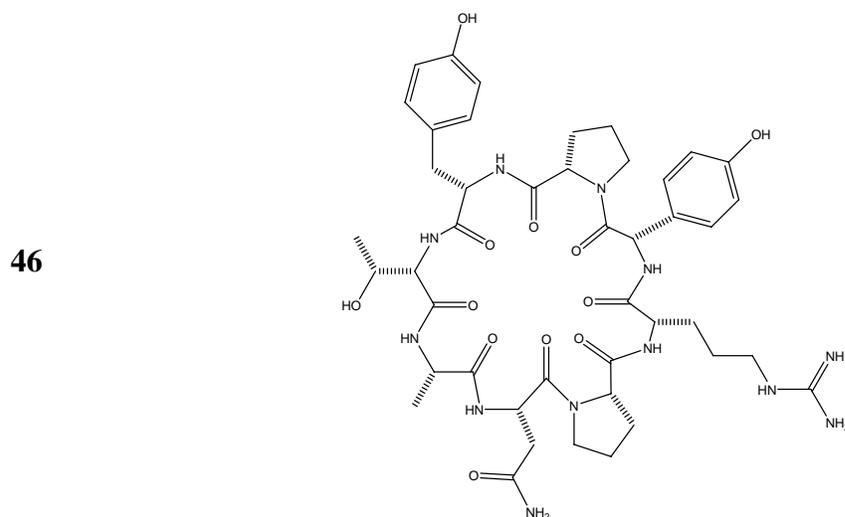


Figura 20. Estructura del ciclonellin

El compuesto **47** (psammaplin A, la estructura se muestra en la **figura 21**) se aisló de la esponja *Pseudoceratina rhax* (Indonesia).

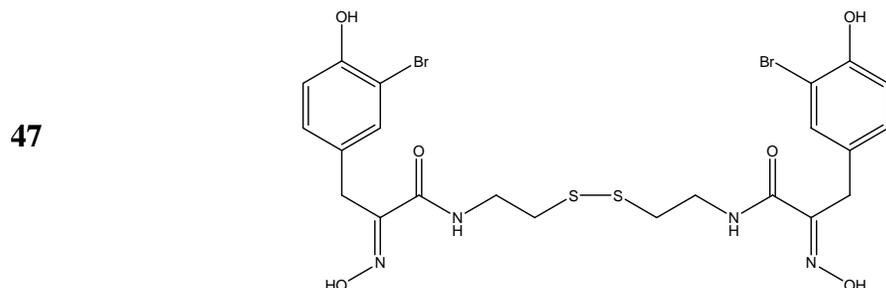


Figura 21. Estructura de psammaplin A.

El aislamiento de **47** fue a partir de una extracción con diclorometano:metanol (1:1) a la esponja liofilizada, la separación fue por HPLC (gradiente de disolventes hexano, acetato de etilo y metanol). Se purificó igual por HPLC fase reversa, usando un sistema de disolventes: acetonitrilo, metanol y agua (3:3:4). La prueba biológica se realizó contra células cancerígenas humanas de mama a nivel de hormonas receptoras. (Mora, 2006).

Otro compuesto citotóxico contra células cancerígenas de leucemia (L 1210) IC_{50} 1 $\mu\text{g/mL}$, y un carcinoma de origen epidérmico (KB) IC_{50} 3 $\mu\text{g/mL}$, es el que se muestra en la **figura 22**.

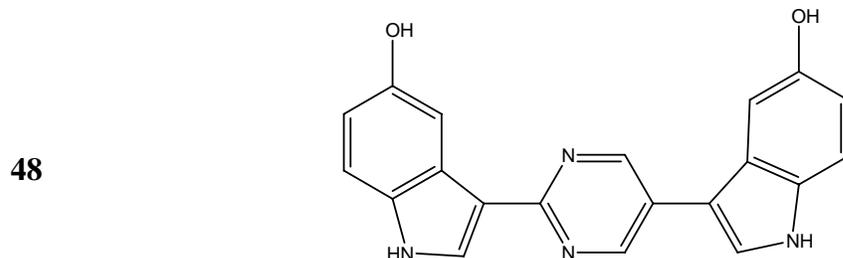


Figura 22. Estructura del hyrtinadina A.

Se obtuvo **48** de la esponja *Hyrtios* sp. (Japón), a partir de la esponja liofilizada, a la cual se le realizó una extracción con metanol. Se le adicionó agua al residuo obtenido y se llevó a cabo una extracción con acetato de etilo; el residuo se fraccionó por HPLC (fase móvil cloroformo:metanol, 45:55), la purificación también fue por HPLC, misma fase móvil, diferente proporción (40:60). (Endo, 2007).

2.3. *Desmapsamma anchorata*

La esponja marina *Desmapsamma anchorata* la describió, por primera vez, Carter (1882) con el nombre de *Fibularis anchorata* y posteriormente se reclasificó como *Desmapsamma anchorata* por Burton, (1934).

2.3.1. Taxonomía

Significa etimológicamente: *Desmapsamma* del griego. "*Desmo*" la encuadernación, como un amarradero o una tendencia para encarcelar y "*sama*" pertenece a un signo, a una marca, a una muestra, a un indicador, o a una tumba. Y del latín "*Anchorata*" significando para lanzar el ancla, para soltar o apagar; el "*anchor*" es también un símbolo de la seguridad, el refugio y el apoyo.

Pertenece a la Clase *Demospongiae*, el Orden *Poecilosclerida*, Sub orden *Ceractinomorpha*, la Familia *Esperiopsidae* y Género *Desmapsamma*. (Layli, 2006). Calcinaï (2004), la clasifica como: Orden *Poecilosclerida*, Familia *Desmacididae*, Género *Desmapsamma* y nombre común *Desmapsamma anchorata*.

2.3.2. Morfología

El color de *D. anchorata* es rosa pálido por fuera y anaranjado ladrillo en el interior con los cambios estacionales leves que pueden ser atribuidos a cambios en la química del agua, la superficie externa es lisa con dobleces dispersos y sobre ello mucosidad resbaladiza. (figura 23)

Esponja ramosa con una base lobulada, las ramas miden de 0.8 a 1.5 cm de diámetro con algunas partes de 2.5 cm, de largo miden de 5 a 15 cm. El **ósculo** es escaso, de manera irregular distribuido y rodeado por una membrana que tiene un espesor de 0.5 a 1 mm. tiene un esqueleto de ectosomal hecho del bióxido de silicio que es reforzado con **oxeas**, los centros de fibras y **espículas** e inclusive, granos de arena. (Layli, 2006).

La reticulación que se forma en el ectosoma es renieroide modificado, los tractos ascendentes miden de 15 a 60 μm de diámetro y los transversales de 9 a 40 μm , con 5 a 6 espículas en el interior de los primeros y 3 a 4 en el interior de los segundos. Se identifica principalmente por las **espículas**, aunque esta tarea se dificulta por la cantidad de partículas adheridas, ya sea por la misma arena o los organismos con los que se encuentra en asociación (Green, 1985).

Normalmente se encuentra en substratos duros en arrecifes asociados con **corales**, **gorgonias**, **hidrozoos**, **cnidarios** y otras esponjas, estas asociaciones biológicas pueden ser positivas (**mutualísticas**), negativas (**competitivas**) y sin efecto, dependiendo específicamente de cada organismos. Debido a las asociaciones, las esponjas se pueden sujetar a la alteración morfológica, mientras que, en otros casos, la esponja fuerza al anfitrión a modificar su organización morfológica.



Figura 23. *Desmapsamma anchorata* (Fotos obtenidas en 1988 y 1989, página web <http://acd.ufrj.br/labpor/5-Imagens/Bahia/Pgsa02eh.htm>)

La mortalidad de la esponja es dependiente del tamaño, la cual aumenta en colonias de tamaño medio, es una esponja muy frágil y puede fragmentarse fácilmente con el movimiento del agua. Se encuentra entre 2 y hasta más de 20 metros de profundidad en sistemas de arrecifes, así como en otros hábitats; su reproducción se reporta no sólo por fragmentación asexual, sino también por reproducción sexual. (Layli, 2006).

2.3.3. Distribución

D. anchorata se encuentra distribuida en áreas subtropicales y tropicales, como, África, centro y sur América, y el Pacífico sur. Se ha colectado en Puerto Rico: arrecife de Media Luna (McLean, 2006), La Parquera (Carballeira, 1988, 1994); también en Venezuela: Aves de Sotavento, La Ciénega de Ocumare (Compagnone, 1999) y al Norte de Sulawesi, Indonesia (Calcinai, 2004).

En México se encuentra, principalmente, en el Golfo de México y el Mar Caribe: parte occidental del Arrecife La Blanquilla, a profundidades entre los 2 y los 15 m (Green, 1986), también en el arrecife de la Anegada de Afuera (Quijano, 1994), ambas arrecifes pertenecientes a Veracruz.

2.3.4. Estudio químico

El estudio de los componentes químicos de la esponja marina *D. anchorata* fue realizado por Carballeira *et. al.* (1988), realizó una extracción con cloroformo:metanol (1:1 v/v) de la

cual obtuvo una mezcla de lípidos. Los lípidos, los glicolípidos y los fosfolípidos fueron separados por CC (fase estacionaria gel de sílice).

Los componentes grasos y los fosfolípidos fueron identificados con la obtención de sus ésteres metílicos por la reacción de los fosfolípidos con el HCl/metanólico seguido por la purificación en CC, fase móvil hexano:éter (9: 1 v/v). Los ésteres metílicos obtenidos por este método fueron analizados por CG/EM.

Se describe la presencia de los siguientes esteroides: desmosterol, colesterol, sitosterol, estigmasterol, 24-metilcolesterol, 24(S)-metilcoleste-5,22-dienol, 24(R)-metilcoleste-5,22-dienol, 24-metilcolesterol, coleste-5,22-dienol. Identificados con HPLC, ¹H-RMN y EM.

Entre los ácidos grasos, más abundantes, se encuentran: ácido tetradecanoico, pentadecanoico, 14-metil pentadecanoico, hexadecanoico, 7-metil-8-hexadecenoico (**49a**), 14-metil-8-hexadecenoico (**49b**), heptadecanoico, 3-metilheptadecanoico (**49c**), 11-octadecanoico, octadecanoico, nonadecanoico, metildocosanoico, docosanoico, henaicosanoico, behenic, tricosanoico, tetracosanoico, pentacosanoico, 5,9-hexacosadienoico y 5,9-octacosadienoico (el porcentaje de abundancia oscila entre 11% y 3%).

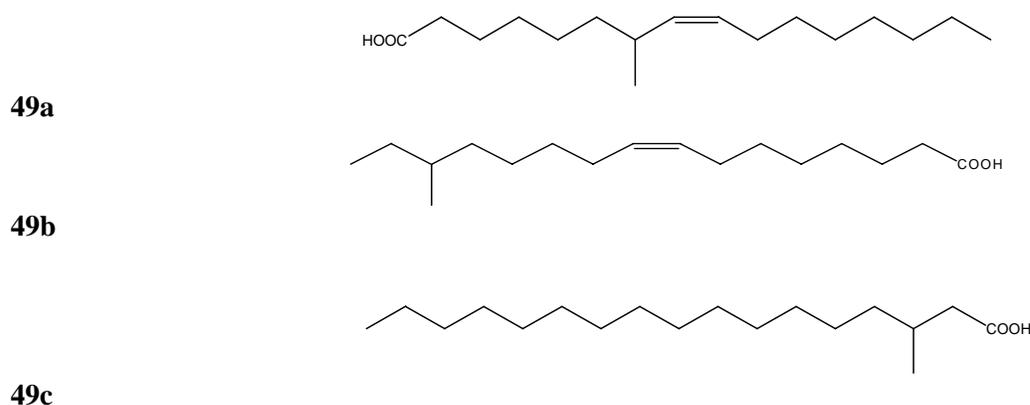


Figura 24. Estructura de ácidos grasos reportados por Carballeira, 1988.

Posteriormente Carballeira *et. al.* (Puerto Rico) en 1994, trabajó con extractos de cloroformo:metanol (1:1 v/v) obteniendo lípidos totales (6 g); los lípidos, los glicolípidos y fosfolípidos los separó con CC (silica gel). Los fosfolípidos fueron fraccionados por TLC (CPP) usando Silica gel y metanol:cloroformo:hidróxido de amonio (65:35:5) como disolvente. Identificó los siguientes fosfolípidos (fosfohetidiletanolamina, fosmotidilcolina, fosfatidilserina y fosfatidilinositol) realizando una transesterificación con HCl/MeOH al 1.0 N. Fueron obtenidos como sus ésteres metílicos, seguida por la purificación del CC, fase móvil hexano:éter etílico (9:1).

Los ácidos grasos los identificó por CG/EM, los más abundantes: ácido 5, 13-eicosadienoico (**50a**); hexadecanoico, 7-metil-6(E)-hexadecenoico (**50b**); 7-metil-6(Z)-hexadecenoico (**50c**); 14-metilhexadecanoico; 11-octadecenoico; octadecanoico; eicosanoico; heneicosanoico; tetracosanoico; y, 5, 9-hexacosadienoico.

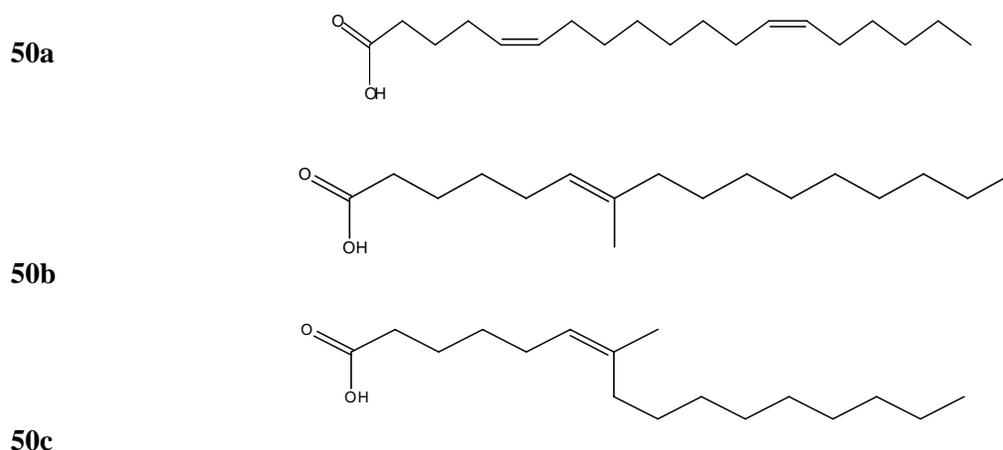


Figura 25. Estructura de ácidos grasos reportado por Carballeira, 1994.

En otro estudio, Quijano, *et. al.* (México) en 1994, exprimió la esponja obteniendo una fase acuosa (filtró el agua que contenía), a la cual realizó una extracción con acetato de etilo; el material insoluble se lavó con éter de petróleo y después con metanol. Así se obtuvieron tres extractos, de acetato de etilo, de éter de petróleo y de metanol. Los residuos fueron similares por CCF, (fase móvil diclorometano: acetona (9:1 v/v) por lo que se combinaron entre sí. Al material restante se le agregó metanol, la mezcla fue filtrada y concentrada.

La fase acuosa fue extraída con diclorometano y acetato de etilo; ya concentrados, se obtuvo un aceite rojizo, el cual se colocó en CC, mientras que el extracto metanólico se fraccionó en otra CC. La fase móvil fue éter de petróleo, éter de petróleo: acetato de etilo (en diferentes proporciones) y metanol, para ambas columnas. Los compuestos encontrados fueron los siguientes:

- La fracción del éter de petróleo dio una mezcla (135mg) de ésteres metílicos de los ácidos grasos. Analizados por CG, la mezcla indica la presencia del C14 a C21. (extracción del metanol).
- De la fracción de éter de petróleo: acetato de etilo se obtuvo una mezcla de esteroides (4.2 g, 134-140°C). Identificados con una reacción de acetilación seguida de una CG/EM. Los esteroides descritos son: desmosterol, colest-5,22-dienol, 24-metilcolest-5-22-dienol, 24-metilcolesterol, colesterol, estigmasterol y sitosterol.
- En las fracciones de éter de petróleo: acetato de etilo (4:1 y 3:1) se observó la presencia de una mezcla de monoésteres alquil de glicerol (sólido amorfo). Se obtuvo 10 mg de la fase acuosa y 300mg del residuo.

Se obtuvieron ocho compuestos del tipo de monoésteres alquil de glicerol, donde sólo varía la cadena de metilenos ($n = \text{---CH}_2\text{---}$, n varía de 13 a 20). **Figura 26.**



Figura 26. Estructura del monoéster alquil de glicerol, donde $n = \text{CH}_2$ varía desde 13 hasta 20 (Quijano, 1994).

Por su parte, Compagnone *et. al.* (1999) aisló compuestos del tipo de alquil pirrol carboxaldehídos (**Figura 52a y 52b**) de *D. anchorata* (Venezuela). A los compuestos les probaron su actividad anti-*leishmania*, como mezclas de los derivados. Los compuestos aislados de *D. anchorata*, presentaron menos actividad (LD_{50} 25 $\mu\text{g/mL}$) que otro compuesto (**figura 52c**) que presentó un $LD_{50} = 12 \mu\text{g/mL}$, aislado de otra esponja analizada en el mismo estudio y por el mismo autor, *Mycale microsignatosa*.

Los derivados los obtuvo a partir del liofilizado de la esponja (320g), se realizó una extracción con cloroformo:metanol (1:1 v/v), los disolventes se evaporaron. Al residuo se le adicionó agua, a la solución obtenida se le realizó una extracción con heptano, evaporado el disolvente se obtuvo un residuo; el cual se separó por CC (silica gel) usando como fase móvil cloroformo:metanol, para dar una mezcla de los ácidos grasos (observados en TLC como un punto) y una fracción, la C se analizó por CG/EM y RMN (^1H y ^{13}C) para su identificación, obteniendo los derivados de pirrol carboxaldehídos.

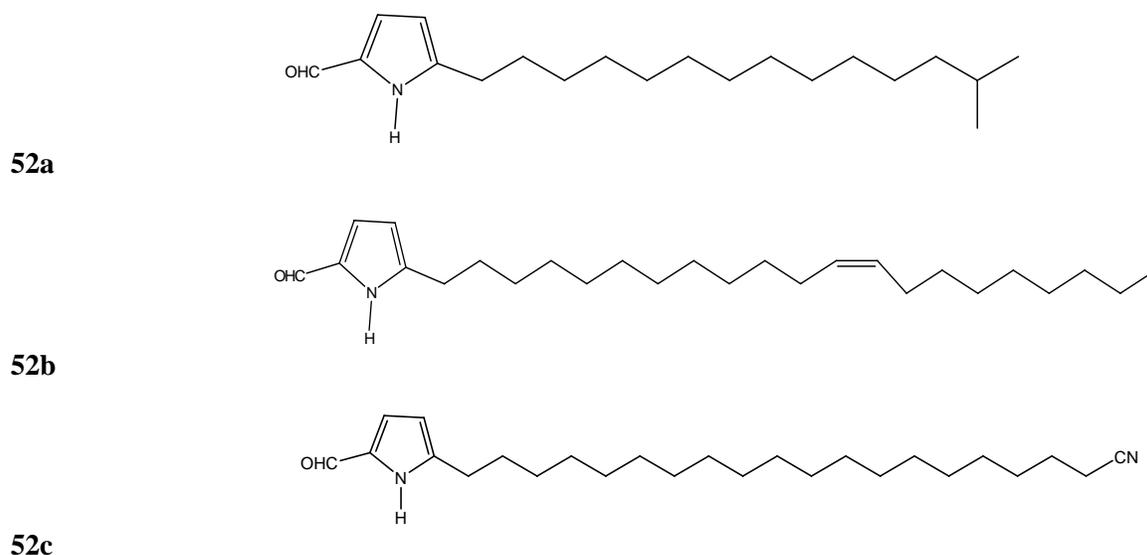


Figura 27. 5-(13-metil tetradecil)-1-pirrol-2-carbaldehido (**5a**),
5-(heneicos-12-en-il)-1-pirrol-2-carbaldehido (**5b**) *D. anchorata*.
5-(alquil nitrilo)-1-pirrol-2-carboldehido (**5c**) *M. microsignatosa*.

No se han descrito estudios de actividad citotóxica a los compuestos aislados de la esponja *D. anchorata*, sólo han demostrado la presencia de esteroides, ácidos grasos, fosfolípidos, derivados del monoésteres alquinos de glicerol y derivados del pirrol carboxaldehído, este último probado para actividad anti-*leishmania*, presentando baja actividad.

2.4. CROMATOGRAFÍA

2.4.1. Definición

La cromatografía (del griego *chroma* que significa “color”, y *graphein* que significa “escribir”), se define como una técnica que separa una mezcla de solutos basada en la velocidad de desplazamiento diferencial de los mismos que se establece al ser arrastrados por una fase móvil (líquida o gaseosa) a través de un lecho cromatográfico que contiene la fase estacionaria, la cual puede ser líquida o sólida. (Skoog, 1992 y Varcáncel, 1988).

También puede definirse de la siguiente manera: La cromatografía es un método físico de separación en el cual los componentes que se separarán se distribuyen entre dos fases, una de las cuáles es inmóvil, mientras que la otra se mueve en una dirección definida. (Braithwaite, 1999)

2.4.2. Fundamento

En las diversas técnicas cromatográficas, la separación de mezclas (de dos o varios componentes) se logra por la exposición de la mezcla en un sistema bifásico que se deja llegar a equilibrio. Las dos fases que intervienen en la separación pueden ser dos líquidos inmiscibles (cromatografía líquido-líquido), un gas y una fase líquida (cromatografía gas-líquido), un gas y una fase sólida (cromatografía gas-sólido) o un líquido y un fase sólida (cromatografía líquido-sólido). (Durst, 1985)

En todas las separaciones cromatográficas, la muestra se desplaza en una fase móvil, que puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico. Esta fase móvil se hace pasar a través de una fase estacionaria con la que es inmiscible, y que se fija a una columna o una superficie sólida.

Las dos fases se eligen de tal forma, que los componentes de la muestra se distribuyen de modo distinto entre la fase móvil y la fase estacionaria. Aquellos componentes que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil; por el contrario, los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria, se mueven con rapidez. Dada la distinta movilidad, los componentes de la muestra se separan en bandas o zonas discretas que pueden analizarse cualitativa y/o cuantitativamente. (Skoog, 1992)

2.4.3. Clasificación

Los métodos cromatográficos se pueden clasificar de tres modos distintos (Varcáncel, 1988); el primero de ellos se basa en la naturaleza de la fase estacionaria, y pueden ser:

- Adsorción. El sólido adsorbe al componente que inicialmente estaba en fase móvil (líquida o gaseosa) (fuerzas de Van der Waals).
- Cambio iónico. El sólido es un cambiador de iones (fuerzas electrostáticas).

- Exclusión (o de geles). El sólido es un gel formado por polímeros no iónicos porosos que retienen a las moléculas del soluto, según su tamaño.
- Afinidad. Es un tipo especial de cromatografía de adsorción, utilizada especialmente en bioquímica, en la que un sólido tiene enlazado a un llamado ligando de afinidad que puede ser por ejemplo, un inhibidor enzimático o un anticuerpo.

Una segunda clasificación se basa en la naturaleza de la fase móvil, y son:

- Líquido. Cromatografía líquido-líquido (partición) y cromatografía líquido-sólido (adsorción, cambio iónico, exclusión, afinidad).
- Gas. Cromatografía de gas-líquido (partición) y cromatografía de gas-sólido (adsorción).
- Fluido supercrítico. Fluido calentado a una temperatura superior a su temperatura crítica, simultáneamente comprimido a una presión mayor que su presión crítica (partición y adsorción).

Otra clasificación se basa en forma en que las fases estacionaria y móvil se ponen en contacto, y se dividen según la técnica utilizada en:

- Cromatografía en columna. En un tubo estrecho, que contiene la fase estacionaria, se hace pasar la fase móvil por presión.
- Cromatografía plana. La fase estacionaria se fija sobre una placa o a los intersticios de un papel, en este caso la fase móvil se desplaza a través de la fase estacionaria por capilaridad o por gravedad.

Los métodos que existen en cromatografía son:

- Cromatografía en papel, CP.(1850)
- Cromatografía en capa fina, CCF. (1889-1898)
- Cromatografía de intercambio iónico, CII. (1939-1945) (IEC en ingles *Ion exchange chromatography*)
- Cromatografía de impregnación de gel (exclusión del tamaño), CIG. (1958) (GPC en ingles *Gel permeation chromatography, size exclusion*)
- Cromatografía de afinidad, CA. (1967)
- Cromatografía de gas, CG. (1950)
- Cromatografía de fluidos supercrítico, CFS. (1930)
- Cromatografía de líquidos de alta resolución, CLAR. (1963) (HPLC en ingles *High performance liquid chromatography*)
- Electroforesis capilar de zona, ECZ. (1937) (CZE en ingles *Capillary zone electrophoresis*)

La electroforesis capilar de la zona es una técnica relativamente reciente (1974) la separación está basada en los índices diferenciados de la migración de especies iónicas en un campo eléctrico aplicado a través de una columna capilar. (Braithwaite, 1999)

- Cromatografía de adsorción.

La adsorción, es un fenómeno de superficie que se manifiesta por un aumento de la concentración del soluto en la interfase que rodea el medio estacionario. La separación está basada en las diferencias de comportamiento, adsorción (desorción, de sustancias contenidas en la fase móvil sobre un sólido estacionario, y pueden ser sistemas líquido-sólido y gas-sólido. En cualquier fenómeno de adsorción influyen tres variables, adsorbente, eluente y solutos; la polaridad de las tres anteriores es importante, ya que influye en el comportamiento de una sustancia en disolución y en el poder adsorbente de la fase estacionaria. A mayor polaridad del soluto aumenta la adsorción, por lo cual se separan sustancias de media o baja polaridad. Lo ideal es elegir la polaridad del eluente análoga a la de la muestra, en la mayoría de los casos adsorbentes activos para sustancias no polares y menos activos para las más polares. (Watty, 1982).

- Cromatografía de partición

La cromatografía de reparto o partición se lleva a cabo sobre tiras de papel filtro, en columnas o en capas finas de polvo de celulosa, gel de sílice húmeda o polvo de diatomeas. En cada uno de estos casos, el medio poroso sirve únicamente como soporte de una fase estacionaria líquida. La separación en este tipo de cromatografía se logra mediante la tendencia diferencial que tienen los compuestos a residir disueltos en la fase estacionaria líquida que cubre los granos del soporte sólido o a migrar disueltos en la fase móvil líquida que se desplaza. Se define el coeficiente de reparto o partición como el cociente entre concentración de la sustancia en la fase estacionaria y en la fase móvil.

- Pares de iones

La cromatografía de pares de iones, que puede considerarse un subconjunto de la cromatografía de fase inversa, puede tratar con especies ionizadas o ionizables en columnas de fase inversa. El método de supresión de iones también está limitado a un intervalo de pH de 2.0-7.5, por la inestabilidad de las fases estacionarias enlazadas fuera de este intervalo de pH.

- Intercambio iónico

Se lleva a cabo con empaques de columna que tienen grupos funcionales cargados unidos a una matriz polimétrica. Los grupos funcionales son grupos iónicos enlazados permanentemente y asociados con contraponos de carga opuesta.

- Exclusión

También llamada cromatografía de permeación en gel, en un modo de separación no interactivo. Las partículas del empaque de la columna tienen varios tamaños y estructuras de poro, de forma de las moléculas son retenidas o excluidas con base en un volumen molecular hidrodinámico. La separación no se basa en el peso molecular. (Willard, 1991)

2.4.3.1. Cromatografía en columna.

Se clasifica de acuerdo al tipo de fase móvil y estacionaria, y en la clase de equilibrios implicados en la transferencia de los solutos entre las fases, como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 3. Clasificación de los métodos cromatográficos en columna.

Clasificación	Método específico	Fase estacionaria	Tipo de equilibrio
Cromatografía de líquidos (CL). Fase móvil: líquida.	Líquido-líquido, o reparto	Líquido adsorbido sobre un sólido	Distribución entre líquidos inmiscibles
	Líquido-fase unida químicamente	Especies orgánicas enlazadas a una superficie sólida	Distribución entre el líquido y la superficie enlazada
	Líquido-sólido, o adsorción	Sólido	Adsorción
	Intercambio iónico	Resina de intercambio iónico	Intercambio iónico
	Exclusión por tamaño	Líquido en los intersticios de un sólido polimérico	Distribución/exclusión
Cromatografía de gases (CG). Fase móvil: gas.	Gas-líquido	Líquido adsorbido sobre un sólido	Distribución entre un gas y un líquido
	Gas-fase unida químicamente	Especies orgánicas enlazadas a una superficie sólida	Distribución entre el líquido y la superficie enlazada
	Gas-sólido	Sólido	Adsorción
Cromatografía de fluidos supercríticos (CFS). Fase móvil: fluido supercrítico.		Especies orgánicas enlazadas a una superficie sólida	Distribución entre el fluido supercrítico y la superficie enlazada.

