



Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología

Universidad Nacional Autónoma de México



**Aislamiento, Elucidación Estructural y Evaluación de la
Actividad Biológica de los Compuestos Provenientes de la
Esponja *Cliona californiana* (De Laubenfels, 1932)**

T E S I S

que para obtener el grado académico de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Química Marina)

Presenta

Oc. Amara Thayde Sánchez Nava

Director de Tesis: Dr. Leovigildo Quijano

Comité Tutorial:

Dr. Tirso Ríos Castillo

Dr. Roberto Arreguín Espinosa

Dra. Judith Sánchez Rodríguez

Dra. María Alejandra Rojas Molina

Dra. Irma Esthela Soria Mercado (Asesor externo)

México, D. F., 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

A mis padres Tayde y Rubén y a mi hermana, por estar siempre mi lado en todo momento y apoyarme incondicionalmente en mis proyectos, porque este logro es para ustedes. Gracias por enseñarme a seguir luchando por lo que quiero, enfrentar las adversidades con fortaleza y entusiasmo y a disfrutar las oportunidades de la vida a su lado. Los Amo.

A Arturo, por tu apoyo, paciencia, amor y por ser parte fundamental en mi vida.

A Saúl, porque tu llegada a mi vida me ha llenado de energía y entusiasmo para seguir adelante.

A toda mi familia defeña porque su apoyo, compañía y amor han hecho que disfrute mi estancia en el DF.

A mis amigos que siempre han estado conmigo en todo momento, a pesar de la distancia.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México pero en particular al Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología por mi formación académica y apoyo en este proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca nacional y mixta otorgada durante la realización de mis estudios de posgrado.

Al Dr. Leovigildo Quijano por sus enseñanzas y por fomentar mi espíritu de superación para seguir aprendiendo cada día sobre la Química de Productos Naturales. Gracias por permitirme seguir siendo su alumna y el apoyo brindado a lo largo de este proyecto.

A los miembros de mi comité tutorial: Dra. Alejandra Rojas Molina, Dr. Roberto Arreguín, Dra. Judith Sánchez Rodríguez y Dr. Tirso Ríos Castillo por su tiempo y dedicación en las revisiones del manuscrito, pero sobre todo por enriquecer este proyecto con sus valiosas aportaciones.

A la Dra. Irma Esthela Soria Mercado por su entusiasmo, consejos y por enseñarme que lo mejor se disfruta en el proceso y no al final.

Al Dr. Carlos Jiménez González y a la Universidade Da Coruña por las facilidades ofrecidas para la realización de una estancia de investigación en sus instalaciones

A Biol. Patricia Gómez por todo su apoyo en la identificación del material porífero.

Al personal técnico espectroscopista del Instituto de Química-UNAM: Q. Rocio Patiño (IR), M. C. Ma. De las Nieves Zavala, Q. Ma. De los Ángeles Peña, M. C. Elizabeth Huerta, M. C. Héctor Ríos, Dra. Beatriz Quiroz (RMN), I. Q. Luís Velasco y Dr. Javier Pérez (EM), por las facilidades prestadas para la realización de los análisis.

Agradezco el apoyo brindado por el personal técnico del SAI-UDC: Dr. Jaime Rodríguez González (director), Jorge Otero Canabal, María Gallego Vázquez, Miriam Rega López (RMN, EM) y Gerardo Fernández Martínez (Técnicas Cromatográficas).

ÍNDICE

| | |
|--|------------|
| ÍNDICE DE TABLAS | VI |
| ÍNDICE DE FIGURAS | VII |
| ABREVIATURAS, FÓRMULAS Y ACRÓNIMOS | IX |
| RESUMEN | XI |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1) GENERALIDADES | 1 |
| 2) ANTECEDENTES | 2 |
| HIPÓTESIS | 17 |
| OBJETIVOS | 17 |
| METODOLOGÍA | 18 |
| 1) LOCALIZACIÓN DEL ÁREA DE RECOLECTA..... | 18 |
| 2) RECOLECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE <i>CLIONA CALIFORNIANA</i> | 19 |
| 3) DISTRIBUCIÓN Y DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE..... | 20 |
| 4) OBTENCIÓN DE METABOLITOS DE LA ESPONJA | 21 |
| a) <i>Material y equipo utilizado para los diferentes análisis</i> | 21 |
| b) <i>Aislamiento y purificación de los componentes de las diferentes recolectas</i> | 23 |
| i) Primera recolecta | 23 |
| (1) Extracto de Éter de Petróleo | 23 |
| (2) Extracto butanólico..... | 24 |
| ii) Segunda recolecta..... | 25 |
| (1) Tratamiento de los extractos obtenidos de la Esponja Húmeda | 26 |
| (a) Extracto de Acetato de Etilo..... | 26 |
| (i) <i>Separación de componentes ácidos y neutros</i> | 26 |
| 1. Separación de componentes de la fracción acida Cc2HAEAcS | 27 |
| 2. Separación de componentes de la fracción neutra Cc2HAENeu | 28 |
| (b) Extracto butanólico. | 29 |
| (c) Extracto acuoso | 29 |
| (2) Tratamiento de la Esponja Seca..... | 34 |
| (a) Extracto butanólico | 34 |
| iii) Tercera recolecta | 35 |
| 5) OBTENCIÓN DE DERIVADOS | 36 |
| a) <i>Acetilación de la fracción CcHEPIb</i> | 36 |
| b) <i>Oxidación de la mezcla de esteroides</i> | 37 |
| 6) VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA | 38 |
| a) <i>Bioensayos de toxicidad con Artemia salina</i> | 38 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 39 |

| | |
|---|-----------|
| 1) ELUCIDACIÓN DE ESTRUCTURAS | 39 |
| a) Ésteres metálicos de ácidos grasos (X-XXII, XXXII-XLI) | 39 |
| b) Ácido graso (XXIII)..... | 45 |
| c) Esteroles (I-IV)..... | 45 |
| d) Derivados 7-oxo de los esteroles (XXIV-XVII)..... | 51 |
| e) Derivados 5,8-Epidioxi de los esteroles (XXVIII-XXXI) | 53 |
| f) 3-metil-uracilo (IX)..... | 54 |
| g) Sulcatina (XLII)..... | 55 |
| h) Nucleósidos (XLIII y XLIV)..... | 58 |
| i) Ácido benzoico (XLVI)..... | 59 |
| j) Sal de sodio del ácido benzoico (XLV) | 60 |
| 2) ACTIVIDAD BIOLÓGICA | 62 |
| CONCLUSIONES..... | 63 |
| RECOMENDACIONES..... | 64 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 65 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla I. Hidrocarburos aislados de <i>Cliona aprica</i> | 5 |
| Tabla II. Ácidos grasos aislados de <i>Cliona aprica</i> | 6 |
| Tabla III. Ácidos grasos aislados de <i>Cliona tenuis</i> | 9 |
| Tabla IV. Recolectas realizadas de <i>C. californiana</i> en dos playas al sur de la ciudad de Ensenada. | 19 |
| Tabla V. Ensayos para determinación del sistema óptimo para la separación de la fracción E.... | 32 |
| Tabla VI. Extracto utilizado para pruebas de toxicidad con <i>A. salina</i> | 38 |
| Tabla VII. Ésteres metílicos de los ácidos de <i>C. californiana</i> , de 2 fracciones del extracto de Acetato de etilo de la segunda recolecta identificados por Cromatografía de Gases acoplado a un detector de masas. | 43 |
| Tabla VIII. Datos de RMN de la fracción en CD ₃ OD (determinados a 500 y 125 MHz)..... | 56 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Compuestos aislados de <i>Cliona caribboea</i> , <i>Cliona schmidtii</i> y <i>Cliona viridis</i> | 4 |
| Figura 2. Estructura de la celenamida E aislada de la esponja <i>Cliona chilensis</i> | 5 |
| Figura 3. Esteroles 3 β ,5 α ,6 β -trihidroxilados y cetonas esteroideas aislados de <i>Cliona copiosa</i> | 7 |
| Figura 4. Dioles esteroideas aislados de <i>Cliona copiosa</i> | 7 |
| Figura 5. Compuestos aislados de <i>Cliona nigricans</i> y <i>Cliona delitrix</i> | 8 |
| Figura 6. Estructura de la clionapirrolidina, aislada de <i>Cliona tenuis</i> | 8 |
| Figura 7. Compuestos aislados de <i>Cliona patera</i> | 13 |
| Figura 8. Estructuras de las estorniamidas A y B, aisladas de una especie no identificada de <i>Cliona</i> sp. | 13 |
| Figura 9. Estructuras de las estorniamidas D y E, aisladas de una especie no identificada de <i>Cliona</i> sp. | 14 |
| Figura 10. Ácidos tetra- y penta-insaturados; y clionamida aislados de <i>Cliona celata</i> | 14 |
| Figura 11. Clionamidas (A-D), clionaminas (A-D) y acetilhomoagmantina, aisladas de <i>Cliona celata</i> | 15 |
| Figura 12. Localización de las zonas de recolecta de <i>C. californiana</i> . a) Ensenada, Baja California (Tomado de Google Earth); b) La Bufadora, B. C.; c) Campo Kennedy | 18 |
| Figura 13. a) Espécimen de la 3ra colecta de <i>C. californiana</i> , Campo Kennedy, Ensenada, B.C.; b) Arreglo de espículas tiloestiles en <i>C. californiana</i> (Tomado de Carballo <i>et al.</i> , 2004) | 21 |
| Figura 14. Diagrama de flujo general de tratamiento de la primera recolecta, donde CcH representa el extracto crudo, CcHEP, CcHAE y CcHB representan los extractos de éter de petróleo, acetato de etilo y n-butanol respectivamente. | 23 |
| Figura 15. Diagrama de flujo general de tratamiento de la segunda recolecta, donde Cc2H y Cc2S representan el extracto crudo de la segunda colecta a partir de material húmedo y seco respectivamente. Cc2HAE, Cc2HB, y Cc2HAq, representan las fracciones en Acetato de etilo, Butanol, Acuoso a partir de la esponja húmeda, y Cc2SAE, Cc2SB y Cc2SAq los mismos extractos pero a partir de la esponja seca. | 26 |
| Figura 16. Cromatograma de la fracción D analizada por CLAE-EM utilizando el método A. | 30 |
| Figura 17. Cromatogramas de las fracciones D (a), E (b) y F (c) analizadas por CLAE-EM, utilizando el método B. | 31 |
| Figura 18. Cromatogramas de los métodos desarrollados para la determinación del sistema óptimo de separación de la fracción Cc2HResE. | 33 |
| Figura 19. Diagrama de flujo general del tratamiento de la terca recolecta, donde Cc3S representan el extracto crudo de la tercera colecta a partir del material seco. Cc3SD, Cc3SB y Cc3SAq representan las fracciones de Diclorometano, Butanol y residuo acuoso de la esponja seca. | 36 |
| Figura 20. Cromatogramas de CG-EM de la fracción Cc2HAEAcSbc. | 40 |

| | |
|--|----|
| Figura 21. Cromatogramas de CG-EM de la fracción Cc2HAENeuBb..... | 41 |
| Figura 22. Estructura del ácido $\Delta^{5,9}$ -Hexacosadienoico (XXIII), aislado de <i>C. californiana</i> | 45 |
| Figura 23. Espectro de RMN ¹ H de la fracción de esteroides obtenidos de los diferentes extractos poco polares. | 46 |
| Figura 24. Estructuras de los compuesto I y V..... | 47 |
| Figura 25. Expansión del espectro de RMN ¹ H de la fracción de esteroides. | 48 |
| Figura 26. Estructuras de los compuesto IV y VIII..... | 48 |
| Figura 27. Expansión del espectro de RMN ¹ H de la fracción de esteroides. | 49 |
| Figura 28. Expansión del espectro de RMN ¹ H de la fracción de esteroides. | 50 |
| Figura 29. Estructuras de los compuesto II-III, VI-VII..... | 51 |
| Figura 30. Espectro de RMN ¹ H de la mezcla de los compuestos XXIV-XXVII..... | 52 |
| Figura 31. Estructuras de los compuestos XXIV-XXVII..... | 53 |
| Figura 32. Estructuras de los derivados 5 α ,8 α -Epidioxi de los esteroides. | 54 |
| Figura 33. Espectro de RMN ¹³ C del 3-metil-uracilo determinado a 100 MHz en CDCl ₃ | 55 |
| Figura 34. Espectro de RMN ¹ H de la sulcatina determinado a 500 MHz en CD ₃ OD. | 57 |
| Figura 35. Estructura del compuesto XLIII..... | 58 |
| Figura 36. Estructura del compuesto XLIV. | 59 |
| Figura 37. Expansión del espectro de RMN ¹ H del ácido benzoico (XLVI), determinado a 300 MHz en CD ₃ OD..... | 60 |
| Figura 38. Expansión del espectro de RMN ¹ H de la fracción L. | 61 |
| Figura 39. Estructura de compuesto XLV..... | 61 |

ABREVIATURAS, FÓRMULAS Y ACRÓNIMOS

| | |
|-------------------------|---|
| δ | Desplazamiento químico |
| λ | Longitud de Onda |
| Δ | Doble Enlace |
| AcOEt | Acetato de Etilo |
| AgNO₃ | Nitrato de Plata |
| BuOH | <i>n</i> -Butanol |
| CC | Cromatografía en Columna |
| CCF | Cromatografía en Capa Fina |
| CDCl₃ | Cloroformo Deuterado |
| CD₃OD | Metanol Deuterado |
| CG-EM | Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas |
| CLAE | Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia |
| CL-EM | Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas |
| COSY | Correlated Spectroscopy |
| CuCl₂ | Cloruro cúprico |
| DCM | Diclorometano |
| d | Señal Doble |
| da | Señal Doble ancha |
| D₂O | Agua Deuterada |
| DEPT | Distortionless Enhancement by Polarization Transfer |
| EM-IE | Espectrometría de Masas por Impacto Electrónico |
| EM-IQ | Espectrometría de Masas por Ionización Química |
| EP | Éter de Petróleo |
| H₂O | Agua |
| HCl | Ácido Clorhídrico |
| HMBC | Heteronuclear Multiple Bond Correlation Spectroscopy |
| HSQC | Heteronuclear Single Quantum Coherence |
| Hz | Hertz |
| ICMyL | Instituto de Ciencias del Mar y Limnología |
| IR | Infrarrojo |
| <i>J</i> | Constante de Acoplamiento |
| LC₅₀ | Concentración media letal |
| m | Señal Múltiple |
| MeOH | Metanol |

| | |
|-------------------------------------|---|
| MHz | Mega Hertz |
| NaCl | Cloruro de Sodio |
| Na₂CO₃ | Carbonato de Sodio |
| NaOH | Hidróxido de Sodio |
| Na₂SO₄ | Sulfato de Sodio |
| p. f. | Punto de Fusión |
| ppm | Partes por Millón |
| RMN¹H | Resonancia Magnética Nuclear Protónica |
| RMN¹³C | Resonancia Magnética Nuclear de Carbon-13 |
| s | Señal Simple |
| ta | Señal triple ancha |
| TMS | Tretametil silano |
| TOCSY | Total Correlation Spectroscopy |
| TR | Tiempo de Retención |
| UNAM | Universidad Nacional Autónoma de México |

RESUMEN

Nuestro interés en el estudio de organismos marinos, con miras a la obtención de nuevos metabolitos secundarios, condujo al aislamiento y la identificación de los compuestos mayoritarios de la esponja *Cliona californiana*. Se realizaron tres recolectas de la esponja por buceo autónomo en dos localidades ubicadas al sur de la ciudad de Ensenada, B. C. Se prepararon extractos primarios usando metanol-diclorometano (7:3), de donde se obtuvieron mediante un proceso de partición líquido/líquido extractos de éter de petróleo, acetato de etilo, *n*-butanol y residuos acuosos. Los extractos se analizaron utilizando técnicas cromatográficas convencionales, obteniéndose una mezcla de 4 esteroides (colesterol, dehidrocolesterol, brassicasterol y 24-metilenocolesterol), identificados como sus derivados acetilados; la mezcla de los derivados 7-oxo- y 5,8-epidioxi- de los esteroides; 23 ésteres metílicos de ácidos grasos, un ácido graso, el 3-metil-uracilo, 2 nucleósidos (uridina y adenosina), sulcatina, ácido benzoico y su respectiva sal de sodio. La mayoría de los compuestos aislados de los extractos menos polares de *C. californiana* coinciden con estudios anteriores de otras especies del género. Sin embargo se registran por primera vez en el género el 3-metil-uracilo, el 7-oxo-24-metilenocolesterol, la mezcla de derivados 5 α ,8 α -epidioxi de los esteroides, uridina, adenosina, sulcatina, ácido benzoico y su sal de sodio. También se realizaron pruebas de toxicidad con *Artemia salina*, sin embargo los extractos y fracciones probadas no mostraron tener algún efecto sobre ésta.

INTRODUCCIÓN

1) *Generalidades*

Una gran variedad de invertebrados marinos sésiles viven en sustratos bentónicos en océanos templados y tropicales. Ciertos grupos de estos invertebrados, incluyen a esponjas, celenterados (cnidarios), briozoarios y ascidias. Muchos de estos organismos, sin embargo, son de cuerpos blandos y relativamente vulnerables ante depredadores, por lo que las defensas especialmente químicas pueden ser muy importantes para ellos (Paul, 1992).

Miles de metabolitos secundarios han sido aislados de invertebrados marinos como esponjas, corales blandos, gorgonias, zoantidos, briozoarios y ascidias. El predominio de estos metabolitos en invertebrados sésiles que habitan en áreas de intensa presión por depredación y que no aparentan defensas morfológicas, sugiere una función defensiva de estos compuestos químicos. Existen evidencias que sostienen que una función de los metabolitos secundarios en invertebrados marinos es de defensa. Se han realizado estudios sobre la función de estos metabolitos secundarios de invertebrados contra organismos depredadores, colonizadores, competidores y contaminantes. Muchos de estos metabolitos secundarios han mostrado ser citotóxicos, antimicrobianos o muestran otras actividades biológicas diferentes en ensayos de laboratorio (Paul, 1992).

El papel de los metabolitos secundarios de esponjas como agentes disuasivos de la ingesta es aún menos estudiado, en comparación con otros organismos. Algunos estudios indican que extractos de esponjas de aguas tropicales, templadas y antárticas tienen actividad antimicrobiana e ictiotóxica; sin embargo, solamente pocos estudios han demostrado que estos extractos tengan un papel disuasivo de la alimentación. En algunos casos, las mezclas naturales de metabolitos son más efectivas que un metabolito puro cuando es probado en las mismas concentraciones (Paul, 1992).

2) *Antecedentes*

Las esponjas son los organismos multicelulares más primitivos, que datan desde la era precámbrica, y que han adquirido apariencias muy diferentes entre sí, producto de la presión ecológica del medio en que viven. Son organismos sésiles que se alimentan por filtración, en ellas las corrientes de agua generadas son esenciales en su alimentación, excreción de desechos, respiración y en algunos casos su reproducción. Pueden ser encontradas en la mayoría de los ambientes acuáticos, donde haya un sustrato para que estas se adhieran y desarrollen. El papel ecológico de los metabolitos secundarios producidos por esponjas incluyen funciones como antidepredatorios, antibióticos, antiadherentes y como agentes fotoprotectores (Harper *et al.*, 2001).

Estos organismos constituyen uno de los grupos más importantes en las comunidades bentónicas litorales, en donde diversos factores abióticos controlan parte de su dinámica (Reid, 1968; Vacelet, 1988; en Camacho-Cruz, 2007), densidad, crecimiento y formación del esqueleto (Hentshel, 1929; Hartman, 1958; Bergquist y Sinclair, 1973; Bavastrello *et al.*, 1993; en Camacho-Cruz, 2007). Estas esponjas desempeñan funciones importantes en los ecosistemas bentónicos marinos al ser filtradores eficientes, al intervenir en los procesos de bioerosión del material calcáreo, y actuar como hospederos para un gran número de organismos invertebrados (Diaz *et al.*, 1985; en Camacho-Cruz, 2007). Por su estrecha relación con el medio que las rodea también se conoce su uso como indicadores de estrés en ecosistemas marinos (Carballo *et al.*, 1994, 1996; Carballo y Naranjo, 2002; en Camacho-Cruz, 2007).

Entre los principales factores ambientales que determinan la distribución y abundancia de las esponjas se citan el movimiento del agua, la sedimentación y la radiación (Scalera *et al.*, 1976; Wilkinson, 1978; Alcolado, 1979; Frost *et al.*, 1982; Carballo *et al.*, 1996; Carballo, 2006; en Camacho-Cruz, 2007) y el hábitat (Carballo y Nava, 2007; en Camacho-Cruz, 2007).

En contraste, con las ascidias y briozoarios, la depredación en esponjas se halla restringida a un grupo especializado de consumidores, como tortugas, algunos peces y moluscos. El éxito ecológico de las esponjas se debe a la presencia de metabolitos secundarios bioactivos que representan a la mayoría de clases de compuestos los cuales han sido utilizados como base para algunos estudios químicos y farmacológicos. Tanto ensayos de laboratorio como de campo han demostrado la potencia de los extractos de esponjas y de compuestos puros que impiden que la

esponja sea consumida por su depredador. Los metabolitos secundarios de esponjas pueden jugar una función importante influenciando los asentamientos y desarrollos larvarios de invertebrados marinos (Garson, 2001).

En las esponjas, los metabolitos secundarios aparecen en respuesta a la presión ecológica del medio, entre los cuales se encuentran: terpenos, policétidos o alcaloides que han sido implicados en interacciones entre esponjas y corales, entre otros (Garson, 2001).

La clase Demospongiae abarca la mayoría de las esponjas vivientes que mayor atención ha recibido de químicos y bioquímicos. Hasta el 2001 se habían reportado 2578 metabolitos provenientes de esta clase de esponjas (Harper *et al.*, 2001); lo que ha conducido al descubrimiento de nuevas moléculas, la mayoría con características estructurales únicas, algunas similares a fuentes terrestres (Schmitz, 1978). En estos organismos, los terpenos representan los metabolitos no esteroideos más abundantes (por ejemplo, pallescensina-1, axisonitrilo-1, anhidrofurospongina-1, escalarina, ircinina-1); estos contienen múltiples unidades de grupos prenilo y anillos de furano. Con respecto a los esteroides, estos se distinguen de los aislados de fuentes terrestres por tres características únicas: a) los patrones de bioalquilación en la cadena lateral; b) la existencia de anillos de tres miembros en la cadena lateral; c) las variaciones del núcleo en el anillo A (Bakus *et al.*, 1986).

Dentro de esta clase podemos encontrar a la familia Clionidae, de la cual se ha reportado el mayor número de metabolitos aislados, principalmente del género *Cliona* (Harper *et al.*, 2001). Este género cuenta con 78 especies descritas, de las cuales existen estudios referentes a 26 de ellas desde 1909 hasta la fecha, estos estudios abarcan líneas de investigación referentes a: actividad biológica, alelopatía, bioindicadores de contaminación marina, biología molecular, biología marina, bioquímica, química inorgánica, síntesis de compuestos y análisis químicos.

En el área de química de productos naturales marinos, se han reportado estudios referentes al aislamiento de metabolitos secundarios de 14 especies del género *Cliona*. Así, de *C. caribboea* se ha reportado el 24-etilcolesta-5,22-dien-3 β -ol (**1**) (Bergmann *et al.*, 1950), la 3-*O*-acetilgiberelina A₃ (**2**) (Hossain *et al.*, 1988), un sesquiterpeno conocido como plumericina (**3**) (Martin *et al.*, 1989) y dos indenocarbazatos: caribbazoina A (**4**) y caribbazoina B (**5**) (Lemke *et al.*, 1990). Con respecto a *C. schmidtii*, solo se ha reportado el aislamiento de algunos pigmentos autooxidables y algunos que son estables en solución clorofórmica (Norton, 1971; Christomanos y Norton, 1974); mientras que para *C. viridis*, se han reportado 9 esteroides: 24-norcolesta-5,22-

dien-3 β -ol (**6**), colest-5,22-dien-3 β -ol (**7**), colesterol (**8**), 24-metilcolest-5,22-dien-3 β -ol (**9**), 24-metilcolest-5,24(28)-dien-3 β -ol (**10**), 24-metilcolest-5-en-3 β -ol (**11**), 24-etilcolest-5,22-dien-3 β -ol (**1**), 24-etilcolest-5,24(28)-dien-3 β -ol (**12**) y clionasterol (**13**) (Sica *et al.*, 1978).