En la cromatografía en columna, la elución implica el transporte de una especie a través de una columna por la adición continuada de nueva fase móvil. Una única porción de la muestra se introduce en la parte superior de la columna, después de lo cual, los componentes de la muestra se distribuyen entre las dos fases.

La introducción de fase móvil adicional (eluyente) hace que la fase móvil que contiene una parte de la muestra avance por la columna, donde tiene lugar un posterior reparto entre la fase móvil y las porciones frescas de fase estacionaria a las que accede. Al mismo tiempo, tiene lugar una distribución entre el disolvente nuevo y la fase estacionaria en el lugar en el que inicialmente se ubicaba la muestra. Las sucesivas adiciones de la fase móvil hacen avanzar las moléculas de soluto por la columna en una serie de continuas transferencias entre las fases estacionaria y móvil.

- Cromatografía Líquida en Columna.

En la cromatografía en columna el adsorbente se introduce en un tubo o columna (generalmente de vidrio), como adsorbente se emplea alúmina (Al_2O_3) o gel de sílice (ácido silícico, $SiO_2 \cdot xH_2O$) y como fase móvil disolventes orgánicos, la cual se hace caer a través de la columna, es decir, la fuerza motriz es la gravedad. (Skoog, 1992)

Los distintos componentes de la mezcla se adsorberán en la superficie del sólido con afinidades diferentes (fuerzas de unión). La fase móvil desplazará y disolverá los componentes de acuerdo con su afinidad por la superficie sólida y la solubilidad de las sustancias en ella. El factor unitario más importante es el establecimiento del equilibrio. Presenta algunos inconvenientes, desde el punto de vista práctico: es lenta, es poco eficaz tanto en la capacidad de discriminación entre solutos como en el número de solutos que pueden separarse, es tediosa por la necesidad de la intervención casi constante del operador.

- Cromatografía Líquida de Alta Resolución, CLAR.

La cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) es una cromatografía en columna en la cual una bomba fuerza el solvente a través del embalaje de la columna, consecuentemente, se aumenta el caudal del solvente y mejora la separación. Tiene categoría de instrumento, ya que proporciona información sobre la composición de la materia al tener un detector continuo integrado en el sistema hidrodinámico.

Se consideran cuatro tipos más importantes de columnas. Éstos son: a) fase normal (la fase móvil es de naturaleza no polar, mientras que la fase estacionaria es polar, como la sílica o alúmina). b) Fase inversa (la fase móvil es polar y la estacionaria no polar (como C18). c) de intercambio iónico (puede ser una resina del intercambio aniónico o una resina de intercambio catiónico). d) exclusión del tamaño (de la filtración de gel).

El diámetro estrecho de la columna, el tamaño de partícula muy pequeña y el empaque de la columna requieren que los solventes estén particularmente puros y libres de residuo insoluble. En la mayoría de los casos, los solventes se deben filtrar a través de los filtros ultra finos y desgasificarlos (han disuelto los gases quitados) antes de utilizarse.

Entre los componentes de un cromatógrafo de líquidos se tienen los siguientes: a) los indispensables para la modalidad isocrática simple (depósito de disolvente, bomba de alta presión, sistema de inyección, columna, detector continuo y registrador); b) los precisos para llevar a cabo una elución con variación de la composición de la fase móvil (depósito con varios disolventes, sistema electrónico de programación de gradiente, con o sin cámara de mezcla); c) los que mejoran el funcionamiento (supresor de pulsos, control de temperatura de la columna, regulador de caudal de la bomba, indicador de presión de la bomba); d) los que mejoran el sistema de toma y tratamiento de datos (integrador electrónico o microprocesador, pantalla, impresora), que ofrecen resultados según requerimientos, aplicando programas de discriminación matemática entre picos; y e) los que están orientados a fines preparativos (colector de fracciones). (Skoog, 1992)

Cuando el detector que responde a la concentración del soluto y se registra la señal en función del tiempo (o del volumen de fase móvil añadido), se obtienen una serie de picos; este gráfico se denomina cromatograma, es útil para el análisis cualitativo como cuantitativo. La posición de los picos en el eje del tiempo puede servir para identificar los componentes de la muestra, las áreas bajo los picos proporcionan una medida cuantitativa de la cantidad de cada componente. (Skoog, 1992).

En un sistema cromatográfico estable el tiempo de retención de un soluto particular es constante y, por lo tanto, puede utilizarse para identificar ese soluto. Así, aunque la cromatografía es primordialmente una técnica de separación, es posible identificar los componentes separados de una mezcla compleja por medio de sus tiempos de retención. El grado de separación o resolución de las bandas adyacentes se define como la distancia entre los picos de las bandas (o centros) dividida entre el ancho promedio de las bandas. (Willard, 1991)

2.4.3.2. Cromatografía plana

La cromatografía plana es un tipo de cromatografía líquida en la que la fase estacionaria está extendida sobre la superficie de un plano y la fase móvil fluye a través de ella. La fase móvil siempre es un líquido, mientras que la fase estacionaria puede ser un líquido soportado en un sólido (cromatografía de partición) o un adsorbente (cromatografía de adsorción, intercambio iónico o exclusión).

En la cromatografía plana, la disolución de la muestra a separar se sitúa sobre el plano que contiene la fase estacionaria en forma de mancha (CCF), a veces en forma de banda (CPP), a corta distancia de uno de los extremos de dicho plano. Una vez seca la mancha o banda, el extremo del plano próximo a la misma se pone en contacto con la fase móvil, manteniendo todo el sistema cromatográfico en una cámara cerrada. La separación se produce por la migración diferencial de los componentes de la muestra en la dirección en que se mueve la fase móvil.

- Cromatografía en Capa Fina (CCF).

En la cromatografía en capa fina, la fase estacionaria (que puede ser de partición, adsorción, cambio iónico o exclusión) se deposita en forma de capa delgada sobre una placa de vidrio, de plástico o metálica; la acción capilar del adsorbente hace subir el disolvente desde una depósito situado en la parte inferior de la placa.

En cromatografía plana, la posición de los solutos se mide mediante los valores de R_f (factor de retraso), este factor se define como la relación entre la velocidad de desplazamiento del soluto y la velocidad de desplazamiento de la fase móvil a un tiempo:

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida por la zona de soluto (Zs)}}{\text{distancia recorrida por la fase móvil (Zf)}}$$

También se puede determinar el R_x , cuando se compara con un estándar. En donde se sustituye la distancia recorrida por la fase móvil por la distancia recorrida por el estándar.

La cromatografía de capa delgada tiene varias aplicaciones importantes en química orgánica (Pavia, 1995), puede ser utilizada en los usos siguientes:

- Establecer si dos componentes son idénticos
- Para determinar el número de componentes en una mezcla
- Para determinar el solvente apropiado para una separación cromatográfica de la columna
- Para supervisar una separación cromatográfica de la columna
- Para comprobar la eficacia de una separación alcanzada en una columna, por la cristalización o por el extracción
- Para supervisar el progreso de una reacción

- Cromatografía en Placa Preparativa (CPP).

Este tipo de cromatografía no es más que una extensión de la CCF, con los mismos fundamentos, ventajas y desventajas; pero con fines preparativos, existe el riesgo de descomposición de las sustancias separadas, debido a su exposición al ambiente. En la cromatografía de placa preparativa se usan capas gruesas (que oscila entre 1 y 2 mm), para separar cantidades de sustancias del orden de 100mg; la disolución de la muestra debe ser lo más concentrada posible (hasta 10%) pudiendo utilizar hasta 10 mL de disolución. A diferencia de la CCF, la muestra se coloca en banda, además, en una placa preparativa no se pueden usarse reveladores destructivos o si se los usa hacerlo en el extremo de la placa. (Varcáncel, 1988).

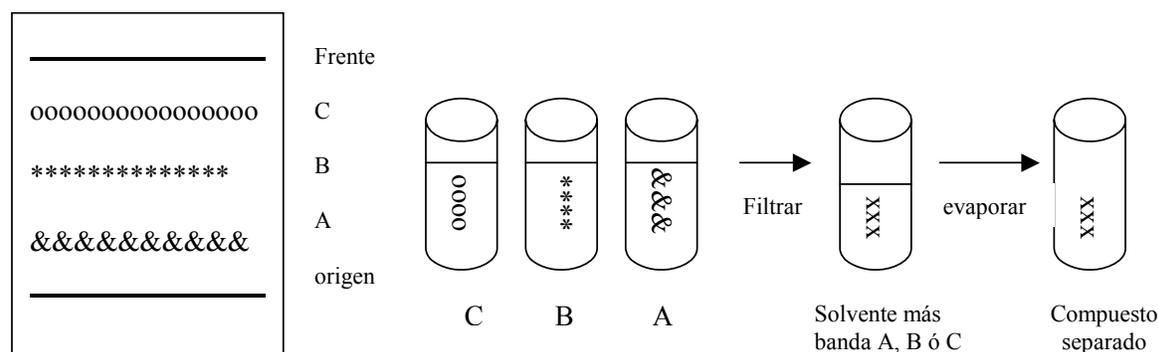


Figura 28. Técnica de cromatografía en placa preparativa, CPP.

Luego se raspa el adsorbente del soporte y se extrae las sustancias con el solvente adecuado. Se centrifuga tomando el sobrenadante o bien se filtra, se evapora el solvente y obtenemos así compuestos puros. (**figura 28**).

- Cromatografía en Capa Fina Centrífuga (CCFC)

Este tipo de cromatografía se realiza en un Chromatotron (**Figura 29**), es una cromatografía de capa fina circular, con aceleración centrífuga radial. (diseñado por los autores del compendio de métodos sintéticos orgánicos), substituye las placas de CCF preparativas, las columnas pequeñas y CLAR. Las dimensiones totales son 30x35x30 centímetro.

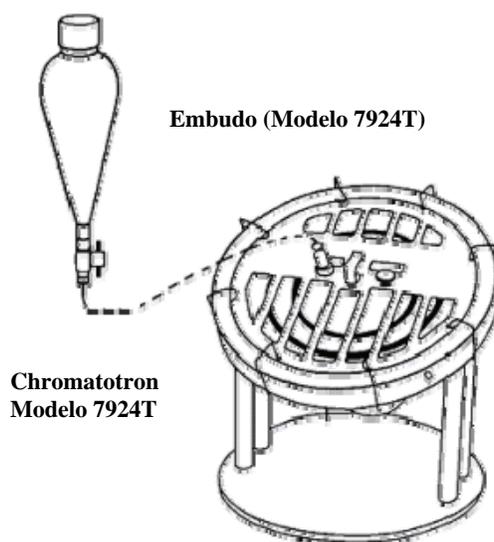


Figura 29. Chromatotron (Imagen obtenida de la página web <http://www.harrisonresearch.com/chromatotron/specs.html>.)

La muestra que se separará se aplica, como solución, cerca del centro de un disco que está cubierto con una capa delgada del adsorbente. Por el disolvente de elución forma bandas, circulares al girar, de los componentes separados, a los cuáles se hacen girar junto al borde del rotor junto con el disolvente (**Figura 30**). Un novedoso sistema de recolección trae la fase móvil a un solo tubo de la salida.

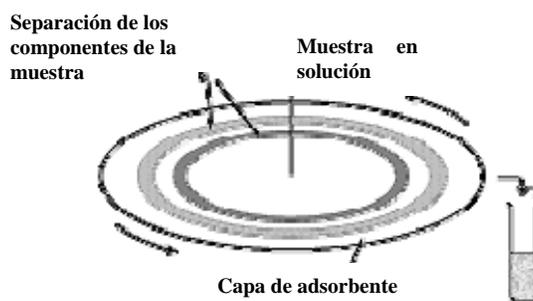


Figura 30. Teoría de operación de la cromatografía de capa fina centrífuga. (Imagen obtenida de la página web <http://www.harrisonresearch.com/chromatotron/specs.html>.)

Tiene la capacidad de hasta 500 mg por el componente, cerca de 1 g total. Como cromatografía de capa fina, puede utilizarse los siguientes adsorbentes: Gel de silicona y alúmina; así como también la fase móvil, compatible con todos los solventes comunes de la

cromatografía, incluyendo el ácido acético. No es conveniente para el uso con los ácidos minerales. Es una técnica sencilla la cual tiene las siguientes advertencias especiales:

- Las separaciones se terminan rápidamente, típicamente en el plazo de 20 Min.
- Una tapa transparente permite la observación directa de compuestos absorbentes o coloreados por UV durante la separación.
- El grueso de la capa de 1, 2 o 4 milímetros da alta capacidad. La capa del adsorbente se regenera fácilmente *in situ* para la reutilización.
- Los solventes se utilizan en mínima cantidad. El gradiente de elución es fácil. Una atmósfera del nitrógeno previene la oxidación de muestras.
- Manejable (fácilmente transportado desde un laboratorio hasta otro laboratorio), pocos controles, no maneja altas presiones.

El monitoreo de las fracciones se pueden realizar por CCF convencional. La conexión al índice de refracción y los monitoreos con UV no se recomiendan. Puede ser utilizado con un colector de fracciones, aunque la colección a mano es adecuada.¹

¹ La información de la Cromatografía en Capa Fina Centrífuga, se obtuvo del proveedor Harrison (2007), en la página web <http://www.harrisonresearch.com/chromatotron/specs.html>.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los compuestos aislados, purificados y caracterizados de las esponjas marinas, han presentado efectos potenciales como agentes antifúngicos, antimicrobianos, antiinflamatorios, inhibidores de VIH y anticancerígenos.

No obstante, no a todas las esponjas se les ha evaluado la actividad biológica de sus componentes químicos, como es el caso de la esponja marina *Desmapsamma anchorata*, de la cual, se han aislado lípidos en extractos metanólicos y clorofórmicos (Carralreira, 1988, 1994); esteroides y derivados de glicerol de extractos de metanol y acetato de etilo (Quijano, 1994). Otro tipo de compuestos aislados son los derivados de pirrol carboxaldehído, cuya evaluación fue la de anti-*Leshmania* (Compagnone, 1999). Sin embargo, no todos los compuestos caracterizados de esta esponja, han sido evaluados en estudios de actividad biológica.

De particular interés es la actividad antitumoral reportada para algunos de los compuestos aislados de las esponjas marinas, (algunos poseen una estructura semejante entre sí). Puesto que el cáncer ocupa el tercer lugar de mortalidad en México², según datos del INEGI, y el cuarto lugar de acuerdo a la OMS³; resulta importante la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos con actividad citotóxica en células cancerígenas.

Las esponjas marinas se han considerado como un recurso potencial de diversos compuestos con actividad biológica. A pesar de que México posee litorales marinos (es de los países con mayor extensión de litorales en el mundo) y una gran diversidad de esponjas (Green, 1985, 1985), la evaluación de la actividad biológica de los compuestos aislados es un campo poco explorado. En la presente investigación se propone realizar extracciones con diferentes disolventes, obtener sus extractos y realizar con ellos la evaluación biológica, que permitirá conocer si presentan actividad citotóxica.

² Fuente INEGI, 2007. www.inegi.gob.mx

³ Fuente OMS, 2007. www.who.int/es/

4. OBJETIVOS

4.1 General

Realizar el estudio químico de la esponja marina *Desmapsamma anchorata*, y probar su actividad biológica (citotoxicidad).

4.2 Particulares

- Extraer la materia orgánica de la esponja, utilizando distintos disolventes (hexano, diclorometano, metanol, etanol:agua y agua).
- Aislar (en cantidad suficiente), y caracterizar los componentes de cada extracto, mediante estudios espectroscópicos.
- Determinar la posible actividad citotóxica de alguno de los extractos obtenidos.

5. HIPÓTESIS

Diversos estudios realizados a diferentes esponjas marinas, han permitido el aislamiento de metabolitos secundarios que presentan una gran variedad de actividades biológicas, entre las que destaca la actividad citotóxica; por lo que, de los extractos crudos obtenidos en la esponja marina *D. anchorata*, es probable encontrar alguno con ésta actividad biológica.

6. METODOLOGÍA

Para obtener los extractos crudos, se emplearon disolventes grado analítico, (GA. J.T. Baker) a excepción del agua, que es destilada por fraccionamiento. Los disolventes utilizados para la recuperación de los extractos, las pruebas de solubilidad y la fase móvil de cromatografía, fueron destilados por fraccionamiento; excepto el cloroformo, que es grado analítico.

La eliminación de los disolventes fue con nitrógeno, N₂ (gas) (para cantidades pequeñas) y destilación al vacío (para cantidades mayores); para este último se utilizó un rotavapor BÜCHI —baño: a 40°C Hesting Bath B-490, Rotavapor: R-205 (rotación en rpm), vacío: Vacuum Controller V-805, controles: Vac V-500, recirculador: ECO 20 (temperatura entre 2-5°C) —; y de acuerdo al disolvente se trabajó a las siguientes presiones (en mbar), agua: 72, cloroformo: 474, diclorometano: atmosférica, etanol: 175, hexano: 335, y metanol: 337.

Se utilizó hielo seco, CO₂ (sólido), para el traslado de la esponja. La liofilización se llevó a cabo en un liofilizador LABCONCO/FREEZONE G, a -40°C con 330x10⁻³ mbar de presión.

El fraccionamiento de los extractos fue por solubilidad en diferentes disolventes y por los siguientes métodos: cromatografía en capa fina (CCF), la cromatografía en columna (CC), y cromatografía en capa fina centrífuga (CCFC) —para fines prácticos es abreviada, en este trabajo, como CCen (cromatografía centrífuga)—, el monitoreo fue por CCF. Para cromatografía en capa fina (CCF), se utilizaron placas 20x20 de Silica Gel 60, MACHEREY-NAGEL (ALUGRAM® SIL G/UV₂₅₄). La placas para la cromatografía preparativa (CPP), fueron de 20x10 ALUMGRAM® SIL 100 G/UV₂₅₄.

La cromatografía en columna (CC), se usaron columnas de diferentes longitudes y diámetros con gel de sílice (SiO₂) 230/400 y 70/230. En la cromatografía centrífuga (CCen), se empleó un Chromatotron modelo 7924T y un multicolector, Super Fraction Collector, Advantec SF-2120.

Las placas de CCF y CPP primero se visualizaron, con una lámpara UV (Spectroline®. Model Enf-260C) a 254 y 365 nm, posteriormente se revelaron con yodo (exponiendo directamente la cromatoplaca en una cámara de yodo) y/o con sulfato cérico al 1% en ácido sulfúrico 2N.⁴ (La fase móvil está expresada en v/v).

La caracterización de las muestras se llevó a cabo por CCF, usando colesterol (estándar secundario Aldrich, 95%, p.f.: 147-149) como referencia; punto de fusión, en grados Celsius, °C (Fisher Scientific); además de RMN (¹H y ¹³C), IR (transformada de Fourier), EM (impacto electrónico)⁵ y CLAR/EM.

⁴ Modo de preparación: Poner sobre el hielo los 12 g del Ce(SO₄)₂, agregar los 22.2 mL de H₂SO₄ concentrado, agitar con una varilla de vidrio, calentar hasta disolución —si la disolución no es completa, filtrar a través de papel— y guardar en recipiente ámbar.

⁵ Experimentos realizados en el Instituto de Química, UNAM, CLAR realizado en el laboratorio de Cromatografía, por Carmen Márquez y Erendira.

Los espectros de RMN ^1H y RMN ^{13}C se registraron en un equipo Varian a 300MHz, Varian-Gemini 200 MHz y Eclipse 300 MHz JEOL; utilizando en todo los casos disolventes deuterados y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los desplazamientos químicos están expresados en partes por millón (δ) en relación al tetrametilsilano. Las abreviaturas utilizadas son: s=singulete, d=doblete, dd=doble de doble, t= triplete, c= cuadruplete, q= quintuplete y m=multiplete.

Los espectros de infrarrojo (IR), se registraron en los instrumentos Perkin-Elmer 283B y Nicolet Magna IR TM 750. Los datos de espectrometría de masas (EM) fueron registrados con un espectrómetro por la técnica de impacto electrónico JEOL JMS-AX 5505 HA y fueron obtenidos a 70 eV

La cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), se registró en un Cromatógrafo Waters 1525, acoplado a un espectrómetro de masas Bruker Esquire 6000 con trampa de iones y ESI. Todos los disolventes utilizados fueron grado HPLC (J.T. Baker).

Para el tratamiento ácido, se utilizó ácido sulfúrico concentrado, Aldrich.

6.1 Obtención de extractos

6.1.1 Colecta de la esponja.

Se confirmó en la NOM-059-ECOL-2001⁶, que la esponja en estudio no se encontraba en peligro o riesgo. Posteriormente, se solicitó el permiso ante CONAPESCA⁷, dependencia de SAGARPA, bajo la asesoría del M. en C. Simón Sánchez García.⁸

La colecta se llevó a cabo en el sistema arrecifal Veracruzano, arrecife de Santiaguillo (**Figura 31**), en Enero del 2004. Se realizó por buceo, con la colaboración de la Bióloga Patricia Gómez⁹, quien fue la encargada de identificar la esponja. La esponja fue localizada a 4.7 m de profundidad (29°C) y a 14.6 m (27°C), se realizó el corte dejando la parte unida al sustrato para su regeneración. La esponja se mantuvo en hielo seco durante su transporte y se conservó en congelación hasta su análisis.

6.1.2 Liofilización

Aproximadamente 2 Kg de esponja se cortaron en fragmentos pequeños; se colocaron en matraces bola de 250 mL, a baño frío (hielo seco en acetona); enseguida se situaron en el liofilizador, hasta sequedad de las muestras.

⁶ Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001, Protección ambiental – especies nativas de México de flora y fauna silvestres – categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión o cambio – Lista de especies en riesgo. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.

⁷ CONAPESCA-01-014: Solicitud de permiso de colección de ejemplares vivos en aguas de jurisdicción federal, para el mantenimiento y reposición de colecciones científicas y culturales, así como los destinados al ornato, espectáculos públicos, acuarios y zoológicas.

⁸ Instituto de Química de la UNAM.

⁹ Instituto de Ciencias del Mar y Limnología.

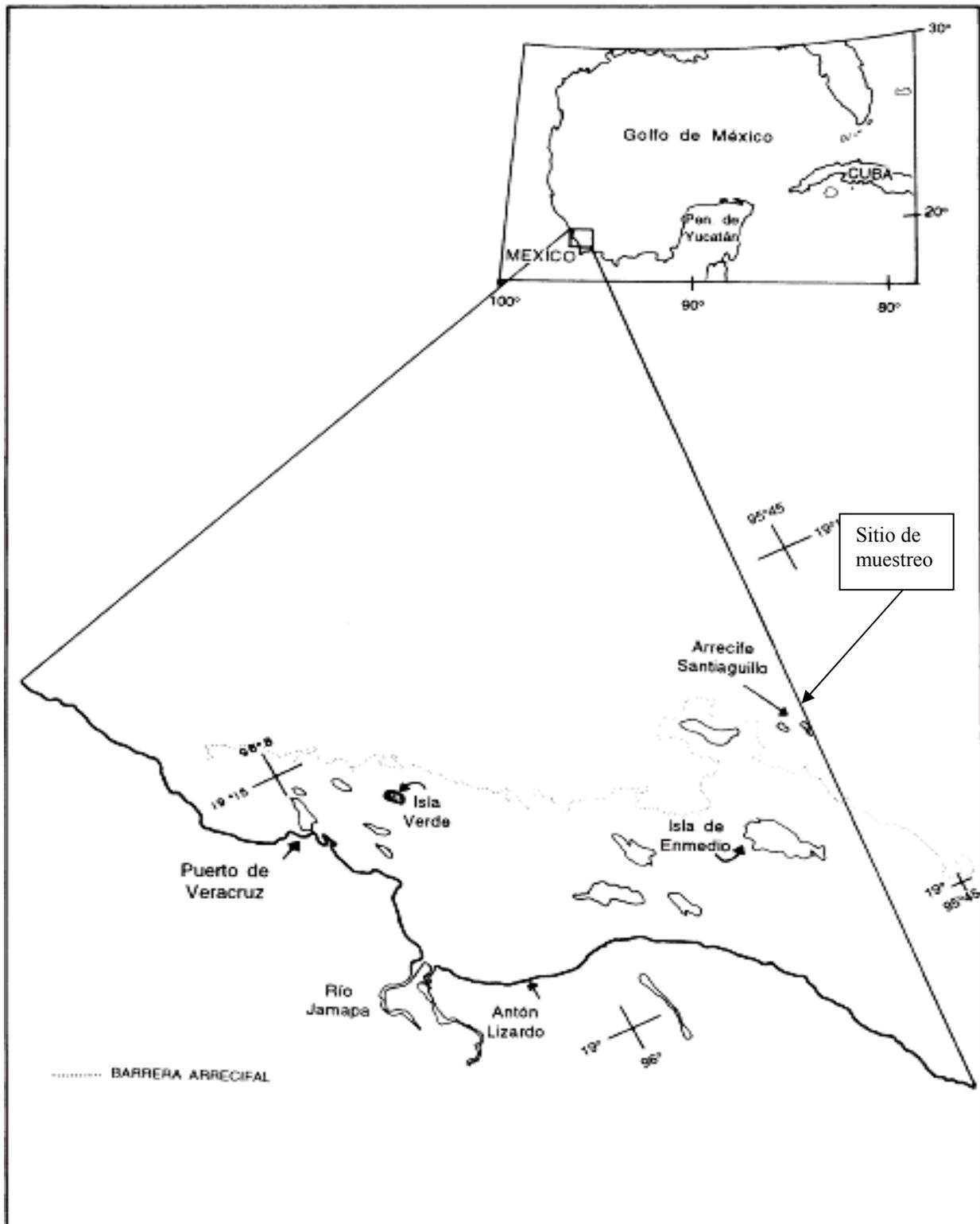


Figura 31. Lugar de muestreo de la esponja: Sistema arrecifal Veracruzano, arrecife de Santiaguillo

6.1.3 Extracciones

La muestra liofilizada se trató con los disolventes en orden de polaridad creciente, en cada caso se realizaron 3 extracciones consecutivas de 1L cada una; como se muestra en la **figura 32** y de la manera en que se describe a continuación:

En un matraz bola de 5 L, se juntó toda la muestra liofilizada y se adicionaron los disolventes consecutivamente (Hex, CH₂Cl₂, MeOH, EtOH:H₂O, H₂O), cada uno se dejó en reposo por 24 horas, a temperatura ambiente; transcurrido el tiempo, se filtró con papel Whatman No. 2 a un matraz bola de 250 mL. El extracto se concentró en rotavapor, después de eliminar el disolvente, el residuo se recuperó con CH₂Cl₂ (para el extracto de Hex y CH₂Cl₂), con CH₂Cl₂, MeOH y H₂O (para el extracto de MeOH), y MeOH (para el extracto de EtOH:H₂O). Estos dos últimos, al tratarlos con los disolventes mencionados, se observó un precipitado, el cual se eliminó a través de papel Whatman No. 2.

A los extractos crudos se les realizó una prueba de solubilidad, así como también CCF, buscando el sistema de elución que permitiera observar la separación de compuestos con la mayor resolución posible.

6.1.4 Fracciones

El fraccionamiento por solubilidad se llevó a cabo agregando el disolvente a la muestra y separando la parte soluble (solución) de la parte insoluble (precipitado), mediante decantación.

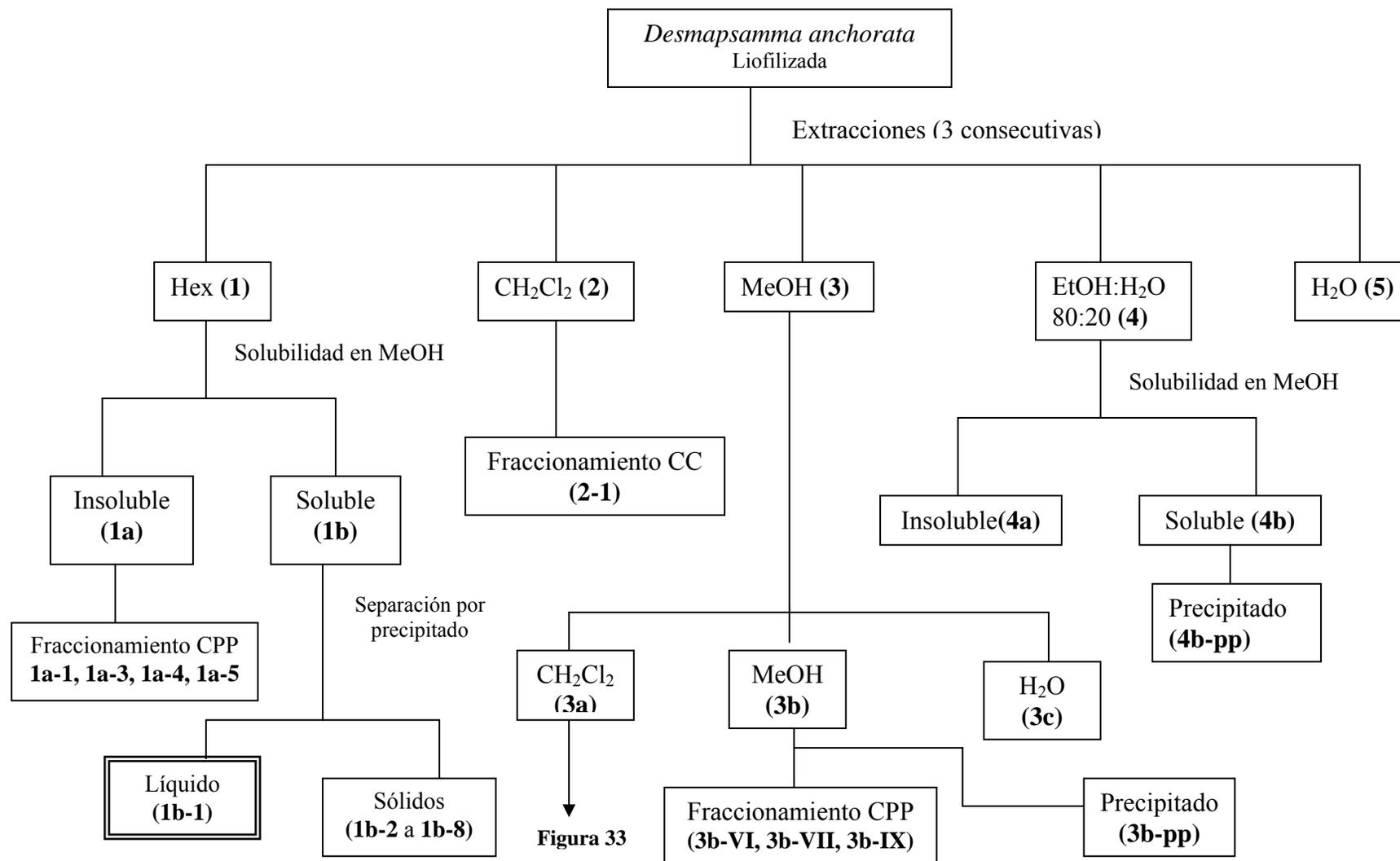
En la cromatografía de placa preparativa (CPP), la cromatoplaca se eluye con la fase móvil que presenta mayor resolución; se evaporan los disolventes y se revela con UV_{254,365}, sólo una franja en el extremo derecho se revela con sulfato cerico y/o Iodo, marcando los componentes separados (fracción 1: frente de disolvente, fracción 10: punto de aplicación de la muestra).

La cromatografía en columna (CC), se realizó usando silica como fase estacionaria (30g de silica por cada gramo de muestra). Los disolventes se adicionaron de manera consecutiva, del menos polar al de mayor polaridad; el cambio de fase móvil se realizó cuando ya no se observó coloración en la fracción colectada.

En cuanto a la cromatografía centrifuga (CCen), se colocaron los disolventes de acuerdo a la solubilidad de la muestra, del menos polar al más polar, cambiando el disolvente, o mezcla de disolventes, hasta que no se observó coloración en la fracción colectada.

El tratamiento ácido se llevó a cabo en la siguiente forma: se adicionó a 200 mg de muestra, 0.2 mL de H₂SO₄ y 1.0 mL de H₂O. Dicha mezcla se colocó en un embudo de separación, adicionando AcOEt, se registró el pH inicial y enseguida se lavó con H₂O hasta pH neutro. Se separó la fase orgánica (AcOEt), de la inorgánica, a la fase orgánica se le eliminó el disolvente en rotavapor; al residuo se le realizó una CCF.

Figura 32. Obtención de extractos crudos y fracciones de la esponja *D. anchorata*.



6.1.4.1 Fraccionamiento del extracto crudo de Hexano, 1. (Figura 32)

El fraccionamiento del extracto crudo de hexano **1**, se realizó agregando metanol, separando la parte insoluble (**1a**) de la soluble (**1b**); el sólido suave insoluble (**1a**) se fraccionó a su vez, por CPP utilizando como fase móvil AcOEt:Hex (1:1). A las fracciones más abundantes se les realizó pruebas espectroscópicas (**1a-1** RMN de ^1H y ^{13}C , IR, EM y **1a-4** y **1a-5** RMN de ^1H y ^{13}C) y a los sólidos punto de fusión. (ver Pág. 52)

En la parte soluble **1b** (solución amarilla) se observó un precipitado, el cual se separó por decantación, cada vez que se separaba el sólido de la solución se observaba nuevamente precipitado, se separó cada vez. Al líquido amarillo muy viscoso, **1b-1**, se obtuvo el espectro de RMN. Los sólidos **1b-2** al **1b-8** (precipitado de la solución) se compararon con colesterol por CCF y se les determinó el p. f. (ver Pág. 52)

6.1.4.2 Fraccionamiento del extracto crudo de Diclorometano, 2. (Figura 32)

El fraccionamiento del extracto crudo de diclorometano (**2**) se realizó por cromatografía en columna, CC. Se colocaron 615 mg del extracto crudo en la columna, enseguida y de manera consecutiva se adicionó Hex (100%), AcOEt:Hex (50:50), AcOEt (100%), AcOEt:MeOH (50:50) y por último MeOH (100%). Se colectaron fracciones de 50 mL, cada una. El disolvente se eliminó en rotavapor, se recuperó el semisólido con CH_2Cl_2 y se dejó a temperatura ambiente hasta sequedad. (Resultados Pág.54).

A la fracción más abundante (**2-1**) se le realizaron pruebas espectroscópicas de RMN de ^1H , IR y EM. (ver Pág. 53)

6.1.4.3 Fraccionamiento de los extractos crudos del Metanol, 3.

Del extracto crudo de metanol (**3**) se obtuvieron inicialmente tres fracciones de acuerdo al disolvente con el que se recuperó el residuo: CH_2Cl_2 (**3a**), MeOH (**3b**) y H_2O (**3c**) (como se muestra en la **Figura 32**). Sólo las muestras **3a** y **3b** se fraccionaron.

6.1.4.3.1 Fracción de diclorometano, **3a**. (Figura 33)

A la fracción de diclorometano **3a** se observó un precipitado, **3a-pp**, el cual se separó de la solución ámbar, esta solución se dejó a temperatura ambiente hasta sequedad. El sólido ámbar obtenido **3a**, se fraccionó de acuerdo a la solubilidad, primero se le agregó CH_2Cl_2 (**3a-I**), enseguida se adicionó AcOEt al sólido insoluble, se separó la parte soluble (**3a-II**) de la insoluble; al sólido insoluble en AcOEt se extrajo con MeOH, y de igual manera, se separa la parte soluble (**3a-III**) de la insoluble (**3a-IV**).

La fracción metanólica (**3a-III**) se le realizó pruebas de citotoxicidad, RMN, IR y EM, y al precipitado (**3a-pp**) se obtuvo el espectro de IR y se realizó tratamiento ácido.

Al realizar la prueba de citotoxicidad a **3a-III** se observó actividad, por lo que una parte del sólido inicial **3a** (fracción de diclorometano) se fraccionó por CCen, usando como fase

móvil AcOEt (100%), AcOEt:MeOH (50:50) y MeOH (100%); para cada uno de los disolventes y mezcla de disolventes se colectaron 40 fracciones, el monitoreo fue por CCF.

Muestras con similitud cromatográfica (R_f semejante) se unieron en una sola, teniendo al final fracciones de la **3a-A** a la **3a-X**, las más abundantes (**3a-C**, **3a-L**, **3a-K** y **3a-P**) se les realizaron pruebas espectroscópicas de IR, EM, RMN, CLAR y la prueba de citotoxicidad. El fraccionamiento de **3a** se muestra en forma esquematizada en la **figura 33 (pág. 46)**.

6.1.4.3.2 Fracción de metanol, **3b**. (Figura 32)

En la fracción de metanol (**3b**) también se observó precipitado, **3b-pp**, el cual se separó de la solución **3b** (se dejó a temperatura ambiente hasta sequedad), se realizó RMN de ^1H a **3b**.

El fraccionamiento de **3b** fue por CPP, colocando 200 mg de muestra en la placa, como fase móvil se utilizó AcOEt:MeOH (2:8). Revelando en UV y Yodo. Se separan las fracciones desde **3b-I** hasta **3b-X**. Las más abundantes (**3b-VI** y **3b-IX**) se les realizó pruebas espectroscópicas de RMN de ^1H , IR y EM. Mientras que el precipitado (**3b-pp**) se obtuvo el espectro de IR y se realizó tratamiento ácido.

6.1.4.3.3 Fracción de agua, **3c**. (Figura 32)

El sólido obtenido de la fracción de agua (**3c**) se analizó por IR y p.f.

6.1.4.4 Extracto crudo de EtOH:H₂O (80:20) (4).

Al extracto crudo de EtOH:H₂O se trató con MeOH, y se obtuvo un precipitado **4a**, el cual se separó de la solución **4b**. La solución se dejó a temperatura ambiente hasta sequedad, formándose sólidos cristalinos (**4b-pp**), los cuales se separaron de **4b**.

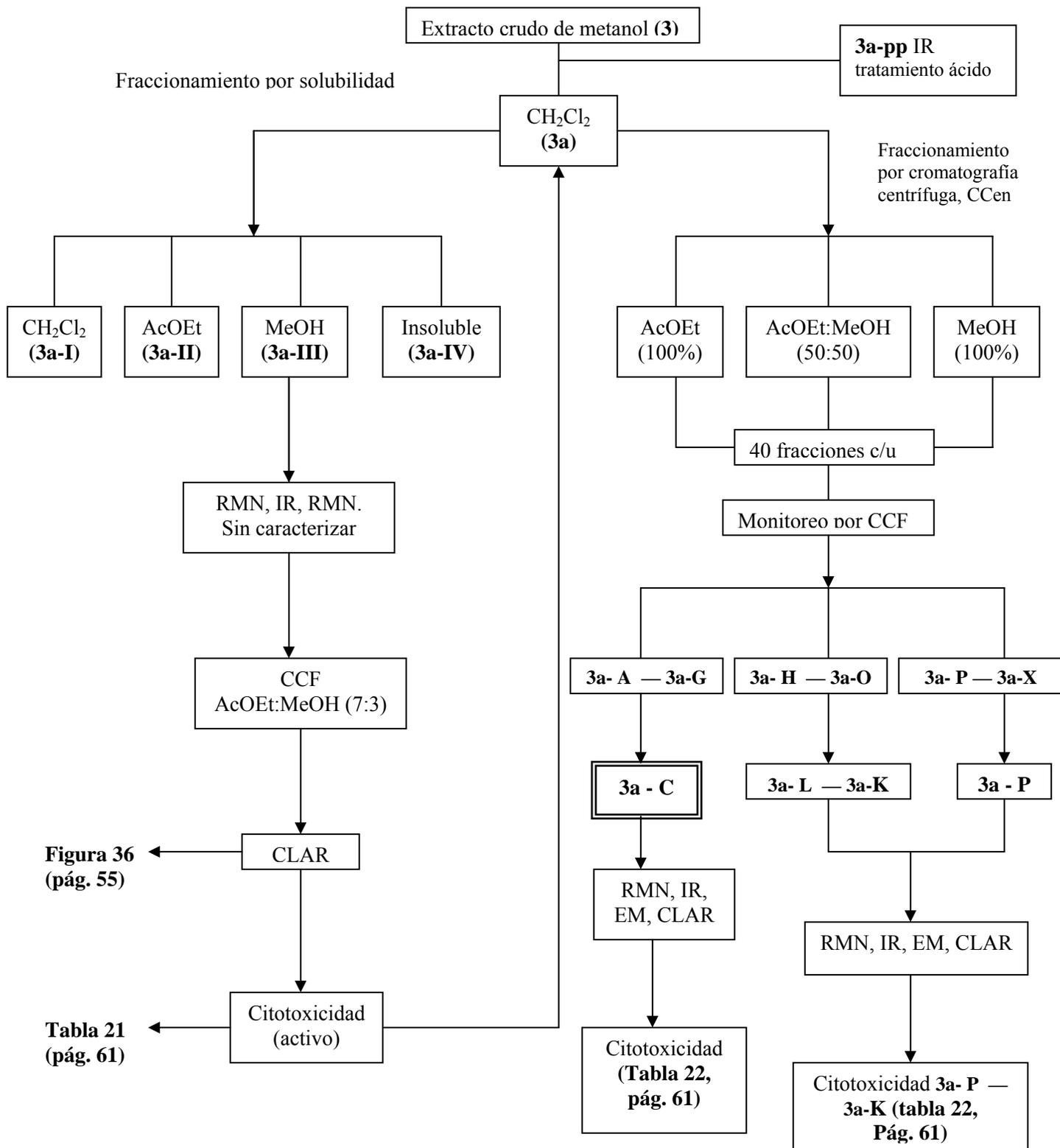
El sólido insoluble en metanol (**4a**) se sometió a tratamiento ácido y se obtuvo el espectro de IR.

De la fracción **4b** se obtuvo el espectro de RMN de ^1H ; mientras que a **4b-pp** se le realizó la prueba espectroscópica de IR y tratamiento ácido.

6.1.4.5 Extracto crudo de H₂O (5).

Se obtuvo un sólido café (**5**) de esta fracción, el cual se analizó por IR y se determinó p. f.

Figura 33. Fraccionamiento de extracto de metanol **3a**.



6.2 Prueba biológica: Citotoxicidad¹⁰.

Las células humanas de cáncer, utilizadas, fueron las siguientes:

U251 : sistema nervioso central (SNC)
PC-3 : próstata
K562 : leucemia
HCT-15 : colon
MCF-7 : mama
SKLU-1 : pulmón

Las líneas celulares pertenecen al panel del NCI (National Cancer Institute), las cuales se adaptaron al medio de cultivo RPMI-1640 (medio 1640 del Roswell Park Memorial Institute), adicionado con suero fetal bovino al 5%, una mezcla de antibióticos al 10% y 2 mM de glutamina. Las líneas celulares se adhieren a las botellas de cultivo y para cosecharlas se adicionó 1mL de tripsina-EDTA. La tripsina actúa produciendo la digestión de las proteínas de adherencia y el EDTA se encarga de quelar los cationes divalentes Ca^{2+} y Mg^{2+} , necesarios para que actúen las proteínas de adherencia.

Una vez que las células se desprendieron del sustrato plástico de la botella de cultivo, se le adicionó 5-10 mL de medio de cultivo para inactivar la tripsina. Las células en suspensión se depositaron en tubos cónicos y se centrifugaron por 3 minutos; ya formado el paquete celular se le adicionó medio de cultivo para resuspender las células. De la suspensión se tomó 0.05 mL del inóculo y se resuspendió en 0.45 mL de azul de tripano, colorante que permite contar a las células vivas; ya que éste no penetra en el citoplasma de las células viables, mientras que las células que no presentan una membrana íntegra aparecen de color azul.

El recuento de células se llevó a cabo utilizando una cámara de Neubauer, para lo cual la cámara se limpió con etanol al 70%, se secó y se colocó en una superficie horizontal. Posteriormente, se tomó una alícuota de 10 μL de la suspensión celular y se colocó en la cámara de Neubauer. Con la ayuda de un microscopio se contaron las células viables, localizadas en los cuatro cuadrantes correspondientes a la cuenta de linfocitos.

El número de células por mililitro de suspensión se obtuvieron de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$C = (RC)(10^{-4})$$

donde:

C = número de células en un mililitro de suspensión.

RC = promedio de células obtenido de la cuenta de los cuatro cuadrantes de la cámara.

¹⁰ Estudio realizado en el Instituto de Química, UNAM, en el Departamento de Pruebas Biológicas por la M. en C. Ma. Teresa Ramírez Apan.

Una vez determinado el número de células por mL, se realizaron los ajustes necesarios para depositar el inóculo en un volumen de 100 µL/pozo a la densidad indicada. Para realizar los ensayos se utilizaron microplacas de plástico con 96 pozos. Cada placa se inoculó con dos líneas celulares por triplicado y se preincubó por 24 horas a 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂ y 100% de humedad relativa, para permitir que las células alcanzaran la fase exponencial de crecimiento antes de adicionar las muestras a probar.

Para realizar un crecimiento primario de los compuestos se utilizó la concentración más alta permitida 100 µM; **todas las muestras se disolvieron en metanol**. Inmediatamente después de la preparación de las muestras en solución, se agregaron 100µL, siendo el volumen final del pozo de 200 µL. Nuevamente la microplaca se incubó por 48 horas bajo las condiciones antes mencionadas.

Al finalizar el periodo de incubación de los compuestos con las células, éstas se fijaron *in situ* añadiendo 50µL de una solución de ácido tricloroacético (TCA) frío al 50% para células adheridas o al 80% para células en suspensión y se incubaron a 4°C por 60 minutos. La ventaja que presenta el TCA es la de fijar rápidamente las células y no crear artefactos morfológicos que puedan interferir con la lectura.

Posteriormente, el sobrenadante se desechó y las placas se lavaron 5 veces con agua desionizada y se secaron al ambiente. El teñido de las células fijadas el sustrato del pozo, se realizó con 100µL de una solución al 0.4% de sulforodamina B (SRB) y se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente. La SRB no unida se removió por 3 lavados con ácido acético al 1% y la placa se dejó secar al ambiente.

La sulforodamina B es un colorante aniónico, el cual reacciona con los grupos sulfónicos y sulfhídricos de las proteínas, formando un complejo que solubiliza en soluciones básicas débiles. Este colorante ofrece importantes ventajas, tales como linealidad de 1.5-2.0 unidades de densidad óptica, estable al ambiente, independiente del metabolismo intermediario y presenta mayor sensibilidad que otros bioensayos.

Una vez realizada la tinción, a las placas se les agregó 100µL de un buffer de tris y se agitaron por 10 minutos para favorecer la solubilización del complejo. Transcurrido este tiempo se solubilizó el colorante SRB con tris-base, se agitaron las placas por 30 min y finalmente se tomó lectura en un lector de microplacas Bio Kenetics (EL 340 de BIO-TEC™) a 515 nm. A continuación se midió la densidad óptica (DOt). Adicionalmente se manejan 3 pozos tratados con MeOH (DOc) y 2 pozos testigos, que corresponden a aquellos que no contienen células pero si compuesto (DOb).

El porcentaje de inhibición del crecimiento se calcula con la siguiente ecuación:

$$\%IC = 100 - \left(\frac{DOt - DOb}{DOc - DOb} \right) * 100$$

7. RESULTADOS

7.1. Estudio químico

7.1.1. El extracto crudo obtenido de la extracción con hexano (**1**), presentó las siguientes características físicas:

Tabla 4 .Características físicas del extracto (**1**).

Peso (g)	3.9944
Color	Rojizo
Consistencia	Sólido suave
Fase móvil en CCF (v/v)	AcOEt:Hex (1:1)
Solubilidad	Soluble en Hex, CH ₂ Cl ₂ y CHCl ₃ . Parcialmente soluble en MeOH

La solubilidad en metanol permitió separar el extracto hexánico (**1**) en dos fracciones, una insoluble (**1a**) y otra soluble (**1b**). El fraccionamiento de la parte insoluble (**1a**) fue por CPP, en la cual se obtuvieron 10 fracciones (fracción 1= frente de disolvente, fracción 10= punto de aplicación de la muestra). Las fracciones que se obtuvieron en cantidad suficiente para su análisis fueron **1a-1**, **1a-3**, **1a-4**, **1a-5**.

A continuación se presentan las características físicas de la muestra **1a-1**.

Tabla 5. Características físicas de la muestra **1a-1**.

Peso (mg)	19.4
Color	Amarillo
Consistencia	Líquido muy viscoso
No. de componentes por CCF	Al menos 6 Fase móvil AcOEt:Hex (1:1)

Los resultados espectroscópicos de RMN e IR, fueron los que se muestran a continuación:

RMN de ¹H (CDCl₃) δ (ppm) 300 MHz, de la fracción 1a-1.

1.25 (s) -(CH₂)_n-, 5.36 (m) -HC=CH-, 0.93, 0.92, .090, 0.88, 0.85, 0.82, 0.80 (septeto) CH₃-CH-CH₃.

RMN de ¹³C (CDCl₃) δ (ppm) 300 MHz, de la fracción 1a-1.

173.34, 173.30 (C=O), 139.74 (C=), 130.53 (C=), 129.90 (HC=), 128.93 (HC=), 122.59 (C-CO), 73.67, 62.09, 56.69, 62.09 (C-O ó C-NH), varias señales entre 42.30-35.78-29.36-25.07-21.02-11.84 (-CH₂-, -CH₃).

IR (cm⁻¹), película, de la fracción 1a-1.

2924-2853 (-CH₃, -CH₂-), 1463 (-CH₃), 1377 (-CH₃), 722 (-CH₂-)_{n>4} donde n es mayor que 4, 972 (HC=CH), 801, 842 (C=CH), 1738 (C=O), 1243 (-O-C=O), 3453 (-OH).

EM (IE⁺), de la fracción 1a-1

m/z = 17 (HO⁺) 18 (HOH), 43 (CHO₂), 213 (C₁₃H₂₅O₂) y 607, 579, 551, 523,

En la **tabla 6** se muestran las Características físicas de las fracciones **1a-3**, **1a-4** y **1a-5**,

Tabla 6. Características físicas de las muestras **1a-3**, **1a-4** y **1a-5**.

Muestras	1a-3	1a-4	1a-5
Peso (mg)	3.2	40.0	33.6
Color	Blanco	Blanco	Blanco
Consistencia	Sólido amorfo	Sólido amorfo	Sólido amorfo
p.f. (°C)	119	125-126	125-126

Los espectros de RMN de ¹H, presentan similitud en las fracciones **1a-4** y **1a-5**, y en el punto de fusión, lo que puede indicar que son muestras semejantes. Enseguida se muestran los datos de **1a-4**.

RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm), de la fracción 1a-4.

5.35-5.34 (d) (H-C=C-H), 3.47-3.57 (m) (H-C-OH), 2.28-2.25 (dd) (H-O-C), 1.01 (s) (CH₃-C), 0.878-0.873 (d) (CH₃-C-H), 0.69 (d) (CH₃-C-C-H), 0.78-0.90 (m) (-CH₂-aromáticos), 1.55-1.02 (m) (-CH₂-alifáticos).

RMN de ¹³C (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm), de la fracción 1a-4.

140.76 (C5), 121.70 (C6), 71.81 (C3), 56.88 (C14), 56.16 (C17), 50.15 (C9), 42.31 (C4, C13), 39.79 (C16), 39.69 (C24), 37.27 (C1), 36.51 (C10), 36.19 (C22), 35.78 (C8, C20), 31.92 (C7), 31.68 (C2), 28.24 (C12), 28.02 (C25), 24.30 (C23), 23.02 (C15), 22.82 (C26), 22.56 (C27), 21.08 (C11), 19.39 (C19), 18.72 (C21), 11.86 (C18).

Los resultados de RMN de ¹H y de ¹³C, permitieron determinar que la muestra **1a-4** se trata de colesterol, por lo que se compararon los datos obtenidos de ¹³C con datos obtenidos en la literatura (**tabla 7, pág. 51**); finalmente para confirmar, se comparó por CCF con un estándar de colesterol (**figura 34, pág. 52**).

Tabla 7. Comparación de datos de RMN de ^{13}C obtenidos de la muestra **1a-4**, con reportados en el catálogo SADTLER (1985).

Posición	SADTLER*	1a-4	Posición	SADTLER*	1a-4
C1	37.3	37.27	C15	23.8	23.02
C2	31.6	31.68	C16	39.8	39.79
C3	71.7	71.81	C17	56.2	56.16
C4	42.3	42.31	C18	11.9	11.86
C5	140.8	140.76	C19	19.4	19.39
C6	121.6	121.70	C20	35.8	35.78
C7	31.9	31.92	C21	18.7	18.72
C8	35.8	35.78	C22	36.2	36.19
C9	50.2	50.15	C23	24.3	24.30
C10	36.5	36.51	C24	39.5	39.69
C11	21.1	21.08	C25	28.0	28.02
C12	28.2	28.24	C26	22.8	22.82
C13	42.3	42.31	C27	22.6	22.56
C14	56.8	56.88	-	-	-

*SADTLER STANDARD, Collection Carbon-13 NMR. Sadtler Research Laboratories in: 1985.

El fraccionamiento de la parte soluble en metanol (**1b**) del extracto hexánico (**1**) se realizó por decantación (al colocar metanol se formaba un precipitado el cual se separó cada vez que se formaba), obteniendo un total de 8 fracciones (de la **1b-1** a la **1b-8**). La fracción **1b-1** presenta las siguientes características físicas y espectroscópicas:

Tabla 8. Características de la muestra **1b-1**.

Peso (mg)	118.6
Color	Amarillo
Consistencia	Líquido muy viscoso
No. de componentes por CCF	Al menos 5
Fase móvil AcOEt:Hex (1:1)	

RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) δ (ppm), de la fracción **1b-1**. (Fig. 39, C, pág. 66)
 6.54, 6.50 (dd) =CH-CH=; 6.27, 6.22 (dd) =CH-CH=; 5.40-5.31 (m) -HC=CH-; 3.76-3.64 (m) -CH₂-CO-; 2.31-2.29, 2.27-2.26, 2.23-2.22 (td) -HC=CH-HC=CH-; 2.09-2.01

(m) $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}$; 1.67-1.49 (m) $\text{CH}_2\text{-HC=CH-CH}_2$; 1.28 (s) $-(\text{CH}_2)_n$; 1.04, 1.01, 0.99 (t) $\text{CH}_2\text{-CH}_2$; 0.83 (s) $-(\text{CH}_2)_n$; 0.85 (s) $-(\text{CH}_2)_n$; 0.72 y 0.71 (s) $-\text{C-CH}_3$.

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 200 MHz) δ (ppm), de la fracción **1b-1**. (Fig. 40, D, pág. 67)

178.40 (C=O), 140.34 (C=), 130.23 (C=), 129.23 (HC=), 128.60 (HC=), 128.34 (HC=), 121.45 (HC=), 72.30, 71.66, 70.28, 66.32, 64.07, 55.98, 49.99 (C-O ó C-NH), 39.43, 37.15, 33.90, 31.88, 31.50, 29.66, 29.43 ($-\text{CH}_2-$), 29.33 intensa ($-\text{CH}_2-$)_n, 29.26, 23.78, 22.68, 22.54 ($-\text{CH}_3$).

IR (cm^{-1}), película, de la fracción **1b-1**. (Fig. 41, E, pág. 68)

2926, 2854 ($-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-$), 1461 ($-\text{CH}_3$), 1377 ($-\text{CH}_3$), 722 $-(\text{CH}_2)_{n \geq 4}$, 1413 (C=C), 971 (C=C), 3393 ($-\text{OH}$), 1049 ($-\text{OH}$ primario), 1713 (C=O).

EM (EI^+), de la fracción **1b-1**. (Fig. 42, F, pág. 69)

m/z 17 (HO^\bullet) 18 (HOH), 43 (CHO_2), y de la cadena alifática en: 185 ($\text{C}_{11}\text{H}_{21}\text{O}_2$), 213 ($\text{C}_{13}\text{H}_{25}\text{O}_2$) y 255 ($\text{C}_{16}\text{H}_{31}\text{O}_2$).

De acuerdo a los resultados de citotoxicidad, sección 7.2. resultados de citotoxicidad **tabla 23** (pág. 62), la muestra **1b-1** presentó actividad citotóxica.

Las muestras **1b-2** a la **1b-8** resultaron ser sólidos, por lo que se determinó el punto de fusión (**tabla 9**), además se compararon con un estándar de colesterol por CCF (**figura 34**).