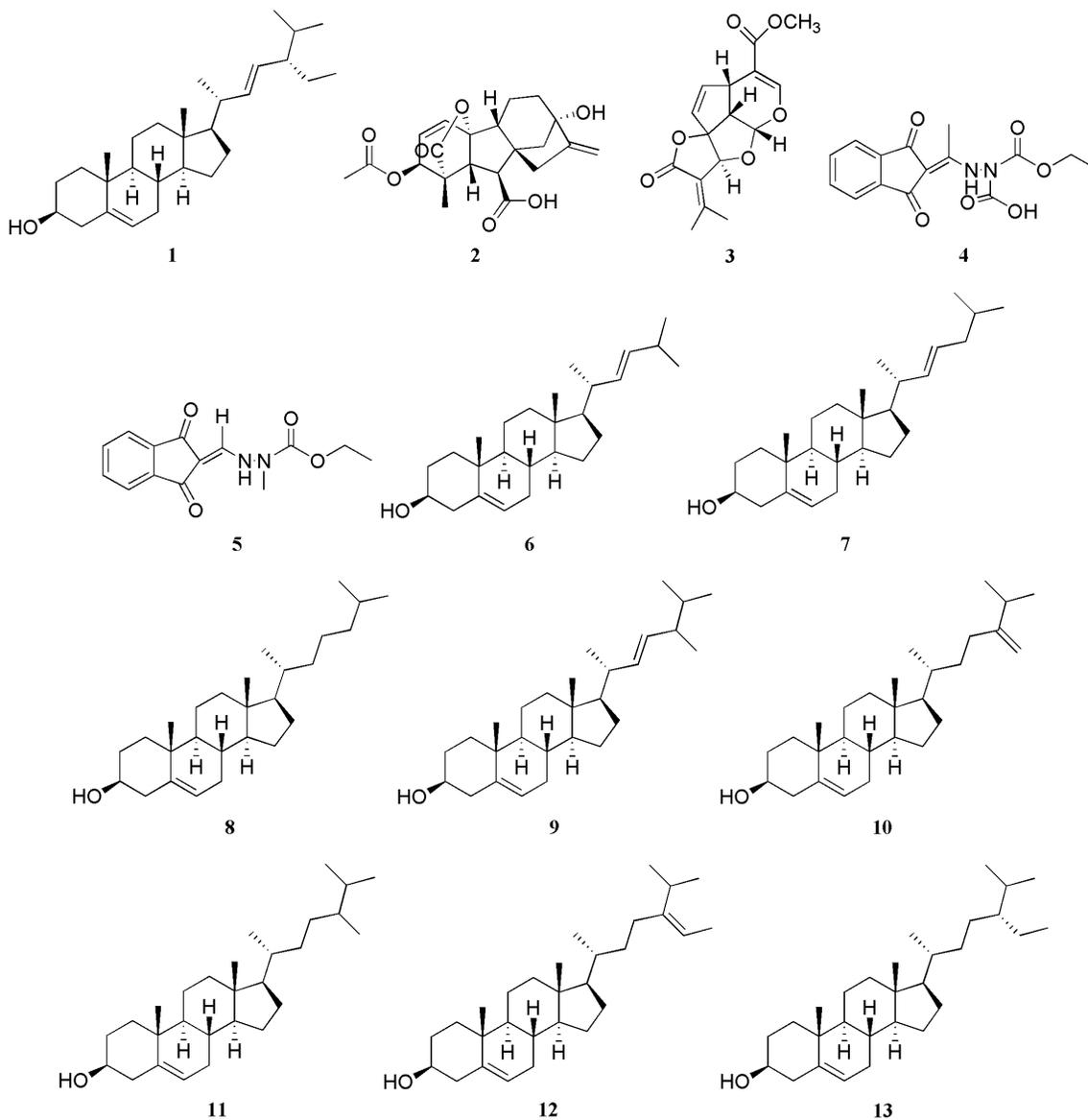


Figura 1. Compuestos aislados de *Cliona caribboea*, *Cliona schmidtii* y *Cliona viridis*.

De *C. chilensis*, también se han aislado esteroides, de los cuales el colesterol (**8**) fue el compuesto mayoritario, 9 de ellos contienen una insaturación en la cadena lateral (Rovirosa *et al.*, 1984), además de un tripéptido llamado celenamida E (**14**) (Palermo *et al.*, 1998).

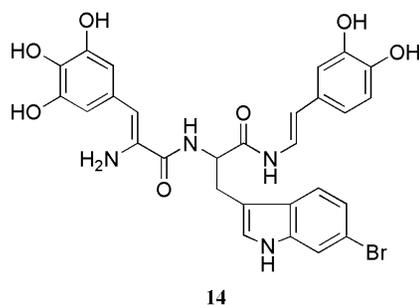


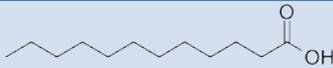
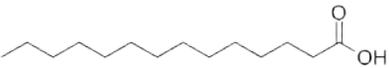
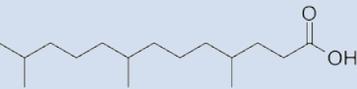
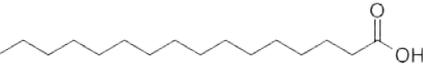
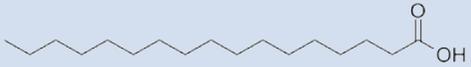
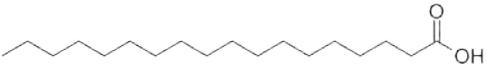
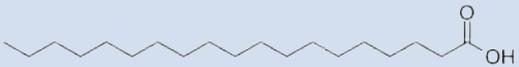
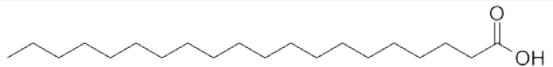
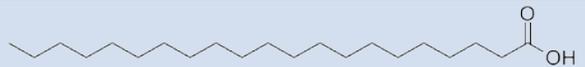
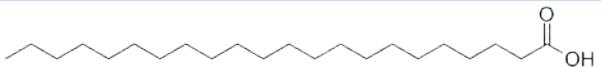
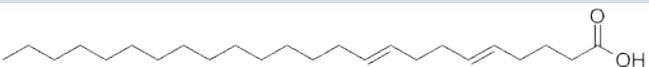
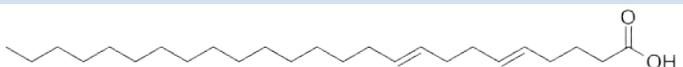
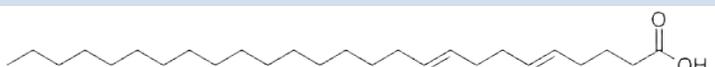
Figura 2. Estructura de la celenamida E aislada de la esponja *Cliona chilensis*.

De *C. aprica* se han aislado 9 hidrocarburos (**15-23**) (Tabla I), de los cuales los componentes mayoritarios fueron **18, 19** y **21** (Carballeira *et al.*, 1988); 7 esteroides (**1, 7-11, 13**) y 17 ácidos grasos (**24-40**) (Tabla II) (Carballeira *et al.*, 1989).

Tabla I. Hidrocarburos aislados de *Cliona aprica*

| No. | Hidrocarburo | Estructura |
|-----|--------------|------------|
| 15 | Undecano | |
| 16 | Dodecano | |
| 17 | Tridecano | |
| 18 | Tetradecano | |
| 19 | Pentadecano | |
| 20 | Heptadecano | |
| 21 | Henicosano | |
| 22 | Tetracosano | |
| 23 | Pentacosano | |

Tabla II. Ácidos grasos aislados de *Cliona aprica*.

| No. | Ácido graso | Estructura |
|-----|-----------------------------|--|
| 24 | Dodecanoico |  |
| 25 | Tetradecanoico |  |
| 26 | 4,8,12-trimetiltridecanoico |  |
| 27 | Hexadecanoico |  |
| 28 | Heptadecanoico |  |
| 29 | Octadecanoico |  |
| 30 | Nonadecanoico |  |
| 31 | Eicosanoico |  |
| 32 | Heneicosanoico |  |
| 33 | Docosanoico |  |
| 34 | Tricosanoico |  |
| 35 | 5,9-Tetracosadienoico |  |
| 36 | Tetracosanoico |  |
| 37 | 5,9-Pentacosadienoico |  |
| 38 | Pentacosanoico |  |
| 39 | 5,9-Hexacosadienoico |  |
| 40 | Heptacosanoico |  |

Una serie de esteroides $3\beta,5\alpha,6\beta$ -trihidroxilados (**41-46**), cetonas esteroidales (**47-53**) y dioles (**54-63**) fueron aislados de *C. copiosa*, recolectada en Italia (Notaro *et al.*, 1991; 1992); mientras que de *C. vastifica* se aisló una nueva proteína dimérica (mapacalcina) que tiene una masa molecular de 19,063 Da; compuesta de dos cadenas homologas, cada una conteniendo nueve cisteínas y nueve puentes disulfuro (Morel *et al.*, 1997).

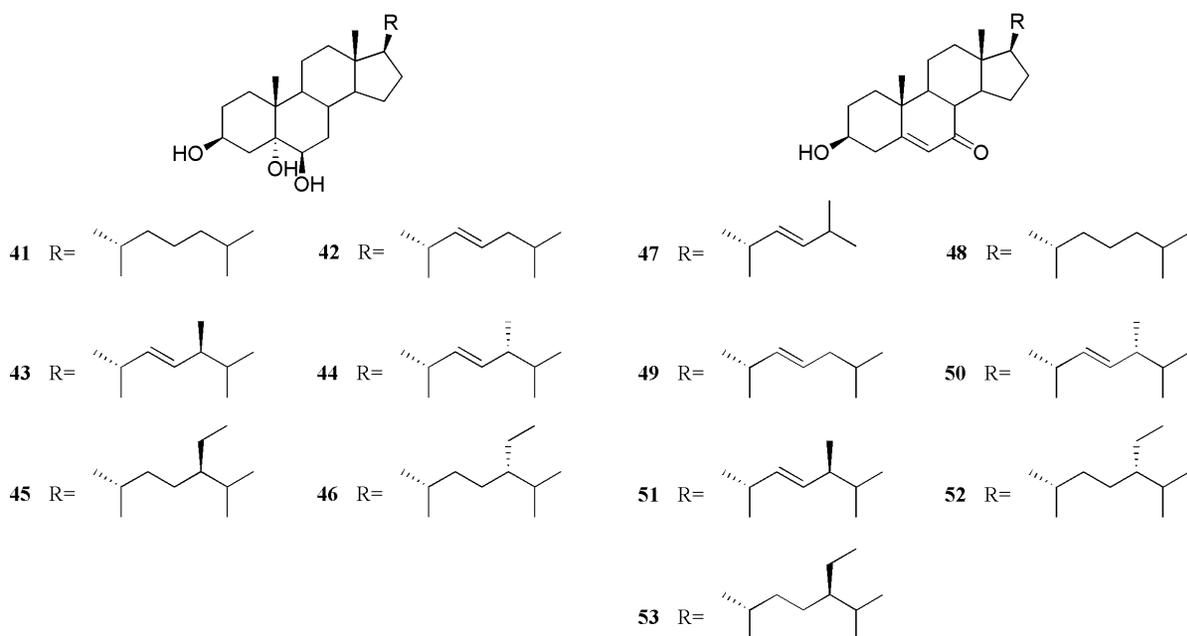


Figura 3. Esteroides $3\beta,5\alpha,6\beta$ -trihidroxilados y cetonas esteroidales aislados de *Cliona copiosa*.

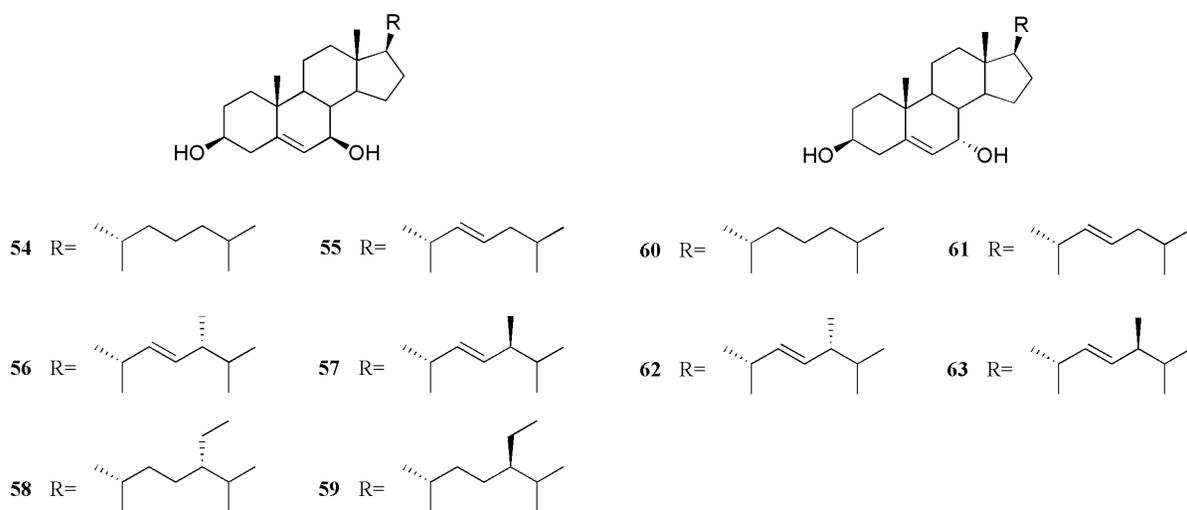


Figura 4. Dioles esteroidales aislados de *Cliona copiosa*.

De *C. nigricans* se aislaron dos androstanos policlorinados: clionastatina A (**64**) y clionastatina B (**65**), los cuales fueron activos contra tres líneas de células tumorales (Fattoruso *et al.*, 2004). Los extractos metanólicos de *C. delitrix*, del golfo de Santos, Brasil, mostraron actividad antimitótica en contra líneas de células tumorales MCF-7; de esta especie se aisló la serotonina (**66**) como compuesto mayoritario en el extracto crudo (Granato *et al.*, 2005). De *C. varians*, se identificaron por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, 17 ácidos grasos y 11 esteroides (Santafe *et al.*, 2005) y mediante fraccionamiento cromatográfico una lectina (CvL) que mostró efecto citotóxico contra bacterias Gram positivas, protozoos patógenos y un efecto pro-inflamatorio en ratones (Moura *et al.*, 2006; Queiroz *et al.*, 2008).

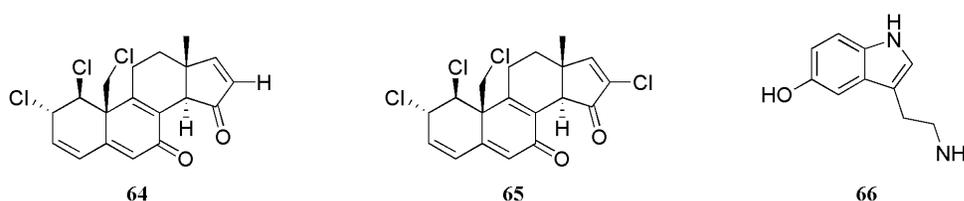


Figura 5. Compuestos aislados de *Cliona nigricans* y *Cliona delitrix*.

Recientemente, se ha reportado el aislamiento y síntesis de la clionapirrolidina A (**67**), obtenida a partir de la fracción acuosa de *C. tenuis*. Este es el primer reporte de un compuesto producido por esponjas, que causa la muerte del tejido del coral en contacto directo (Castellanos *et al.*, 2006; Chaves-Fonnegra *et al.*, 2008); también se ha estudiado la fracción lipídica, la cual presentó propiedades antiincrustantes (*antifouling*) en pruebas de campo y que permitió identificar 81 ácidos grasos diferentes (**24-39**, **68-134**) (Ver tablas II y III), de los cuales no habían sido previamente reportados: los ácidos 4,8-hexadecadienoico (**74**), 11-metil-4,10-octadecadienoico (**92**), 6,9,12,14-icosatetraenoico (**97**) y 6,9,12,14,17-icosapentanoico (**98**) (Castellanos y Duque, 2008). Los 81 ácidos grasos fueron aislados como ésteres metílicos de ácidos grasos, glicéridos, glicolípidos, fosfolípidos y ácidos grasos libres.

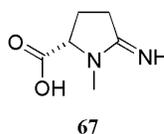
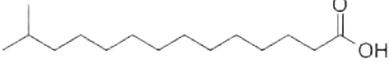
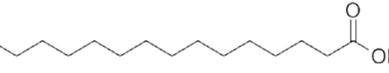
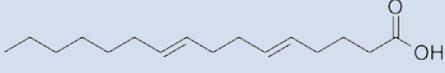
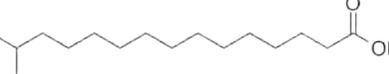
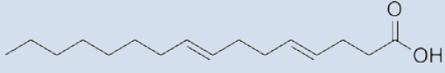
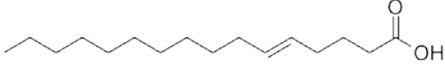
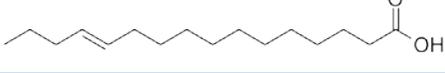
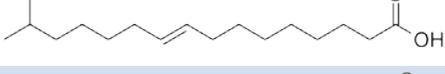
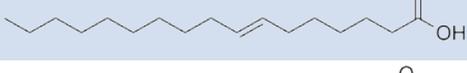
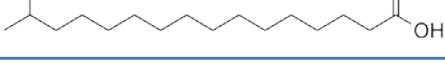


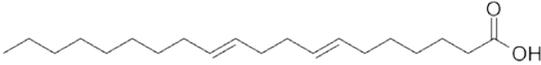
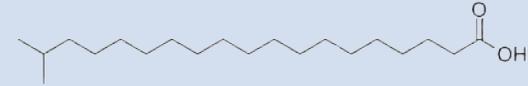
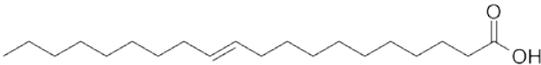
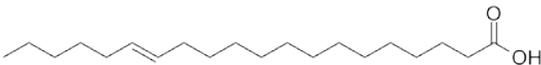
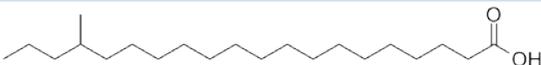
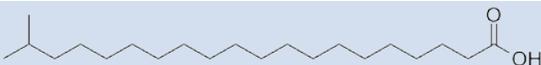
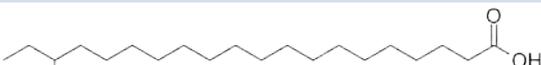
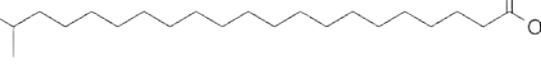
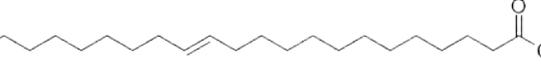
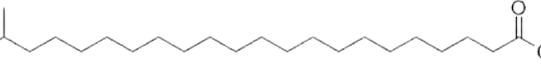
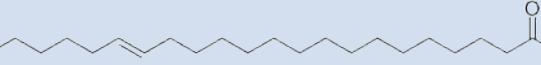
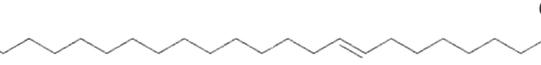
Figura 6. Estructura de la clionapirrolidina, aislada de *Cliona tenuis*.

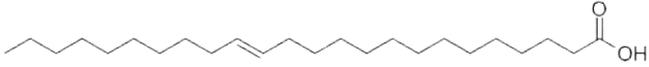
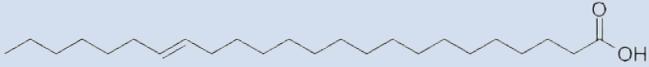
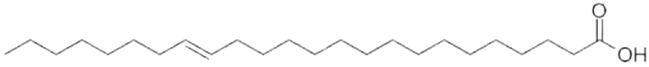
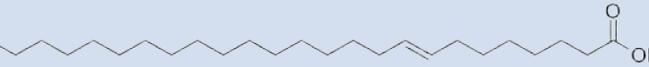
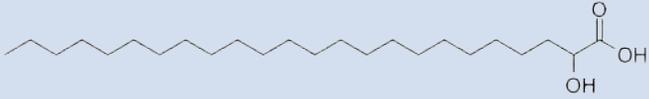
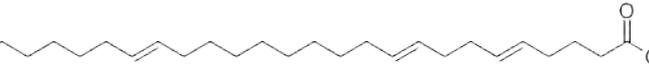
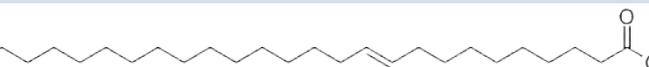
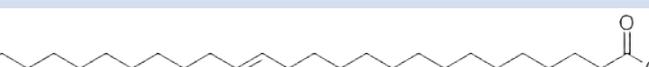
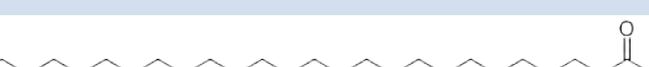
De *C. patera* (Sawangwong *et al.*, 2008) se han reportado clionasterol (**13**), 3 éteres de glicerol (**135-137 Ver estructuras**), el ácido *p*-hidroxibenzoico (**138**), *ciclo*-(L-Pro-L-Tyr) (**139**), 3-metilmaleimida-5-oxima (**140**), maleimida-5-oxima (**141**), tetillapirona (**42**) y nortetillapirona (**143**).