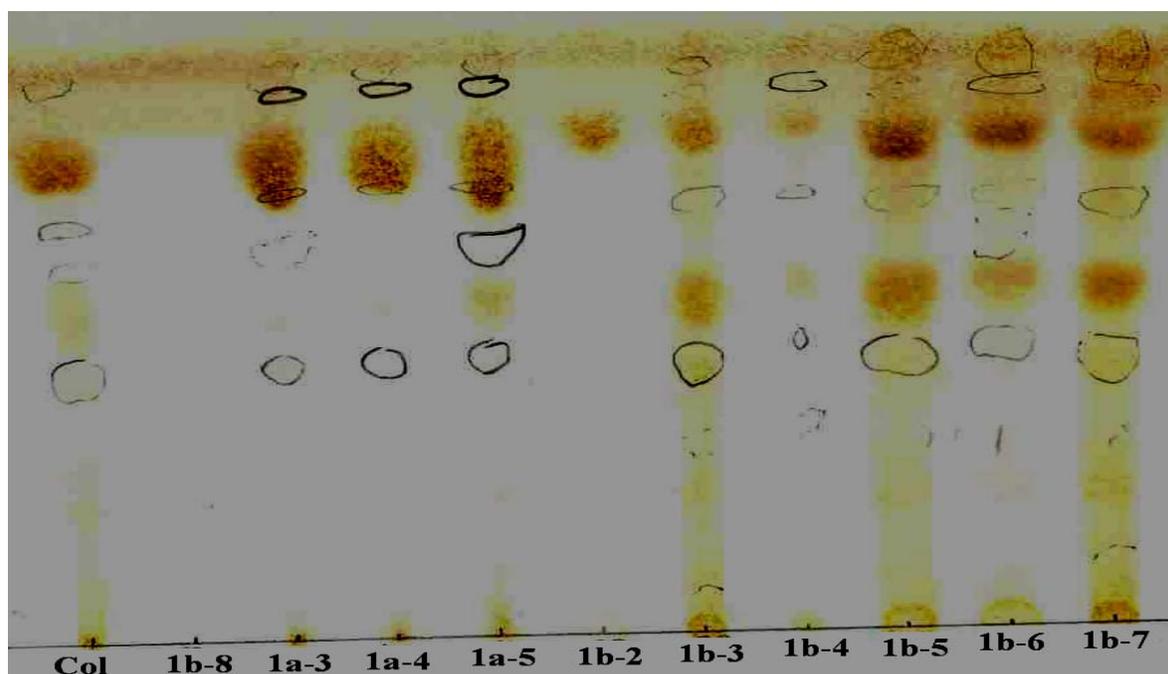


Figura 34. Comparación de un estándar de colesterol (**Col**) con los sólidos obtenidos del fraccionamiento del extracto de hexano. Fase móvil = AcOEt:Hex (1:1). $\text{R}_f = 1$ (colesterol).

Tabla 9. Punto de fusión de los sólidos precipitados de **1b**.

Muestra	Peso (mg)	p. f. (°C)	Aspecto
Colesterol	referencia		Sólido amorfo color blanco
1b-2	24.1	95-97	Sólido amorfo color blanco
1b-3	10.2	117-120	Sólido amorfo color blanco
1b-4	22.9	76-79	Sólido suave ligeramente amarillo
1b-5	9.0	71-73	Sólido amorfo ligeramente amarillo
1b-6	1.2	*	Sólido amorfo ligeramente amarillo
1b-7	10.0	92-95	Sólido suave ligeramente blanco
1b-8	15.4	64-65	Sólido amorfo color blanco

* a 300 °C no funde, sólo se descompone (se oscurece).

7.1.2. El extracto crudo obtenido de la extracción con CH_2Cl_2 (**2**) presenta las siguientes características físicas:

Tabla 10. Características físicas del extracto con CH_2Cl_2 (**2**).

Peso (g)	0.6458
Color	Ámbar
Consistencia	Semisólido muy aromático
Fase móvil en CCF (v/v)	AcOEt:Hex y AcOEt: CH_2Cl_2 (1:1)
Solubilidad	Soluble en Hex, CH_2Cl_2 y CHCl_3 . Parcialmente soluble en AcOEt Insoluble en MeOH

El fraccionamiento del extracto crudo de CH_2Cl_2 (**2**) se llevó a cabo por CC, obteniendo 23 fracciones. La fracción más abundante resultó la **2-1**; en la **tabla 11** se observan las características físicas de la muestra y enseguida los resultados espectroscópicos.

Tabla 11. Características de la muestra **2-1**.

Peso (mg)	205.8
Color	Ámbar
Consistencia	Semisólido translúcido
No. de componentes por CCF	1 componente Fase móvil AcOEt: CH_2Cl_2 (1:1)

RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) δ (ppm), de la fracción 2-1. (Anexos Fig. 53, K, pág. 92)
5.36-5.32 (t) $\text{H}-\text{C}=\text{C}-\text{H}$, 2.06-2.00 (t) $-\text{CH}_2-\text{C}=\text{C}$, 1.25 (s) $-\text{CH}_3$, 0.90-0.84 (t) $-\text{CH}_3$.

IR (cm^{-1}), película, de la fracción 2-1. (Anexos Fig. 54, L, pág. 93)
3006 (C=C), 2925-2853 ($-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_3$) 721 $-(\text{CH}_2)_{n>4}-$,

EM (EI^+), de la fracción 2-1. (Anexos Fig. 55, M, pág. 94)
 m/z ($\text{M}+1$) 449. $\text{C}_{32}\text{H}_{64}$ PM 448.5

Las fracciones **2-3** a la **2-5** se obtuvo una mínima cantidad por lo que no se analizaron por espectroscopia, mientras que las fracciones **2-6** a la **2-10** no se observó separación por CCF (mezclas complejas de más de tres componentes), en las fracciones **2-11** a la **2-23** se obtuvo una mínima cantidad, además de que no se observa separación por CCF (**figura 35**). Todas estas fracciones (**2-1** a la **2-28**) presentan la característica de ser líquidos muy viscosos color amarillo, en diferentes tonalidades.

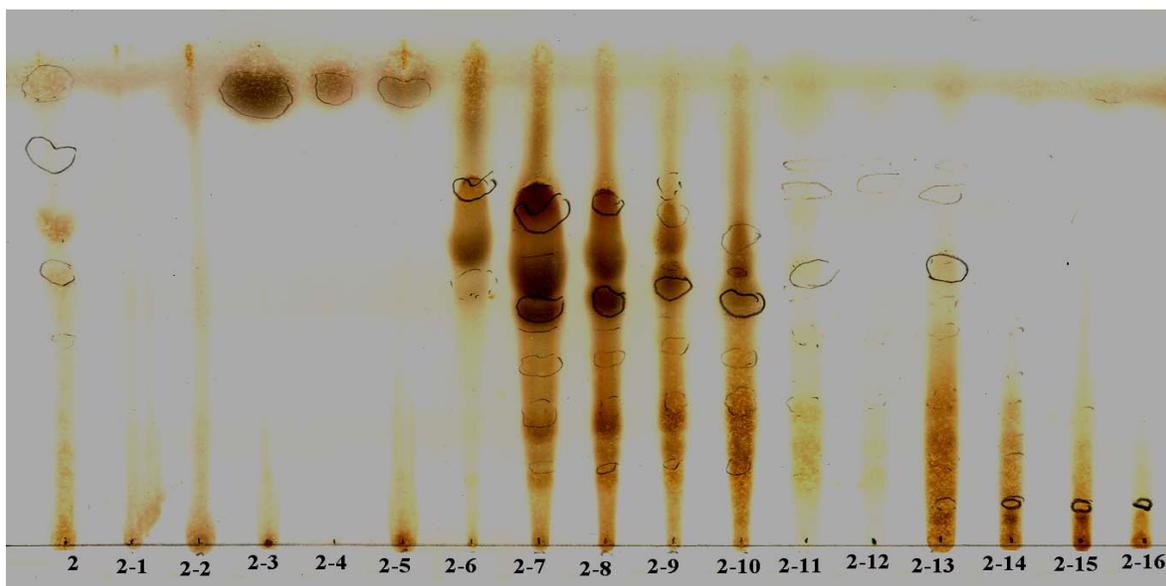


Figura 35. Fracciones (**2-1** a la **2-16**) obtenidas del fraccionamiento del extracto crudo de CH_2Cl_2 (**2**) por CC. Fase móvil AcOEt:Hex (1:1)

7.1.3. Extracto crudo de metanol (**3**)

Del extracto crudo metanólico (**3**) se obtuvieron 3 fracciones, de acuerdo al disolvente utilizado al recuperar el residuo inicial (como se indica en la sección **6.1.3.**, **Fig. 32**, pág. **43**), las fracciones son las del CH_2Cl_2 (**3a**), la del MeOH (**3b**) y la del H_2O (**3c**).

7.1.3.1. La fracción de CH_2Cl_2 (**3a**) presenta las siguientes características físicas:

Tabla 12. Características de la muestra de la fracción de CH_2Cl_2 (**3a**) obtenida del extracto crudo de metanol (**3**).

Peso (g)	1.5872
Color	Ámbar
Aspecto	Sólido de apariencia cristalina, flexible, muy aromático.
Fase móvil en CCF	AcOEt:Hex (1:1 y 2:8).
Solubilidad	Soluble en CH_2Cl_2 y CHCl_3 . Ligeramente soluble en AcOEt Parcialmente soluble en MeOH

El fraccionamiento de la fracción de CH₂Cl₂ (**3a**), fue por solubilidad en diclorometano (**3a-I**), en acetato de etilo (**3a-II**) y metanol (**3a-III**). Las características de la fracción más abundante **3a-III**, son las que se encuentran en la **tabla 13**.

Tabla 13. Características físicas de la fracción **3a-III** (obtenida de la fracción de CH₂Cl₂ (**3a**)).

Peso (mg)	573.2
Color	Amarillo
Consistencia	Semisólido suave, ceroso
No. de compuestos	18 por CLAR*

* Eluyente ACN/agua: 10/90 (inicial), 80/20 (20 minutos) 100/0 (30 minutos).

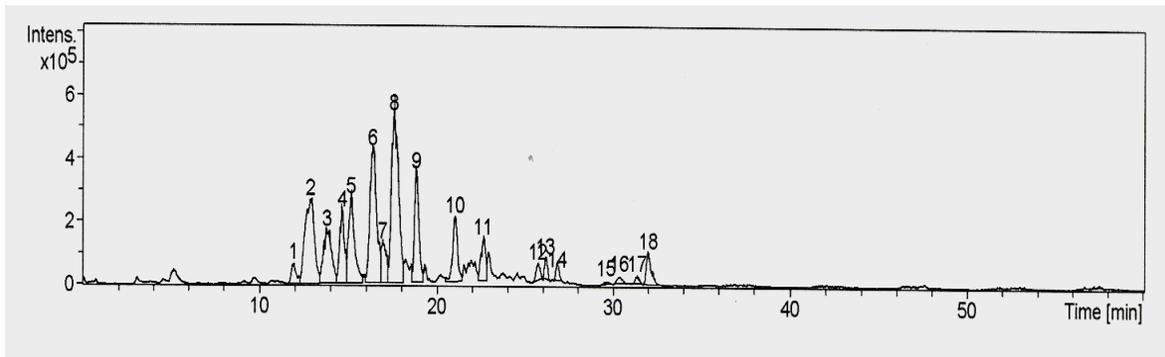


Figura 36. Cromatograma de CLAR, de la fracción del metanol **3a-III**.

Los resultados de citotoxicidad se muestran en la **tabla 21** de la sección **7.2**. (resultados de citotoxicidad., **pág. 61**), obteniendo un %IC de 51.52 en células HCT-15 (colon).

La muestra **3a-III**, se trata de una mezcla compleja (por el número de componentes). Por lo que se realizó nuevamente un fraccionamiento de la muestra original **3a** (fracción de CH₂Cl₂, **Fig. 33**, **pág. 46**) se fraccionó por otro método, CCen, obteniendo 25 fracciones. Las fracciones más abundantes son las que se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 14. Características físicas de las muestras obtenidas del fraccionamiento de **3a** por CCen.

Muestras	3a-C	3a-L	3a-K	3a-P
Peso (mg)	42.6	60.8	40.5	13.4
Aspecto	Líquido muy viscoso	Líquido muy viscoso con precipitado blanco	Líquido muy viscoso con precipitado blanco	Líquido muy viscoso
Color	Amarillo	Amarillo	Amarillo	Amarillo
No. de componentes por CLAR*	5	4	13	13

* Eluyente ACN/Agua: 10/90 (inicial), 80/20 (20 minutos) 100/0 (30 minutos).

Los datos espectroscópicos de las fracciones menos compleja **3a-L** se muestra a continuación.

RMN de ^1H (CD_3OD , 300 MHz) δ (ppm), de la fracción **3a-L.**

4.16 (m); 3.68, 3.62 (c); 3.56, 3.53 (d) $-\text{CH}-\text{CO}-$; 3.51 (t) $-\text{CH}_2-\text{CO}-$; 3.11 (m); 3.06 (t); varias señales en: 2.92 (s); 2.56 (m); 2.31 (m); 2.24 (m) $-\text{CH}_2-\text{OH}$ ó $-\text{CH}_2-\text{NH}_2$; 2.16, 2.14 (d) $-\text{CH}-\text{CO}-\text{H}$; 1.55 (t) $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$; 1.28 (s) $-\text{CH}_2-$; 0.86-0.91 (m) $-\text{CH}_3$, no simétricos, no equivalentes.

Los resultados de citotoxicidad de **3a-K** y **3a-P**, se presentan en la sección 7.2. de resultados de citotoxicidad (Tabla 22, pág. 61), resultando sin actividad.

La fracción que resultó con actividad citotóxica fue la mezcla (figura37) **3a-C**. Los resultados de RMN, IR, EM son los que se muestran enseguida..

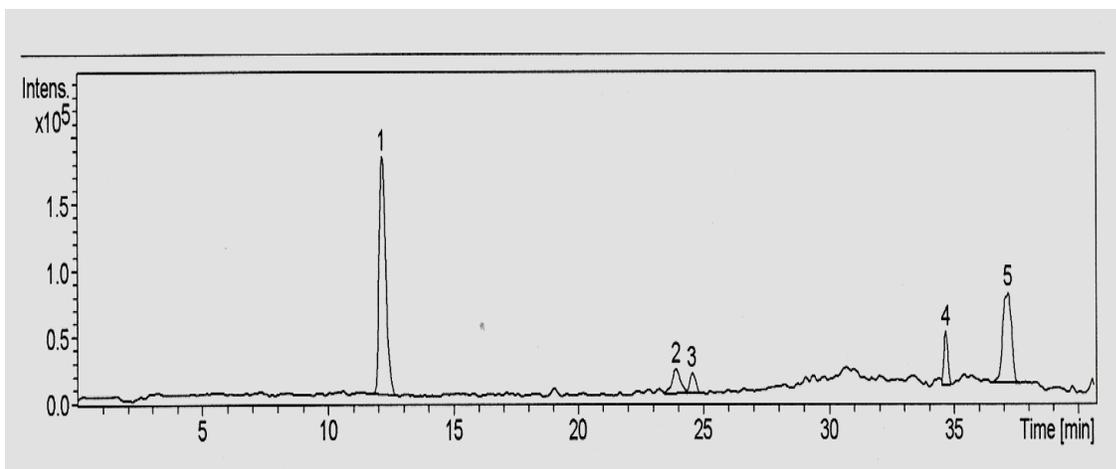


Figura 37. Cromatograma de CLAR, de la fracción **3a-C**.

RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm), de la fracción **3a-C. (Fig. 44, G. pág. 73)**

0.64, 0.80, 0.84, 0.96 (c) $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$; 1.21 (s) $-(\text{CH}_2)_n-$; 1.55, 1.51 (m) $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$; 2.34, 2.30, 2.26 (m) $-\text{CH}_2-\text{COOH}$.

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) δ (ppm), de la fracción **3a-C. (Fig. 45, H, pág. 74)**

178.29 ($\text{HO}-\text{CO}-$), 55.97, 49.96, 42.10, 39.98, 39.65, 39.37, 38.59, 37.13, 36.07, 35.70, 33.82, 31.85, 30.88, 29.64 ($-\text{CH}_2-$)_n, 29.39 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 29.18 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$), 24.66 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$), 22.66 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 14.10 ($-\text{CH}_3$).

IR (cm^{-1}), película, de la fracción **3a-C. (Fig. 46, I, pág. 75)**

2926, 2854 ($-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-$), 1462 ($-\text{CH}_3$), 1378 ($-\text{CH}_3$), 722 $-(\text{CH}_2)_{n>4}-$, 3397 ($-\text{OH}$), 1055 ($-\text{OH}$ terminal), 1713 ($\text{C}=\text{O}$), 1412 ($\text{C}=\text{O}:\cdots:\text{H}-\text{O}-\text{C}=\text{O}$).

EM(EI^+), de la fracción **3a-C. (Fig. 47, J, pág. 76)**

m/z 17 (HO^+) 18 (HOH), 43 (CHO_2), 129 ($\text{C}_7\text{H}_{13}\text{O}_2$), 185 ($\text{C}_{11}\text{H}_{21}\text{O}_2$), 213 ($\text{C}_{13}\text{H}_{25}\text{O}_2$), 256 ($\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2$), 270 ($\text{C}_{17}\text{H}_{34}\text{O}_2$), 353 ($\text{C}_{23}\text{H}_{46}\text{O}_2$), 369 ($\text{C}_{24}\text{H}_{48}\text{O}_2$).

Conforme a los resultados de citotoxicidad de **3a-C** presentados en la **tabla 22** (pág. 61) (sección 7.2. resultados de citotoxicidad), resultó activa.

7.1.3.2. La fracción de MeOH (**3b**) tiene las características físicas que se muestran en la tabla siguiente.

Tabla 15. Características de la fracción de metanol **3b**, obtenida del extracto crudo de metanol (**3**).

Peso	8.1932 g
Color	Café
Aspecto	Líquido muy viscoso
Fase móvil en CCF	AcOEt:MeOH (1:1).
Solubilidad	Insoluble en AcOEt Parcialmente soluble en MeOH Soluble en H ₂ O

Las pruebas de citotoxicidad de esta fracción, resultaron negativas. Se presentan en la sección 7.2. en resultados de citotoxicidad (**Tabla 19**, pág. 60),

El fraccionamiento de **3b** se realizó por CPP (se obtuvieron 10 fracciones en total —fracción 1= frente de disolvente, fracción 10= punto de aplicación de la muestra—, se obtuvieron tres fracciones abundantes: **3b-VI**, **3b-VIII** y **3b-IX**, tienen las características que se muestran a continuación:

Tabla 16. Características físicas de las muestras (**3b-VI**, **3b-VIII** y **3b-IX**) obtenidas del fraccionamiento de **3b** por CPP.

Muestras	3b-VI	3b-VIII	3b-IX
Peso (mg)	58.1	96.4	99.1
Aspecto	Líquido muy viscoso	Líquido muy viscoso con precipitado blanco	Líquido muy viscoso con precipitado blanco
Color	Amarillo		
No. de componentes por CCF	2	2	3
	Fase móvil AcOEt:MeOH (2:8) (4:6)		

Los resultados de RMN y IR de la fracción **3b-VI** son los que se muestran enseguida:

RMN de ¹H (D₂O, 300MHz) δ (ppm), de la fracción **3b-VI**.

3.74, 3.72, 3.70, 3.69 (q) -CH₂-CH-CH₂-; 3.47 (s) -C-CH-C-; 3.62-3.52 (m), 3.41-3.32 (m), 3.23-3.10 (m), 3.08-3.04 (m) -CH-CO; 2.71 (s) -C-CH₂-C-; 2.41, 2.39, 2.36 (t) -CH₂-CH₂-; 1.41, 1.38 (d) -CH-CH₃; 1.27, 1.26, 1.23, 1.19 (c) -CH-CH₃; 0.97, 0.95 (dd), 0.92, 0.89 (dd), 0.95, 0.94 (dd), 0.89, 0.88 (dd) CH₃-CH-CH₃.

RMN de ^{13}C (CD_3OD , 75MHz) δ (ppm), de la fracción **3b-VI.**
73.49, 62.21 ($-\text{O}-\text{C}$ ó $-\text{NH}-\text{C}$), 37.23 ($-\text{CH}_2-$), 30.72 ($-\text{CH}_2-$).

IR (cm^{-1}), película, de la fracción **3b-VI.**

2966, 2927 ($-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-$), 1416, 1334 ($-\text{CH}_2-$), 3379 ($-\text{OH}$), 1508 ($-\text{O}-\text{H}$), 1043 ($-\text{OH}$ primario), 1627 ($-\text{NH}_2$) 3379 ($-\text{NH}$), 923 ($-\text{NH}_2$).

Los resultados de citotoxicidad de la fracción **3b-VI** resultaron negativos, tal y como se presentan en la sección 7.2. de resultados de citotoxicidad, (Tabla 20 , pág. 60),.

Los resultados de RMN de la fracción **3b-VIII** son los que se muestran a continuación:

RMN de ^1H (CD_3OD , 300MHz) δ (ppm), de la fracción **3b-VIII.**

8.53 (s), 8.11 (s), 8.02 (s) $-\text{CO}-\text{NH}-$; 3.77 (s), 3.75 (s), 3.73 (t) $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$; 3.65 (m) $-\text{CH}_2-\text{O}$; 2.41, 2.39, 2.37 (t) $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$; 1.89 (s) $\text{CH}_3-\text{C}-$; 1.27 (s) $\text{CH}_3-\text{C}-$; 1.02, 1.06 (d) $-\text{CH}-\text{CH}_3$; 1.04, 1.03 (dd), 1.01, 1.00 (dd) $\text{CH}_3-\text{CH}-\text{CH}_3$; 0.98, 0.96 (d) $\text{CH}_3-\text{CH}-$.

RMN de ^{13}C (CD_3OD , 300MHz) δ (ppm), de la fracción **3b-VIII.**

105.32 ($-\text{CH}-$), 60.33 ($-\text{CH}_2-\text{N}-$ ó $-\text{CH}_2-\text{O}$), 41.01 ($-\text{CH}_2-$), 40.97 ($-\text{C}-$), 30.73 ($-\text{CH}_3$).

Los resultados de RMN y IR de la fracción **3b-IX** son los que se muestran a continuación:

RMN de ^1H ($\text{CD}_3\text{OD}+\text{CDCl}_3+\text{DMSO}$, 300MHz) δ (ppm), de la fracción **3b- IX.**

8.53 (s) $-\text{NH}-$; 3.77, 3.75, 3.73 (t) $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$; 3.66 (s) $-\text{CH}_2-\text{N}-$; 2.42, 2.34, 2.38 (t) $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$; 1.29 (s) $-\text{CH}-\text{CH}_3$.

RMN de ^{13}C ($\text{CD}_3\text{OD}+\text{CDCl}_3+\text{DMSO}$, 300MHz) δ (ppm), de la fracción **3b- IX.**

179.04 ($-\text{CO}-\text{O}-$), 104.52 ($-\text{CH}-\text{NH}$), 70.86 ($-\text{C}-\text{NH}$ ó $-\text{C}-\text{O}$), 59.95 ($-\text{CH}_2-\text{O}-$), 40.54 ($-\text{CH}_2-$), 30.63 ($-\text{CH}_2-$), 23.64, 20.36 ($-\text{CH}_3$).

IR (cm^{-1}), película, de la fracción **3b- IX.**

2959, 2959, 2855 ($-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-$), 1463 ($-\text{CH}_3$), 3383 ($-\text{OH}$), 1041 ($-\text{OH}$ primario), 1569 ($-\text{NH}_2$).

7.1.4. El extracto crudo obtenido de la extracción con $\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$ (**4**) presentó un precipitado (**4a**) al tratarlo con metanol, por lo que se separó de la parte soluble **4b**, fracción que se describe a continuación:

Tabla 17. Características de la muestra soluble en metanol, **4b**.

Peso (g)	4.7376
Color	Café
Aspecto	Líquido muy viscoso
No. de componentes por CCF	Al menos 3. Fase móvil (v/v) $\text{AcOEt}:\text{MeOH}$ (1:9).
Solubilidad	Ligeramente soluble en EtOH Soluble en H_2O

Los resultados espectroscópicos de **4b** son los que se muestran a continuación:

RMN de ^1H (D_2O , 300MHz) δ (ppm), de la fracción **4b.**

8.27 (s) $-\text{C}-\text{N}-\text{H}$ ó $-\text{OH}$; 3.63, 3.46, 3.18 (s) $-\text{CH}_2-\text{OH}$; 3.04, 3.02 (d) $-\text{CH}_2-\text{CH}$, $-\text{CH}-\text{NH}_2$; 2.62, 2.43, 2.24 (s) $-\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}-$; 1.75 (s) $-\text{C}-\text{CH}_2$; 1.35, 1.32, 1.30 (t) $-\text{CH}-\text{CH}_2-$; 1.17, 1.15 (d) $-\text{CH}-\text{CH}-$; 0.88 (s) $-\text{C}-\text{CH}_3$; 0.86, 0.85 (d) $-\text{CH}-\text{CH}-$; 0.83 (s) $-\text{C}-\text{CH}_3$; 0.81 (s) $-\text{C}-\text{CH}_3$; 0.75, 0.74 (d) $-\text{CH}-\text{CH}_3$; 0.73 (s) $-\text{C}-\text{CH}_3$.

IR (cm^{-1}), película, de la fracción **4b.**

3381 ($-\text{OH}$), 1339 ($-\text{O}-\text{H}$), 1048 ($-\text{OH}$ primario), 1640 ($-\text{NH}$), 1453 ($-\text{NH}$).

La muestra **4b** no se caracterizó por RMN de ^1H , debido a que no se observan señales complementarias que permitan proponer una estructura (por ejemplo: no se observa la señal como cuadruplete de $-\text{CH}-\text{CH}_3$, aunque se encuentra una señal en 0.75, 0.74 $-\text{CH}-\text{CH}_3$ como doblete, ambas en el área característica de los metilos).

Los resultados de todos los sólidos obtenidos de las fracciones **3**, **4** y **5** se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 18. Características físicas de las muestras sólidas de las fracciones **3**, **4** y **5**.

Muestras	3a-pp	3b-pp	3c	4a	4b-pp	5
Peso (g)	1.5017	0.7218	0.1399	7.7956	6.8332	1.0209
Aspecto	Sólido amorfo (gránulos)	Sólido amorfo (polvo)	Sólido cristalino translucido	Sólido amorfo (polvo)	Cristales translucidos	Sólido amorfo
Color	café claro	crema	inoloro	blanco	café	café
p.f.	a 300 °C no funde					
IR (pastilla, KBr)	No se observan señales para ninguna muestra.					
Tratamiento ácido	No se obtuvo ningún residuo orgánico, por CCF.					

7.2 Citotoxicidad

En la literatura se reporta la presencia de metabolitos con actividad citotóxica, en extractos metanólicos o a partir de extractos con metanol, por lo que sólo se les realizó prueba de citotoxicidad a extractos o fracciones metanólicas.

En la siguiente tabla se muestran los resultados de citotoxicidad de la fracción **3b**. Obtenida del fraccionamiento del extracto crudo metanólico **3**.

Tabla 19. Citotoxicidad del extracto de metanol (**3b**) expresado en %IC.

Líneas celulares	%IC
HCT-15	6.30
K562	15.24
MCF-7	27.03
PC-3	20.30
U251	S.A.
SKLU-1	S.A.

HCT-15 = colon, K562 = leucemia, MCF-7 = mama, PC-3 = próstata,
U251 = SNC, SKLU-1 = pulmón. S.A. = sin actividad

Como se observa en la **tabla 19**, el extracto presenta bajo %IC, y sólo en células de cáncer de mama y próstata. Para observar si existe mayor actividad al fraccionar el extracto, se le realizó la prueba biológica a la fracción **3b-VI**, obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 20. Citotoxicidad de la fracción **3b-VI** expresado en %IC.

Líneas celulares	%IC
HCT-15	28.85
K562	21.38
MCF-7	S.A.
PC-3	2.8
U251	S.A.
SKLU-1	11.71

HCT-15 = colon, K562 = leucemia, MCF-7 = mama, PC-3 = próstata,
U251 = SNC, SKLU-1 = pulmón. S.A. = sin actividad

La fracción **3b-VI** permanece la baja actividad, por lo que se descarta como posible agente citotóxico.

Otra fracción soluble en metanol fue la **3a-III**, del fraccionamiento del extracto de diclorometano (**3a**), el cual se presentan los resultados a continuación en la siguiente tabla:

Tabla 21. Citotoxicidad del extracto **3a-III**.

Líneas celulares	%IC
HCT-15	51.52
K562	36.38
MCF-7	S.A.
PC-3	23.39
U251	S.A.
SKLU-1	3.0

HCT-15 = colon, K562 = leucemia, MCF-7 = mama, PC-3 = próstata, U251 = SNC, SKLU-1 = pulmón. S.A. = sin actividad

De acuerdo a los datos presentados, el extracto demuestra un porcentaje importante de inhibición en células de cáncer de colon (HCT-15), un poco más del 50%, por lo que se decidió trabajar como posible agente citotóxico. Para obtener y caracterizar los compuestos responsables de la actividad, se realizó un fraccionamiento por CCen a una muestra original de la fracción **3a** (figura 33 pág. 46).

Los resultados de citotoxicidad de las muestras del extracto **3a** (fraccionado por CCen) son los siguientes:

Tabla 22. Citotoxicidad de las fracciones **3a-C**, **3a-K** y **3a-P**.

Líneas celulares	%IC		
	3a-C	3a-K	3a-P
HCT-15	100	53.06	31.53
K562	88.38	36.30	37.92
MCF-7	100	16.39	24.32
PC-3	65.02	28.40	10.21
U251	32.2	42.47	19.46
SKLU-1	100	10.35	7.89

HCT-15 = colon, K562 = leucemia, MCF-7 = mama, PC-3 = próstata, U251 = SNC, SKLU-1 = pulmón.

La muestra **3a-P** no presenta actividad citotóxica, como se observa, el %IC es menor del 50% en cada línea celular. Para la muestra **3a-K**, sólo destaca una baja citotoxicidad en células de cáncer de colon (HCT-15); sin embargo, en la muestra **3a-C** se observa mayor actividad en células de cáncer de colon (HCT-15), de mama (MCF-7) y en células de cáncer de pulmón (SKLU-1); en células de leucemia (K562) y de próstata (PC-3) se observa también actividad, aunque menor que las anteriores. Donde no se tiene actividad citotóxica, es en las células del sistema nervioso central, SNC, con apenas un %IC del 32.2.

Del extracto hexánico, también se obtuvo una fracción soluble en metanol por lo que se realizó el ensayo de citotoxicidad a la muestra **1b-1**, obteniendo los resultados siguientes:

Tabla 23. Citotoxicidad del extracto **1b-1**.

Líneas celulares	%IC
HCT-15	78.88
K562	100
MCF-7	79.13
PC-3	93.90
U251	99.87
SKLU-1	100

HCT-15 = colon, K562 = leucemia, MCF-7 = mama, PC-3 = próstata,
U251 = SNC, SKLU-1 = pulmón.

A diferencia de la fracción **3a-C**, la fracción **1b-1** presenta actividad en todas las líneas celulares; se advierte actividad importante en células de leucemia (K562), pulmón (SKLU-1), sistema nervioso central (SNC) y próstata (PC-3).

8. ANÁLISIS DE RESULTADOS

8.1. Estudio Químico

8.1.1. Fracción de hexano

Del extracto hexánico se obtuvieron diferentes fracciones, las más abundantes y caracterizadas fueron **1a-1**, **1a-4** y **1b-1**, mientras que las fracciones **1a-3**, **1a-5** y **1b-2** a la **1b-8** sólo se compararon con un estándar secundario. La única fracción con actividad citotóxica del extracto de hexano fue la **1b-1**.

La fracción **1a-1** es una mezcla de compuestos que presentan al menos seis componentes (por CCF); el estudio de RMN de ^1H muestra una señal en δ 1.25, en forma de singulete posiblemente de una cadena alifática; la señal en δ 5.36 en forma de multiplete indica la presencia de hidrógenos vinílicos; el septeto entre δ 0.93-0.80 indica un protón propílico.

En tanto que, en el estudio de RMN de ^{13}C , muestra la presencia de carbonilos en δ 173.34 y δ 173.30; carbonos cuaternarios en δ 139.74 y 130.53; también se observan carbonos vinílicos en δ 122.90, 128.93; los carbonos vecinos a carbonilo se observaron en δ 122.59; entre δ 73.67 y 62.09 se observan los carbonos unidos a heteroátomos; se observaron varias señales entre δ 42.30-11.83, que caracterizan a los metilos y metilenos.

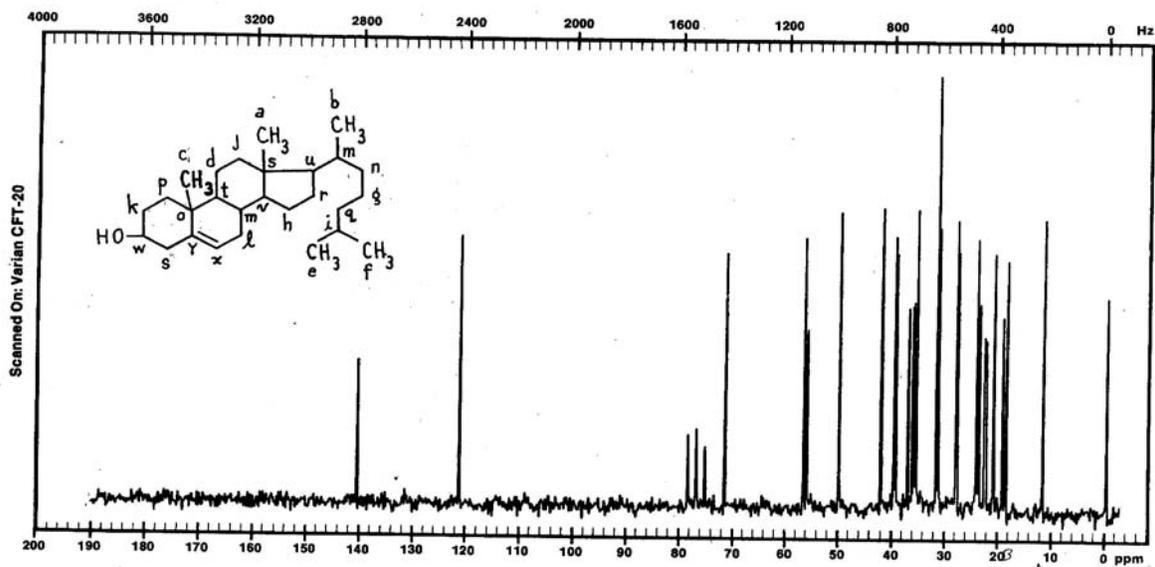
La espectroscopía de infrarrojo confirma la presencia de grupos metilo y metileno con las señales presentes en $2924\text{-}2853\text{ cm}^{-1}$ con sus sobretonos en $1463, 1377\text{ cm}^{-1}$ y la señal en 722 cm^{-1} indica la presencia de una cadena alquilica con más de cuatro metilenos; en $972, 801$ y 842 cm^{-1} son señales de grupos vinílicos. Se confirma la presencia de grupo carbonilo en 1738 cm^{-1} y en 3453 cm^{-1} la presencia de un hidróxilo, que posiblemente esté unido a un carbonilo, por las señales en 1243 cm^{-1} (sobretonos de un ácido carboxílico).

Para la espectroscopía de masas, se tienen fragmentos característicos de un ácido carboxílico en m/z 17 y 18 que indican HO^\bullet y HOH^\bullet , respectivamente. Así como en m/z 43 es el fragmento de CHO_2 ; en m/z 213 el fragmento es de $\text{C}_{13}\text{H}_{25}\text{O}_2$.

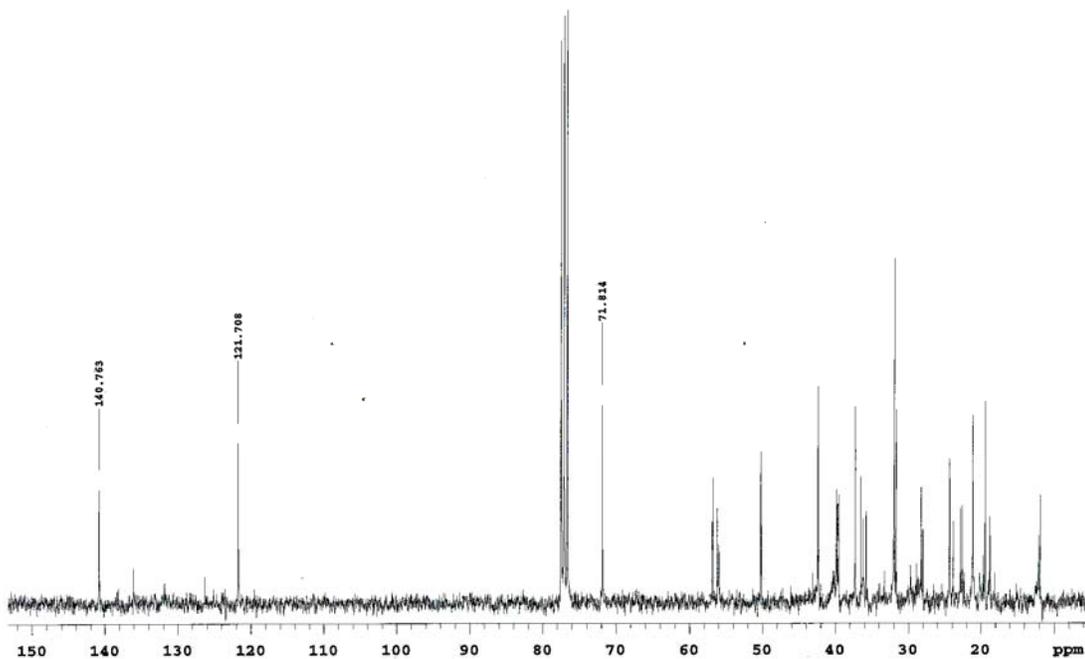
La evaluación de los estudios espectroscópicos de la muestra **1a-1** indican que se trata de una mezcla de compuestos de tipo ácidos carboxílicos, de cadenas largas con una o varias insaturaciones, o por lo menos el compuesto mayoritario presenta esta naturaleza.

Mientras que los sólidos obtenidos fueron (**1a-3**, **1a-4**, **1a-5**, **1b-2** al **1b-8**) comparados con un estándar de colesterol, resultaron semejantes, o por lo menos una mancha con Rx igual al estándar. Sin embargo, en la CCF (**figura 34, pág. 52**) se observan varias manchas, por lo que se trata de mezcla de compuestos o bien impurezas; predomina la mancha característica del colesterol. Sin embargo, el punto de fusión es diferente para cada muestra, lo que indica que se tratan de diferentes esteroides, excepto la muestra **1a-4** y **1a-5**, en cuyo p.f. es semejante, así como los espectros de RMN de ^1H .

La espectroscopía de RMN de ^{13}C de la muestra **1a-4** se comparo con resultados reportados para colesterol, en el catálogo SADTLER (**figura 38**), por lo que se trata de colesterol (aunque no puro, ya que por CCF se observan otras manchas de impurezas).



38a (A)



38b (B)

Figura 38. Espectros de colesterol, **38a:** catalogo SADTLER, **38b:** muestra **1a-4**.

Los esteroides que se han encontrado en *D. anchorata* son: demosterol, colesterol, sitosterol, estigmasterol, 24-metilcolesterol, 24-metilcoleste-5,22-dienol, coleste-5,22-dienol, 24-metilcolesterol, (Calleira, 1994 y Quijano, 1994).

En la muestra **1b-1** se observa, por CCF, al menos cinco componentes, que conjuntamente dan un espectro de RMN de ^1H con señales en δ 6.54, 6.50, 6.27 y 6.22 en forma de doble de dobles, lo que indica la presencia de protones unidos a carbonos sp^2 conjugados ($\text{H}-\text{C}=\text{CH}-\text{CH}=\text{C}-\text{H}$). La señal múltiple entre δ 5.40 y 5.31 indica la presencia de protones vinílicos. ($-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$).

Las señales entre δ 3.76-3.64 y δ 3.57-3.35 en forma de multipletes, demuestra la presencia de protones vecinos a dos o tres enlaces de heteroátomos. Mientras que en δ 2.31-2.29, 2.27-2.26, 2.23-2.22 con forma de triple de dobles, se observan los protones vecinos a los protones sp^2 conjugados ($\text{H}-\text{C}=\text{CH}-\text{CH}=\text{C}-\text{H}$). En tanto, que en δ 2.09-2.01 (multiplete) se tienen los protones vecinos a cuatro enlaces de un heteroátomo; señales presentes entre δ 1.67 y 1.49 representan los protones vecinos a dobles enlaces ($-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$). Las señales en forma de singulete intensas, presentes en δ 1.28, 0.83 y 0.85 son características de cadenas alifáticas. En δ 0.72 y 0.71 se tienen la señal de metilos sin protones vecinos. (**figura 39, C, pág. 66**)

El espectro de RMN de ^{13}C muestra una señal en δ 178.40 característica de un carbonilo, mientras en δ 140.34 y 130.23 se observan dos carbonos cuaternarios; en δ 129.23, 128.60, 128.34 y 121.45 se tienen los carbonos de configuración sp^2 , como se encuentran en pares entonces se trata de dos insaturaciones. Las señales que se observan en δ 72.30, 71.66, 70.66, 70.28, 66.32, 64.07, 55.98 y 49.99 indican la presencia de carbonos unidos a heteroátomos como el oxígeno o nitrógeno. Los carbonos de tipo metileno se observan entre δ 39.43-29.43, en δ 29.33 se observa una señal más intensa que las otras señales, y más grande (alta) que otras, dicha señal indica la presencia de una cadena alifática. En δ 29.26, 23.78, 22.68 y 22.54 se tienen las señales de metilos. (**figura 40, D, pág. 67**)

Como se observa en los espectros de RMN de ^1H y de ^{13}C se trata de una mezcla compleja, en la cual el compuesto (o compuestos) mayoritario(s) tienen la característica estructural de cadena alifática con más de dos insaturaciones (por las señales en 6.54-6.22 y 5.40-5.31) la cadena alifática se encuentra unida al ácido carboxílico.

La espectroscopía de IR confirma la presencia de una cadena alifática en 722 cm^{-1} , en 2926 , 2854 cm^{-1} se tienen los grupos metilo y metileno, y los sobretonos en 1461 y 1377 cm^{-1} ; se confirma también el grupo vinílico en 1413 y 971 cm^{-1} ; así como del carbonilo en 1713 cm^{-1} e hidroxilo en 1049 cm^{-1} . (**figura 41, E, pág. 68**)

La espectroscopia de Masas muestra fracciones características de ácidos carboxílicos, como son: m/z 17 (HO^+) 18 (HOH), 43 (CHO_2), y de la cadena alifática en: 185 ($\text{C}_{11}\text{H}_{21}\text{O}_2$), 213 ($\text{C}_{13}\text{H}_{25}\text{O}_2$) y 255 ($\text{C}_{16}\text{H}_{31}\text{O}_2$). (**figura 42, F, pág. 69**)

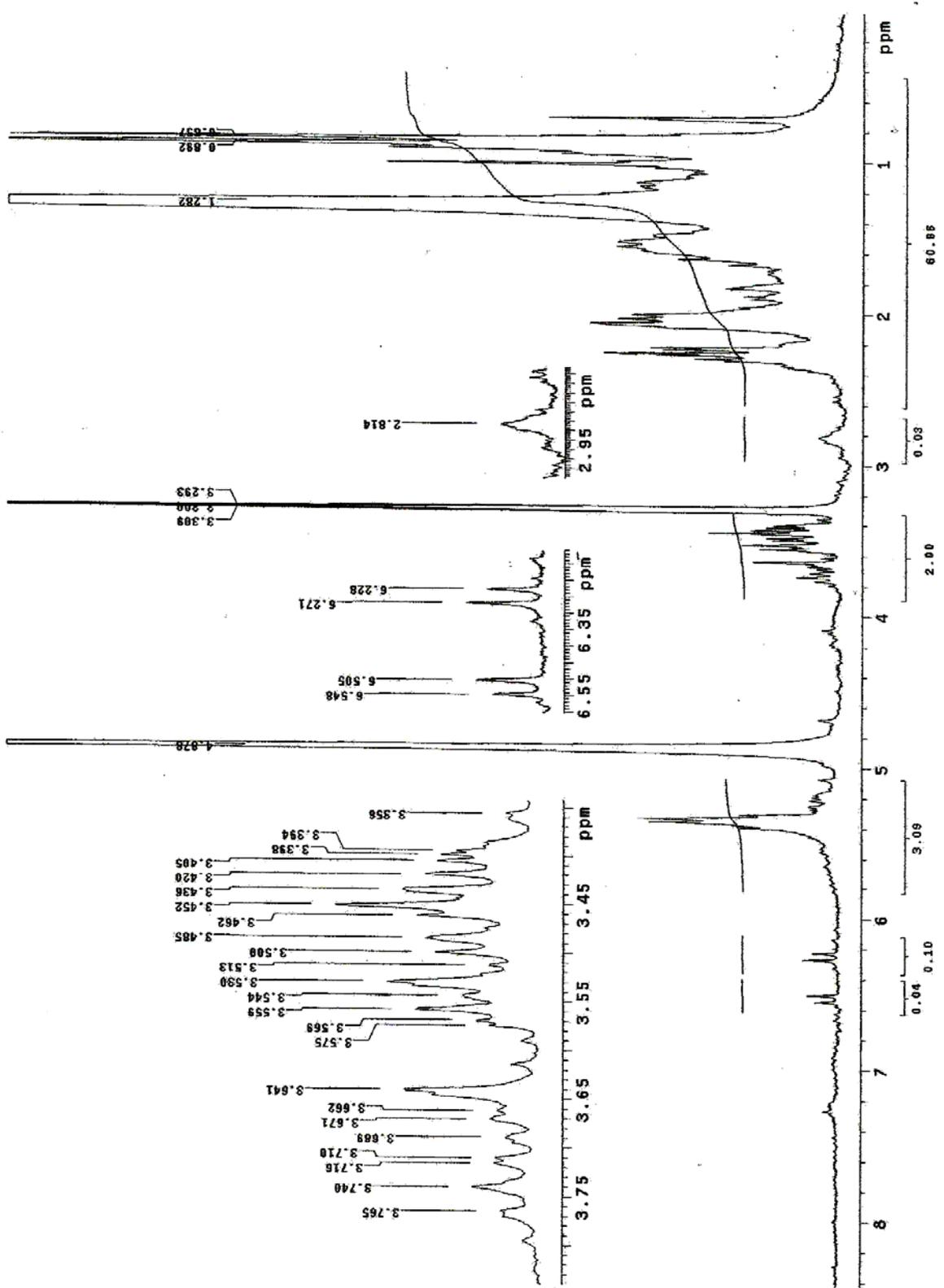


Figura 39. Espectro de RMN ^1H de la muestra 1b-1. (C)

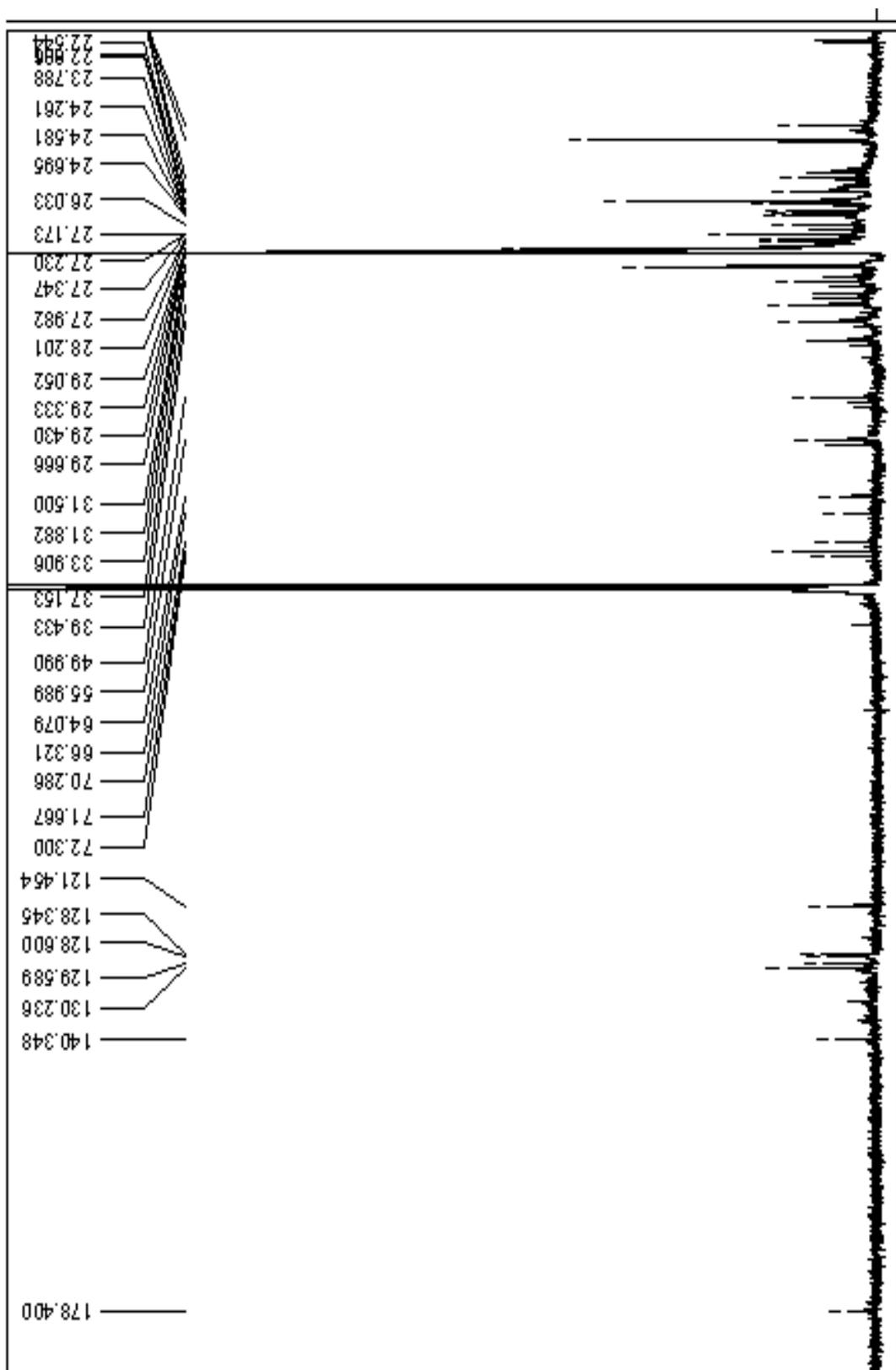


Figura 40. Espectro de RMN ^{13}C de la muestra 1b-1. (D)

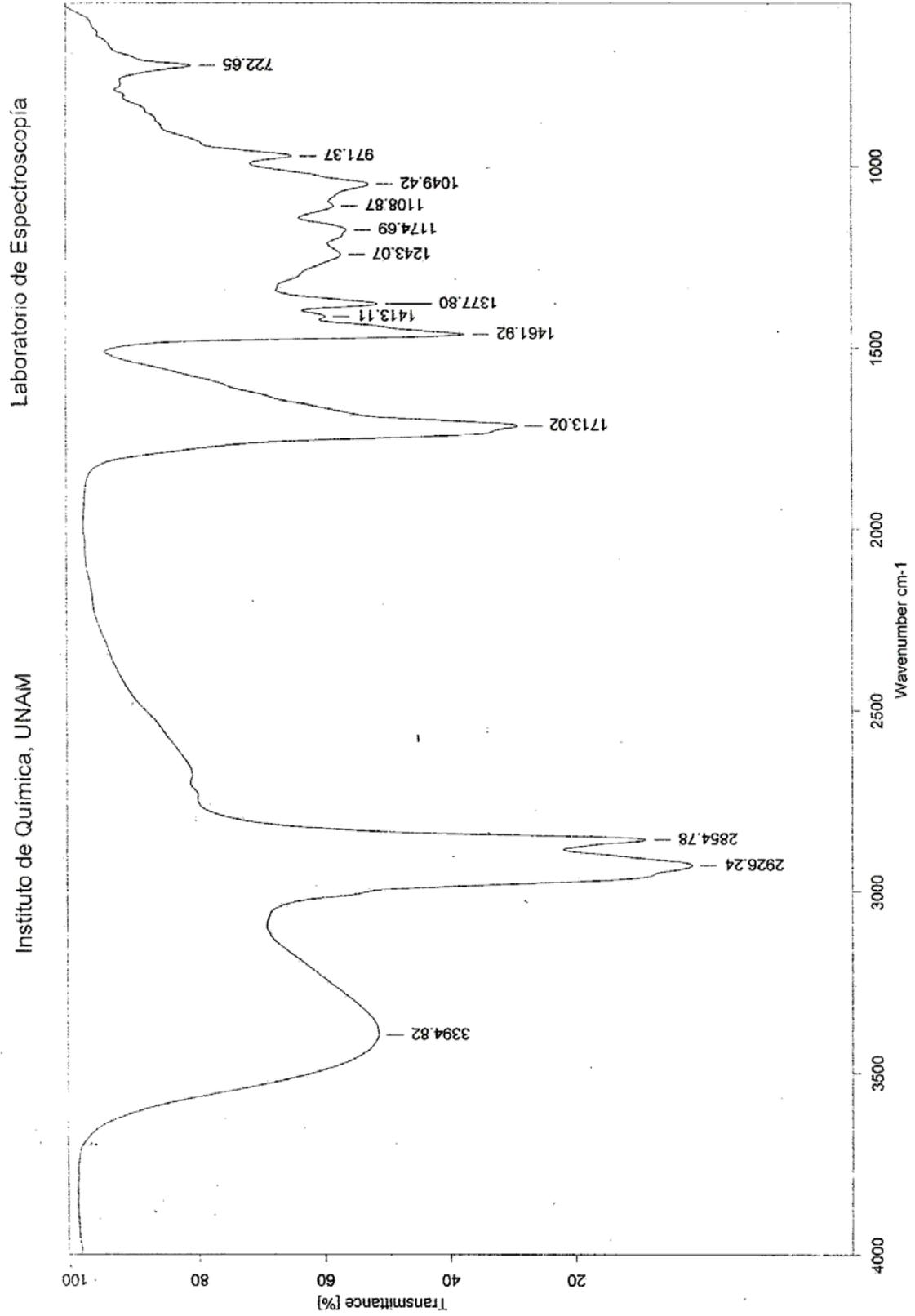


Figura 41. Espectro de IR de la muestra Ib-1. (E)

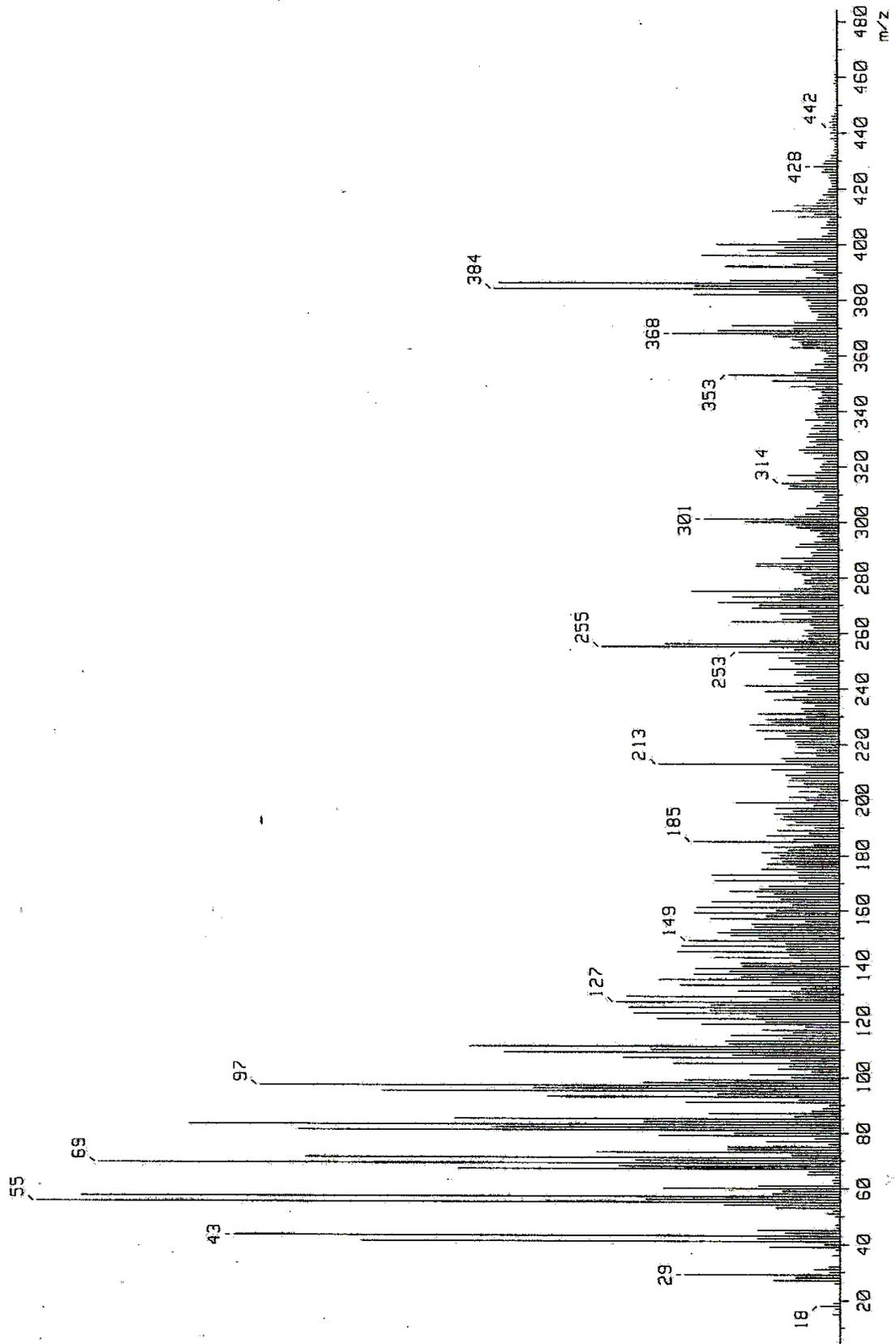


Figura 42. Espectro de EM de la muestra 1b-1. (F)

No es extraño encontrar ácidos grasos en *D. anchorata*, dado que, ya ha sido reportado la presencia de ácidos grasos, como son ácido tetradecanoico, pentadecanoico, 14-metil pentadecanoico, hexadecanoico, 7-metil-8-hexadecenoico (**49a**), 14-metil-8-hexadecenoico (**49b**), heptadecanoico, 3-metilheptadecanoico (**49c**), 11-octadecanoico, octadecanoico, nonadecanoico, metildocosanoico, docosanoico, henaicosanoico, behenic,tricosanoico, tetracosanoico, pentacosanoico, 5,9-hexacosadienoico y 5,9-octacosadienoico (Carballeira, 1988)

En 1994, Carballeira, en un estudio confirmó la presencia de ácidos grasos como son: ácido 5, 13- eicosadienoico (**50a**); hexadecanoico, 7-metil-6(E)-hexadecenoico (**50b**); 7-metil-6(Z)-hexadecenoico (**50c**); 14-metilhexadecanoico; 11-octadecenoico; octadecanoico; eicosanoico; heneicosanoico; tetracosanoico; y, 5, 9-hexacosadienoico. Quijano, 1994, también reporta la presencia de ácidos grasos del C14 al C21.