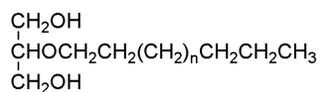
Tabla III. Ácidos grasos aislados de *Cliona tenuis*.

| No. | Ácido graso | Estructura |
|-----|--------------------------|--|
| 68 | 9-Tetradecenoico |  |
| 69 | 13-Metiltetradecanoico |  |
| 70 | 12-Metiltetradecanoico |  |
| 71 | Pentadecanoico |  |
| 72 | 5,9-Hexadecadienoico |  |
| 73 | 14-Metilpentadecanoico |  |
| 74 | 4,8-Hexadecadienoico |  |
| 75 | 5-Hexadecenoico |  |
| 76 | 9-Hexadecenoico |  |
| 77 | 12-Hexadecenoico |  |
| 78 | 11-Hexadecenoico |  |
| 79 | 15-Metil-9-hexadecenoico |  |
| 80 | 7-Heptadecenoico |  |
| 81 | 15-Metilhexadecanoico |  |

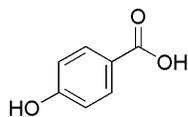
| | | |
|-----|-------------------------------------|--|
| 82 | 14-Metilhexadecanoico | |
| 83 | 10-Heptadecenoico | |
| 84 | 9-Heptadecenoico | |
| 85 | 5,9,12-Octadecatrienoico | |
| 86 | 5,9-Octadecadienoico | |
| 87 | 16-Metilheptadecenoico | |
| 88 | 9,12-Octadecadienoico | |
| 89 | 9-Octadecenoico | |
| 90 | 11-Octadecenoico | |
| 91 | 11-Metiloctadecanoico | |
| 92 | 11-Metil-4,10-octadecadienoico | |
| 93 | 17-Metiloctadecanoico | |
| 94 | 11-Nonadecenoico | |
| 95 | 5,8,11,14-Icosatetraenoico | |
| 96 | Icosapentaenoico no identificado | |
| 97 | 6,9,12,14-Icosatetraenoico | |
| 98 | 6,9,12,14,17-Icosapentaenoico | |
| 99 | 8,11,14-Icosatrienoico | |
| 100 | 8,11,13,15-Icosatetraenoico | |

| | | |
|-----|------------------------|--|
| 101 | 7,11-Icosadienoico |  |
| 102 | 18-Metilnonadecanoico |  |
| 103 | 11-Icosenoico |  |
| 104 | 13-Icosenoico |  |
| 105 | 14-Icosenoico |  |
| 106 | Icosanoico |  |
| 107 | 17-Metilicosanoico |  |
| 108 | 19-Metilicosanoico |  |
| 109 | 18-Metilicosanoico |  |
| 110 | 18-Metilheneicosanoico |  |
| 111 | 20-Metilheneicosanoico |  |
| 112 | 14-Docosenoico |  |
| 113 | 13-Docosenoico |  |
| 114 | 15-Docosenoico |  |
| 115 | 21-Metildocosanoico |  |
| 116 | 16-Tricosenoico |  |
| 117 | 8-Tetracosenoico |  |
| 118 | 15-Tetracosenoico |  |

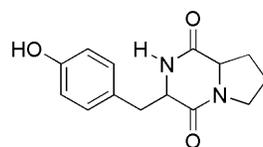
| | | |
|-----|--|--|
| 119 | 14-Tetracosenoico |  |
| 120 | 17-Tetracosenoico |  |
| 121 | 16-Tetracosenoico |  |
| 122 | 8-Pentacosenoico |  |
| 123 | Acido de 26 átomos de carbono no identificado | |
| 124 | 2-Hidroxitetraacosanoico |  |
| 125 | 5,9,19-Hexacosatrienoico |  |
| 126 | 8-Hexacosenoico |  |
| 127 | 10-Hexacosenoico |  |
| 128 | 17-Hexacosenoico |  |
| 129 | 15-Hexacosenoico |  |
| 130 | 19-Hexacosenoico |  |
| 131 | Hexacosanoico |  |
| 132 | 5,9-Heptacosadienoico |  |
| 133 | Octacosanoico |  |
| 134 | Triacotanoico |  |



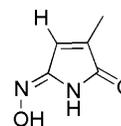
135 n= 11
136 n= 12
137 n= 13



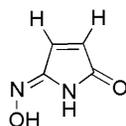
138



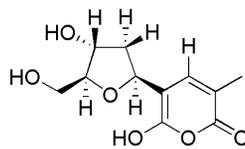
139



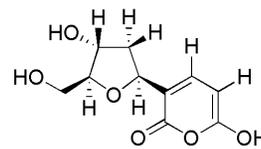
140



141



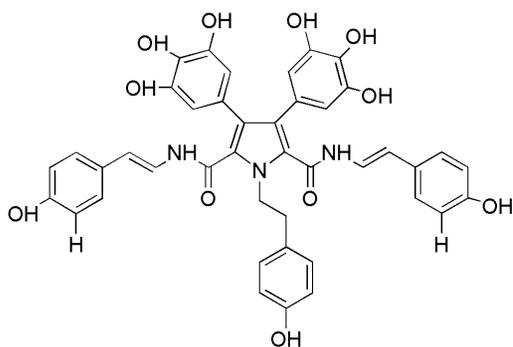
142



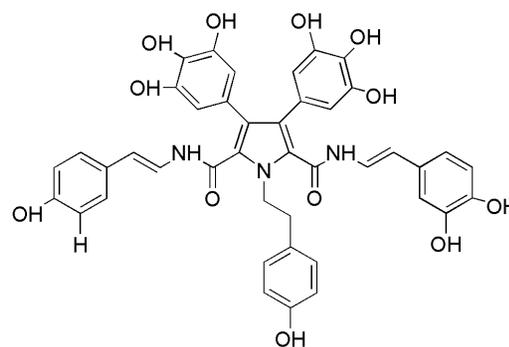
143

Figura 7. Compuestos aislados de *Cliona patera*.

De una especie no identificada *Cliona* sp., se identificaron 4 péptidos (estorniamidas A-D) (144-147), los cuales mostraron actividad contra bacterias Gram positivas (Palermo *et al.*, 1996); también, se ha encontrado que los extractos acuosos de la especie recolectada en las costas de Brasil, poseen actividad anti-herpética (Cordeiro da Silva *et al.*, 2006), y antibacteriana en contra de *Mycobacterium tuberculosis* y contra bacterias resistentes a antibióticos (Selegim *et al.*, 2007).



144



145

Figura 8. Estructuras de estorniamidas A y B, aisladas de una especie no identificada de *Cliona* sp.

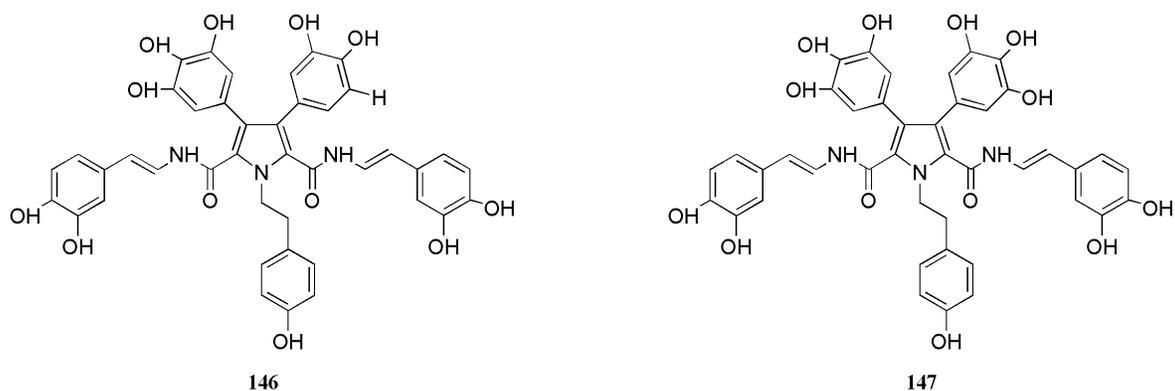


Figura 9. Estructuras de estorniamidas D y E, aisladas de una especie no identificada de *Cliona* sp.

De estas 14 especies, la que mayor atención ha recibido es *C. celata*, la cual ha sido estudiada desde 1941. De esta se han aislado siete esteroides: **8**, **13** (Valentine y Bergmann, 1941), **6-11** (Erdman y Thomson, 1978), mientras que Litchfield y colaboradores (1979) reportaron la presencia de los ácidos 15,18,21,24-triacontatetraenoico (**148**) y 15,18,21,24,27-triacontapentaenoico (**149**). Por otra parte investigadores canadienses, han estudiado los constituyentes nitrogenados de este organismo, revelando la presencia de: clionamida (**150**) (Andersen, 1978; Andersen y Stonard, 1979), celenamidas (A-D) (**150-154**) (Stonard y Andersen, 1980 *a, b*), clionaminas (A-D) (**155-158**) (Keyzers *et al.*, 2008). Lenis y colaboradores (1996) aislaron de las fracciones más polares del extracto metanólico la acetilhomogmatina (**159**) que fue sintetizada 10 años después por Castellanos y colaboradores (2006).

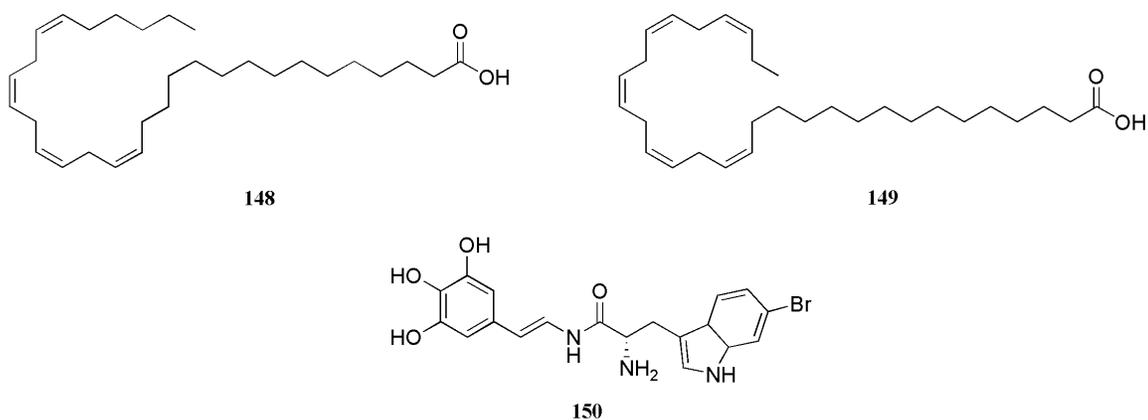


Figura 10. Ácido tetra- y penta-insaturado; y clionamida aislados de *Cliona celata*.

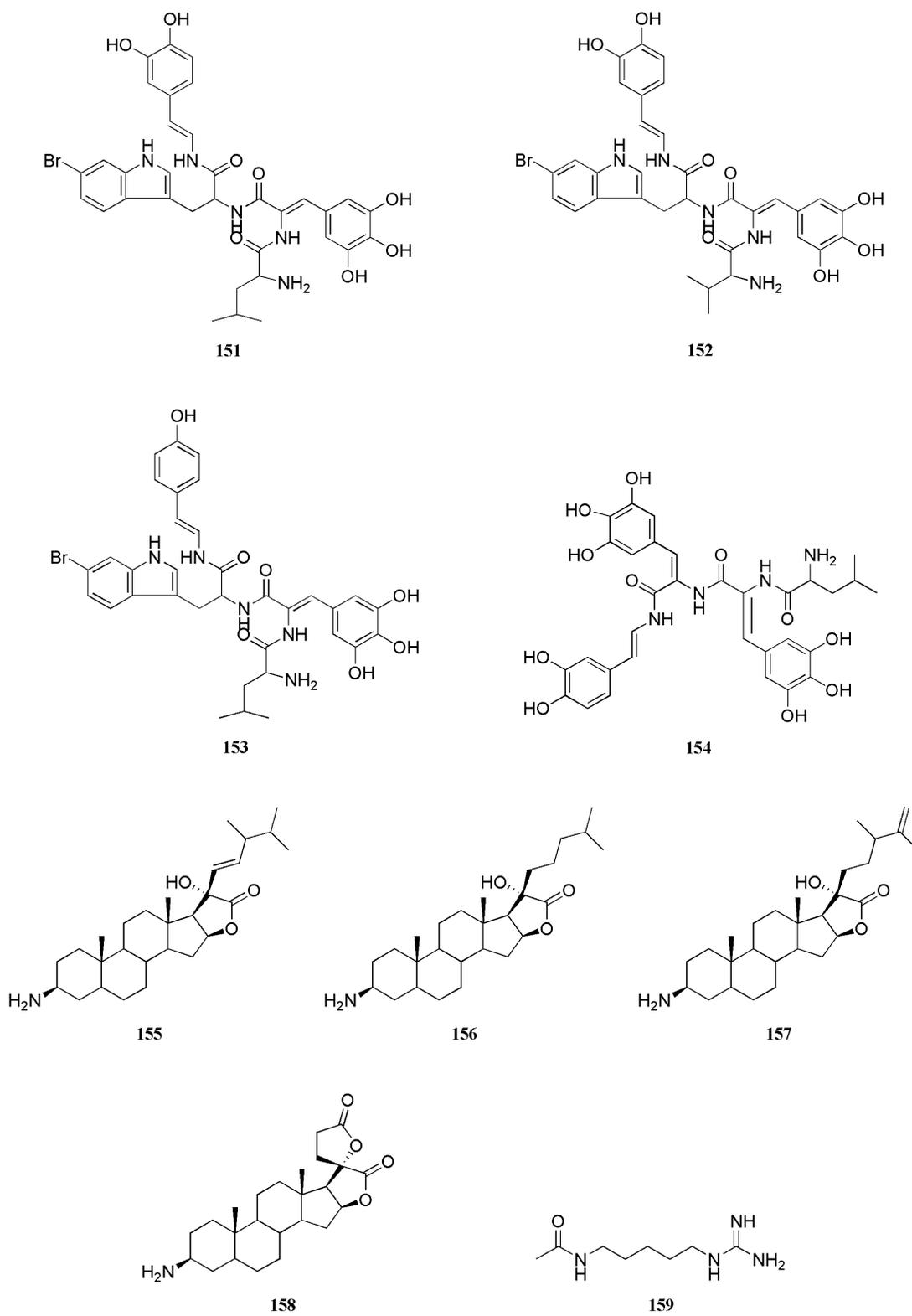


Figura 11. Clionamidas (A-D), clionaminas (A-D) y acetilhomogmantina, aislados de *Cliona celata*.

Se ha investigado la actividad antioxidante de la enzima dismutasa superoxidasa *C. celata* (Marques *et al.*, 2008), desde que se reportó que esta enzima podría ser un eficiente biomarcador de contaminación marina en otros invertebrados marinos (Marques *et al.*, 2006). Es bien conocido que esta enzima es parte del primer nivel de respuesta en contra del estrés oxidativo; esto es muy importante para determinar el intervalo de valores “normales” en estos organismos colectados en algunas localidades, en diferentes ocasiones y periodos. Los intervalos normales pueden ser determinados basándose en datos de lugares no contaminados (Marques *et al.*, 2008).

HIPÓTESIS

Cliona californiana, biosintetiza compuestos estructuralmente similares a los aislados de otras especies del mismo género, los cuales podrían ser biológicamente activos.

OBJETIVOS

Aislar e identificar estructuralmente los componentes químicos más conspicuos presentes en la esponja *C. californiana* (De Laubenfels, 1932).

Evaluar la toxicidad frente a *Artemia salina* de los compuestos aislados de *C. californiana*.

METODOLOGÍA

1) Localización del área de recolecta

La recolecta del material biológico (*Cliona californiana*) se realizó al sur de la ciudad de Ensenada, B. C. (Fig. 12a) en dos localidades conocidas como “La Bufadora” (Fig. 12b) y “Campo Kennedy” (Fig. 12c), en la Bahía de Todos Santos, la cual se ubica a 60 millas náuticas al sur de la frontera México-Estados Unidos, sobre la costa oeste de la península de Baja California.



Figura 12. Localización de las zonas de recolecta de *C. californiana*. a) Ensenada, Baja California (Tomado de Google Earth); b) La Bufadora, B. C.; c) Campo Kennedy

2) *Recolección e identificación de Cliona californiana.*

Para el desarrollo de este trabajo, se llevaron a cabo tres recolectas del material porífero (*C. californiana*); las dos primeras se llevaron a cabo en la Bufadora y la última en Campo Kennedy (Tabla IV).

Tabla IV. Recolectas realizadas de *C. californiana* en dos playas al sur de la ciudad de Ensenada.

| RECOLECTA | FECHA | PESO HUMEDO TOTAL (Kg) |
|-----------|---------------------|---------------------------|
| 1 | Julio del 2005 | 1.01 |
| 2 | Agosto del 2006 | 2.8 |
| 3 | Septiembre del 2008 | 2.9 |

El material fue recolectado por buceo autónomo, con la colaboración de los M. C. Francisco Becerril Bobadilla y Daniel Badillo Zapata; los oceanólogos Disraely González Acevedo, Arturo Santiago Andrade y Miguel Angel Lozano Hugenin. Para la obtención del material porífero, los ejemplares fueron “podados”; es decir, se cortaron pedazos o fragmentos del organismo sin extraerlo totalmente. Una vez fuera del agua, el material se limpió con agua de mar de manera manual para eliminar organismos y material sedimentario adherido a la esponja, para posteriormente colocarlos en bolsas de plástico previamente etiquetadas y colocadas en un hielera para su congelación hasta su procesamiento en el laboratorio 2-6 del Instituto de Química (IQ) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) en la ciudad de México.

Una porción de aproximadamente 5 cm³ de la esponja de cada recolecta, fue fijada en una solución de etanol al 90% en un frasco de vidrio, destinados para la confirmación taxonómica de la especie y su depósito en el laboratorio 021 del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología (ICMyL), UNAM quedando registrados con número de catálogo 0793 dentro de la colección Nacional del Phylum Porifera “Gerardo Green” (CNPGG). La identificación de la especie se realizó siguiendo el método ya establecido (Green y Gómez, 1984 y Vázquez-Maldonado, 1994) y fue confirmada por la bióloga Patricia Gómez López, responsable del laboratorio.

De acuerdo con De Laubenfels en 1932 la esponja estudiada (Etiquetada como Cc) se clasificó de la siguiente manera:

Reino: Animalia
Phylum: Porifera
Clase: Demospongiae
Orden: Hadromerida
Familia: Clionidae
Género: Cliona
Especie: *C. californiana*

3) *Distribución y descripción de la especie*

C. californiana (Fig. 13a) se ha identificado con los sinónimos *Cliona celata* var. *californiana* y *Pseudosuberites pseudos*; se distribuye en el Mar de Cortés y en las costas de California, E. U. A., Baja California, Sonora, Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Guerrero y el Golfo de Tehuantepec en Oaxaca. Esta es de las esponjas más característica del norte del Mar de Cortés tanto en abundancia como en tamaño. Es una esponja masiva semi-ovalada de 14-20 cm de diámetro, consistencia firme y ligeramente compresible, la coloración fuera del agua es café oscuro por fuera y amarillo ocre por dentro. Su superficie es lisa con numerosas papilas que la hacen ver irregular y tuberculada al extraerse del agua. Con el preservado se hunden y se delimitan más las papilas que se abren en orificios grandes y pequeños que corresponden a los ósculos (papilas exhalantes) y en ostias o papilas inhalantes. El ectosoma es una empalizada de espículas tiloestiles ligeramente curvadas, con tilo redondo a ovalado y con mucron, miden 189-325 × 7.5-13 μm, con las puntas hacia el exterior y el coanosoma es un conglomerado de espículas sin dirección (Fig. 13b) (Carballo *et al.*, 2004).



Figura 13. a) Espécimen de la 3ra colecta de *C. californiana*, Campo Kennedy, Ensenada, B.C.; b) Arreglo de espículas tiloestiles en *C. californiana* (Tomado de Carballo *et al.*, 2004)

4) *Obtención de metabolitos de la esponja*

a) **Material y equipo utilizado para los diferentes análisis**

Para las cromatografías en capa fina (CCF) se utilizaron cromatofolios de aluminio con una capa de gel de sílice 60 F₂₅₄ de 0.25 mm de espesor (Merck). Para visualizar las placas se utilizó una lámpara de luz UV Spectroline modelo CX-20 a longitudes de onda (λ) 254 y 365 nm y/o una solución de sulfato cérico al 1% en ácido sulfúrico 2 N seguido de calentamiento a 120C aproximadamente por 1 ó 2 minutos en una parrilla eléctrica.

Para las cromatografías en columna (CC) se utilizó gel de sílice para cromatografía en capa fina (Merck), Sephadex LH-20 (SIGMA) o Amberlita XAD-4 (SIGMA).

Para las cromatografías en capa fina preparativa (CCF) se utilizaron placas de vidrio de 10 x 10 cm, 20 x 10 cm y/o de 20 x 20 cm, recubiertas de gel de sílice 60 F254 (Merck) de 0.25, 0.5 y 1 mm (según el caso).

Para cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE) se utilizaron cromatógrafos: *i*) Hewlett Packard Series 1100 equipado con un detector de Índice Refracción HP 10474 con una columna semipreparativa de fase reversa Nucleosil (Scharlau Science B25Y78) (300 mm x 8 mm) y *ii*) Para las determinaciones analíticas se utilizó un cromatógrafo Spectra SYSTEM 4000 con desgasificador de disolventes modelo SCM 1000, bomba cuaternaria P4000 y un detector ultravioleta UV6000LP (todos de la misma marca). Se utilizó una columna analítica fase reversa Discovery HS F5 (SUPELCO, 567515-U) (100 mm x 4.6 mm x 5 μ). La adquisición e integración de los datos se llevo a cabo con un software Xcalibur. Las determinaciones de CLAE se

realizaron en las instalaciones de la facultad de Ciencias de la Universidade da Coruña (UDC), España.

Los análisis de por Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de masas (CL-EM) se realizaron en un cromatógrafo Agilent technologies modelo 1200 con una columna LUNA C18 (150 mm x 4.6 mm x 5 μ), acoplado a un espectrómetro de masas Applied Biosystems modelo API 3200, en las instalaciones de Servicios de Apoyo a la Investigación de la UDC.

Los análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) se realizaron utilizando un cromatógrafo de gases marca Hewlett Packard modelo 5890 serie II, acoplado a un detector másico modelo 5972 de la misma marca.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns en grados Celsius ($^{\circ}$ C) y no están corregidos.

Los espectros en el infrarrojo (IR) se determinaron en un espectrofotómetro Bruker Tensor 27-FT en película, solución clorofórmica o pastilla.

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) se determinaron en espectrómetros analíticos Bruker-Avance 300, Jeol Eclipse 300, Varian Unity 300, Varian Unity Inova 500 o Bruker-Avance 500 en solución de cloroformo deuterado (CDCl_3), metanol deuterado (CD_3OD) y/o agua deuterada (D_2O). Los desplazamientos químicos δ están dados en partes por millón (ppm) referidos al tetrametil silano (TMS) como referencia interna.

Los espectros de masas se determinaron mediante las técnicas de impacto electrónico (EM-IE) o ionización química (EM-IQ) en un espectrómetro JEOL JMS-AX505HA y en uno Thermo MAT95XP; y para las técnicas por electrospray positivo y/o negativo en un espectrómetro LC-Q-q-TOF Applied Biosystems QSTAR Elite.

Todos los disolventes utilizados en los diferentes análisis, fueron bidestilados previamente y otros grado HPLC para el caso de CLAE.

b) Aislamiento y purificación de los componentes de las diferentes recolectas.

i) Primera recolecta

Una vez identificada y caracterizada la esponja, se llevó a cabo un análisis preliminar con el material obtenido durante la primera recolecta (julio 2005), para lo cual se descongeló el material, se pesó (1.01 Kg), se cortó en trozos pequeños de aproximadamente 2 cm³ y se extrajo por maceración con una mezcla de diclorometano (DCM): metanol (MeOH) (3:7). El extracto se filtró, posteriormente se eliminó el disolvente mediante destilación a presión reducida y 60 °C de temperatura, obteniéndose un residuo café oscuro (9.98 g), el cual se nombró como **CcH**. Este se disolvió en H₂O y se sometió a un proceso de partición líquido/líquido con disolventes de polaridad creciente, obteniéndose 3 extractos de diferente polaridad: éter de petróleo (EP), acetato de etilo (AcOEt) y n-butanol (BuOH). El fraccionamiento y los pesos correspondientes a cada extracto una vez que se eliminó el disolvente por destilación a presión reducida se muestran en la figura 14.

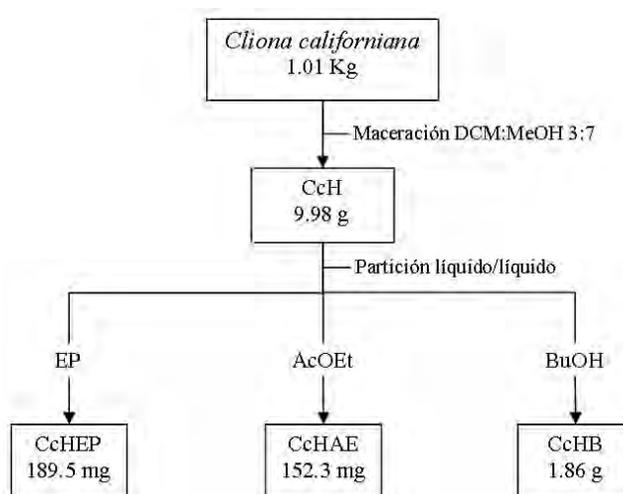


Figura 14. Diagrama de flujo general de tratamiento de la primera recolecta, donde CcH representa el extracto crudo, CcHEP, CcHAE y CcHB representan los extractos de éter de petróleo, acetato de etilo y n-butanol respectivamente.

(1) Extracto de Éter de Petróleo

El extracto de éter de petróleo de la primera recolecta CcHEP (189.5 mg), se fraccionó mediante cromatografía en columna abierta (CC) de silica gel, utilizando como eluyentes mezclas

de polaridad creciente de éter de petróleo (EP), acetato de etilo (AcOEt) y metanol (MeOH). Se obtuvieron 104 eluatos, los cuales se reunieron con base en la semejanza de sus componentes, en 53 fracciones primarias, de las cuales solo se analizó la más abundante (77 mg). Esta, se separó por cromatografía en capa fina preparativa (CCF), utilizando como fase móvil DCM/MeOH (97.5:2.5), eluyendo la placa 3 veces consecutivas (3x). Se obtuvieron 4 fracciones (a-d), de las cuales, la fracción **b** (60 mg) se acetiló de la manera usual utilizando anhídrido acético/piridina. La mezcla de reacción se purificó por CCF impregnada con nitrato de plata (AgNO₃) al 10 %, utilizando como fase móvil una mezcla de DCM/acetona 99:1, obteniéndose 2 fracciones (a, b). La fracción más polar (**b**), resultó ser material recuperado, que se identificó por RMN¹H como una mezcla de esteroides, que se identificaron como: colesterol (**I**), brassicasterol (**II**), dehidrocolesterol (**III**) y 24-metilenocolesterol (**IV**). La fracción menos polar (**a**) (36 mg), se obtuvo como un sólido cristalino de color blanco con punto de fusión de 139-144 °C, que se identificó espectroscópicamente, haciendo uso principalmente de resonancia magnética nuclear protónica (RMN¹H) y de carbono-13 (RMN¹³C) en una y dos dimensiones (COSY, DEPT, HSQC y HMBC), y espectrometría de masas por impacto electrónico (EM-IE), como una mezcla de acetatos de colesterilo (**V**), brassicasterilo (**VI**), dehidrocolesterilo (**VII**) y 24-metilenocolesterilo (**VIII**).

(2) Extracto butanólico

El extracto de *n*-butanol (CcHB) (1.86 g) se separó en una columna de Sephadex LH-20 utilizando como fase móvil una mezcla de EP/DCM/MeOH (1:1:2), obteniéndose 25 eluatos que se reunieron con base en la semejanza de sus componentes en 13 fracciones primarias (A-M).

Nota: Las fracciones obtenidas por cromatografía se nombran de acuerdo al abecedario, denotando con letras mayúsculas aquellas que corresponden a un proceso por CC y con minúsculas por CCF.

La fracción (CcHB)C (734.8 mg) se cristalizó de metanol, obteniéndose 2 cosechas y un total de 49.9 mg de producto sólido, que se identificó espectroscópicamente como la mezcla de esteroides (**I - IV**) aislada anteriormente. Las aguas madres (684.6 mg) se fraccionaron por CC de gel de sílice, utilizando como eluyentes mezclas de polaridad creciente de EP, DCM y MeOH;

obteniéndose 81 eluatos, los cuales se reunieron con base en la semejanza de sus componentes en 21 fracciones (CcHB)C (A-T). De las anteriores, la fracción **CB** (77 mg) se cristalizó obteniéndose 9 mg de un sólido blanco el cual se acetiló. El producto de acetilación (CBAcO) se identificó por comparación en CCF y RMN¹H como la mezcla de acetatos de los esteroides (**V - VIII**) aislados anteriormente. Las aguas madres de la fracción **CB** (68 mg) se acetilaron y se purificaron por CC en gel de sílice, utilizando como fase móvil mezclas de polaridad creciente de EP, DCM, AcOEt y acetona; se obtuvieron 39 fracciones las cuales se reunieron con base en la semejanza de sus componentes en 12 fracciones CB (A-L). La fracción **B** (2.4 mg) se comparó por CCF con una muestra de los acetatos de la mezcla de esteroides (**V- VIII**) aislado previamente, confirmando la presencia de dichos compuestos.

Las fracciones primarias (CcHB)**D** y (CcHB)**E** se reunieron y nombraron como (CcHB)**D** (180 mg), ya que mostraron ser similares al ser analizadas por CCF.

Una muestra de la fracción reunida (CcHB)**D** (~ 50 mg), se fraccionó nuevamente por CCF, utilizando como fase móvil MeOH, obteniéndose 13 fracciones (a-m). Las fracciones más abundantes: **a** (28.1 mg) y **b** (10.2 mg), se acetilaron para ser purificadas por CCF y analizadas por RMN¹H; sin embargo, la cantidad del material obtenido para ambas fracciones limitó el hacer otros experimentos y se decidió analizar la fracción completa.

Otra muestra de la fracción (CcHB)**D** (130 mg) se acetiló. El residuo de la reacción (124.7 mg) se separó en 2 fracciones: la parte soluble en DCM (60.1 mg) y la parte soluble en MeOH (64 mg). La fracción diclorometánica se purificó por CCF, utilizando como fase móvil DCM/MeOH 95:5 y eluyendo la placa escalonadamente. Se obtuvieron 2 fracciones (a-b). La fracción **b** (5 mg) se analizó por RMN ¹H y ¹³C en una y dos dimensiones, los datos espectroscópicos permitieron caracterizarlo como el 3-metil-uracilo (**IX**).

ii) Segunda recolecta

El material obtenido durante la segunda recolecta (agosto 2006), se separó en dos partes y se prepararon dos extractos primarios macerando con una mezcla de DCM/MeOH (3:7), uno a partir de 2.7 Kg de material húmedo el cual se nombró como **Cc2H** y un segundo extracto a partir de 700 g de material seco el cual se nombró como **Cc2S**. Los residuos de ambos extractos se

disolvieron en H₂O y se sometieron por separado a procesos de partición líquido/líquido obteniéndose tres diferentes fracciones: AcOEt, BuOH y H₂O. El fraccionamiento y los pesos correspondientes a cada fracción una vez que se eliminó el disolvente por destilación a presión reducida se observan en la figura 15.

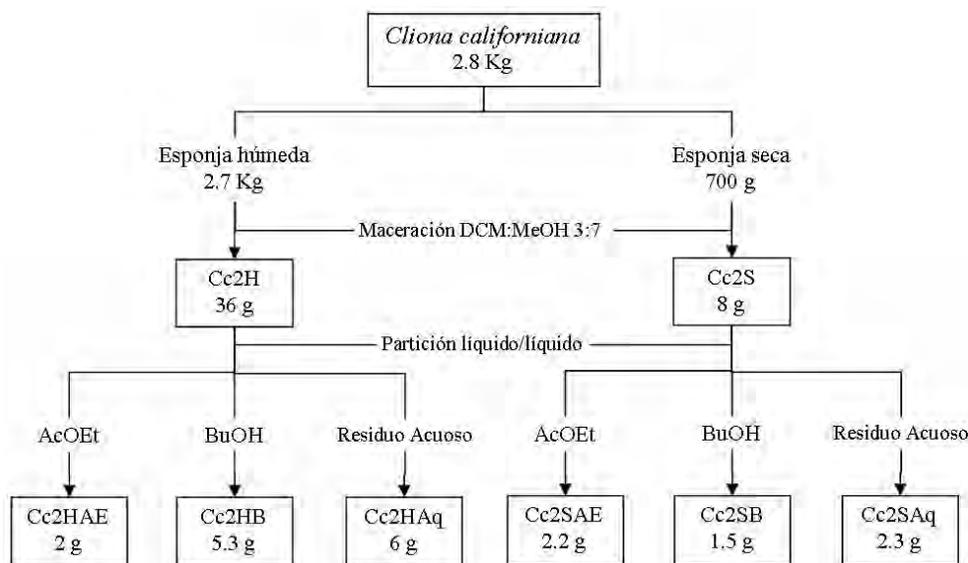


Figura 15. Diagrama de flujo general de tratamiento de la segunda recolecta, donde Cc2H y Cc2S representan el extracto crudo de la segunda colecta a partir de material húmedo y seco respectivamente. Cc2HAE, Cc2HB, y Cc2HAq, representan las fracciones en Acetato de etilo, Butanol, Acuoso a partir de la esponja húmeda, y Cc2SAE, Cc2SB y Cc2SAq los mismos extractos pero a partir de la esponja seca.

(1) Tratamiento de los extractos obtenidos de la Esponja Húmeda

(a) Extracto de Acetato de Etilo

(i) Separación de componentes ácidos y neutros

El extracto de acetato de etilo de la esponja húmeda de la segunda recolecta Cc2HAE (2.26 g), se separó en ácidos y neutros. Para esto el extracto se disolvió en 100 mL de DCM, la solución se trasvasó a un embudo de separación y se extrajo tres veces con volúmenes de 30 mL de una solución acuosa de hidróxido de sodio (NaOH) al 5%, agitándose vigorosamente. Posteriormente la fase orgánica (fase neutra) se lavó con agua hasta que las aguas de lavado mostraron el pH neutro, se secó con sulfato de sodio (Na₂SO₄) anhidro y se eliminó el disolvente

por destilación, obteniéndose 1.37 g de compuestos neutros que se nombraron como **Cc2HAENeu**.

La fase acuosa alcalina, se reunió con las aguas de lavado de la fase orgánica, se aciduló con ácido clorhídrico (HCl) y se extrajo cinco veces con DCM. Las fases orgánicas reunidas (fracción ácida) se lavaron con 20 mL de agua destilada (que fue desechada); se secó con Na₂SO₄ anhidro y posteriormente se eliminó el disolvente por destilación, obteniéndose 0.8 g de compuestos ácidos que se etiquetaron como **Cc2HAEAcs**.

Se recuperó un total de 2.17 g correspondientes a compuestos neutros y ácidos, obteniendo un rendimiento de 96 % en la separación.

1. Separación de componentes de la fracción ácida **Cc2HAEAcs**.

Una muestra de 500 mg de los compuestos ácidos se cromatografió sobre una columna de gel de sílice (15 g) eluyendo con mezclas de polaridad creciente de: EP, DCM y AcOEt, obteniéndose 107 eluatos, los cuales se analizaron por CCF y se reunieron con base en la semejanza de sus componentes en 22 fracciones Acs(A-U).

La fracción Acs**B** (46 mg) se purificó por CCFp, utilizando como fase móvil EP/DCM (1:1) y obteniendo 5 fracciones (a-e). La fracción Acs**Bc** (10.8 mg) fue analizada por RMN¹H y por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM). El análisis por CG-EM mostró la presencia de 13 esteres metílicos de ácidos grasos (**X - XXII**).

La fracción Acs**F** (84 mg) fue purificada por CCF utilizando como fase móvil una mezcla de EP/acetona (95:5) desarrollando la placa escalonadamente, obteniéndose 9 fracciones (a-i). La fracción Acs**Ff** (8 mg) se obtuvo como un aceite color amarillo que fue analizado por RMN¹H y EM-IE. Sus datos espectroscópicos permitieron identificarlo como el ácido $\Delta^{5,9}$ -hexacosadienoico (**XXIII**).

La fracción Acs**H** (193 mg) se cristalizó de metanol, obteniéndose 2 cosechas y un total de 81 mg de un producto sólido cristalino. El análisis por RMN¹H permitió identificarlo como la mezcla de esteroides (**I - IV**), aislados previamente. Las aguas madres se purificaron por CCF utilizando como fase móvil DCM/acetona (95:5), obteniendo 6 fracciones Acs**H**(a-f). La fracción Acs**Hc** (50 mg) fue la más abundante y se identificó por CCF como la mezcla de esteroides (**I -**

IV) aislados anteriormente. La fracción AcsHd (6 mg) se analizó por RMN¹H y EM-IE. Los datos obtenidos permitieron su identificación como los derivados 7-oxo del colesterol (**XXIV**), dehidrocolesterol (**XXV**), brassicasterol (**XXVI**) y 24-metilenocolesterol (**XXVII**), de acuerdo con los reportados previamente en la literatura y confirmado por síntesis a partir de los esteroides.

La fracción AcsI (25 mg) se purificó por CCF usando como fase móvil una mezcla de DCM/acetona (9:1). La placa se desarrolló 2 veces, obteniéndose 4 fracciones (a-d). La fracción AcsIc (2.3 mg) se identificó por RMN¹H como los derivados 7-oxo de la mezcla de esteroides (**XXIV - XXVII**) aislada en la fracción anterior.

La fracción AcsÑ se purificó por CCF utilizando como fase móvil una mezcla de DCM/acetona (97.5:2.5). Se obtuvieron 5 fracciones (a-f); la fracción AcsÑc (3.6 mg) se analizó por RMN¹H y se identificó espectroscópicamente como la mezcla de los derivados 5 α ,8 α -epidioxi del colesterol (**XXVIII**), dehidrocolesterol (**XXIX**), brassicasterol (**XXX**) y 24-metilenocolesterol (**XXXI**).

NOTA.- La presencia de compuestos neutros en la fracción ácida, se explica por la formación de emulsiones durante el proceso, que no permitieron una buena separación de las fases.

2. Separación de componentes de la fracción neutra **Cc2HAENeu**.

La fracción neutra (1.38 g) se cristalizó de metanol, obteniéndose 3 cosechas y un total de 265 mg de la mezcla de esteroides (**I - IV**). Las aguas madres (1 g) se separaron por CC usando gel de sílice (21 g) y eluyendo con mezclas de polaridad creciente de EP/AcOEt. Se obtuvieron 65 eluatos los cuales se reunieron con base en la semejanza de sus componentes determinada por CCF obteniendo 26 fracciones (A-Y).

La fracción NeuB (43 mg) fue purificada por CCF utilizando como fase móvil EP/AcOEt (9:1), se obtuvieron 6 fracciones (a-f). La fracción NeuBb (13.2 mg) se analizó por RMN¹H y CG-EM. El análisis por CG-EM mostró la presencia de 18 ésteres metílicos de ácidos grasos (**XXXII al XLI**, además de los **X-XI, XV, XVIII- XXII**, identificados anteriormente).

La fracción NeuG (93 mg) fue analizada de la misma manera que la fracción anterior utilizando como fase móvil EP/AcOEt (1:1), obteniéndose 3 fracciones (a-c). La fracción NeuGc (4.7 mg) fue identificada espectroscópicamente como los derivados 7-oxo de la mezcla de esteroides (**XXIV-XXVII**).

La fracción Neu**H** (374 mg) se cristalizó, obteniendo 3 cosechas las cuales se reunieron obteniendo 160 mg de la mezcla de esteroides (**I - IV**) aislada anteriormente. Las aguas madres de esta fracción (130 mg) se purificaron por CCFp utilizando como fase móvil EP/AcOEt (1:1), obteniendo 6 fracciones NeuH(a-f). La fracción NeuH**b** proporcionó 10 mg de la mezcla de esteroides (**I - IV**). La fracción NeuH**e** (16 mg) se repurificó por CCFp en las mismas condiciones que la fracción original, obteniéndose 2 fracciones (a-b). La fracción NeuH**e****b** (8 mg) se identificó por RMN¹H, como los derivados 7-oxo de la mezcla de esteroides (**XXIV – XXVII**).

La fracción Neu**N** (69 mg) se purificó por CCFp, eluyendo con DCM/acetona (9:1), obteniéndose 2 fracciones (a-b). La fracción NeuN**b** (5 mg) se identificó por RMN¹H como la mezcla de los derivados 5 α ,8 α -epidioxi (**XXVIII - XXXI**) de la mezcla de esteroides, previamente aislada.

(b) Extracto butanólico.

El extracto de *n*-butanol obtenido de la esponja húmeda de la segunda recolecta Cc2HB (5.3 g) se fraccionó de manera semejante al extracto butanólico de la primera recolecta, obteniéndose 33 eluatos que se reunieron con base en la semejanza de sus componentes, en 26 fracciones Cc2HB(A-Y), de las cuales solo se analizaron las fracciones más abundantes (E-G).

De las fracciones Cc2HB**E** (1.55 g), Cc2HB**F** (388 mg) y Cc2HB**G** (516 mg) se obtuvieron por cristalización de metanol mezcla de esteroides (**I - IV**) (436 mg, 100 mg y 20 mg, respectivamente).

(c) Extracto acuoso

El residuo de la fracción acuosa del material procesado en húmedo (Cc2HAq) (6 g), se disolvió en 30 mL de agua y se pasó sobre una columna empacada con 400 g de Amberlita XAD-4 (5 cm diámetro x 55 cm altura), con el fin de eliminar las sales inorgánicas y otros productos muy polares. La columna se eluyó con agua poco a poco, hasta que la resina se impregnó por completo de la muestra, posteriormente se mantuvo el flujo de 1 mL/min, realizando cada 15 min una prueba de cloruros por precipitación con una solución de AgNO₃. Una vez que no hubo

precipitación con AgNO_3 se aumentó el flujo y se comenzó la elución con metanol. Se obtuvieron dos fracciones, una hidro-alcohólica y otra metanólica que proporcionaron 216 y 867 mg de residuo, respectivamente, los cuales se reunieron obteniéndose 1.083 g libre de sales, el cual se nombró como **Cc2HAqss**.

El residuo libre de sales Cc2HAqss, se fraccionó por cromatografía en columna de Sephadex LH-20 (3 cm diámetro x 100 cm de largo). La muestra se disolvió previamente en una mezcla de $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ (9:1), se aplicó y se eluyó con $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ (9:1). Se obtuvieron 154 eluatos que se reunieron con base en la semejanza de sus componentes, obteniendo finalmente 27 fracciones (A-Y), de las cuales se analizaron las fracciones **D-F**, **J**, **L**, **S** y **Y**.

Las fracciones **D-F** fueron analizadas por cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas (CLAE-EM) utilizando una columna LUNA C18 (150 mm x 4.6 mm x 5μ), para lo cual se hicieron varios ensayos.

Ensayo A: Se utilizó un flujo de 1 mL/min, durante un tiempo de 45 min y una temperatura de 25° . Como fase móvil se utilizó agua (acidulada con 0.1% ácido fórmico): acetonitrilo. Se inició con una proporción de 95:5 y finalizando con 100 % acetonitrilo. En el cromatograma obtenido de la fracción **D** se observa en la figura 16.

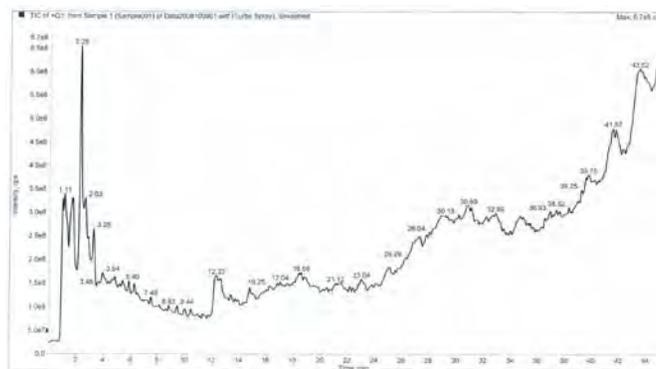


Figura 16. Cromatograma de la fracción D analizada por CLAE-EM utilizando el método A.

Ensayo B: En el segundo ensayo se utilizó el mismo flujo, temperatura y un tiempo de 48 min. Como fase móvil un gradiente de agua (ácido fórmico 1%): acetonitrilo (ACN) (100:0 a 0:100%) durante los primeros 15 min, posteriormente acetonitrilo durante 30 min y 3 min de recuperación a la mezcla inicial (Fig. 17).

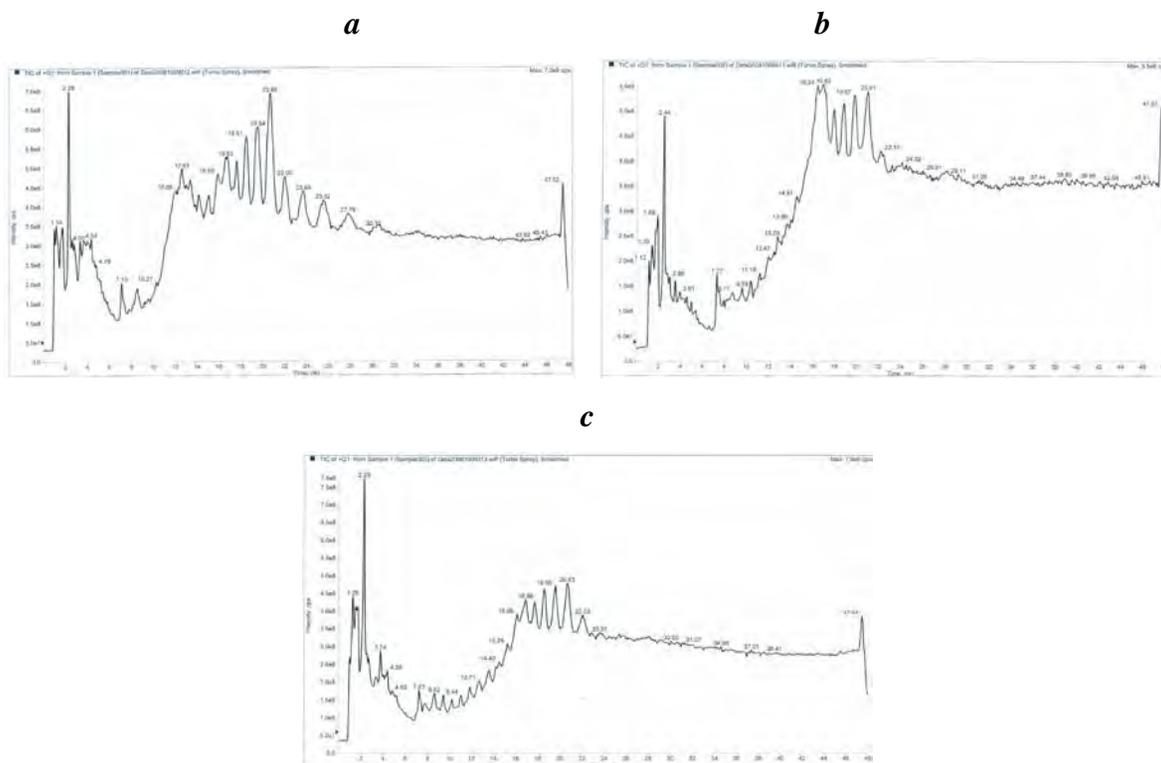


Figura 17. Cromatogramas de las fracciones D (a), E (b) y F (c) analizadas por CLAE-EM, utilizando el método B.

Con base a los resultados obtenidos en el ensayo B con las fracciones D, E y F (Fig. 5) se procedió a la separación de la fracción Cc2HAqssE por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE) utilizando un cromatógrafo Hewlett Packard Series 1100 con una columna de fase reversa Nucleosil (300 mm x 8mm).

Se analizaron 4 mg de la fracción **E** que se disolvieron en acetonitrilo con unas gotas de agua, como fase móvil se usó acetonitrilo 100% con un flujo de 1 mL/min, atenuación de 5 y sensibilidad de 32. Una vez estabilizada la línea base se inyectó la muestra y se recolectaron 22 fracciones. Debido a que no se obtuvieron los resultados esperados, se cambio de equipo y las fracciones obtenidas se desecharon.

Para las siguientes pruebas, se utilizó un cromatógrafo Spectra SYSTEM 4000 con una columna fase reversa Discovery HS F5 (100 mm x 4.6 mm x 5 μ). Se programó el aparato en un intervalo de longitud de onda (λ) de 170-800 nm, un flujo de 1 mL/min, alta sensibilidad, tiempo de análisis de 10 min. Como fase móvil se utilizaron mezclas de acetonitrilo y agua (ambos al 0.1% de ácido trifluoroacético). Con estas condiciones se desarrollaron 7 diferentes ensayos (Tabla V, Fig. 18) cambiando únicamente las proporciones de la fase móvil. Volumen de inyección 10 μ L de muestra.