Cabe señalar que los ácidos grasos forman parte de la composición de la membrana celular de las esponjas, así como los esteroides; condición que tienen en común las esponjas de agua dulce y marinas de la clase *Desmospongiae*. La composición de las células con una biomembrana única permite el transporte al interior o exterior; (Dembitsky, 2003)

8.1.2. Fracción de diclorometano

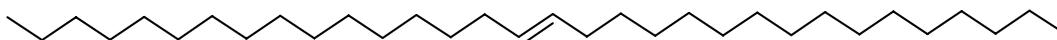
El fraccionamiento del extracto crudo de diclorometano fue por CC, lo que permitió obtener 23 fracciones; sólo se caracterizó la **2-1**, las fracciones **2-2** a la **2-23** no se observa separación de componentes (por CCF).

Los espectros de RMN, de **2-1**, presenta una señal en δ 1.25 en forma de singulete, muy intensa de grupos metileno (-CH₂-), otra señal en δ 0.90-0.84 en forma de triplete indica la presencia de un grupo metilo (-CH₃) terminal; también se observa una señal en δ 5.36-5.32 característica de una insaturación (-C=C-). La señales en δ 2.06-2.00 en forma de triplete son de dos protones vecinos a un protón vinílico. (Anexos Fig. 53, K, pág. 92)

En el espectro de IR se observan señales de grupo -CH₂- (2898 cm⁻¹), así como una señal en 728 cm⁻¹, lo que indica una cadena de más de cuatro -CH₂-. En 3006 cm⁻¹ se observa el grupo vinílico. No se observan otras señales con otro tipo de componente, como carbonilo (C=O), nitrogenados (aminas), ni de otra naturaleza. (Anexos Fig. 54, L, pág. 93)

El espectro de Masas muestra m/z 449 (M⁺+1) lo que permitió conocer el peso molecular del compuesto, C₃₂H₆₄ (PM=448.5). (Anexos Fig. 55, M, pág. 94)

Por estas características espectroscópicas permite proponer una molécula lineal simétrica, con una insaturación, se propuso la estructura que se muestra enseguida,



Este tipo de compuesto (hidrocarburo insaturado) sólo se reporta en el estudio realizado a la esponja *Xestospongia subtriangularis*, en donde, se obtuvieron tanto hidrocarburos saturados como insaturados (Vázquez, 1998).

Dichos compuesto son, posiblemente, de origen exógeno puesto que las esponjas son organismos filtradores de agua de mar, en forma constante, por lo que es probable obtenerlos del medio. Y dado que el área en donde fue colectada la esponja (tanto *Xestospongia* como *D. anchorata*), el puerto de Veracruz —en donde se llevan a cabo diversas actividades portuarias—, tiene como fuente contaminante el petróleo e hidrocarburos que son desechados al medio en donde las esponjas marinas crecen y se desarrollan, éstas pueden ser bioacumuladores, no sólo de nutrientes, sino también de contaminantes, como los hidrocarburos.

Cabe mencionar que todos los hidrocarburos reportados en la esponja marina *X. subtriangularis* por Vázquez (1998), presentan las mismas características físicas que las fracciones **2-3** a **2-23** (líquidos viscosos de tonalidades amarillas); por que posiblemente sean también hidrocarburos, además de que se obtuvieron de la extracción de un disolvente no polar, CH₂Cl₂; y los hidrocarburos al ser cadenas largas presentan baja polaridad, se disuelven en disolventes semejantes.

8.1.3. Fracción de metanol

De las fracciones primarias (**3a** diclorometano, **3b** metanol, y **3c** agua) obtenidas del extracto metanólico sólo se encontró una con actividad citotóxica la **3a-C**. Las más abundantes y caracterizadas fueron **3a-C**, **3a-L**, **3b-VI**, **3b-VIII** y **3b-IX**; la fracción **3c** no se caracterizó.

8.1.3.1. Fracción de diclorometano, **3a**.

La complejidad de la muestra **3a-III** (más abundante de esta fracción) no permitió caracterizarla (por la cantidad de componentes, 18 por CLAR (**Fig. 36, pág. 55**)); pero, por los resultados favorecedores obtenidos de citotoxicidad de apenas un 51.52 % de IC en células HCT-15 (colon), se fraccionó por CCen (25 fracciones en total). Obteniendo sólo cuatro más abundantes (**3a-C**, **3a-L**, **3a-K**, y **3a-P**), las cuales se les realizó la prueba de citotoxicidad a **3a-C**, **3a-K**, y **3a-P**.

Las muestras **3a-K**, y **3a-P** resultaron ser más complejas con 13 componentes cada uno (por CLAR) por lo que no se caracterizaron, además de que resultaron sin actividad citotóxica. La muestra **3a-L** fue la menos compleja con 4 componentes; en el espectro de RMN de ¹H (**pág. 56**), se observan señales en δ 4.16 en forma de multipletes, en δ 3.68-3.62 cuadruplete, en δ 3.56-3.53 doblete, δ 3.51 triplete, δ 3.11 multiplete, δ 3.06 triplete, que indican la presencia de múltiples protones vecinos a dos y tres enlaces de un grupo hidroxilo.

Las señales entre δ 2.92 singulete, δ 2.56 multiplete, δ 2.31 multiplete, δ 2.24 multiplete, son características de protones del hidroxilo. Entre tanto, las señales que se encuentran en δ

2.16, 2.14 doblete, se trata de un protón vecino a hidroxilo. La señal en δ 1.55 en forma de triplete indica dos protones vecinos a metilo; la señal en δ 1.28 en forma de singulete indica un grupo metilo sin protones vecinos. En δ 0.86-0.91 como multiplete indica la presencia de metilos.

El espectro de RMN de ^1H no permite caracterizar la muestra, ya que no se observan señales definidas, sólo la presencia de grupos hidroxilo y, posiblemente, de grupos éter. En *D. anchorata* si se ha reportado compuestos oxigenados, como son los reportados por Quijano *et. all.* en 1994, que indica la presencia de glicerol monoésteres.

La muestra **3a-C** resultó activa en el estudio de citotoxicidad, la espectroscopia de RMN de ^1H muestra señales en δ 0.64-0.96 en forma de cuadruplete indica la presencia protones de metileno vecinos a un metilo terminal. La señal intensa en δ 1.21 en forma de singulete muestra una cadena alifática; las señales en δ 1.55-1.51, multiplete, se les asignó a los protones de un metileno vecino a tres enlaces de un carbonilo; mientras que, los protones vecinos al carbonilo se encuentran en δ 2.34-2.26 como multiplete. (**figura 44, G, pág. 73**)

La espectroscopía de RMN de ^{13}C muestra el carbonilo en δ 178.29, entre δ 55.97-29.64 se observan catorce señales en total, los carbonos de metileno posiblemente de la cadena alifática; en δ 29.39, se encuentra la señal del carbono vecino a cinco enlaces; en δ 29.18 y δ 24.66 se le asignó a los metilenos a tres y dos enlaces, respectivamente, del carbonilo. Mientras que la señal del metilo está en δ 14.10, y la del metileno vecino al metilo la señal se encuentra en δ 22.66. (**figura 45, H, pág. 74**)

La espectroscopía de infrarrojo corrobora los grupos metilos y metilenos en 2926 y 2854 cm^{-1} , en 1462 y 1378 cm^{-1} están los sobretonos; en 722 cm^{-1} se observa la señal característica de una cadena alifática. El grupo hidroxilo se encuentra en 3397 cm^{-1} y el grupo carboxilo en 1713 cm^{-1} ; mientras que en 1412 se observa un sobretono de ácido carboxílico (debido al puente de hidrógeno). (**figura 46, I, pág. 75**)

En la espectroscopia de masas presenta fragmentos particulares de un ácido carboxílico; m/z 17 (HO^{\bullet}) 18 (HOH), 43 (CHO_2) del grupo carbonilo, y de la cadena alifática 129 ($\text{C}_7\text{H}_{13}\text{O}_2$), 185 ($\text{C}_{11}\text{H}_{21}\text{O}_2$), 213 ($\text{C}_{13}\text{H}_{25}\text{O}_2$) y 256 ($\text{C}_{16}\text{H}_{31}\text{O}_2$). También se observan en m/z 256, 270, 353 y 369. (**figura 47, J, pág. 76**)

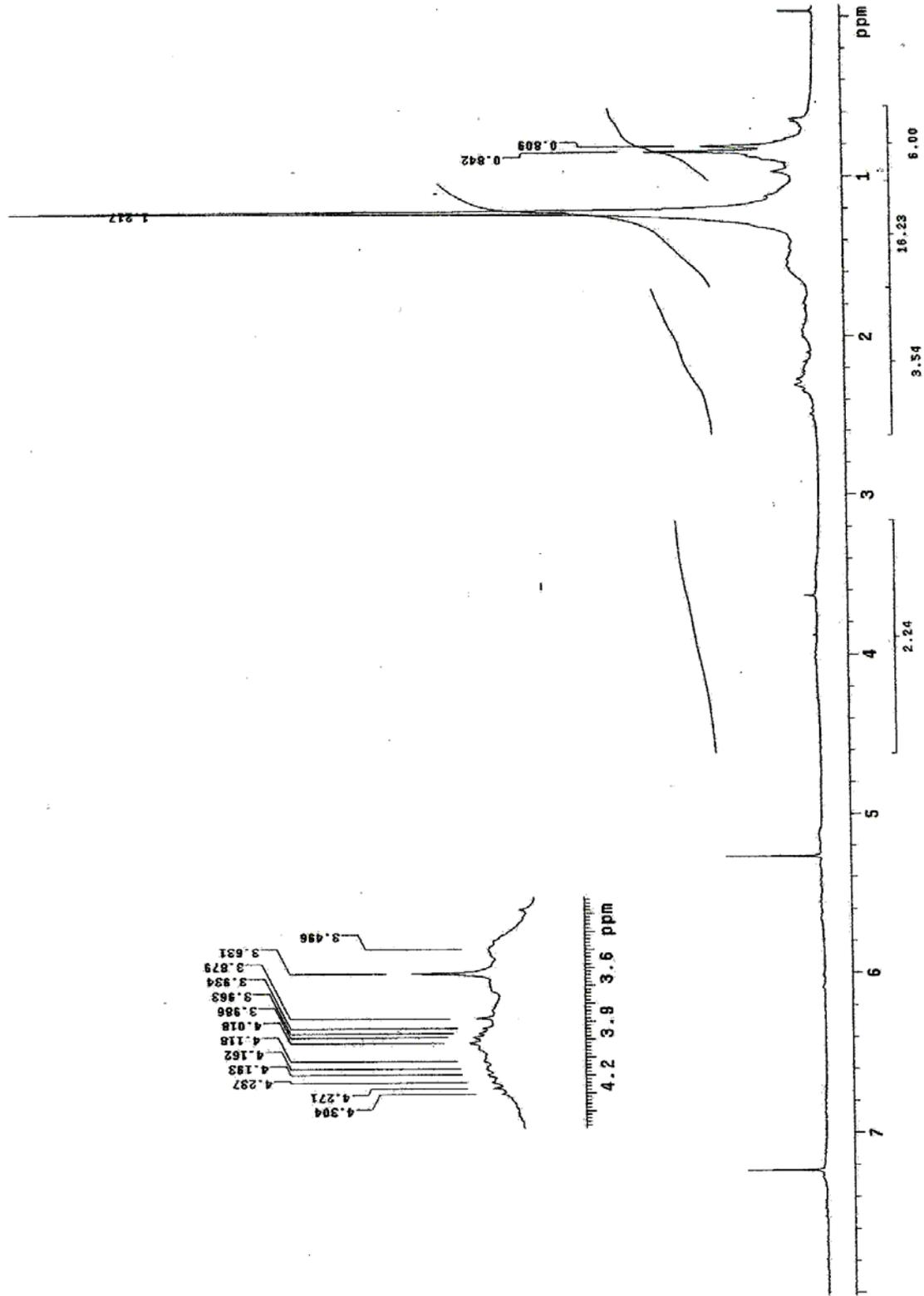


Figura 44. Espectro de RMN-¹H de la muestra 3a-C. (G)

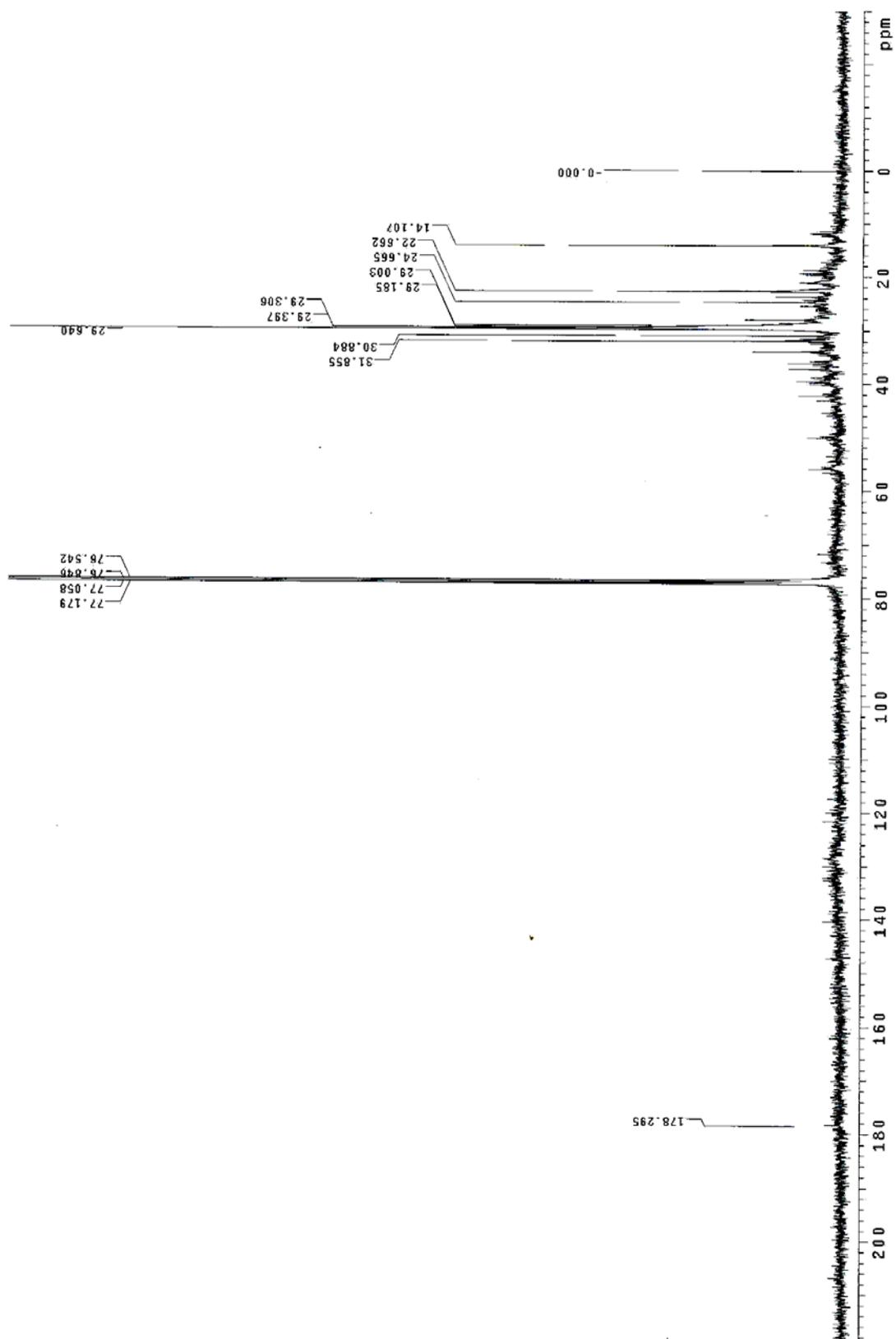


Figura 45. Espectro de RMN- ^{13}C de la muestra 3a-C. (H)

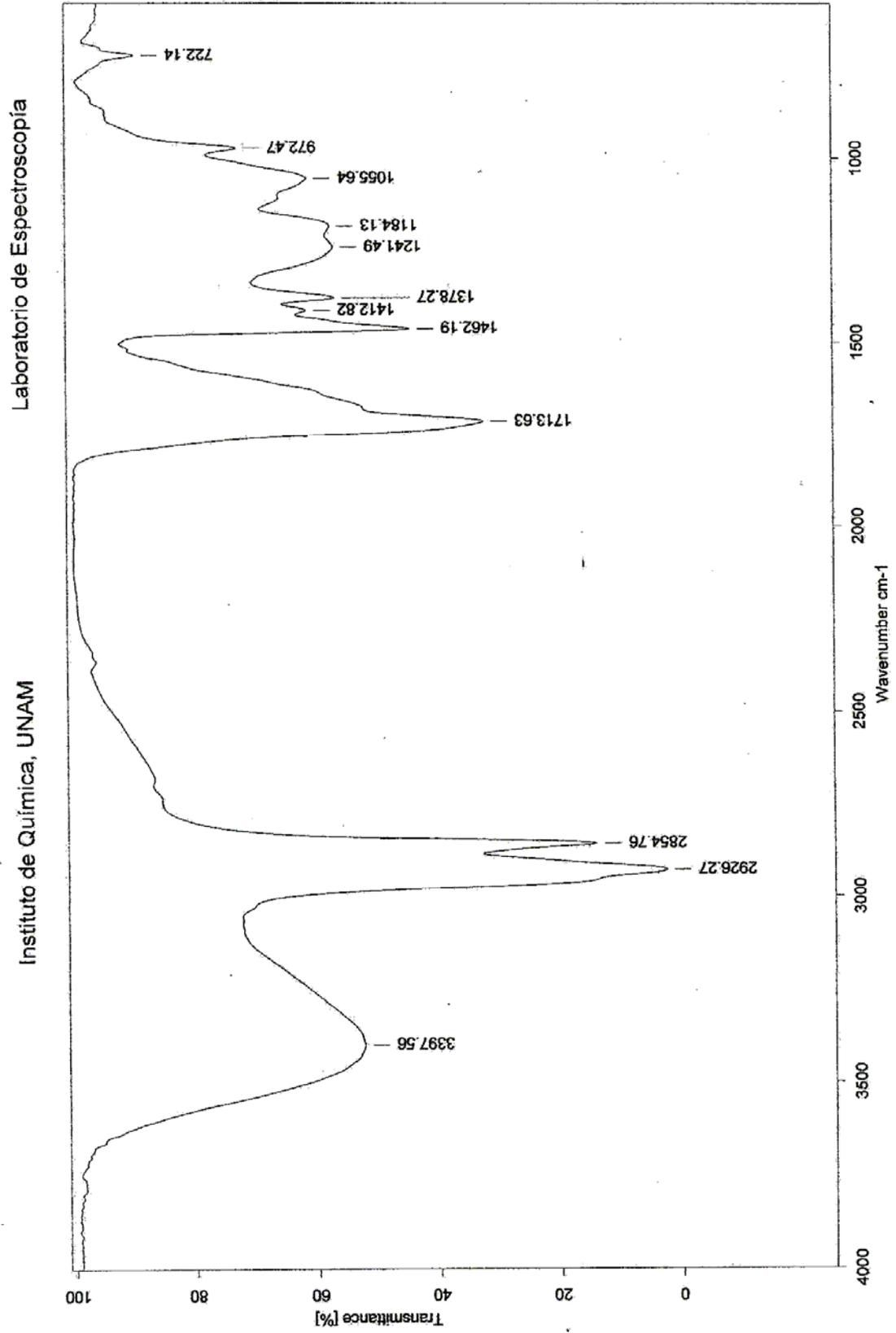


Figura 46. Espectro de IR de la muestra 3a-C. (I)

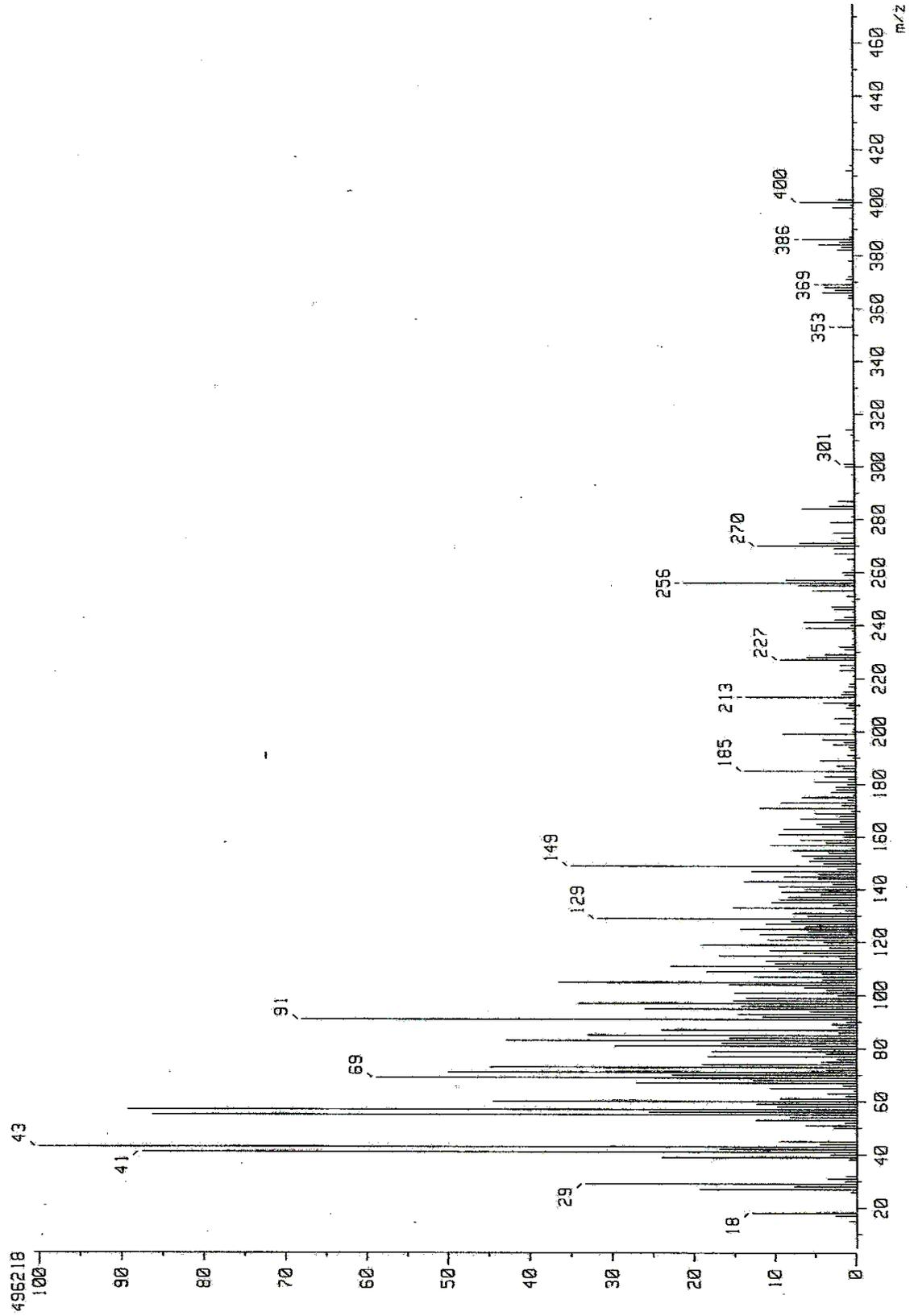


Figura 47. Espectro de EM de la muestra 3a-C. (J)

El estudio espectroscópico indica que la muestra se trata de una mezcla (al menos 5 componentes por CLAR) de ácidos carboxílicos lineales, y de acuerdo a EM, podrían ser ácido palmítico m/z 256 ($C_{16}H_{32}O_2$ PM 256.24), ácido heptadecanoico m/z 270 ($C_{17}H_{34}O_2$ PM 270.25), ácido tricosanoico 353 ($C_{23}H_{46}O_2$ PM 354.34) y ácido tetracosanoico m/z 369 ($C_{24}H_{48}O_2$ PM 368.35). Las estructuras son las que se muestran a continuación en la **figura 48**.

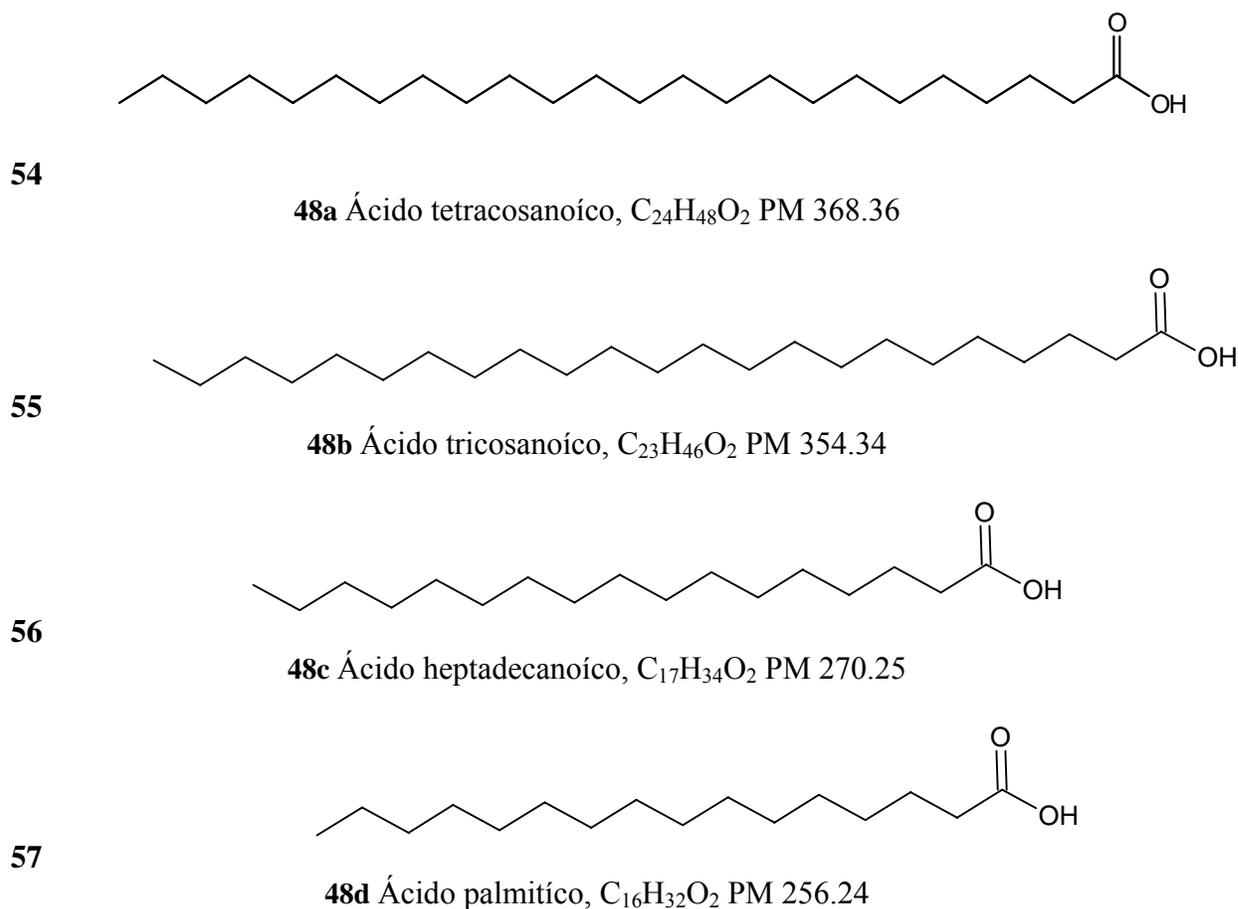


Figura 48. Estructura de ácidos carboxílicos lineales aislados de *D. anchorata*.