Tabla V. Ensayos para determinación del sistema óptimo para la separación de la fracción E.

| No. | Tipo | Inicio (%) | | Final (%) | |
|-----|------------|------------|-----|-----------|----|
| | | A | B | A | B |
| 1 | Isocrático | 10 | 90 | 10 | 90 |
| 2 | Gradiente | 0 | 100 | 50 | 50 |
| 3 | Gradiente | 50 | 50 | 100 | 0 |
| 4 | Isocrático | 20 | 80 | 20 | 80 |
| 5 | Isocrático | 30 | 70 | 30 | 70 |
| 6 | Isocrático | 5 | 95 | 5 | 95 |
| 7 | Isocrático | 2 | 98 | 2 | 98 |

A= acetonitrilo, B= Agua

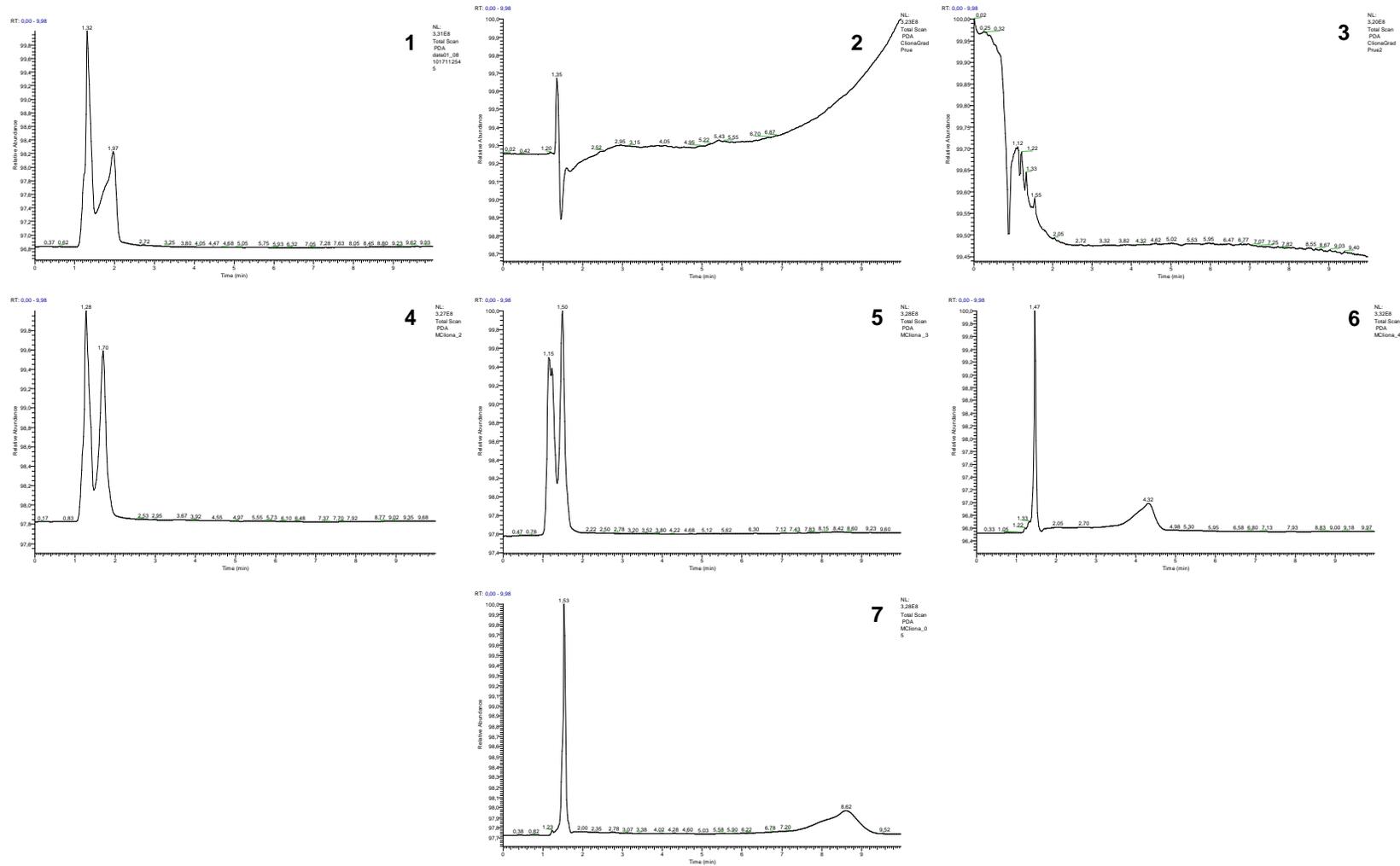


Figura 18. Cromatogramas de los métodos desarrollados para la determinación del sistema óptimo de separación de la fracción Cc2HResE.

Los diferentes cromatogramas (Fig. 18) muestran la presencia de dos picos que tienen una mejor separación en el caso 6. Es importante señalar que para los dos métodos de gradiente no se inyectó muestra, debido a la inestabilidad que presentó con acetonitrilo. Con base en lo anterior, se eligió el método 6 para la separación de la fracción AqssE. Se realizaron 191 inyecciones de 20 µL con una concentración aproximada de 2 µg/µL por inyección; el producto obtenido fue analizado por RMN¹H, RMN¹³C y Espectrometría de Masas por electrospray positivo. Los datos obtenidos están de acuerdo para la sulcatina (**XLII**), aislada por primera vez en el 2000 por Aiello y colaboradores del tunicado *Microcosmus vulgaris* y la cual presentó actividad antiproliferativa *in vitro*.

El análisis minucioso de los espectros de RMN a 500 MHz en 1 y 2 dimensiones (COSY, TOCSY, HMQC, HMBC) de la fracción AqssF (la cual fue similar en composición a las fracciones D y E) permitió corroborar la estructura y los datos obtenidos de la sulcatina (**XLII**) purificada por CLAE.

Las fracciones **J**, **L** y **S** fueron analizadas por RMN¹H, los espectros obtenidos indicaron la presencia de uridina (**XLIII**) (fracción **J**), adenosina (**XLIV**) (fracción **S**) y una mezcla de estas en la fracción **L**. Además de los nucleósidos caracterizados en estas fracciones se identificó la sal de sodio del ácido benzoico (**XLV**) por comparación con sus datos reportados en la literatura.

La fracción **Y** se cristalizó de H₂O:MeOH, obteniéndose 3 mg de un producto sólido cristalino de punto de fusión 101° C, los datos de RMN¹H, RMN¹³C y Espectrometría de Masas por electrospray negativo, concuerdan para el ácido benzoico (**XLVI**).

(2) Tratamiento de la Esponja Seca

(a) Extracto butanólico

El residuo del extracto butanólico de la esponja seca de la segunda recolecta (Cc2SB) (1.5 g) se disolvió en 15 mL de agua y se trató de la misma manera que el residuo acuoso de la esponja húmeda (Cc2HAq) para eliminar las sales, obteniendo un residuo total (**Cc2SBss**) de 222 mg y el cual se analizó por RMN¹H y RMN¹³C.

El residuo libre de sales (Cc2SBss, 222 mg) obtenido se fraccionó por cromatografía en columna en Sephadex LH-20, obteniendo 84 eluatos los cuales se reunieron con base en la semejanza de sus componentes en 27 fracciones (A-S), de las cuales solo se analizaron las fracciones menos complejas de acuerdo con sus espectros de RMN¹H; sin embargo todas las fracciones analizadas no fueron objeto de estudio.

iii) Tercera recolecta

De los 2.9 Kg obtenidos durante la tercera recolecta (septiembre 2008), se preparó un extracto total por maceración con una mezcla de DCM/MeOH (3:7) a partir de 695 g de material seco y molido, de los cuales se obtuvieron 38.5 g de residuo, el cual se nombró como Cc4S. El residuo obtenido se fraccionó mediante el método modificado de Kupchan *et al.* (1975) (Anta *et al.*, 2002), obteniéndose la fracción poco polar con DCM, la cual al ser analizada por CCF, mostró la presencia de esteroides y ácidos grasos identificados en las recolectas anteriores. La fase acuosa, se extrajo con butanol obteniéndose las fracciones: **Cc3SAq** y **Cc3SB**. El fraccionamiento y los pesos correspondientes a cada fracción una vez que se eliminó el disolvente por destilación a presión reducida se observan la figura 19.

El residuo del extracto butanólico del material seco de la tercera recolecta (**Cc3SB**, 5.778 g) se disolvió en 50 mL de agua y se trató de la misma forma que los extractos anteriores para eliminar las sales y otros productos muy polares, obteniéndose un residuo total de 1.952g (**Cc3SBss**).

El residuo libre de sales del extracto butanólico de esta recolecta no fueron objeto de análisis debido a que sus espectros de RMN¹H y RMN¹³C mostraron ser similares en composición a los extractos analizados en las recolectas anteriores.

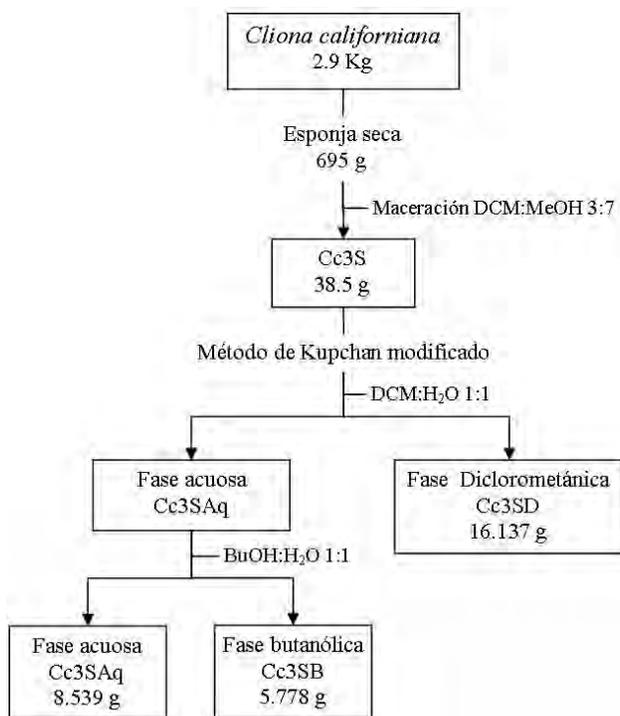


Figura 19. Diagrama de flujo general del tratamiento de la tercera recolecta, donde Cc3S representan el extracto crudo de la tercera colecta a partir de material seco. Cc3SD, Cc3SB y Cc3SAq representan las fracciones de Diclorometano, Butanol y acuoso de la partición líquido/líquido.

5) Obtención de derivados

a) Acetilación de la fracción CcHEPIb

La fracción CcHEPIb más abundante (60 mg) del extracto de éter de petróleo de la primera recolecta se disolvió en DCM, posteriormente se agregaron 2 gotas de piridina y 8 gotas de anhídrido acético, se agitó y se esperó a que se llevara a cabo la reacción, la cual se siguió por CCF. Una vez concluida la reacción (3 horas) se agregaron unas gotas de MeOH para eliminar el remanente de anhídrido acético, posteriormente se eliminó el MeOH y el acetato de metilo producido, mediante una corriente de nitrógeno. El exceso de piridina se eliminó al alto vacío, obteniéndose 50 mg de un residuo sólido. El análisis del producto de reacción se describe en la metodología (Ver página 33, Extracto de éter de Petróleo).

b) Oxidación de la mezcla de esteroides

Para llevar a cabo la oxidación alílica de los esteroides, se siguió la técnica desarrollada por Brunel y colaboradores (2005) para la oxidación de colesterol.

Se tomaron 200 mg de la mezcla de esteroides aislada de las diferentes recolectas y 88 mg de N-hidroxifitalamida que fueron disueltos en una mezcla de AcOEt:acetona (100 mL, 1:1 v/v) en un reactor de vidrio de 500 mL equipado con un condensador y un agitador magnético. Se agregó peróxido de benzoilo (12 mg) a una temperatura de 50-60° C. La mezcla de reacción se mantuvo a la misma temperatura con agitación y burbujeo de aire durante el día, agregándosele AcOEt:acetona (1:1) cada vez que se requería, debido a la pérdida de disolvente por el flujo de aire a través de sistema. El curso de la reacción se siguió por CCF sobre gel de sílice, usando como fase móvil EP:AcOEt (1:1). Después de cuatro días siete horas se detuvo la reacción y se eliminó el disolvente por destilación al vacío.

El residuo se disolvió en DCM, se trasvasó a un embudo de separación y la solución se trató dos veces con carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 10%, posteriormente con una solución saturada de cloruro de sodio (NaCl), se secó con Na_2SO_4 anhidro y se le eliminó el disolvente. El residuo se disolvió en 2 mL de piridina, se enfrió hasta 0°C y se agregó cloruro cúprico (CuCl_2 , 4 mg), manteniendo en agitación toda la noche. Al día siguiente se agregaron 25 mL de agua y se extrajo tres veces con volúmenes de 25 mL de AcOEt, la fase orgánica reunida se lavó cuatro veces con volúmenes de 25 mL con una solución de ácido clorhídrico (HCl) 0.1 M, se secó con Na_2SO_4 anhidro y se eliminó el disolvente por destilación al vacío.

La mezcla de reacción (190 mg) se purificó por CC sobre gel de sílice utilizando mezclas de polaridad creciente de EP y AcOEt. Las fracciones 33-39 eluidas con EP:AcOEt 8:2 (OE33-39) se reunieron (61 mg) y se purificaron por CCF utilizando una placa de 1 mm de espesor de gel de sílice. La fracción OE33a (35 mg) se obtuvo como un sólido blanco, que se identificó por RMN^1H y RMN^{13}C como la mezcla de los derivados 7-oxo de colesterol (**XXIV**), brassicasterol (**XXV**), dehidrocolesterol (**XXVI**) y 24-metilenocolesterol (**XXVII**).

6) *Valoración de la actividad biológica*

a) *Bioensayos de toxicidad con Artemia salina*

Estos bioensayos se llevaron a cabo como lo describe McLaughlin *et al.* (1988). Se probaron concentraciones de 10, 100 y 1000 ppm ($\mu\text{g/ml}$) en viales de 20 mL por triplicado y utilizando 10 de nauplios de *Artemia salina* (*A. salina*) por vial. Se contaron los organismos después de 24 horas y el porcentaje de muertes de cada dosis fue registrado. Estos datos se procesaron en programas de computadora para estimar la concentración media letal (LC_{50}) con un nivel de confianza del 95% para comparaciones estadísticas significativas.

Se realizaron pruebas de toxicidad con el crustáceo *A. salina* de las fracciones más abundantes del extracto butanólico de la primera recolecta y de los diferentes extractos de la segunda recolecta (Tabla VI).

Tabla VI. Extracto utilizado para pruebas de toxicidad con *A. salina*.

| Extracto | Peso (g) |
|---------------------|-----------------|
| <i>CcFDA</i> | 0.162 |
| <i>CcFBA</i> | 0.1022 |
| <i>CcFBB</i> | 0.2674 |
| <i>Cc2S</i> | 8.3121 |

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De los extractos de éter de petróleo, acetato de etilo, *n*-butanol y residuos acuosos del primer y segundo muestreo de la esponja *Cliona californiana* recolectada en dos localidades al sur de la ciudad de Ensenada, Baja California, se obtuvieron después de separaciones sucesivas por CC, CCF, CLAE en fase normal y reversa, una mezcla de 4 esteroides (**I-IV**) que fueron identificados como sus correspondientes derivados acetilados (**V-VIII**), un derivado de uracilo (**IX**), 23 ésteres metílicos de ácidos grasos (**X-XXII**, **XXXII-XLI**), un ácido graso insaturado (**XXIII**), los derivados 7-oxo (**XXIV-XXVII**) y 5 α ,8 α -epidioxi (**XXVIII-XXXI**) de la mezcla de esteroides, un alcaloide (**XLII**), 2 nucleósidos (**XLIII**, **XLIV**), un ácido carboxílico (**XLVI**) y su respectiva sal de sodio (**XLV**).

Las pruebas de actividad biológica realizadas con los extractos crudos y diferentes fracciones frente a *A. salina* no presentaron tener algún efecto de toxicidad.

1) Elucidación de estructuras

a) Ésteres metílicos de ácidos grasos (**X-XXII**, **XXXII-XLI**)

De las fracciones de AcOEt obtenidas mediante partición líquido/líquido de los extractos crudos de la esponja húmeda, se obtuvieron mezclas de ésteres metílicos de ácidos grasos (Cc2HAEAcSbc y Cc2HAENeuBb) (Fig. 20 y 21), las cuales fueron analizadas por RMN¹H y CG-EM.

La fracción Cc2HAEAcSbc fue caracterizada como una mezcla de ésteres metílicos de ácidos grasos saturados e insaturados, por medio de su espectro de RMN¹H (300 MHz). En el espectro se observó una señal múltiple a 5.3 ppm, debida a la presencia de protones vinílicos (-CH=CH-), además de una señal simple aguda a 3.66 ppm que corresponde a los tres protones del metilo del grupo éster (-OCH₃). La presencia de la cadena alifática -(CH₂)_n- y el metilo terminal CH₃-, dan lugar a una señal simple y otra señal triple distorsionada en 1.25 y 0.88 ppm, respectivamente. El análisis de la mezcla de ésteres metílicos por CG-EM condujo a la identificación de 13 ácidos grasos (**X-XXII**).

La fracción Cc2HAENeuBb presentó el mismo perfil que la fracción anterior, en su espectro de RMN¹H. El análisis por CG-EM (Figura 21) mostró la presencia de componentes similares, permitiendo la identificación de 10 ácido grasos (**XXXII-XLI**) más que en la fracción anterior.

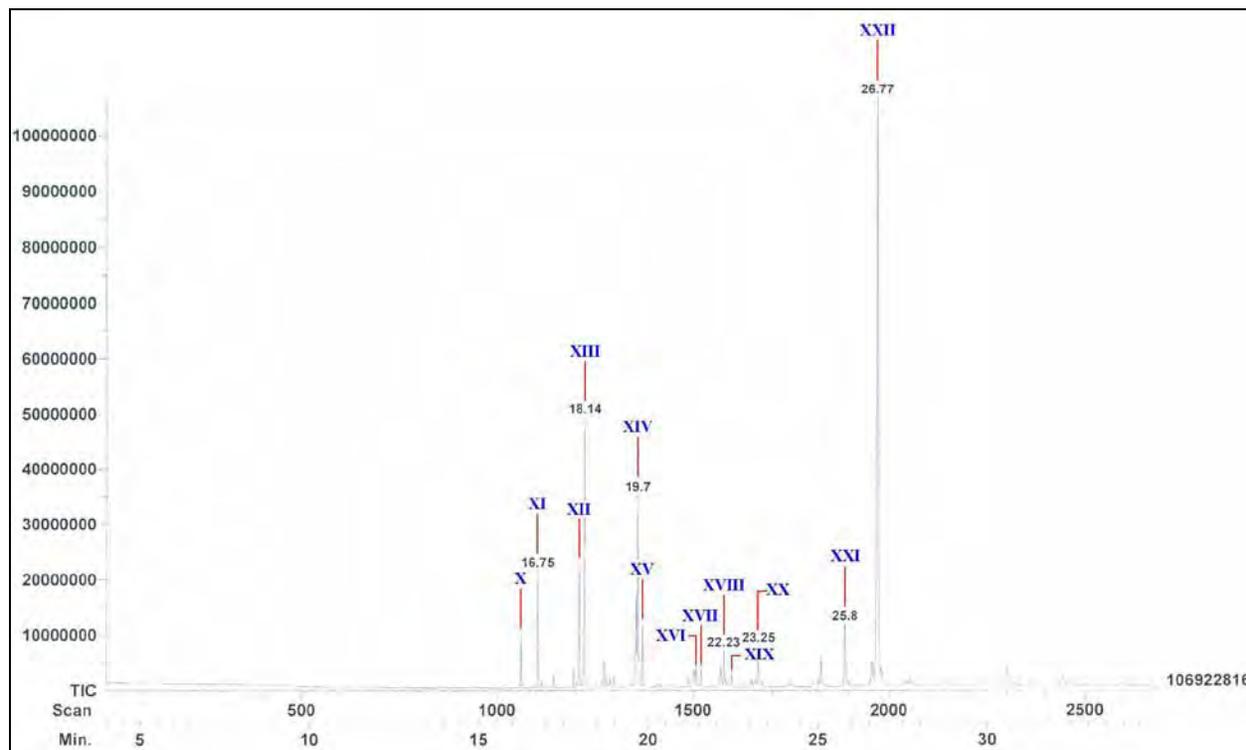


Figura 20. Cromatogramas de CG-EM de la fracción Cc2HAEAcBc.

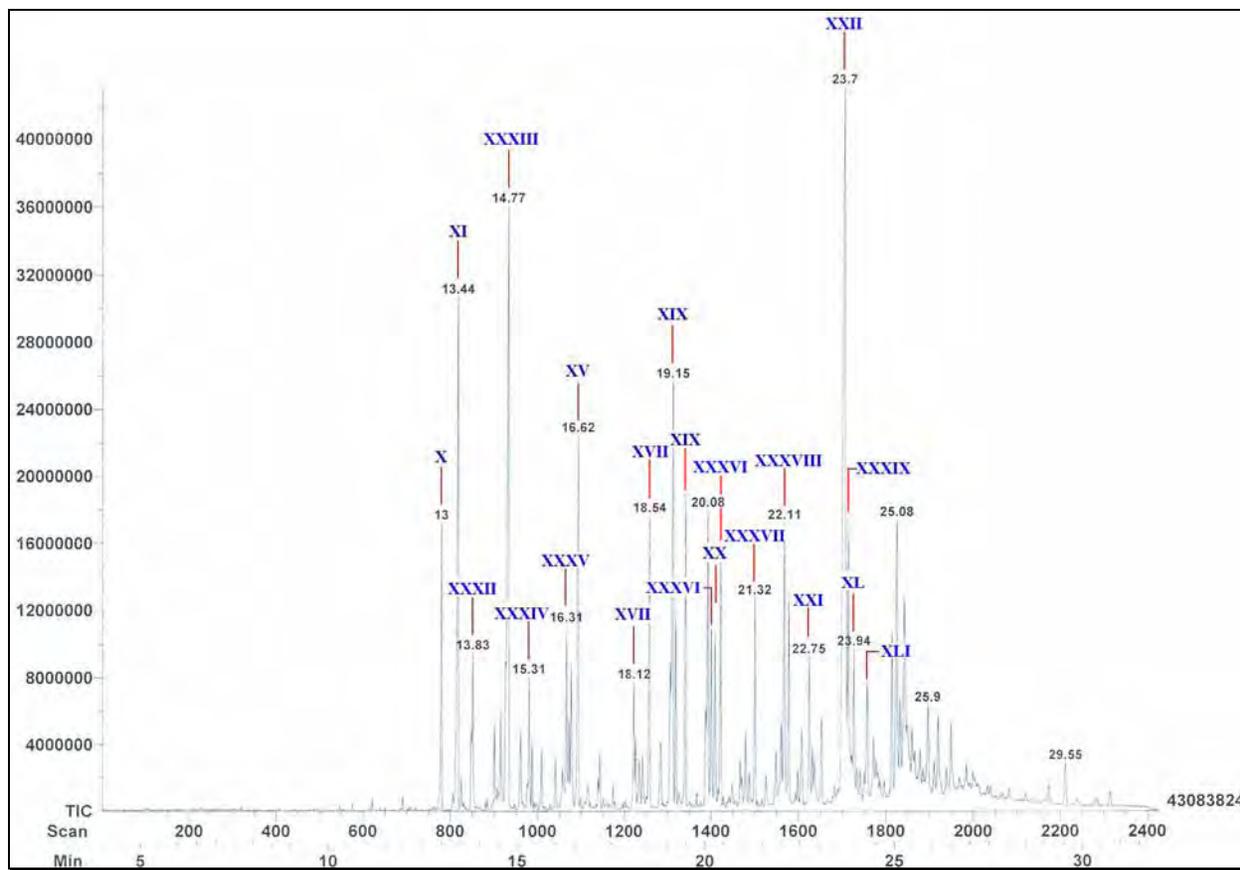


Figura 21. Cromatogramas de CG-EM de la fracción Cc2HAENeuBb.

Los resultados de los análisis por CG-EM de estas mezclas permitieron identificar ácidos grasos lineales y ramificados de 14 a 26 átomos de carbono (C-14 a C-26), tanto saturados como insaturados (Tabla VII). En estas mezclas se logró identificar ésteres metílicos correspondientes a los siguientes ácidos grasos:

- *Saturados*: tetradecanoico (**X**), 4,8,12-trimetil-tridecanoico (**XI**), hexadecanoico (**XIII**), octadecanoico (**XV**), eicosanoico (**XVII**), heneicosanoico (**XIX**), 9-metil-tetradecanoico (**XXXII**), 14-metil-pentadecanoico (**XXXIII**), heptadecanoico (**XXXIV**), 3,7,11,15-tetrametil-hexadecanoico (**XXXV**), docosanoico (**XXXVI**), tricosanoico (**XXXVII**), hexacosanoico (**XL**).

- *Insaturados*: insaturados: Δ^9 -hexadecanoico (**XII**), Δ^{11} -octadecenoico (**XIV**), Δ^{11} -eicosenoico (**XVI**), Δ^{15} -heneicosenoico (**XVIII**), Δ^{13} -docosenoico (**XX**), Δ^{15} -tetracosenoico (**XXXVIII**), Δ^{15} -hexacosenoico (**XXXIX**), Δ^{15} -pentacosenoico (**XLI**).
 - Di-insaturados: $\Delta^{5,9}$ -pentacosadienoico (**XXI**) y $\Delta^{5,9}$ -hexacosadienoico (**XXII**).