Como ya se ha mencionado, los ácidos carboxílicos presentes en esta esponja, ya se han reportado, y son componentes importantes de la membrana celular.

8.1.3.2. Fracción de metanol, 3b.

A la fracción de metanol (**3b**), se le realizó el ensayo de citotoxicidad, resultando con baja actividad; al fraccionar la muestra (**3b**) por CPP, a la fracción **3b-VI** se le efectuó la prueba de citotoxicidad, permaneciendo la baja actividad. Las fracciones caracterizadas sólo fueron tres, **3b-VI**, **3b-VIII** y **3b-IX**.

Las características espectroscópicas de **3b-VI** (RMN de ^1H) muestra señales en δ 3.74-3.69 en forma de quintuplete, forma que indica un protón con cuatro protones vecinos ($-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_2-$); la señal en δ 3.47, como singulete, revela un protón de metileno sin protones vecinos. En tanto que, las señales en δ 3.62, 3.41, 3.23 y 3.08 cada una a manera de multiplete, muestra la presencia de protones vecinos a un grupo oxigenado ($-\text{OH}$, $-\text{O}-$, ó $-\text{CO}-$). Las señales en δ 2.71 en forma de singulete muestra un metileno sin protones vecinos, y la señal triple en δ 2.41-2.36 muestra otro metileno vecino a dos protones. (pág. 57)

En δ 1.41 se observa un doblete indicando la presencia de un metilo con un protón vecino ($\text{CH}-\text{CH}_3$), en δ 1.27 y 1.19 se observa el cuadruplete del protón vecino al metilo ($-\text{CH}-\text{CH}_3$). Entre δ 0.97, 0.92, 0.95, 0.88 en forma de dobles cada una, lo que indicaría la presencia de protones del caso anterior ($-\text{CH}-\text{CH}_3$), sin embargo, en el espectro no se observan las señales con forma de cuadruplete, características del metilo; posiblemente se trate de señales doble de dobles, lo que muestra la presencia de varias estructuras (al menos cuatro) con un protón vecino a dos metilos equivalentes ($\text{CH}_3-\text{CH}-\text{CH}_3$). (pág. 57)

En RMN de ^{13}C sólo se observan cuatro señales dos de ellas en δ 73.49 y 62.21, lo que indica la presencia de carbonos unidos a heteroátomos como oxígeno o nitrógeno; las señales en δ 37.238 y 30.720 representan a los carbonos sp^2 de tipo metileno. (pág. 58)

El espectro de IR corrobora la presencia de grupo metileno y metilo (observados en RMN) en 2966 y 2927 cm^{-1} , en 1416 y 1334 cm^{-1} observan los sobretonos. En 3379 cm^{-1} como banda muy ancha, se tiene los grupo alcohol, con sobretonos en 1508 y 1045 cm^{-1} como bandas pequeñas. Se observa un grupo amino ($-\text{NH}$) en 1627 cm^{-1} , los sobretonos se muestran en 3379 y 923 cm^{-1} . (pág. 58)

La fracción **3b-VI** es una mezcla (al menos dos componentes por CCF) de compuestos amino, con grupo alcohol, no se trata de una cadena alifática (como en las fracciones anteriores) ya que en IR no se observan bandas por 700 cm^{-1} , así que tal vez sean moléculas pequeñas.

Por otra parte, la fracción **3b-VIII** en su análisis espectroscópico de RMN muestra las siguientes características: en el estudio de RMN- ^1H se observan señales en δ 8.53, 8.11 y 8.02 correspondientes a un protón unido a nitrógeno perteneciente a un grupo amido ($-\text{CO}-\text{NH}-$); se tiene un doblete en δ 3.77 indicando la presencia de protones vecinos a un protón y por el desplazamiento hasta δ 3.7, posiblemente se encuentre unido a un oxígeno ($\text{O}-\text{CH}-\text{CH}_2-$), el grupo metileno se observa en δ 3.73 en forma de triplete.

Las señales en δ 3.65 multiplete, δ 2.418 triplete son protones vecinos a uno y dos enlaces de oxígeno. Mientras que en δ 1.89 y 1.27 con forma de singuletes, representa protones de metilo sin hidrógenos cercanos. Con forma de dobletes se encuentran unas señales en δ 1.02 indicando un metileno (por la zona) vecino a otro hidrógeno. El doble de dobles que se observa en δ 0.97 y 0.92 indica la presencia de un hidrógeno vecino a otro hidrógeno.

Se observa otro doblete en δ 0.96 lo que indica un protón vecino a un metilo (por la posición en la zona de metilos), sin embargo la señales de metileno (tripleto) y el metilo (cuadrupleto) no se observan, entonces posiblemente los protones que se observan, no están unidos a estos grupos (metilo y metileno) sino a un grupo con un protón que los protege, y tal efecto hace que las señales salgan a campo alto. (pág. 58)

La resonancia de carbono ^{13}C , se observan sólo cinco señales, una de ellas en δ 105.32 (carbono con un protón); en δ 60.33 se observan los carbonos unidos a heteroátomo, como nitrógeno o oxígeno. En δ 41.01, 40.97 y 30.73 son señales características de metilenos; empero, no se observan los de metilos, confirmando que en RMN de ^1H las señales de los protones entre δ 1.02-0.96 no están unidos a metilos. (pág. 58)

La última fracción metanólica caracterizada es la **3b-IX** la cual tienen las particularidades siguientes: en su estudio de RMN de ^1H , se tiene una señal en δ 8.53 indicando (al igual que **3b-VIII**) un protón unido a nitrógeno. La señal en δ 3.77, en forma de tripleto, indica la presencia de un metileno con dos protones vecinos ($\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ó $\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), y por el desplazamiento es probable que se encuentren junto a un heteroátomo. En tanto que, en δ 3.66 se observa un singulete, asignado a un metileno sin protones vecinos; se observa otro tripleto en δ 2.42 señal asignada a un metileno con dos protones vecinos ($\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ó $\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$). El singulete en δ 1.29 indica la presencia de un metilo sin protones vecinos. (pág. 58)

La RMN de ^{13}C muestra un carbonilo en δ 179.04, mientras que en δ 104.52 se tiene un carbono con un protón. Los carbonos unidos a heteroátomos están en δ 70.86 y 59.95; los metilenos se encuentran en δ 40.54 y 30.63; también se observan dos metilos en δ 23.64 y 20.36. (pág. 58)

Las bandas observadas en espectroscopía de IR indican la presencia de grupos metilo y metileno en 2959 , 2959 y 2855 cm^{-1} , cuyos sobretonos se observan en 1463 cm^{-1} ; la banda en 3383 cm^{-1} , muestra la presencia de un $-\text{OH}$, el sobretono se encuentra en 1041 cm^{-1} . Se observa un grupo amino en 1569 cm^{-1} ($-\text{NH}$) como lo indican los espectros de RMN de ^1H y de ^{13}C , empero, no se observan grupos carbonilo. (pág. 58)

Posiblemente, las muestra de la fracción **3b** son sustancias de desecho de proteínas, por la presencia de nitrógeno y carbonilo en ellas. Las proteínas, en las esponjas marinas, forma parte del esqueleto en forma de fibras gruesas, dicha proteína (semejante al colágeno) es la espongina. Las excreciones y desechos nitrogenados salen del cuerpo con las corrientes de agua. (Barnes, 1995)

8.1.4. Extracto de etanol:agua (80:20), 4.

El extracto de etanol:agua (**4**) se obtuvieron tres fracciones, dos de las cuales resultaron sólidos insolubles (**4a** y **4b-pp**), sólo la fracción **4b** resultó soluble (agua), por lo que es la única que se le realizó RMN e IR.

La espectroscopía de RMN de ^1H de la fracción **4b** muestra señales en δ 8.27 como singulete, indica la presencia de un protón unido a heteroátomo como es nitrógeno u

oxígeno (O–H ó N–H); en tanto que, en δ 3.63, 3.46 y 3.18 se observan los protones vecinos a éstos. Las señales en δ 3.04 (doblete) muestra un metileno con un protón vecino (–CH–CH₂–). En δ 2.62, 2.43, 2.24 y 1.75 como singuletes, se tienen metilenos sin protones vecinos (–C–CH₂–). Se observa un protón con dos protones vecinos en δ 1.35 como triplete (–CH–CH₂–). Una señal en forma de doblete se encuentra en δ 1.17, el doblete indica que existe un protón con sólo protón vecino (–CH–CH–). La otra señal complementaria, se observa en δ 0.86, como doblete (–CH–CH–). Metilos sin protones vecinos se caracterizan por presentar señales en forma de singuletes, en el espectro se observan en δ 0.88, 0.83, 0.81 y 0.73. (pág. 59)

En tanto que, en la espectroscopía de IR, se tiene una banda ancha en 3381 cm⁻¹ particular del grupo hidróxilo, con una banda de sobretono en 1339 cm⁻¹ (–O–H) y 1048 cm⁻¹ (–OH primario). Se confirma la presencia de grupos nitrogenados en 1640 cm⁻¹ (–NH), en 1453 cm⁻¹ se observa su sobretono. (pág. 59)

Tanto la fracción **3b**, como la de **4b** presentan compuestos nitrogenados en sus componentes, posiblemente, formaron parte orgánica del esqueleto de la esponja y los sólidos (precipitados en estas fracciones) parte del esqueleto inorgánico (Brusca, 2003). El esqueleto orgánico, formado de fibras de esponjina, y el esqueleto inorgánico formado, principalmente, de espículas.

Los sólidos obtenidos en *D. anchorata* se obtuvieron de disolventes polares, metanol (**3a**, **3b-pp**, **3c**), etanol:agua (**4a**, **4b-pp**) y agua (**5**); son de característica inorgánica ya que en el estudio de IR no se observan bandas para ninguna muestra (la espectroscopía de infrarrojo es una técnica para analizar compuestos orgánicos, cada banda observada es propia de un grupo funcional orgánico).

También se realizó un tratamiento con ácido sulfúrico, para separar la parte orgánica de la inorgánica (si es que se encontraba unida a ésta); tampoco se observó residuo orgánico (por CCF). Al determinar el punto de fusión, ningún sólido funde a 300°C. (Tabla 18, pág. 59)

Si, efectivamente, los sólidos son componentes del esqueleto inorgánico de la esponja, posiblemente se trate, entre otros, de carbonato de calcio (p.f. 825°C) y sílice (p.f. 1600°C). Componentes que forman las espículas (Vázquez, 1998 y Brusca, 2003) y que sirven para la regeneración, así como de iones calcio y magnesio (Barnes, 1995).

Sin embargo, no sólo puede tratarse de los componentes antes mencionados, también componentes del medio ambiente, en este caso, el agua de mar. Dado que las esponjas filtran grandes volúmenes de agua de mar a través de sus poros, pasando a través de los poros inhalantes hacia el espongocele y saliendo por el ósculo (Dembitky, 2003), estos pueden bioacumularse dentro de la estructura de la esponja. Lo que justifica el p. f. tan alto, que no se registra con el instrumento Fisher (máximo 300°C). Tales componentes¹¹ son: cloruro de sodio (mayoritario) con un p. f. de 801°C, cloruro de magnesio (714°C), sulfato de sodio (884°C), cloruro de calcio (772) y cloruro de potasio (770°C), entre otros componentes minoritarios.

¹¹ Pontes, Miguel. La composición del agua de mar. 2008. <http://marenostrum.org>

8.2. Estudio de citotoxicidad

De las fracciones metanólicas que se les realizó estudio de citotoxicidad (**3b**, **3b-VI**, **3a-III**, **3a-C** y **1b-1**), sólo la **3a-C** y la **1b-1** reflejaron resultados favorables. El extracto **3b** resultó con baja actividad en algunas líneas celulares (mama y próstata), al fraccionarlo, la muestra **3b-VI** no presentó aumento en la citotoxicidad, permaneció el bajo %IC en las líneas celulares de colon y leucemia. Los estudios espectroscópicos de esta última determinan que se trata de una mezcla tanto de componentes oxigenados ($-\text{OH}$), por RMN de ^1H y de ^{13}C (pág. 78), como de componentes como nitrogenados ($-\text{NH}$) observado por IR.

En tanto que las fracciones activas se tratan de, la fracción **1b-1**, una mezcla de ácido grasos insaturado (fraccionado sólo por precipitación), mientras que la fracción **3a-C** es una mezcla de ácidos grasos, pero lineales. Si se observó el aumento de la citotoxicidad al fraccionar (por CCen) la muestra **3a-III**, que inicialmente era de un 51.52, 36.38 y 23.39 %IC en líneas celulares de colon, leucemia y próstata, respectivamente.

No se han reportado ácidos grasos con actividad citotóxica, aislados de esponjas marinas; se ha reportado la actividad antileucémica de dos ácidos grasos el ácido palmítico (**57**) y el ácido esteárico (**59 E**), resultando sin actividad (con un IC_{50} mayor a $25 \mu\text{g/mL}$), aislados del alga *Didemnum psammatores*. (Takeara, 2007)

En este estudio, los compuestos que presentan actividad antileucémica son unos derivados de glicerol (figura 26, pág. 26, estructura 51 donde $n=10$ 1,2-propenediol-3-(heptadeciloxi), $n=11$ alcohol batil, $n=12$ 1,2-propanediol-3-((metiloctadecil)oxi)) con un IC_{50} entre 12.10 y $32.56 \mu\text{g/mL}$. (Takeara, 2007)

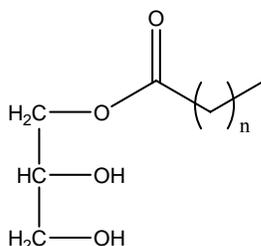
Se han realizado estudios de la influencia de estos, en las enzimas que (directa o indirectamente) influyen en el crecimiento de células cancerígenas. Como es el estudio realizado a los ácidos: mirístico, pentadecanoico, palmítico, esteárico, oleico, linoleico, araquidonico, eicosapentaenoico, docosapentaenoico y docosaheptaenoico, que inhiben la acción de la enzima Aromatasa (enzima encargada de catalizar el paso final en la biosíntesis de estrógenos —estrone y estradiol—, de los andrógenos —testosterona y androstenediona—). La inhibición de la Aromatasa demostró reducir la producción de estrógeno en el cuerpo en niveles casi indetectables, y tiene efecto significativo en el desarrollo y progresión de la hormona sensible de cáncer de mama. (Balulas, 2006).

En otro estudio, con ácido palmítico, inhiben la acción de la enzima soraphen A (enzima inhibitoria de CAC —enzima acetil CoA carboxilasa—). La enzima soraphen A bloquea la síntesis de ácidos grasos y estimula la oxidación de ácidos grasos en células de cáncer de prostata (LNCaP y PC-3M) disminuyendo la proliferación de las células cancerosas, inclusive matarlas. (Beckers, 2007).

Los ácidos grasos influyen indirectamente en la proliferación de células cancerosas, en estos dos estudios. No obstante, se reportan estudios de ácidos grasos con diferentes bioactividades, se describen a continuación.

Los ácidos grasos aislados del tubérculo, *Ibervillea sonarea* (nombre común “wereque”), planta endémica de Sinaloa y Baja California. Presenta actividad hipoglucemiante: resultando activa a dosis de 300 y 600 mg/Kg, glicemia de 30.1% y 70.1%, respectivamente, a los 360 min.

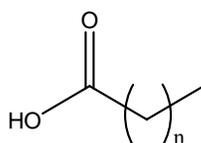
Tal actividad se le atribuye al grupo de compuestos administrados conjuntamente: mezcla de 11 monoglicéridos (**figura 49**) donde sólo varía la cadena alifática. ($n = \text{CH}_2$) $n = 15, 16, 17, 18, 21, 22, 23, 24, 25, 27$. (Hernández, 2007)



58

Figura 49. Estructura base del mono glicérido, aislado de *Ibervillea sonarae*.

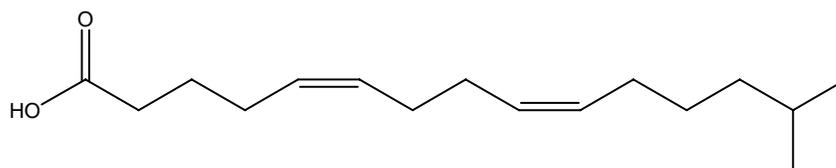
Y los siguientes ácidos grasos: ácido láurico **A** ($n = 9$), ácido mirístico **B** ($n = 11$), ácido pentadecanoico **C** ($n = 12$), ácido palmítico **D** ($n = 13$), y ácido esteárico **E** ($n = 15$). **Figura 50.** donde $n = \text{CH}_2$. (Hernández, 2007)



59

Figura 50. Estructura base de ácido graso, aislado de *Ibervillea sonarae*.

Otro estudio, reporta la actividad antibacteriana en algunos ácidos grasos, uno de ellos aislados de la Gorgonia *Eunicea succinea* (phylum *Coelenterata*, clase: *Anthozoa*, subclase: *Octocorallia*, orden: *Gorgonacea*), el ácido en cuestión es el (5Z,9Z)-14-metil-5,9-pentadecadienoico (**figura 51**)



60

Figura 51. Estructura del ácido graso aislado, (5Z,9Z)-14-metil-5,9-pentadecadienoico de *Eunicea succinea*.

La actividad biológica fue evaluada en bacterias gram positivas: *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus faecalis*, con una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 0.24 $\mu\text{mol/mL}$ y 0.16 $\mu\text{mol/mL}$, respectivamente. (Carballeira, 1997)

Distintos ácidos grasos (**figura 52**, metil-3,5,15-trimetil-7-metilen hexadeca-2,10,12-tienoico **26**, metil-6,8,10,13-tetrametilpentadeca-2,4,6,8,12,14-hexaenoico **27**; metil-7,9,14-trimetilhexadeca-2,4,8,10-tetraenoico **28**; (**tabla 2**, **pág. 12**); metil-6,9,12-trimetiltetradeca-2,4,8,10-tetraenoico **61**; y metil-4,6-dimetilhexadeca-2,4-dienoico **62**) que presentan la actividad antimicrobiana, son los aislados de las esponjas marinas *Ephydatia syriaca*, *Nudospongilla* sp. y *Cortispongilla barroisi* (clase *Demospongia*, familia: *Spongillidae*). (Rezanka, 2002)

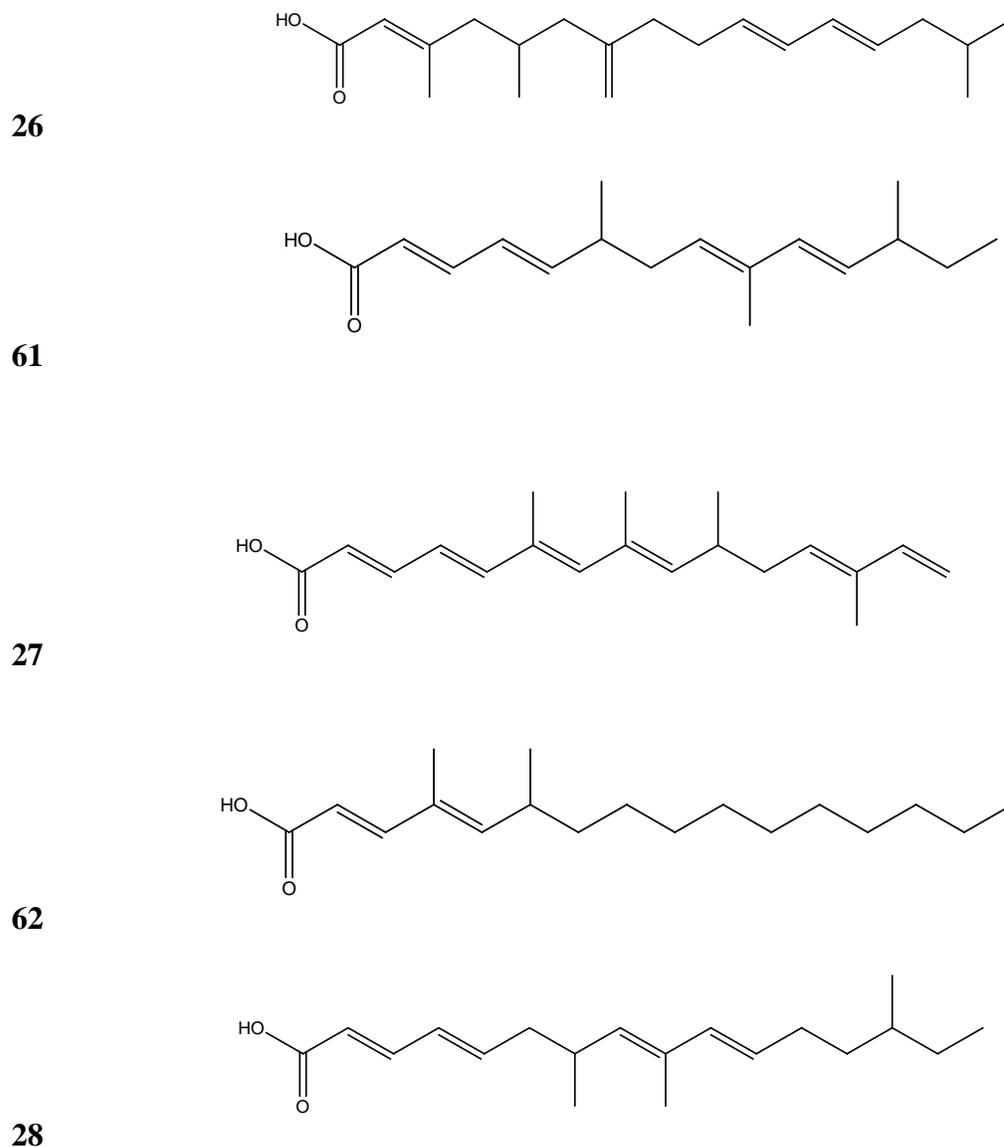


Figura 52. Estructura de ácidos grasos, aislados de las esponjas *Nudospongilla* sp. *Ephydatia syriaca*, *Cortispongilla barroisi*.

Probado contra *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*, a una concentración de 10 µg, reporta el diámetro del halo de inhibición.. Los resultados del diámetro de inhibición (mm) a una concentración de 10µg, probados en *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*, son los siguientes:

Tabla 24. Diámetro de inhibición de los compuestos **1 a 5**, en *S. aureus* y *B. subtilis*.

Compuesto	Diámetro de inhibición (mm)	
	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>
26	84.1	74.9
61	49.0	117.6
27	62.4	89.0
62	56.7	81.0
28	148.4	78.1

Como se observa en la **tabla 24** no todos los ácidos aislados presentan una buena actividad antibacteriana, sobresalen los compuestos **26** con una inhibición en ambas bacterias, el **61** sólo presenta inhibición en *B. subtilis*, así como **28** que sólo presenta inhibición en *S. aureus*. (Řezanka, 2002)

Aunque no hay estudios reportando ácidos grasos con citotoxicidad (aislados de esponjas marinas), en este trabajo se encontró que la mezcla de éstos, tienen actividad citotóxica. Las esponjas al ser organismos sésiles, no se desplazan (crecen adheridos a su sustrato); por lo tanto, su mecanismo de defensa es químico, se debe a metabolitos que son capaces de impedir que otros organismos se establezcan en sus superficies, o de rechazar a algunos depredadores potenciales, muchas resultan tóxicas para los peces. (Barnes, 1995).

9. CONCLUSIONES

- o La esponja marina *D. anchorata* presenta componentes con actividad citotóxica que pueden ser evaluados en ensayos anticancerígenos más específicos.
- o El estudio químico de la esponja permitió determinar la presencia de esteroides, ácidos grasos, compuestos oxigenados y nitrogenados. Así como la de compuestos alifáticos lineales; y por último, la existencia de sales minerales del cuerpo caucáseo y de lo acumulado por la filtración del agua de mar.
- o En el extracto hexánico, se encontró la presencia de esteroides y una fracción bioactiva, la cual resultó ser una mezcla de ácidos grasos.
- o El extracto de diclorometano presentó compuestos lineales alifáticos, exógenos de la esponja.
- o La fracción de diclorometano del extracto metanólico, también se obtuvo una fracción bioactiva. Tratándose de una mezcla de ácidos grasos.
- o Mientras que, la fracción de metanol del extracto metanólico, no presentó fracciones con bioactividad. Las muestras no se caracterizaron, sólo se observó la presencia de componentes oxigenados (—OH).
- o El análisis de la fracción de etanol:agua, determinó que se trata de compuestos tanto oxigenados (—OH) como nitrogenados (—NH).
- o De los extractos hexánicos y metanólicos se obtuvieron dos mezclas de compuestos con actividad citotóxica. Los estudios espectroscópicos permitieron caracterizarlas y establecer que se tratan de mezclas de ácidos grasos saturados e insaturados, respectivamente.
- o La complejidad de las mezclas de compuestos que forman las esponjas hace que se obtengan mínimas cantidades de componentes activos, lo que dificulta su estudio e identificación.
- o El estudio de productos naturales es una actividad interdisciplinaria, en la que se incluyen diferentes áreas, para una investigación completa y veraz.

10. RECOMENDACIONES

- Es necesario trabajar inicialmente con una mayor cantidad de esponja marina, para así obtener mayor cantidad de compuestos finales.
- Se necesita un estudio real de biodiversidad y abundancia de la esponja marina *D. anchorata*, para poder coleccionar una gran cantidad de material biológico, sin poner en riesgo la supervivencia de la esponja.
- Es recomendable realizar un estudio biodirigido, para ubicar todos los componentes bioactivos.
- Realizar la purificación de los extractos bioactivos por otros métodos de separación, como CLAR. Para comprobar si, dicha actividad biológica, es responsable de un compuesto o del grupo de compuestos.
- Una vez separados determinar, además del por ciento de inhibición de crecimiento (%IC), también la inhibición de crecimiento al 50% (IC₅₀).
- Realizar estudios biológicos en diferentes bioactividades, además de la citotóxica, la de antifúngica, antimicrobiana, antiinflamatoria, entre otras.

11. REFERENCIAS

1. Alam N, Wang W, Hong J, Lee CO, Im KS, Jung JH. Cytotoxic Sphingosine 4-sulfates from the sponge *Spirastrrella abata*. *J. Nat. Prod.* 2002, 65: 944-945.
2. Altena IA, Butler AJ, Dunne SJ. A new cyclized 9,11-secoesterol enol-ether form the Australian sponge *Euryspongia arenaria*. *J. Nat. Prod.* 1999, 62: 1154-1157.
3. Aoki S, Yoshioka Y, Miyamoto Y, Higuchi K, Setiawan A, Murakami N, Chen ZS. Agosterol A, a novel polyhidroxy sterol acetate reversin multigrug resistanse from a Marine sponge of *Spongia* sp. *Tetrahedron Letters*. 1998, 39: 6303-6306.
4. Balunas MJ, Su B, Landini S, Breeggemeirt RW, Kinghorn AD. Interference by naturally occurring fatty acids in a noncellular enzyme-based aromatase bioassay. *J. Nat. Prod.*, 2006, 69: 700-703.
5. Barile FA. Introduction to In vitro Cytotoxicology Mechanisms and Methods. USA: CRC Press, 1994: 1-57.
6. Barnathan G, Doumenq P, Njinkové JM, Mirallès J, Debitus C, Lévi C, Komprobst JM. Sponge fatty acids, 3, occurrence of series of n- moniecoic and iso-5,9 dienoic long-chin fatty acids in the phospholipids on the marine sponge *Cianachyrella off. Schulzai* keller. *Lipids*. 1994, 29: 297-303.
7. Barnes RD, Ruppert EE. Zoología de los Invertebrados. Sexta Edición. México: McGraw-Hill interamericana; 1995: 75-93.
8. Beckers A, Organe S, Timmermans L, Scheys K, Peters A. Chemical inhibition of acetyl-CoA carboxylase induces growth arrest and cytotoxicity selectively in cancer cell. *Cancer Res.*, 2007, 67(17): 8180-8187.
9. Brusca RC, Brusca GJ. Invertebrates. Second edition. USA: Sinaver Associates Inc, 2003:179-182.
10. Calcinaï B, Bavestrello G, Cerrano C. Dispersal and association of two alien species in the Indonesian coral reefs: the octacoral *Carijoa riisei* and the *Desmapsamma anchorata*. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.* 2004, 84: 937-941.
11. Campagnuolo C, Fattorusso E, Taglialatela-Scafati O. Feroxosides A-B, two morlanostane tetraglycosides form the Caribbean sponge *Ectyoplasia ferox*. *Tetrahedron*. 2001, 57: 4049-4055.
12. Cantrell CL, Gustafson KR, Cecere MR, Pannell LK, Moyd MR. Chonropsins A and B: novel tumor cell growth-inhibitory macrolide lactams from de marine sponge *Chondropsis* sp. *J. Am. Chem. Soc.* 2000, 122: 8825-8829.
13. Carballeira NM, Maldonado ME. 7-Methyl-8-hexadecenoic acid: a novel fatty acid from the marine sponge *Desmapsamma anchorata*. *Lipids*. 1988, 23:690-693.
14. Carballeria NM, Negrón V, Reyes ED. Novel monounsaturated fatty acids from the sponges *Amphimedon compressa* and *Mycale laevis*. *J. Nat. Prod.* 1992, 55: 333-339.
15. Carballeira NM, Pagán M. Identification and total synthesis of a novel dimethylated fatty acid from the Caribbean sponge *Calyx podatypa*. *J. Nat. Prod.* 2000, 63: 666-669.
16. Carballeria NM, Reyes ED. Identification of the new 23-methyl-5,9-pentanosadienoic acid in the sponge *Cribrochalina vasculum*. *Lipids*. 1990, 25: 69-71.