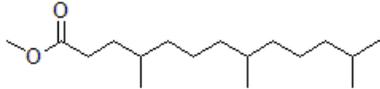
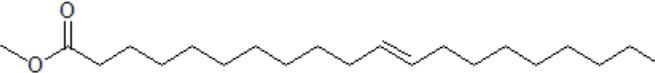
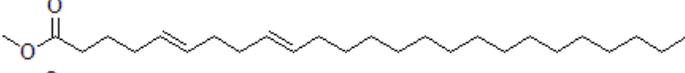
Los ésteres metílicos de ácidos grasos presentan un patrón de fragmentación característico en espectrometría de masas en el que se observan iones correspondientes a fragmentos hidrocarbonados de tipo alquilo C_nH_{2n+1} (m/z 29, 43, 57, 71, ...), acompañados de fragmentos olefínicos C_nH_{2n-1} (m/z 27, 41, 55, 69, ...) y otra serie de fragmentos con oxígeno, de los cuales el más característico es el pico de m/z 74 y que corresponde al pico base (100 %) en el espectro, seguido del pico m/z 87 que corresponde a un ion $[CH_2-CH_2-COOMe]^+$.

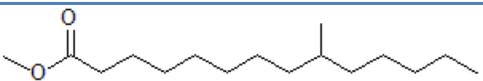
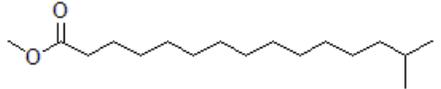
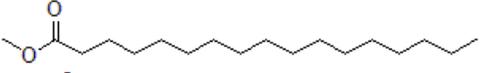
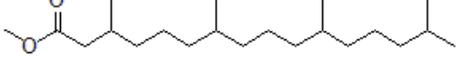
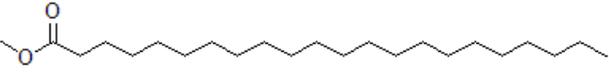
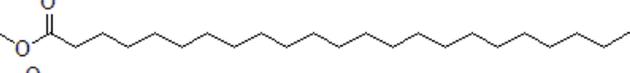
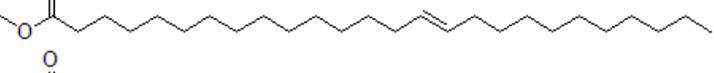
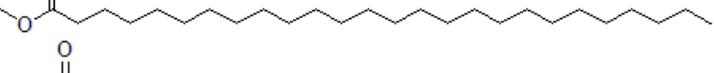
Para los ésteres con doble insaturación, Carballeira y colaboradores (1988 y 1990) explican que si en el espectro de masas del éster metílico de un ácido graso se observa un pico base de m/z 81, se puede sugerir la existencia de una doble insaturación 5 y 9. Los espectros de masas de los dos ácidos demospóngicos ($\Delta^{5,9}$ insaturados) identificados en *C. californiana* muestran un patrón de fragmentación muy similar, en el cual los fragmentos significativos son los m/z 81, 109 y 141. El pico base de m/z 81 se origina muy probablemente de la ruptura del enlace 7/8, generando un fragmento $[CH_2-CH=CH-(CH_2)_3-COOCH_3]^+$ de m/z 141, el cual por pérdida de 32 unidades de masa (pérdida de MeOH) genera el ion m/z 109 o bien pérdida de 60 unidades de masa (H-COOMe) da el pico base de m/z 81. Se observan además del ion molecular $[M]^+$, otros picos significativos correspondientes a los fragmentos (M-31), (M-32), (M-31-18), (M-74). Sin embargo, en los ácidos mono-insaturados es más difícil confirmar la posición del doble enlace, en este caso se proponen algunas estructuras donde no se sabe exactamente la posición del mismo.

En algunos casos se encontraron más de un TR para un mismo peso molecular, indicando con ello que se trata de diferentes isómeros. Por esta razón en la tabla VII se observan en algunos casos, más de un valor de TR para una misma fórmula molecular.

Las dos fracciones presentaron un comportamiento similar en su composición; en donde, el compuesto mayoritario en ambas mezclas fue el éster metílico del ácido demospóngico **XXII** (Fig. 20 y 21).

Tabla VII. Esteres metílicos de los ácidos de *C. californiana*, de 2 fracciones del extracto de Acetato de etilo de la segunda recolecta identificados por Cromatografía de Gases acoplado a un detector de masas.

| No. De Estructura | Nombre | m/z | [M] ⁺ | Estructura | Cc2HEPAcsBc | Cc2HAENeuBb |
|-------------------|-----------------------------------|-----|------------------|--|-------------|------------------------------------|
| X | Tetradecanoico | 74 | 272 |  | TR=16.25 | TR=13 |
| XI | 4,8,12-trimetil-tridecanoico | 8 | 270 |  | TR=16.75 | TR=13.44 |
| XII | Δ^9 -hexadecenoico | 55 | 268 |  | TR=17.97 | |
| XIII | Hexadecanoico | 74 | 270 |  | TR=18.14 | |
| XIV | Δ^{11} -octadecenoico | 55 | 264 |  | TR=19.7 | |
| XV | Octadecanoico | 74 | 298 |  | TR=19.84 | TR=16.62 |
| XVI | Δ^{11} -Eicosenoico | 55 | 324 |  | TR=21.41 | |
| XVII | Eicosanoico | 74 | 326 |  | TR=21.55 | TR=18.12 TR ₁ =18.54 |
| XVIII | Δ^{15} -Heneicosenoico* | 55 | 338 |  | TR=22.23 | |
| XIX | Heneicosanoico | 74 | 340 |  | TR=22.47 | TR=19.15 TR ₁ =19.49 |
| XX | Δ^{13} -docosenoico | 55 | 352 |  | TR=23.25 | TR=20.27 |
| XXI | $\Delta^{5,9}$ -Pentacosadienoico | 81 | 392 |  | TR=25.8 | TR=22.75 |
| XXII | $\Delta^{5,9}$ -Hexacosadienoico | 81 | 406 |  | TR=26.77 | TR=23.7 |

| | | | | | |
|----------------|-------------------------------------|-------|-----|---|------------------------------------|
| XXXII | 9-metil-tetradecanoico | 74 | 256 |  | TR=13.83 |
| XXXIII | 14-metil-pentadecanoico | 74/87 | 270 |  | TR=14.77 |
| XXXIV | Heptadecanoico | 74 | 284 |  | TR=15.31 |
| XXXV | 3,7,11,15-tetra-metil-hexadecanoico | 101 | 252 |  | TR=16.31 |
| XXXVI | Docosanoico | 74 | 354 |  | TR=20.18 TR ₁ =20.42 |
| XXXVII | Tricosanoico | 74 | 368 |  | TR=21.32 |
| XXXVIII | Δ^{15} -tetracosenoico | 55 | 380 |  | TR=22.11 |
| XXXIX | Δ^{15} -Hexacosenoico* | 376 | 408 |  | TR=23.81 |
| XL | Hexacosanoico | 74 | 410 |  | TR=23.94 |
| XLI | Δ^{15} -Hexacosenoico* | 125 | 394 |  | TR=24.3 |

TR= Tiempo de retención, esta dado en min.

* = Posición probable del doble enlace

En el 2008 Castellanos y Duque reportaron para *C. tenuis* 55 ésteres metílicos de ácidos grasos; en este trabajo se identificaron 23 ésteres, de los cuales 14 (**X**, **XII-XV**, **XX-XXII**, **XXXIV**, **XXXVI-XL**) coinciden con los reportados para *C. tenuis*. Por lo que, el presente trabajo constituye el segundo reporte sobre esteres metílicos de ácidos grasos para el género *Cliona*.

b) *Ácido graso (XXIII)*

De una de las fracciones primarias menos polares de los ácidos purificada por CCF se obtuvo un sólido de bajo punto de fusión, ligeramente amarillo. Su espectro de RMN¹H, presenta señales en: δ 0.88 (t, $J = 7$ Hz), 1.25 (s), 1.70 (t, $J = 7.5$ Hz), 2.06-2.38 (m) y 5.38 (m). Su espectro de masas muestra un ión molecular $[M]^+ = 392$, que está de acuerdo con la fórmula molecular $C_{26}H_{48}O_2$; además de otros picos en m/z 256 (16%), 167 (18%), 127 (38%), 109 (36%), 97 (64%), 81 (77%), 69 (58%), 55 (100%) y 43 (97%). Todos los datos anteriores, concuerdan con los reportados para el ácido $\Delta^{5,9}$ -Hexacosadienoico (**XXIII**) (Fig. 22) (Mena *et al.* (1984), Hahn *et al.* (1987) y Sánchez-Nava (2006).

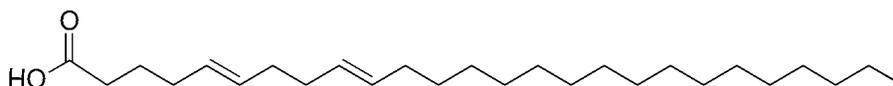


Figura 22. Estructura del ácido $\Delta^{5,9}$ -Hexacosadienoico (**XXIII**), aislado de *C. californiana*.

La obtención del ácido demospónico C-26 (**XXIII**) es congruente con la obtención 5,9-Hexacosadienoato de metilo (**XXII**) como compuesto mayoritario en la mezcla de ésteres metílicos. Así mismo, Carballeira *et al.* (1989) y Castellanos y Duque (2008) aislaron el mismo ácido demospónico (**XXIII**) de *C. aprica* y *C. tenuis*, respectivamente; lo cual nos lleva a deducir que hay una similitud en composición de ácidos grasos en el género *Cliona*.

c) *Esteroles (I-IV)*

De los extractos de EP y *n*-BuOH de la primera recolecta, y de AcOEt y *n*-BuOH de la segunda recolecta procesada húmeda, se obtuvo como componente mayoritario una mezcla de 4 esteroides (**I-IV**) que se identificaron por sus correspondientes acetatos (**V-VIII**) por comparación

de sus datos espectroscópicos de RMN¹H y RMN¹³C, así como, de espectrometría de masas (EM), con los datos reportados en la literatura.

De la fracción menos polar del extracto de EP de la primera recolecta, purificada por CCF y acetilada se obtuvo por cristalización un sólido cristalino de color blanco con punto de fusión (p.f.) 121-123 °C. Su espectro de RMN¹H, mostró un perfil con señales sobresalientes y características de esteroides (Fig. 23); se confirmó la presencia del éster del ácido acético, ya que mostró una señal simple aguda a 2.04 ppm correspondiente a los protones del grupo metilo del acetato, además de las señales correspondientes a los protones de los metilos C₁₈ y C₁₉, que se observaron como señales simples agudas a 0.68 y 1.02, respectivamente. En la señal correspondiente al protón del metino base del acetato (H₃) en el anillo A, se observó a campo bajo como una señal ancha a 4.61 ppm; así como también, la presencia de una señal doble ancha a 5.38 ppm correspondiente al protón vinílico en C₆; y 4 señales adicionales en 5.25 (m), 5.17 (m) y 4.72 (s) y 4.66 (d) debidas a protones vinílicos.

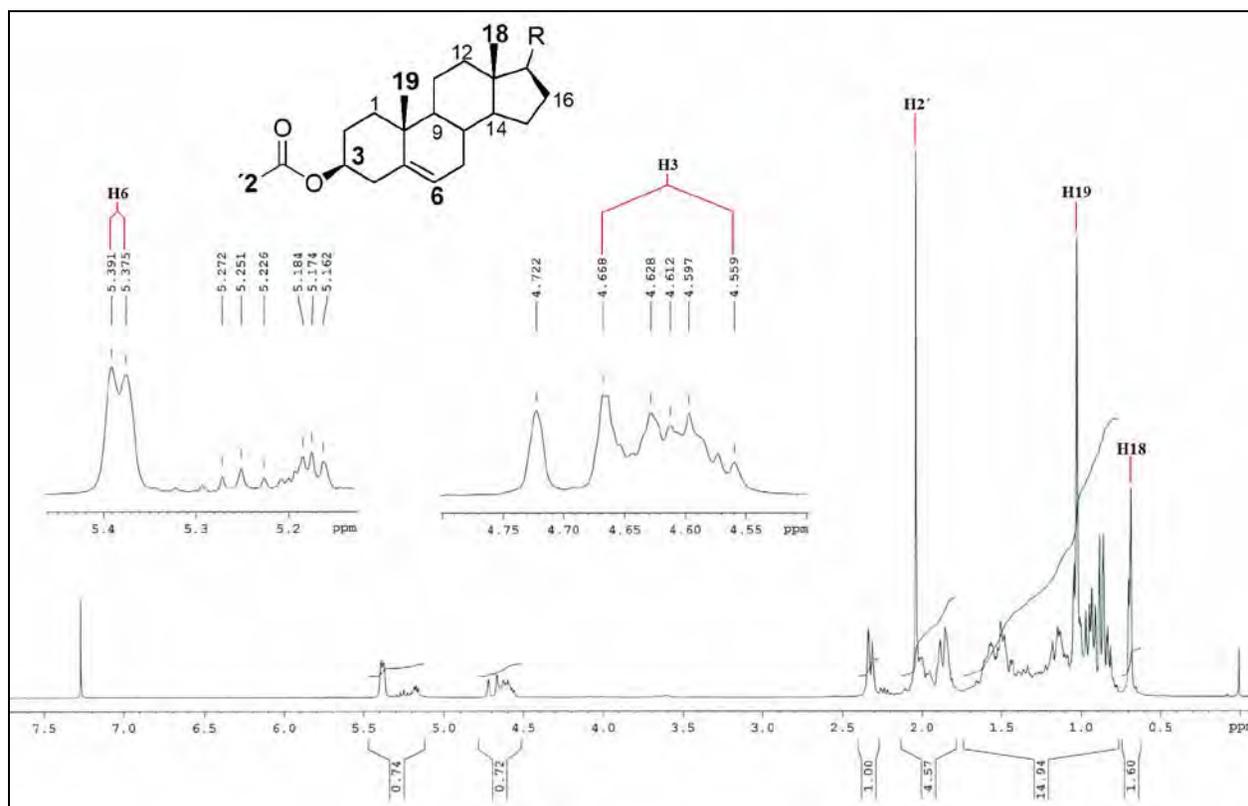


Figura 23. Espectro de RMN¹H de la fracción de esteroides obtenidos de los diferentes extractos poco polares.

Rubinstein *et al.* (1979), Pouchet y Bennke (1993) y Sánchez-Nava (2006) reportan para el acetato de colesterol (**V**) tres señales dobles a campo alto en 0.91, 0.87 y 0.86 ppm con constantes de acoplamiento (J) de 6.8 Hz, que se deben a los metilos secundarios C₂₁, C₂₆ y C₂₇, respectivamente. En el presente trabajo se observaron señales similares con una J de 6.6 Hz en 0.92, 0.88 y 0.87 ppm; así como, las señales correspondientes a los protones H₃, H₆, H₁₈ y H₁₉ por consiguiente, uno de los compuestos presentes en esta fracción es el colesterol (**I**), el cual fue caracterizado como su correspondiente derivado acetilado (**V**). El espectro de masas no mostró el ión molecular, y en su lugar se observó un ión de m/z 368 que está de acuerdo con la fórmula molecular C₂₇H₄₄, es decir M⁺ -60 unidades de masa menos, comparado con el compuesto **V**, debido a la pérdida de ácido acético. Se observaron además picos en m/z 353(23%), 296 (29%), 260(19%), 255(88%), 247(25%) y 213(56%), los cuales están de acuerdo con los reportados por Santalova y colaboradores (2004) para la fragmentación del colesterol (**I**) (Fig. 24).

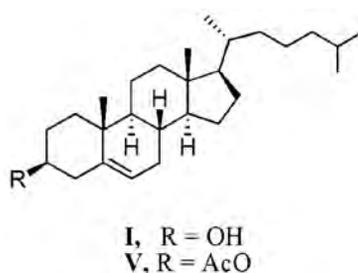


Figura 24. Estructura de los compuesto **I** y **V**.

Massey y Djerassi (1979), Lo *et al.* (2001), Giner *et al.* (2002), Lu *et al.* (2004) y Sánchez-Nava (2006) reportan para el 24-metilenocolesterol (**IV**) desplazamientos químicos a 1.03 y 1.02 ppm para los metilos 26 y 27, además de dos señales simples adicionales en 4.7 y 4.6 ppm; debidas al doble enlace $\Delta^{24(28)}$. En la figura 25 se puede observar 2 señales simples en 4.72 y 4.66 ppm que pueden deberse a la presencia de un doble enlace terminal; también se observan dos señales dobles en 1.04 y 1.03 ppm, las cuales pueden atribuirse a los protones de C₂₆ y C₂₇. De esta manera se estableció que otro de los compuestos presentes en la mezcla es el 24-metilenocolesterol (**IV**), caracterizado como su correspondiente derivado acetilado (**VIII**) (Fig. 26). El espectro de RMN¹³C está de acuerdo con la estructura y cuyos desplazamientos químicos son similares a los reportados por Sánchez-Nava (2006) para el compuesto **VIII**.

El espectro de masas también está de acuerdo, aunque no se observó el ion molecular, este presentó un pico de $m/z = 380$, que corresponde a $M^+ - 60$ unidades de masas para el compuesto **VIII** debido a la pérdida del ácido acético; así como picos en m/z 365(10%), 296(48%), 281(27%), 253(24%) y 213(56%) que están de acuerdo con los reportados por Santalova *et al.* (2004) para la fragmentación del oestrasterol **IV**.

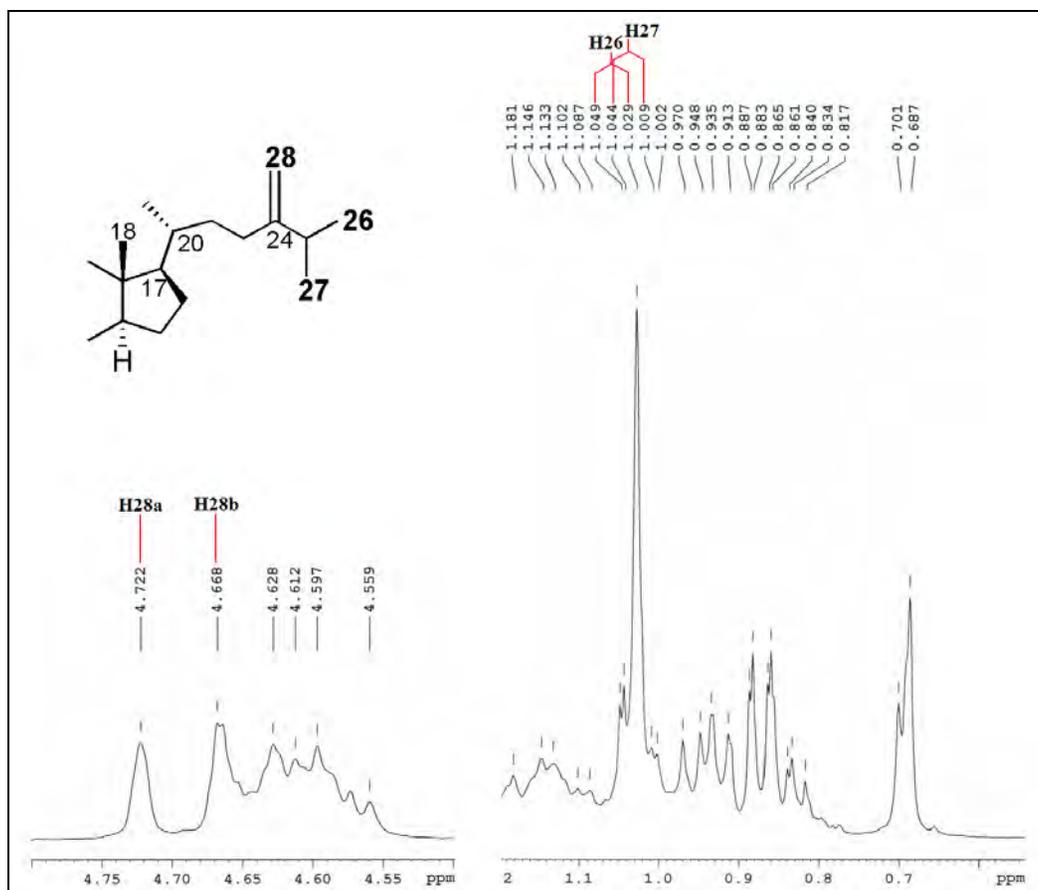
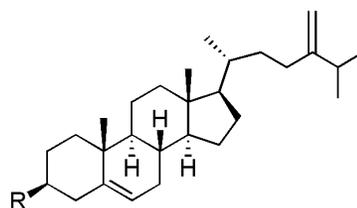


Figura 25. Expansión del espectro de RMN^1H de la fracción de esteroides.



IV, R = OH
VIII, R = AcO

Figura 26. Estructura de los compuesto **IV** y **VIII**.

Las señales adicionales en 5.25 (m), 5.17 (m) pueden ser asignadas a protones vinílicos los cuales se localizarían en las posiciones 22,23 de la cadena lateral; además de las señales adicionales a campo alto entre 0.84 y 1.02 ppm, las cuales se pueden asignar a protones de metilos secundarios. Sánchez-Nava (2006) reporta para el acetato de Δ^{22} -dehidrocolesterol (**VI**) desplazamientos químicos similares para los protones de los metilos C₁₈, C₁₉, C₂₁, C₂₆ y C₂₇ (Fig. 27), los cuales coinciden con los observados en el espectro de esta fracción; además de la señal en δ 5.25 que corresponden a los protones vinílicos H₂₃ y H₂₂. Por lo que otro de los componentes de esta fracción fue identificado como el Δ^{22} -dehidrocolesterol (**II**), identificado por su correspondiente derivado acilado (**VI**).

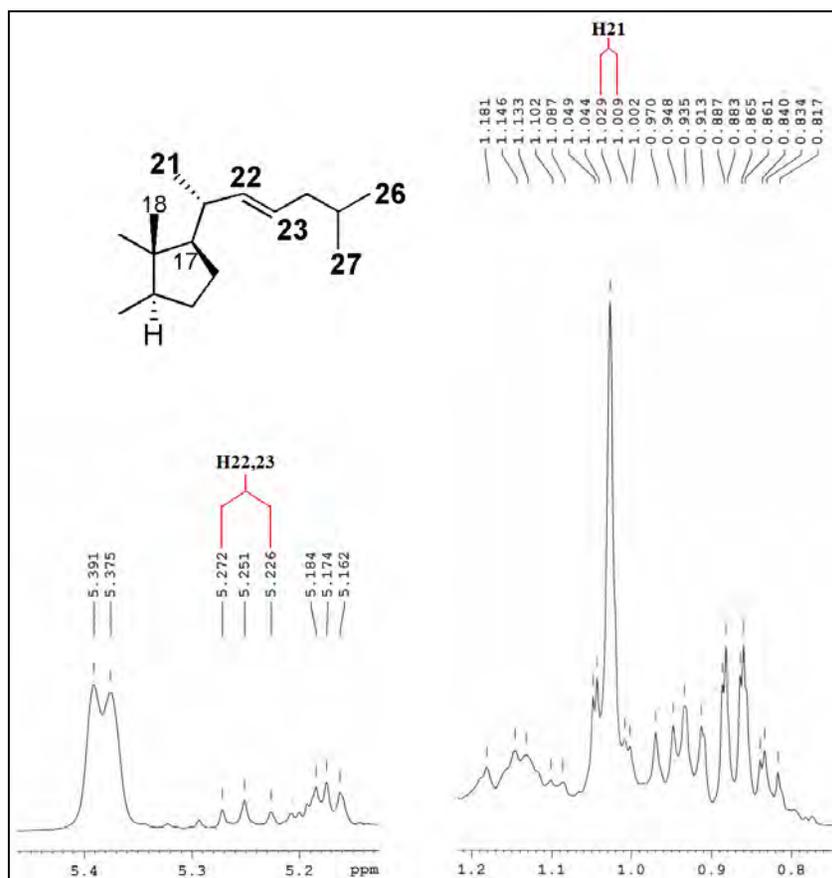


Figura 27 Expansión del espectro de RMN¹H de la fracción de esteroides.

Rubinstein *et al.* (1979), Akihisa *et al.* (1987), Giner *et al.* (2002), Suckla *et al.* (2004) reportan para el brassicasterol (**III**) un señal doble en 0.91 ppm que es asignada a los protones del

metilo 28 (H₂₈) que se localiza en la posición 24 de la cadena lateral y otra señal en 5.16 ppm para los protones vinílicos H₂₂ y H₂₃; además de un desplazamiento a campo alto de los protones de metilos secundarios H₂₆ y H₂₇ (Fig. 28).