17. Carballeria NM, Reyes ED, Shalabi F. Identification of novel iso/anteiso nonacosadienoic acids from the phospholipids of the sponges *Chondrosia remiformis* and *Myrmekioderma styx*. *J. Nat. Prod.* 1993, 56: 1850-1855.
18. Carballeria NM, Shalabi F. Unusual lipids in the Caribbean sponges *Amphimedon viridis* and *Desmapsamma anchorata*. *J. Nat. Prod.* 1994, 57: 1152-1159.
19. Castell JV, Gómez-Lechon MJ. In Vitro Methods in Pharmaceutical Research. Great Britain: Academic Press, 1997:2-51.
20. Compagnone RS, Oliveri MC, Piña IC, Marques S, Rangel HR, Dagger F, Suárez AI, Gómez M. 5-alkylpyrrole-2-carboxaldehydes from the Caribbean sponges *Mycale microsignatosa* and *Desmapsamma anchorata*. *Natural Product Letters.* 1999, 13(3): 203-211.
21. Dai J, Liu Y, Zhou YD, Nagle DG. Hypoxia-Selective antitumor agents; Norseserpene preoxides from the marine sponge *Diacarnus levii* preferentially suppress the growth of tumor cells under hypoxic conditions. *J. Nat. Prod.* 2007, 70: 130-133.
22. Dembitsky VM, Rezanka T, Srebnik M. Lipid compounds of freshwater sponges: family *Spongillidae* class *Demospongiae*. *Chemistry and physics of lipids.* 2003, 123: 117-155.
23. Durst HD, Gokel GW. Química Orgánica. Barcelona: Reverté, 1985:78-96.
24. Endo T, Tsuda M, Fromont J, Kobayashi J. Hyrtinadine A, a bis-indole alkaloid from a marine sponge. *J. Nat. Prod.* 2007, 70: 423-424.
25. Graithwaite A, Smith FJ. Chromatographic methods. Fifth edition. USA: Kluwer Academic Publishers, 1999: 2-15.
26. Green G, Fuentes V Laura E, Gómez LP. Nuevos registros de Porifera del arrecife de La Blanquilla, Veracruz, México. Universidad Nacional Autónoma de México: Anales del Centro de Ciencias del Mar y Limnología. 1985: 127-146.
27. Green G, Gómez LP. Estudio Taxonómico de las Esponjas de la Bahía de Mazatlán, Sinaloa, México. Universidad Nacional Autónoma de México: Anales del Centro de Ciencias del Mar y Limnología. 1985: 273-300.
28. Gillian MN, Hong TW, Molinski TF, Lerch MF, Canilla MT. Oceanapiside, an Antifungal bis- α - ω -animo alcohol glycoside from de marine sponge *Oceanapia phillipensis*. *J. Nat. Prod.* 1999, 62: 1678-1681.
29. Gochfield DJ, Hamann MT. Isolation and Biological Evaluation of Filiformin, Plakortide F, and Plakortone G from the Caribbean Sponge *Plakortis* sp. *J. Nat. Prod.* 2001, 64: 1477-1479.
30. Göran L, Bohlin L. Studies of Swedish marine organisms, Part X. Biologically active compounds from the marine sponge *Geodia baretii*. *J. Nat. Prod.* 1988, 51: 1277-1280.
31. Gunasekera P, McCarthy PJ, Longley RE, Pomponi SA, Wright AE, Lobkovsky, Clardy J. Descorhabdin P, a new enzyme inhibitor from a deep-water Caribbean sponge of the genus *Batzella*. *J. Nat. Prod.* 1999, 62: 173-175.
32. Hernández G Claudia J, Zubía E, Ortega MJ, Carballo L. Sesterpene metabolites from the sponge *Hyatella intestinalis*. *Tetrahedron.* 2006, 62:5392-5400.
33. Ho, KB, Mar W, Kim S, Kim JY, Lee TH, Kim JG, Shin D, Sim CJ, Shin J. Antimicrobial activity and cytotoxicity of Bis(indole) alkaloids from the sponge *Spongisorites* sp. *Biol. Pharm. Bull.* 2006, 29:570-573.

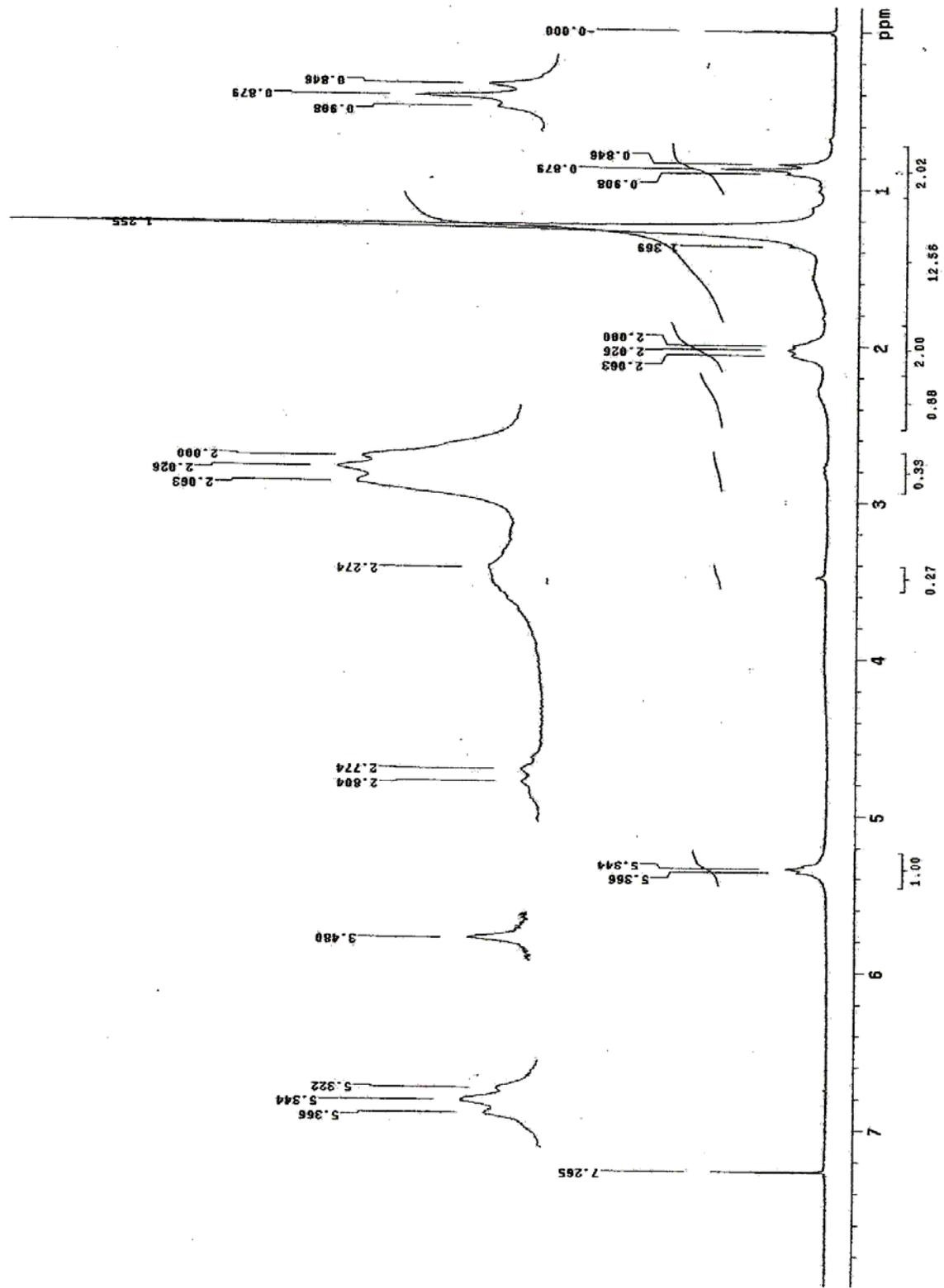
34. Keyzers RA, Northcote PT, Webb V. Clathriol, a novel polyoxygenated 14 β steroid Iissosclera the New Zealand marine sponge *Clanthria iissosclera*. *J. Nat. Prod.* 2002, 65: 598-600.
35. Kong A, Andersen RJ. Polymastiamides B-F, novel steroid amino acid conjugates isolated from the Norwegian marine sponge *Polymastia boletiformis*. *J. Nat. Prod.* 1996, 59: 379-385.
36. Layli ME. Ecology of the encrusting sponge *Desmapsamma anchorata*, Universidad de Puerto Rico. 2006, Puerto Rico.
37. Lough AJ, McLean S, Reynolds WF, Yu M. Geodiamolides H and I, further Cyclodepsipeptides from the marine sponge *Geodia* sp. *Tetrahedron*. 1998, 54: 4451-4458.
38. Luo X, Li F, Hong J, Lee CO, Sim CJ, Im KS, Jung LH. Cytotoxic oxylipins from a marine sponge *Topsentia* sp. *Nat. Prod.* 2006, 69: 567-571
39. Melcher J, Janussen D, Garson MJ, Hiebl J, Vetter W. Polybrominated Hexahydroxanthene Derivatives (PBHDs) and Other Halogenated Natural Products from the Mediterranean Sponge *Scalarispongia scalaris* in Marine Biota. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2007, 52: 512-518.
40. Milanowski DJ, Rashid MA, Gustafson KR, O'Keefe BR, Nawrocki JP, Pannell LK, Boyd MR. Cyclonellin, a new cyclic octapeptide from the marine sponge *Axinella carteri*. *J. Nat. Prod.* 2004, 67: 441-444.
41. Mora FD, Jones DK, Desai PV, Patny A. Bioassay for the identification of natural product-based activators of Peroxisome proliferator-activated Receptor- δ (PPAR δ): the marine sponge metabolite Psammaphin A activates PPAR δ and induces apoptosis in human breast tumor cells. *Nat. Prod.* 2006, 69: 547-552.
42. Nemoto T, Yochino G, Ojika M, Sakagami Y. Amphimic acids and related long-chain fatty acids as DNA Topoisomerase I inhibitors from an Australian sponge, *Amphimedon* sp.: isolation, structure, synthesis, and biological evaluation. *Tetraedon*. 1997, 53(49): 16699-16710.
43. Nicholas GM, Hong TW, Molinski TF, Lerch ML, Candilla MT, Lebrilla CB. Oceanopiside, an Antifungal Bis- α,ω -amino Alcohol Glucoside the Marine Sponge *Oceanapia phillipnsis*. *J. Nat. Prod.* 1999, 62: 1678-1681.
44. Oku N, Gustafson KR, Cartner LK, Wilson JA, Shignematsu N, Hess S, Pannell LK, Boyd MR, McMahan JB. Neamphamide A, a new HIV-inhibitory depsipeptide from the papua New Guinea marine sponge *Neamphius huxleyi*. *J. Nat. Prod.* 2004, 67: 1407-1411.
45. Ortega MJ, Zubía E, Sánchez MC, Salva J, Carballo JL. Structure and cytotoxicity of new metabolites from the sponge *Mycale cecilia*. *Tetrahedron*. 2004, 60: 2517-2524.
46. Papazisis KT, Geromichalos GD, Dimitriadis KA, Kortsaris AH. Optimization of the sulforhodamine B colorimetric assay. *Journal of Immunological Methods*. 1997, 208: 151-158.
47. Patil AD, Freyer AJ, Breen A, Carte B, Jonson RK. Halistanol Disulfate B, a Novel Sulfated Sterol from the Sponge *Pachastrella* sp.: Inhibitor of Endothelin Converting Enzyme. *J. Nat. Prod.* 1996, 59: 606-608.
48. Pauwels B, Korst EC, Ammelies, de Pooter MJ, Christel, Pattyn GO, Greet, Lambrechts AJ, Hilde. Comparison of the sulforhodamine B assay for in vitro chemoradiation studies. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2003, 51:221-226.

49. Pavia DL, Lampman GM, Kriz GS. Introduction to organic laboratory Techniques. A microscale approach. Second Edition. USA: Saunders College Publishing, 1995: 728, 730-731, 735, 749-766.
50. Plubrokarn A, Yuenyongsawad S, Thammasaroj T, Jitsue A. Cytotoxic isoquinoline Quinones from the thai sponge *Cribrochalina*. *Pharmaceutical Biology*. 2003, 41(6): 439-442.
51. Quijano I, Cruz F, Navarrete I, Gómez P, Rios T. Alkyl glycerol monoethers in the marine sponge *Desmaysamma anchorata*. *Lipids*. 1994, 29: 731-734.
52. Rashid MA, Cantrell CL, Gustafson KR, Boyd MR. Chondropsin D, a new 37-membered – ring macrolide lactam from the marine sponge *Chondropsis* species. *J. Nat. Prod.* 2001, 64: 1341-1344.
53. Řezanka T, Dembits K Varley M. Multibranched polyunsaturated and very-long-chain fatty acids of freshwater Israeli sponges. *J. Nat. Prod.* 2002, 65: 709-713.
54. Rashid MA, Cantrell CL, Gustafson KR, Boyd MR. Chondropsin D, a new 37-Membered-Ring Macrolide Lactam from the Marine Sponge *Chondropsis* Species. *J. Nat. Prod.* 2001, 64: 1341-1344.
55. Rashid MA, Gustafson KR, Boyd MR. A new isoquinoline alkaloid from the marine sponge *Haliclona* species. *J. Nat. Prod.* 2001, 64: 1249-1250.
56. Rashid MA, Gustafson KR, Boyd MR. New Chondropsin macrolide lactams from marine sponges in the genus *Ircinia*. *Tetrahedron letters*. 2001, 42: 1623-1626.
57. Rashid MA, Gustafson KR, Boyd MR. New cytotoxic N-methylated beta-carboline alkaloids from the marine *ascidian* Eudistoma gilboverde. *J. Nat. Prod.* 2001, 64: 1454-1.-
58. Rashid MA, Gustafson KR, Cartner LK, Shigematsu N, Pannell LK, Boyd MR. Microspinosamide, a new HIV-inhibitory cyclic depsipeptide from the marine sponge *Sidonops michospinosa*. *J. Nat. Prod.* 2001, 64: 117-121.
59. Rashid MA, Gustafson KR, Cardellina JH 2ad, Boyd MR. Absolute stereochemistry and anti HIV activity of minquartynoic acid, a polyacetylene from *Ochonostachys amentacea*. *Nat. Prod. Lett.* 2001, 15: 21
60. Rashid MA, Gustafson KR, Crouch RC, Groweiss A, Pannell LK, Boyd MR. Application of High-Field NMR and Cryogenic Probe Technologies in the Structural Eludation for Poecillastrin A, a new Antitumor Macrolide Lactam from the sponge *Poellastra* species. *Organic letters*. 2002, 4(19): 3293-3296.
61. Rudi A, Yosief T, Shoshana, Hizi A, Schleyer M, Kashman V. Clathsterol, a novel anti-IHV-1 RT sulfated from the sponge *Clathria* species. *J. Nat. Prod.* 2001, 64: 1451-1453.
62. Sera Y, Adachi K, Shizuri Y. A new Epodioxy Sterol as an Antifouling Substance from a Palauan Marine Sponge, *Lendenfeldia chondrodes*. *J. Nat. Prod.* 1999, 62: 152-154.
63. Shin BA, Kim YR, Lee IS, Sung CK, Hong J, Sim CJ, Im KS, Jung JH. Lyso-PAF analoges and lysophosphatidylcholines form the marine sponge *Spirastrella abata* as inhibitors of Cholesterol biosynthesis. *J. Nat. Prod.* 1999, 62: 1554-1557.
64. Sjögren M, Göransson U, Johnson AL, Dahlström M, Andersson R, Bergman J, Jonson PR, Bohlin L. Antifouling Activity of Brominated Cyclopeptides from the Marine Sponge *Geodia barretti*. *J. Nat. Prod.* 2004, 67: 368-372.
65. Skoog DA, Holler FJ. Principios de Análisis instrumental. Quinta Edición. España: McGraw Hill, 1992: 730-733.

66. Sperry S, Crews P. Haliclostano sulfato y Halistanol sulfato de un Indo-pacífico *Haliclona* esponja. *J. Nat. Prod.* 1997, 60: 29-32.
 67. Tabudravu JN, Jaspars M. Stelliferin Riboside, un triterpeno monosacárido aislado de la Fijiana esponja *Geodia globostellifera*. *J. Nat. Prod.* 2001, 64: 813-815.
 68. Takada K, Choi BW, Rashid MA, Gamble WR, Cardellina JH, Van QN, Lloyd JR, McMahan JB, Gustafson KR. Asignación estructural de Poecillstrin B y C, macrólidos lactámicos de la esponja de aguas profundas del Caribe *Poecillastra* especie. *J. Nat. Prod.* 2007, 70: 428-431.
 69. Takeara R, Jimenez PC, Veras WD, Odorico de Moraes M, Pessoa C, Peoporine LN, Callegari L João L, Monteiro da Cruz LT, Veras CLL. Efectos antileucémicos de *Didemnum psammatoedes* (Tunicata: Ascidiacea) constituyentes. *Comp. Bioch. and Phys.* Part A. 2007, Feb 20: 1-7.
 70. Umeyama A, Adachi K, Ito S, Arihara S. Nuevo 24-isopropilcolesterol y 24-isopropenilcolesterol sulfato de la esponja marina *Epipolasis* especie. *J. Nat. Prod.* 2000, 63: 1175-1177.
 71. Umeyama A, Shoji N, Enoki M, Arihara S. Swinhosterols A-C, 4-metileno secosteroides de la esponja marina *Theonella swinhoei*. *J. Nat. Prod.* 1997, 60: 296-298.
 72. Uy MM, Ohta S, Emi O, Mikoto Y, Hirata T, Ikegami S. Nuevos spirocíclicos Sesquiterpenos de la esponja marina *Geodia exigua*. *Tetrahedron* . 2003, 59: 731-736.
 73. Vankateswarlu Y, Venkata M Rami R, Rama MR. Un nuevo éster de la esponja *Ircinia fasciculata*. *J. Nat. Prod.* 1996, 59: 876-877.
 74. Varcáncel CM, Gómez HA. Técnicas analíticas de separación. España: Reverté, 1988: 333, 389-425.
 75. Vázquez M Laura E. Estudio químico-biológico de la esponja marina *Xestospongia subtriangularis* (Duchassaing 1850). Instituto de Química, UNAM. 1998, México DF.
 76. Vichai V, Kirtikara K. Ensayo colorimétrico de Sulforhodamina B para el cribado de citotoxicidad. *Nature protocols.* 2006, 1(3): 1112-1116.
 77. Willard HH, Merritt Jr. LL, Dean JA, Settle Jr. FA. Métodos Instrumentales de Análisis. México: Grupo Editorial Iberoamerica; 1991: 526, 513, 606, 611, 616, 618, 622 y 632.
- Green, 1985. Anales del Centro de Ciencias del Mar y Limnología. Disponible en Internet: http://www.biblioweb.dgsca.unam.mx/cienciasdelmar/anales_i/ins_inx.htm (citado el 24 de agosto de 2007).
 - Departamento de Zoología. Universidad de Córdoba. Disponible en Internet: http://www.uco.es/dptos/zoologia/zoolobiolo_archivos/practicas/practica_3/poriferos_botton.htm (citado el 08 de agosto de 2007).
 - Nature notes. Actualizado en abril del 2006. Disponible en Internet: http://ww.naturenotes.org/notes/dbiologia/biologia_poliferos.htm (citado el 21 de septiembre de 2007).
 - Departamento de Zoología. Instituto de Biología. Universidad Federal de Bahía. Actualizado el 09 de febrero del 2004. Disponible en Internet: <http://poliferabrsil.mn.ufrj.br/> (citado el 09 de marzo de 2007)

- Harrison. Disponible en Internet:
<http://www.harrisonresearch.com/chromatotron/specs.html> (citado el 03 de agosto de 2007).
- INEGI. Disponible en Internet: www.inegi.gob.mx (citado el 24 de agosto de 2007).
- OMS. Disponible en Internet: www.who.int/es/ (citado el 23 de agosto de 2007).
- CONAPESCA. Disponible en Internet:
http://conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/cona_tramites (citado el 19 de marzo de 2007).
- Pontes. La composición del agua de mar, 2008. Disponible en Internet:
<http://marenostrum.org>. (citado el 05 de febrero de 2008).

12. ANEXOS

Figura 53. Espectro de RMN de ^1H de la muestra 2-1 (K)

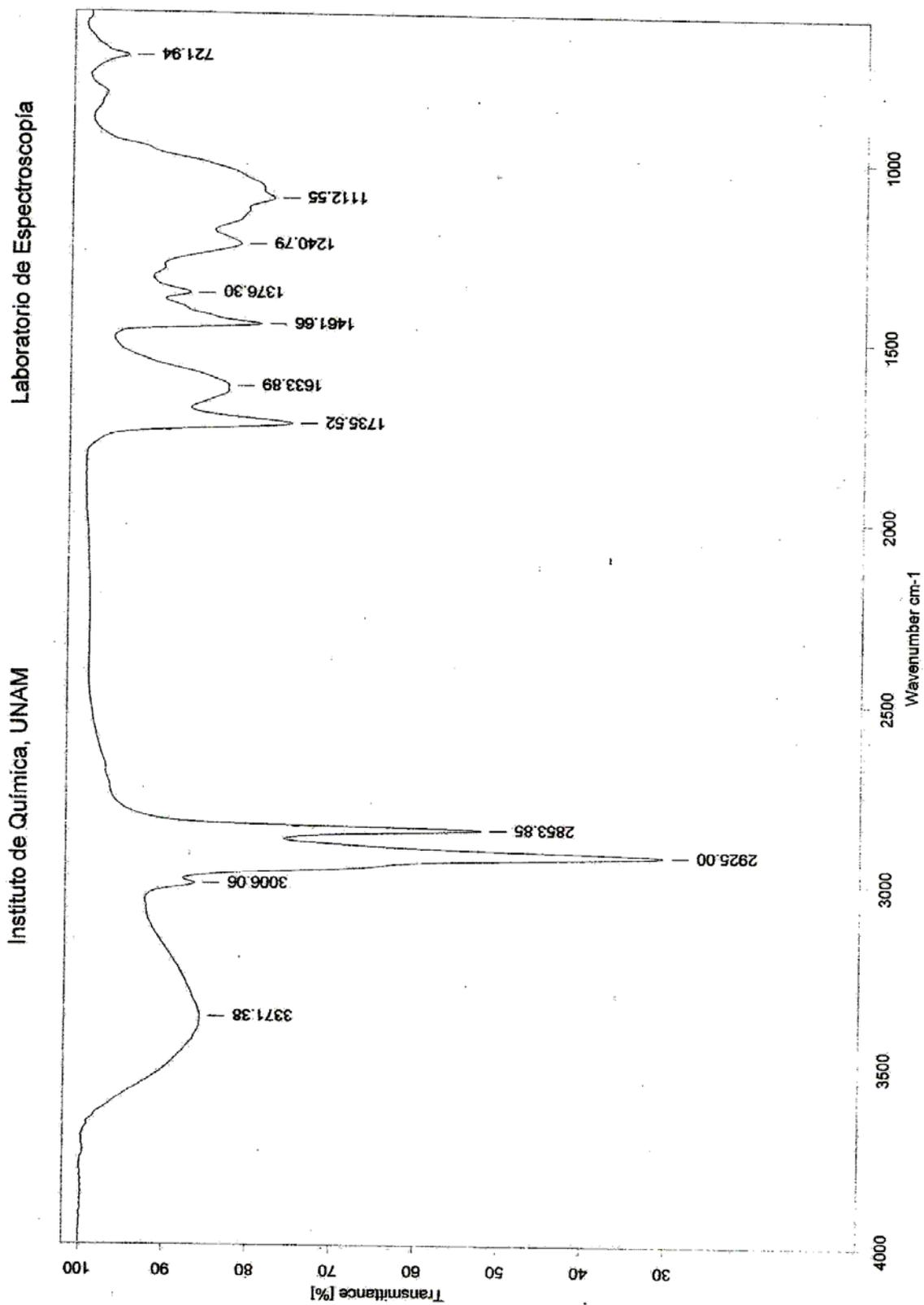


Figura 54. Espectro de IR de la muestra 2-1. (L)

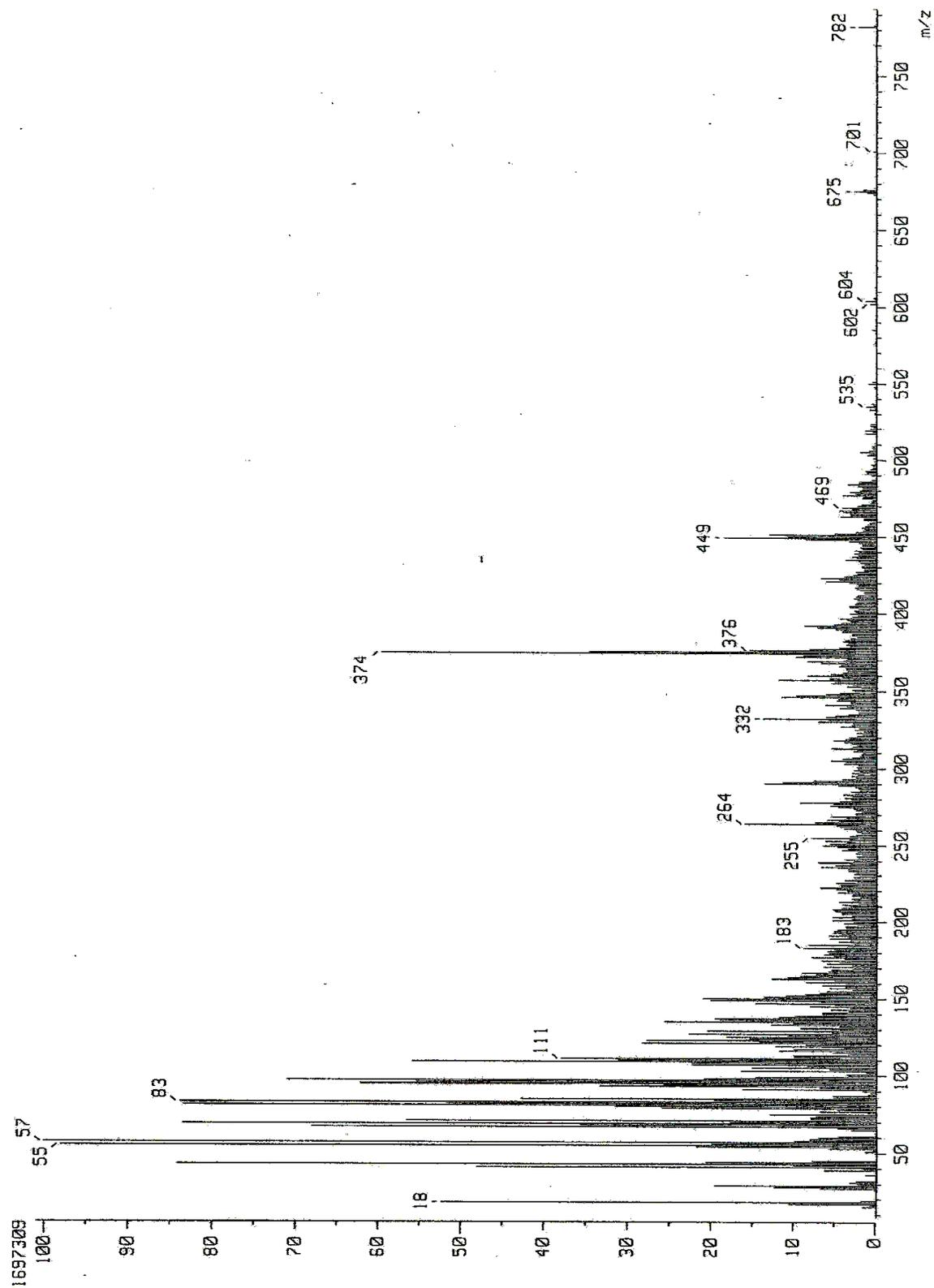


Figura 55. Espectro de EM de la muestra 2-1. (M)