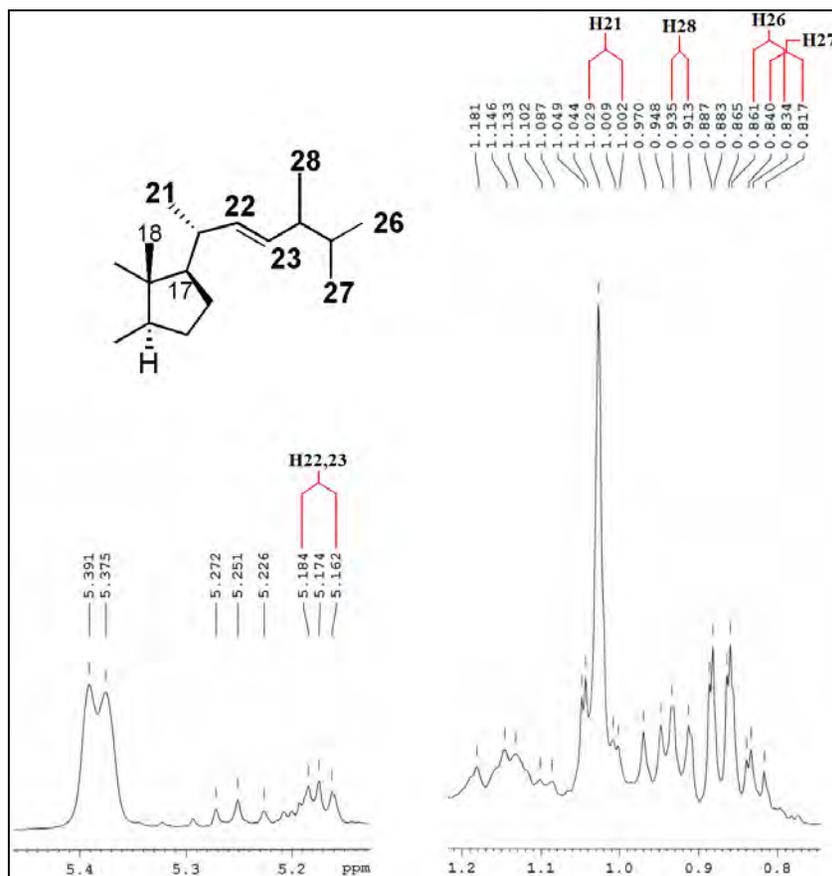


Figura 28. Expansión del espectro de RMN¹H de la fracción de esteroides.

El espectro de RMN¹³C también está de acuerdo a lo anterior ya que se observan señales similares a los reportados por Wright *et al.* (1978), Shukla *et al.* (2004) y Sánchez-Nava (2006) para los compuestos compuesto **VI** y **VII**. Con base en lo mencionado anteriormente, en el espectro de masas se esperarían dos iones moleculares de m/z 426 y 440, correspondientes a los compuestos **VI** y **VII**, respectivamente, los cuales no se observaron en el espectro; sin embargo, este mostró picos en m/z 366 (100%) y 380 (74%), es decir $M^+ - 60$ unidades de masa, que corresponden a la pérdida de ácido acético a partir del ion molecular; así mismo se observan

picos en m/z 365, 352, 282, 255 y 213, similarmente a los reportados por Santalova *et al.* (2004) para los compuestos **II** y **III** (Fig. 29).

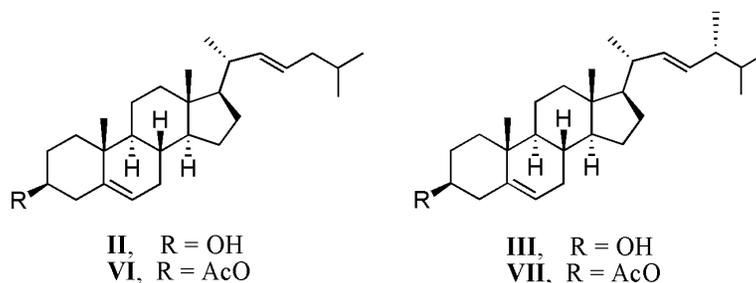


Figura 29. Estructura de los compuesto **II-III**, **VI-VII**.

Los compuestos **I-IV**, han sido aislados y caracterizados previamente por diversos grupos de investigación que han tenido como objeto de estudio alguna especie del género *Cliona*: tales como, *C. viridis* (Sica *et al.* 1978), *C. chilensis* (Roviroso *et al.*, 1984), *C. aprica* (Carballeira *et al.*, 1989) y *C. celata* (Valentine y Bergman, 1941; Erdman y Thomson, 1978), esta última con el mayor número de estudios realizados hasta la fecha en este género.

En general los datos de RMN¹H de los alcoholes, fueron muy similares a los acetatos, con excepción de los cambios inherentes a la presencia del alcohol, que consistieron en:

- a) la ausencia de la señal de los protones del metilo del grupo acetato en 2 ppm.
- b) el desplazamiento a campo alto (menor frecuencia) de la señal correspondiente al protón del metino C₃ base del alcohol en el anillo A en 3.86 ppm, la cual se observó el caso del alcohol como una señal múltiple

La mezcla de estos compuestos se presentó en los extractos menos polares en las recolectas analizadas; por lo cual puede afirmarse que constituyen los componentes mayoritarios de la esponja.

d) *Derivados 7-oxo de los esteroides (XXIV-XVII)*

El espectro de RMN¹H de la mezcla de los compuestos XXIV-XVII (Fig. 30) resultó ser similar al obtenido para la mezcla de los compuestos **I-IV** descritos en la sección anterior; como diferencia significativa se observaron desplazamientos a mayor frecuencia (campo bajo) de los

protones H₆ y H₁₉ situadas en δ 5.69 y 1.2, respectivamente. Esto puede deberse a la presencia de un grupo funcional que desprotege a dichos protones en el anillo B del esterol.

Su espectro de RMN¹³C mostró señales en la región de grupos carbonilos en δ 202 y el desplazamiento a mayor frecuencia de las señales de los carbonos C₄, C₅, C₆ y C₈. En el espectro de masas se observaron 3 iones moleculares de *m/z* 368, 400 y 412; lo anterior coincide con lo reportado por Notaro y colaboradores (1992) para 3β-hidroxicolest-5-en-7-ona (**XXIV**), (22E)-3β-hidroxicolesta-5,22-dien-7-ona (**XXV**) y (22E, 24R)-3β-hidroxi-24-metilcolesta-5,22-dien-7-ona (**XXVI**) aislados a partir de una esponja del mismo género (*C. copiosa*); y por Findlay y Patil (1985) para el 3β-hidroxi-24-metileno-5-colesten-7-ona (**XXVII**) aislado de la esponja *Haliclona oculata* (Ver Fig. 31).

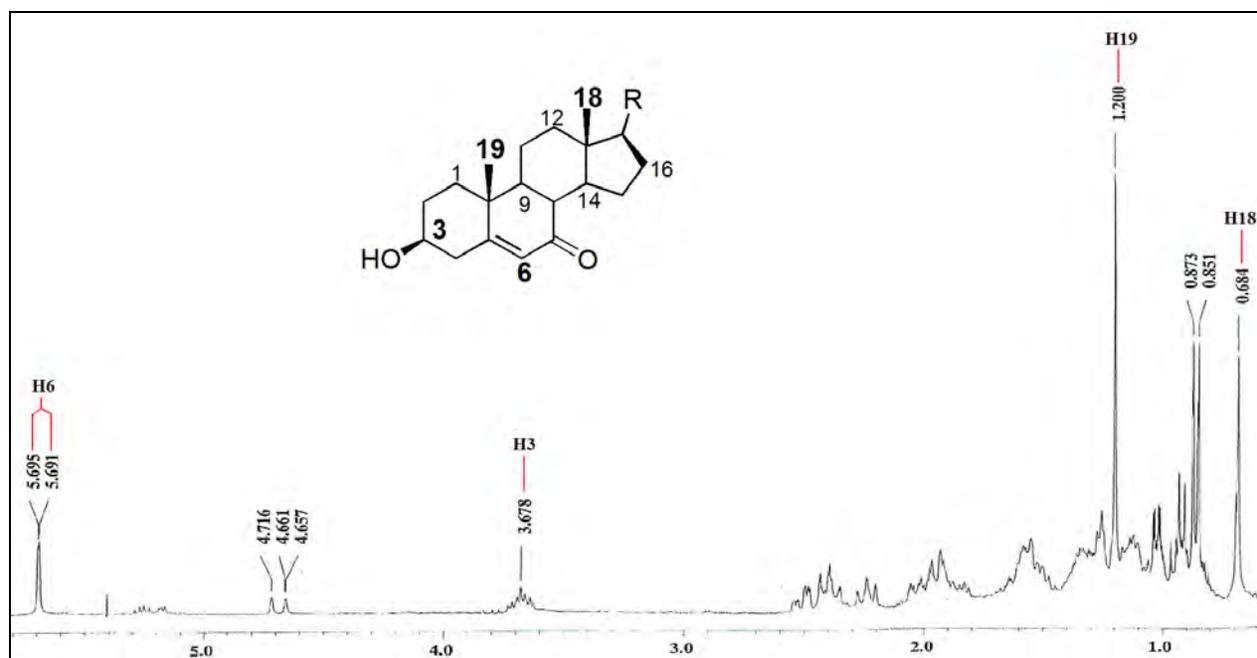


Figura 30. Espectro de RMN¹H de la mezcla de los compuestos **XXIV-XXVII**.

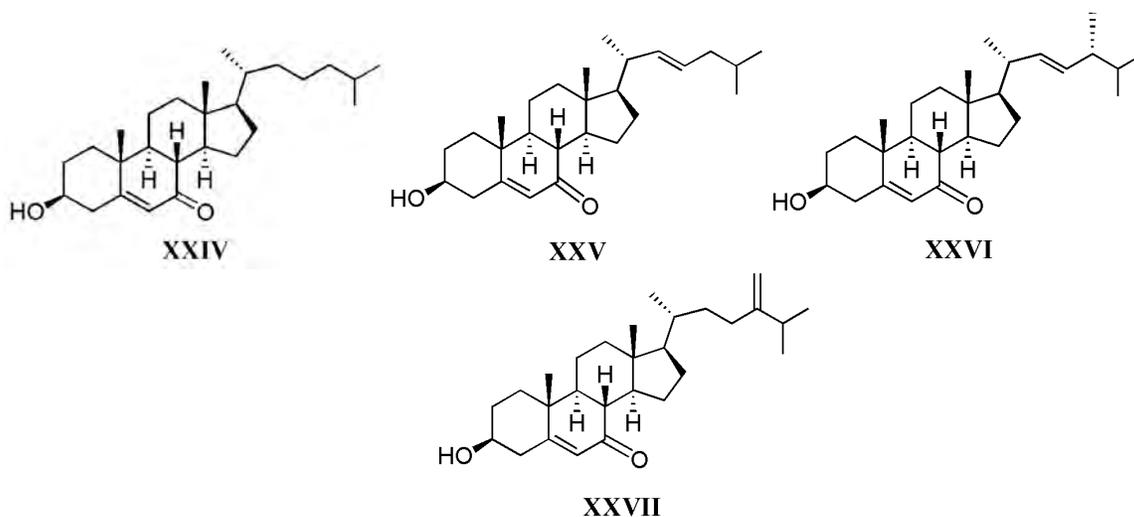


Figura 31. Estructura de los compuestos **XXIV-XXVII**.

Los datos obtenidos para el producto de oxidación de la mezcla de esteroides (**I-IV**) (Ver Metodología) analizado por espectroscopia de IR, RMN¹H y RMN¹³C (homo y heteronuclear) y por espectrometría EM-IE, confirma que los productos obtenidos de la esponja son los mismos obtenidos en forma sintética.

El aislamiento y caracterización del compuesto **XXVII** se ha reportado en otras esponjas, pero no en el género *Cliona*, por lo cual este trabajo constituye el primer reporte de este compuesto en el género.

La presencia de este tipo de compuestos en la fracción ácida se explica por la formación de emulsiones durante el proceso de separación de los ácidos y los neutros, que no permitieron una buena separación de las fases.

e) *Derivados 5,8-Epidioxi de los esteroides (XXVIII-XXXI)*

El espectro de RMN¹H de los compuestos **XXVIII-XXXI**, también presentó cierta similitud con los compuestos **I-IV**. Como diferencia significativa, en la región de protones vinílicos se observaron claramente 2 señales dobles correspondientes a un sistema AB, centradas en δ 6.24 y 6.50 con una *J* de 8.7 Hz, originadas por los protones vinílicos sobre C₆ y C₇; estas señales son características de 5,8-epidioxi-esteroides (Lara-Guadarrama (1986). Lo anterior coincide con los reportados por Gunatilaka *et al.* (1981), Miyamoto *et al.* (1988), Della Greca *et*

al. (1990), Gauvin *et al.* (2000), Lo *et al.* (2001), Wang *et al.* (2004), Sánchez-Nava (2006) para el 5 α ,8 α -epidioxi-colesta-6-en-3 β -ol (XXVIII), 5 α ,8 α -epidioxi-colesta-6,22-dien-3 β -ol (XXIX), 5 α ,8 α -epidioxi-24-metilcolesta-6,22-dien-3 β -ol (XXX) 5 α ,8 α -epidioxi-ergosta-6,24(28)-dien-3 β -ol (XXXI) (Fig. 32). Hasta la fecha no se ha reportado el aislamiento de 5 α ,8 α -epidioxi-esteroles en el género *Cliona*, por lo que el presente trabajo constituye el primer reporte de estos compuestos para el género. La presencia de estos compuestos en la fracción ácida se explica en la sección anterior.

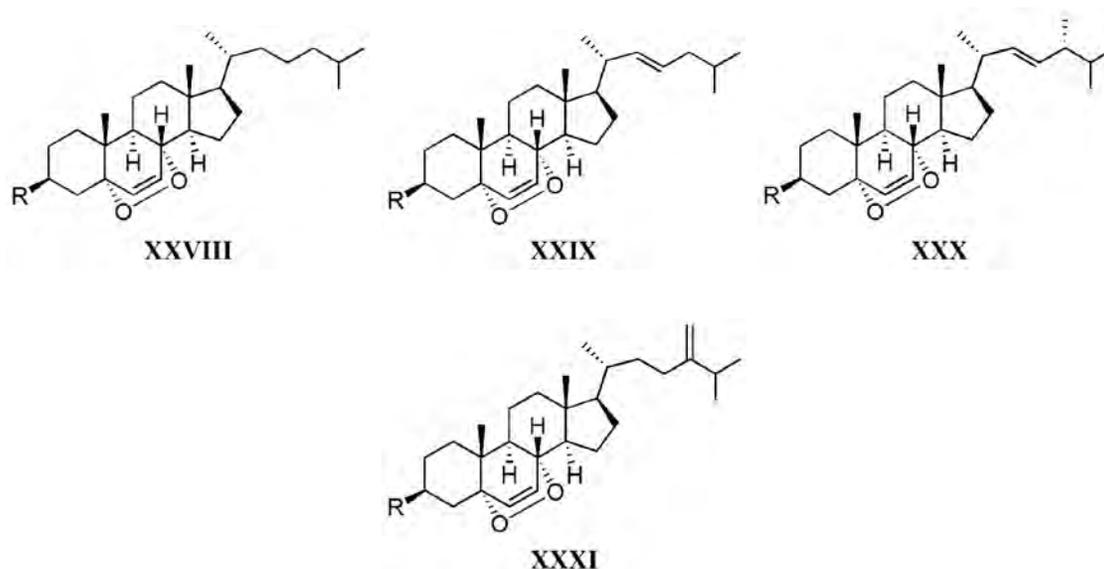


Figura 32. Estructura los 5 α ,8 α -Epidioxi de esteroles.

f) *3-metil-uracilo* (IX)

Del extracto butanólico de la primera recolecta se obtuvo por CC en Sephadex LH-20 y posterior purificación por CCF, un compuesto sólido de p. f. 169-173°C. En su espectro de RMN¹H se observaron señales en la región de protones vinílicos a 7.19 (d, 5.4 Hz) y 5.78 (d, 7.32 Hz) que integra cada una para un protón; además de una señal simple aguda a 3.32 ppm, debido posiblemente a los protones de un metilo que se encuentra a campo bajo. Así mismo en el espectro de RMN¹³C determinado a 100 MHz se observaron señales correspondientes a 5 átomos de carbono que corresponden a 1 metilo (27.29 ppm), 2 metinos (102.06 y 138.41 ppm) y dos carbonos cuaternario (153.35 y 163.65 ppm), de acuerdo con los experimentos DEPT, COSY, HSQC y HMQC (Ver Fig. 33). Los datos anteriores están de acuerdo con lo reportado por Still *et*

al. (1978) y Bernáth *et al.* (1987) para el 3-metil-uracilo (**IX**). En el espectro de masas el ion molecular es poco intenso pero su patrón de fragmentación es similar al reportado por Matsui y colaboradores (1990) para el compuesto **IX**.

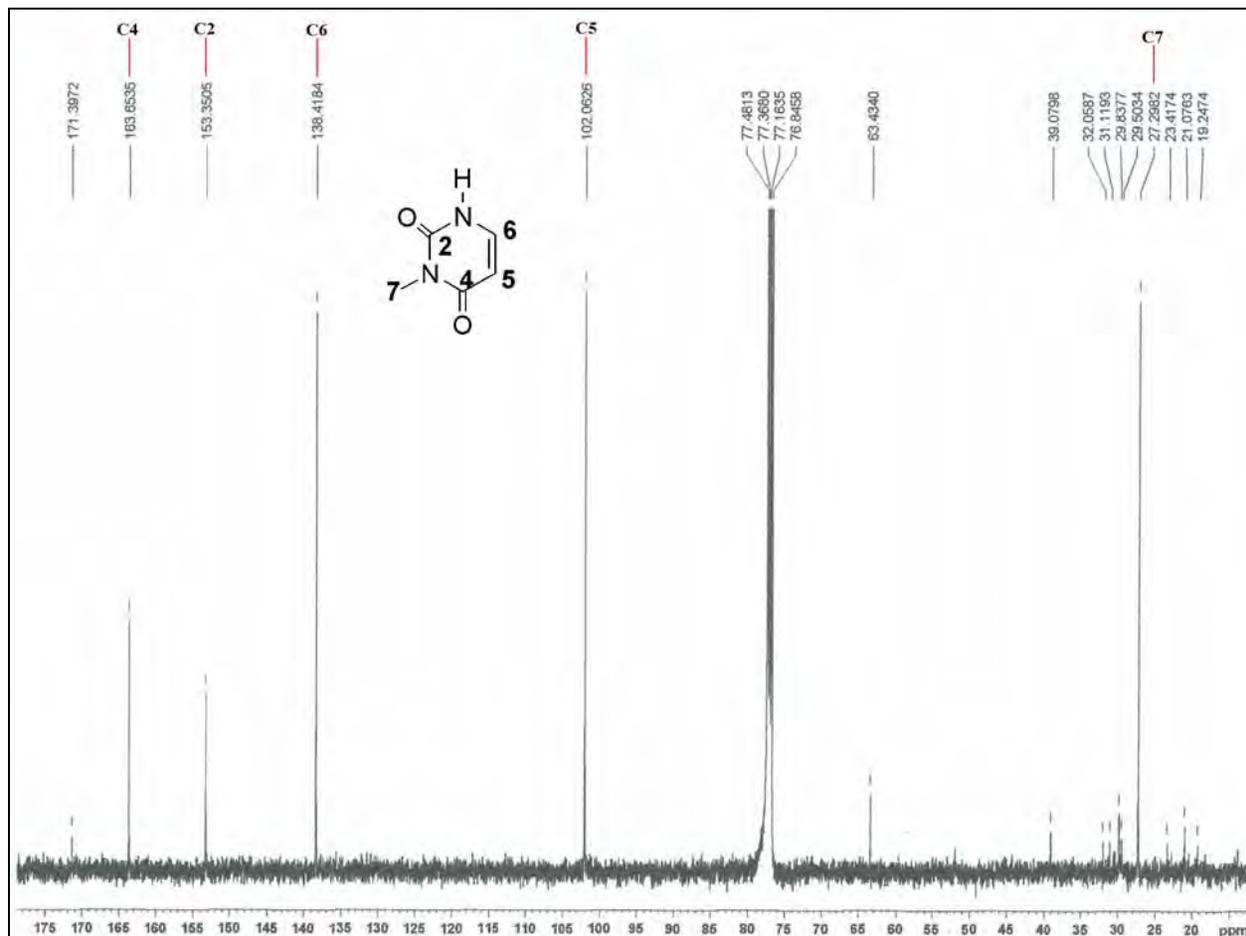


Figura 33. Espectro de RMN¹³C de 3-metil-uracilo determinado a 100 MHz en CDCl₃.

g) *Sulcatina* (**XLII**)

Dos de las fracciones que se obtuvieron por CC en Sephadex LH-20 del residuo acuoso de la segunda recolecta procesada en húmedo, fueron analizadas por RMN¹H. Los datos obtenidos mostraron una similitud en composición, por lo cual la fracción menos abundante fue sometida a un análisis minuciosos de RMN a 500 MHz en una y dos dimensiones. Su espectro de RMN¹H mostró señales a 8.64, 8.56, 7.84, cuyos desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento son característicos de un anillo piridínico 1,3,4-trisustituido (Aiello *et al.*, 2000). Se observó también una señal asignable a un *N*-metilo a 4.21 ppm, 2 señales triples acopladas a 2.59

y 3.10 ppm, correspondientes a dos grupos metileno contiguos y una señal simple (Ver Fig.34 y Tabla VIII). Así mismo en el espectro de RMN¹³C determinado a 125 MHz se observaron señales correspondientes a 10 carbonos, que corresponden a 2 metilos, 2 metilenos, 3 metinos y 3 carbonos cuaternarios, de acuerdo con los experimentos DEPT.

Tabla VIII. Datos de RMN de la fracción en CD₃OD (determinados a 500 y 125 MHz).

| Posición | $\delta^1\text{H}$ (mult, <i>J</i>) | $\delta^{13}\text{C}$ | COSY | HMBC (H-C) |
|----------|--------------------------------------|-----------------------|---------|----------------------|
| 2 | 8.64 (s) | 143.92 | 6, 7, 8 | C-3, -4, -8, -11 |
| 3 | | 141.48 | | |
| 4 | | 157.65 | | |
| 5 | 7.84 (da, 6.2) | 128.37 | 6, 11 | C-3, -6 |
| 6 | 8.56 (da, 6.2) | 141.69 | 2, 5, 7 | C-2, -4, -11 |
| 7 | 4.21 (s) | 47.27 | 2, 6 | C-2, -6 |
| 8 | 3.10 (t, 7) | 26.45 | 2, 9 | C-2, -3, -4, -8, -10 |
| 9 | 2.59 (t, 7) | 35.27 | 8 | C-3, -8, -10 |
| 10 | | 177.64 | | |
| 11 | 2.66 (s) | 18.41 | 5 | C-3, -4, -5 |

s = señal simple ancha; da = señal doble ancha; las constantes de acoplamiento (*J*) están dadas en Hz.

La fracción más abundante (similar a la anterior) fue purificada por CLAE, obteniendo 6 mg de producto sólido el cual fue analizado por RMN a 500 MHz y EM (modalidad electrospray positivo); los datos obtenidos concuerdan los descritos anteriormente. La masa exacta (180.1024) del ion molecular protonado [$\text{M}^+\text{+H}$], concuerda con la fórmula molecular de C₁₀H₁₄NO₂. Lo anterior está de acuerdo con lo reportado por Aiello y colaboradores (2000) para la sulcatina (**XLII**) aislada del tunicado *Microcosmus vulgaris* y la cual presentó actividad antiproliferativa *in vitro* en 4 diferentes líneas celulares tumorales. En el 2004 Kehraus y colaboradores reportan el mismo compuesto de *Atrium robustum* un tunicado recolectado en las costas de Australia.

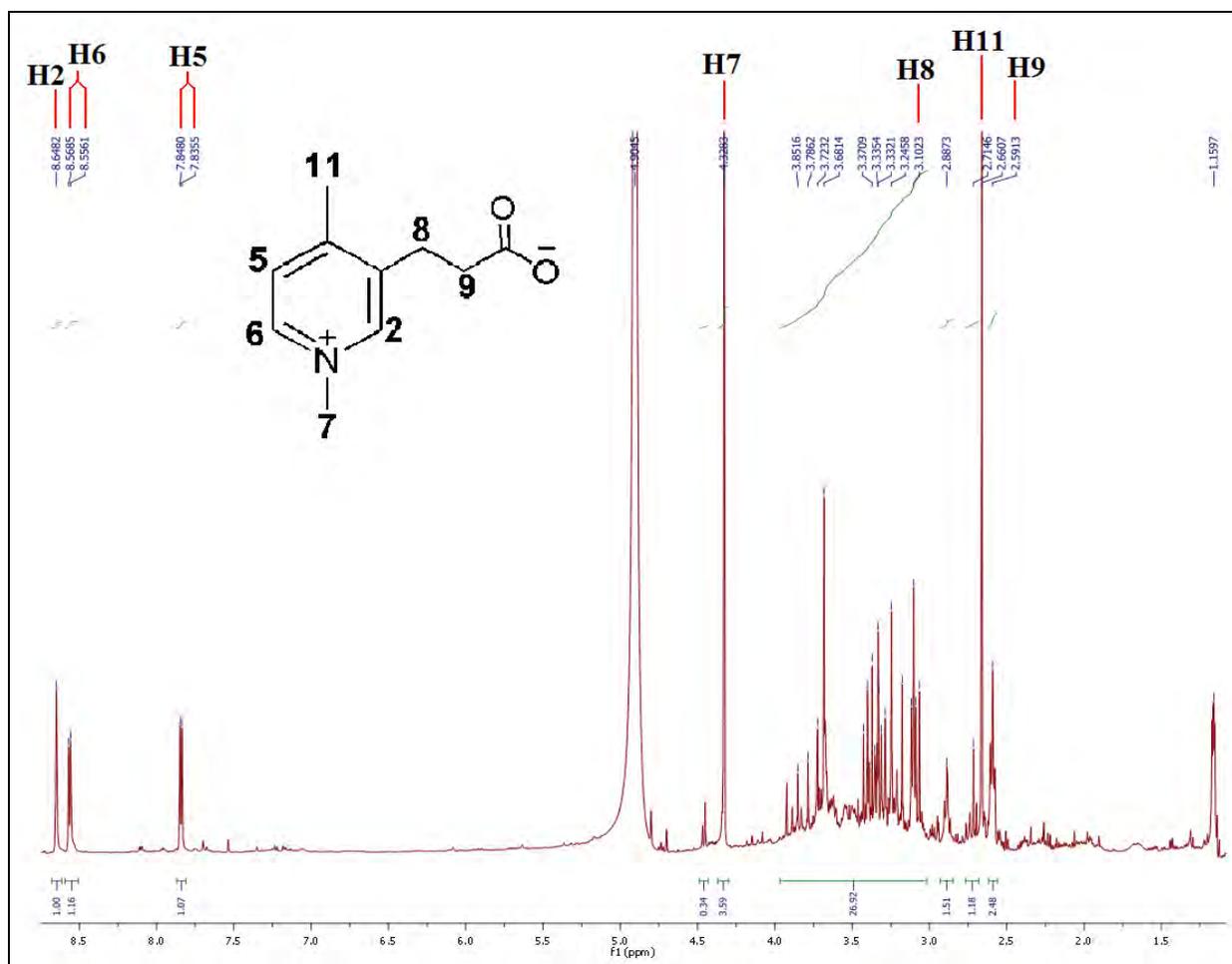


Figura 34. Espectro de RMN¹H de la sulcatina (**XLII**) determinado a 500 MHz en CD₃OD.

Hasta ahora este compuesto solo ha sido aislado de 2 tunicados, siendo este el primer reporte sobre su presencia en una especie del phylum Porifera. Con respecto al género *Cliona* se han aislado compuestos nitrogenados de bajo peso molecular, tal es el caso de la clionapirrolidina (**67**, ver estructura en antecedentes) que fue aislada de *C. tenuis* y la cual causa muerte del tejido de coral por contacto directo (Castellanos *et al.*, 2006; Chávez-Fonnegra *et al.*, 2008). De *C. patera* en el 2008 se reportó el aislamiento de 3-metilmaleimida-5-oxima y maleimida-5-oxima (**140** y **141**, ver estructuras en antecedentes) (Sawangwong *et al.*, 2008).

h) *Nucleósidos (XLIII y XLIV)*

De las fracciones de polaridad intermedia (**J**, **L** y **S**) obtenidas por CC en Sephadex LH-20 analizadas por RMN¹H, se detectó la presencia de uridina (**XLIII**), adenosina (**XLIV**) y una mezcla de ambas, las cuales fueron identificadas por comparación con muestras auténticas.

En el espectro de RMN¹H de la fracción **J** determinado a 300 MHz, se observaron 3 señales a bajo campo en δ 8.01 (d, $J = 7.8$ Hz), 5.91 (da, $J = 4.4$ Hz) y 5.71 (da, $J = 8$ Hz); además de las señales en la región entre 3.6 y 4.2 ppm.

Li y colaboradores en el 2005 reportan para la uridina 3 señales dobles en δ 8.00 ($J = 4.8$ Hz), 5.90 ($J = 7.8$ Hz) y 5.71 ($J = 4.8$ Hz), las cuales son asignadas a los protones de los carbonos 6, 1' y 5, respectivamente. En el 2009 Duarte *et al* reportan desplazamientos para el mismo compuesto en δ 7.89 (d), 5.92 (d), 5.89 (d). En base a lo anterior, el compuesto aislado en la fracción **J** se identificó como uridina (**XLIII**) (Fig. 35). La comparación con una muestra auténtica del nucleósido confirmó la aseveración anterior.

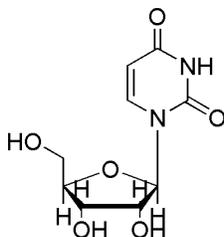


Figura 35. Estructura del compuesto **XLIII**.

En el espectro de RMN¹H de la fracción **S** se observaron señales en la región entre 3.6 y 4.2 ppm, sin embargo en la región a campo bajo se observó una señal doble en δ 5.98 con una J de 6.3 Hz y dos señales simples agudas en 8.19 y 8.32 ppm; estas últimas corresponden a protones vinílicos no acoplados, muy probablemente bajo la influencia de un grupo funcional que los desprotege y que provoca el desplazamiento a alta frecuencia (campo bajo). Los datos anteriores están de acuerdo con los reportados para la adenosina (**XLIV**) (Fig. 36) (Pruchnik *et al.*, 2008). La comparación con una muestra auténtica, confirmó la anterior aseveración.

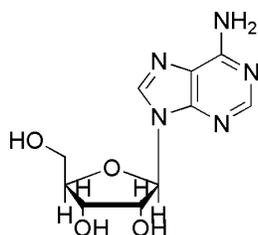


Figura 36. Estructura del compuesto **XLIV**.

i) *Ácido benzoico* (**XLVI**)

De la fracción **Y** del residuo acuoso de la segunda recolecta procesada en húmedo se obtuvo por CC en Sephadex LH-20, 3 mg de un sólido que cristalizó de H₂O:MeOH, con p. f. de 101 °C. En su espectro de RMN ¹H (Ver Fig. 37) se observan 3 señales en la región de aromáticos: δ 7.47 (ta, *J* ~ 8 Hz, 2H_m), 7.59 (ta, *J* ~ 8 Hz, H_p), 8.03 (da, *J* ~ 8 Hz, 2H_o), que integran para 2, 1 y 2 protones, respectivamente. En su espectro de RMN ¹³C se observan 3 señales en 128.01, 129.29 y 132.21 ppm. En su espectro de masas determinado por electrospray negativo se observa un pseudoion molecular [M-1]⁻ de 121 unidades de masa. Lo anterior concuerda con Grasselli y Ritchey (1975) y Pouchert y Behnke (1993) para el ácido benzoico (**XLVI**); así mismo, por comparación de un muestra autentica se determinó que el compuesto aislado de la esponja *C. californiana* se trata del ácido benzoico. El aislamiento de ácidos como el benzoico, a partir de esponjas no es común, sin embargo de *C. patera* recolectada en las costas de Tailandia, se ha reportado el aislamiento del ácido *p*-hidroxibenzoico (Sawangwong *et al.* 2008).

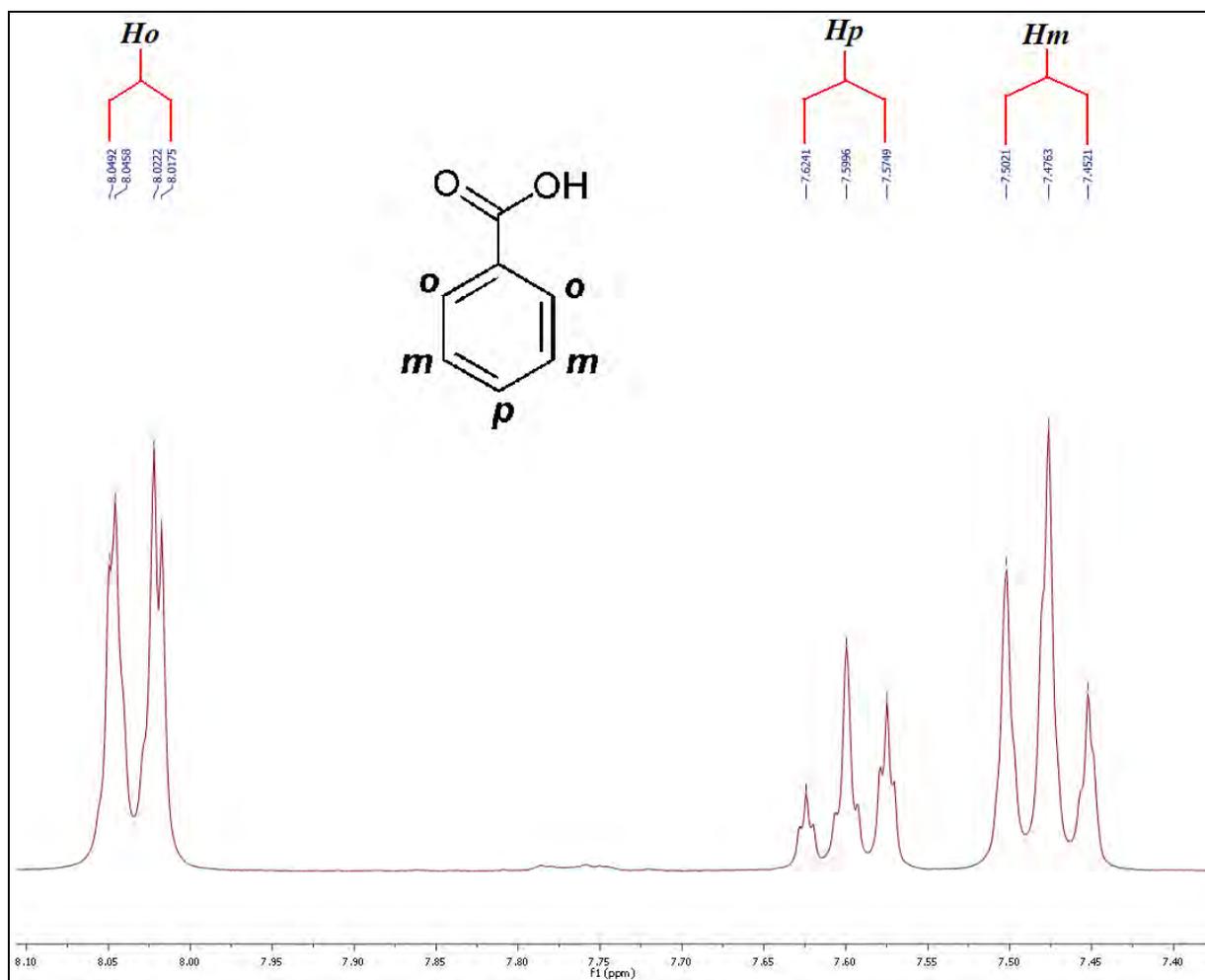


Figura 37. Expansión del espectro de RMN^1H del ácido benzoico (**XLVI**), determinado a 300 MHz en CD_3OD .

j) *Sal de sodio del ácido benzoico (XLV)*

De las fracciones **J**, **L** y **S** de las cuales se aislaron y caracterizaron los nucleósidos, se observaron en sus espectros de RMN^1H señales adicionales en la región de aromáticos en δ 7.12 (*p*, *m*) y 7.98 (*o*), la primera como una señal múltiple y la segunda como una señal doble (Ver Fig. 38) similares a las descritas en la sección anterior para el compuesto **XLVI**. La señal doble en 7.98 ppm podría ser asignada a los protones *orto*- del anillo aromático monosustituido, mientras que la señal múltiple correspondería a las señales triples de los protones *meta*- y *para*- que se encuentran desplazadas y casi sobrepuestas, comparadas con las descritas para el compuesto **XLVI**. Lo anterior está de acuerdo a lo reportado por Pouchert y Behnke (1993) para la sal de sodio del ácido benzoico (**XLV**) (Fig. 39).

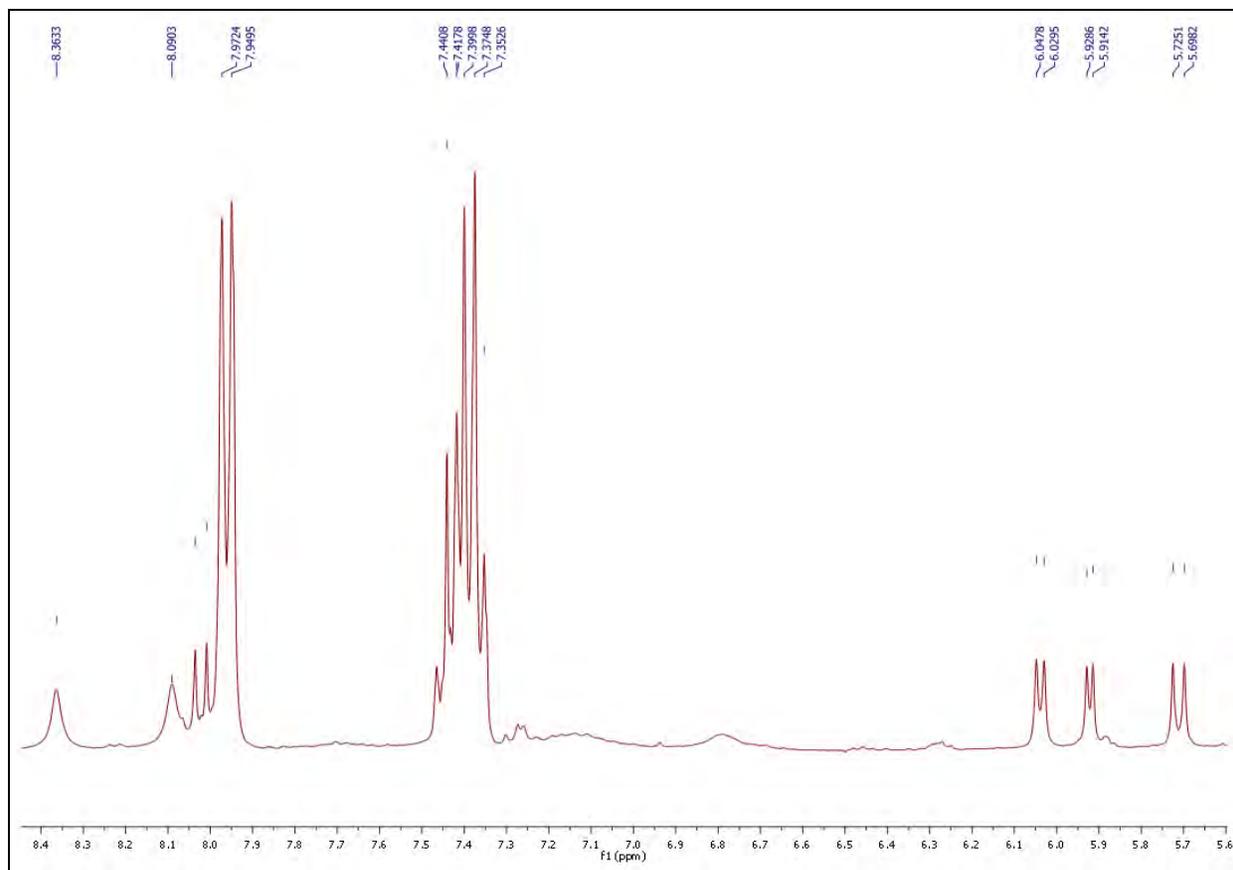


Figura 38. Expansión del espectro de RMN¹H de la fracción L.

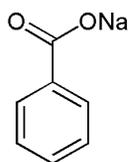


Figura 39. Estructura de compuesto XLV.

En la figura 38 se muestra la región de los protones aromáticos en la que se observan las señales correspondientes a la mezcla de los nucleósidos y el benzoato de sodio, este último en mayor proporción que los compuestos **XLIII** y **XLIV**. De acuerdo con la intensidad de las señales, correspondería a cerca de 60 % para muestra para la sal de sodio y el 20% para cada uno de los nucleósidos; es decir, estarían en una proporción de 3:1:1 en la muestra. Para el caso de las fracciones en donde solamente se encuentra un nucleósido y la sal, las proporciones fueron

aproximadamente de 2:8; es decir, la sal corresponde al 80 % de la muestra, mientras que el nucléosido al 20% restante.

La mayoría de los compuestos aislados de los extractos menos polares de *C. californiana* coinciden con estudios anteriores de otras especies del género; mientras que aquellos aislados de los extractos polares no han sido reportados en estudios previos. Este trabajo constituye el primer estudio químico de la especie.

2) **Actividad Biológica**

Los bioensayos de toxicidad de los extractos y fracciones probadas con *A. salina* resultaron ser negativos con las tres concentraciones probadas; es decir no hubo actividad tóxica sobre *A. salina*.

El hecho de que todos los bioensayos hayan resultado sin actividad para los extractos y/o fracciones utilizadas, no quiere decir que no existan compuestos que posean alguna actividad biológica. Existe la posibilidad de que alguno de los compuestos con actividad se encuentre en proporciones tan pequeñas (minoritarias) que su efecto no sea detectable (Vanden y Vlietink, 1991).

Es importante tomar en cuenta que la mayoría de los compuestos aislados e identificados se encontraron en cantidades menores a las requeridas para los bioensayos de toxicidad, lo cual conllevó a que no se realizará la valoración biológica sobre éstas.

Cabe mencionar que la sulcatina que se aisló y caracterizó en el presente trabajo se ha reportado que posee actividad antiproliferativa en contra de líneas celulares tumorales (Aiello *et al.*, 2000).

CONCLUSIONES

El estudio químico de la esponja marina *Cliona californiana*, condujo a la identificación de 46 compuestos, con base en sus datos espectroscópicos principalmente de RMN, EM y por comparación con datos reportados en la literatura.

Los compuestos aislados se identificaron como una mezcla de 4 esteroides: colesterol (**I**), dehidrocolesterol (**II**), brassicasterol (**III**) y 24-metilenocolesterol (**IV**), así como sus correspondientes mezclas de derivados 7-oxo (**XXIV-XXVII**) y 5,8-epidioxi (**XXVIII-XXXI**); mezclas de ácidos grasos y sus correspondientes ésteres metílicos (**X-XXII**, **XXXII-XLI**); dos nucleósidos (adenosina, **XLIII** y uridina, **XLIV**); el 3-metil-uracilo (**IX**); la sulcatina (**XLII**), el ácido benzoico (**XLVI**) y su respectiva sal de sodio (**XLV**).

El aislamiento de colesterol, dehidrocolesterol, brassicasterol y 24-metilenocolesterol de *Cliona californiana*, está de acuerdo con la presencia de estos metabolitos en otras especies del género *Cliona* estudiadas anteriormente, y de acuerdo con la hipótesis planteada.

Se aislaron mezclas de ácidos grasos C₁₃ a C₂₆ saturados e insaturados y/o ramificados, y sus correspondientes ésteres metílicos, los cuales fueron identificados por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. El presente trabajo constituye el segundo reporte sobre ésteres metílicos de ácidos grasos para el género *Cliona*.

El aislamiento del ácido C_{26:2} 5,9-Hexacosadienoico del grupo denominado como ácidos demospongiacos es característico de la composición lipídica de especies de géneros de la clase Demospongiae y se ha reportado en especies del género *Cliona*. La obtención del ácido es congruente con la obtención de su respectivo éster metílico (**XXII**) como compuesto mayoritario en la mezcla de ésteres de ácidos grasos.

El aislamiento de los derivados 7-oxo del colesterol, brassicasterol y dehidrocolesterol constituye el segundo reporte de estos compuestos en el género *Cliona*.

Se registran por primera vez en el género *Cliona* el 3-metil-uracilo, el 7-oxo-24-metilenocolesterol, los derivados 5 α -8 α -epidioxi de los esteroides I-IV, los nucleósidos adenosina y uridina, sulcatina, el ácido benzoico y su sal sodio.

La mayoría de los compuestos aislados de los extractos menos polares de *C. californiana* están de acuerdo con estudios anteriores de otras especies del género; mientras que aquellos aislados de los extractos polares no han sido reportados en estudios previos.

Las pruebas de actividad biológica probadas con extractos y fracciones frente a *Artemia salina* no presentaron algún efecto de toxicidad; sin embargo, no significa que no existan compuestos en estos que posean alguna actividad biológica.

RECOMENDACIONES

Se recomienda continuar con el análisis de los extractos butanólico y acuoso de la tercera colecta para comprobar la reproducibilidad de los análisis anteriores y con el objeto de obtener cantidades adicionales de aquellos compuestos que no lograron ser identificados debido a que se obtuvieron en cantidades muy pequeñas.

BIBLIOGRAFÍA

- Aiello A, Fattorusso E, Menna M, Iuvone T. 2000. Sulcatin, a Novel Antiproliferative *N*-Methylpyridinium Alkaloid from the Ascidian *Microcosmus vulgaris*. *J Nat Prod* 63(4): 527-519.
- Akihisa T, Shimizu N, Ghosh P, Thakur S, Rosenstein FU, Tamura T, Matsumoto T. 1987. Sterols of the Cucurbitaceae. *Phytochemistry* 26(6): 1693-1700.
- Andersen RJ. 1978. Tetracetyl clionamide, a 6-bromotryptophan derivative from the sponge *Cliona celata*. *Tetrahedron Lett* (29): 2541-4.
- Andersen RJ, Stonard RJ. 1979. Clionamide, a major metabolite of the sponge *Cliona celata* Grant. *Can J Chem* 57(17): 2325-8.
- Anta C, Gonzalez N, Santafe G, Rodriguez J, Jimenez C. 2002. New xenia diterpenoids from the Indonesian soft coral *Xenia sp.* *J Nat Prod* 65(5): 766-768.
- Bergmann W, McTigue FH, Low EM, Stokes WM, Feeney RJ. 1950. Marine products. XXVI. Sterols from sponges of the family Suberitidae. *J Org Chem* 15:96-105.
- Bernáth G, Stáger G, Szabó AE, Szóke-Molnár Z. 1987. Stereochemical studies 107. Saturated heterocycles 111. Preparation of uracils via cycloreversion of norbornene-fused pyrimidinediones. *Tetrahedron* 43(8): 1921-1930.
- Brunel JM, Loncle C, Vidal N, Dherbomez M, Letourneux Y. 2005. Synthesis and antifungal activity of oxygenated cholesterol derivatives. *Steroids* 70: 907-912.
- Camacho-Cruz ML. 2007. Dinámica poblacional y crecimiento de *Cliona californiana* (Porifera: Hadromerida) en la Bahía de Ohuira (Topolobampo, Sinaloa). Tesis de Maestría. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología: Universidad Nacional Autónoma de México. 79 p.
- Carballeira NM, Negrón V, Porras B, Díaz BA. 1988. On the hydrocarbon composition of caribbean sponges. Preliminary study. *Mar Chem* 24(2): 193-198.

-
- Carballeira NM, Maldonado L. 1988. The phospholipids fatty acids of the marine sponge *Xestospongia muta*. *Lipids* 23(7): 682-684.
- Carballeira NM, Maldonado ME, Rivera E, Porras B. 1989. The fatty acid 4,8,12-trimethyltridecanoic as a common constituent of the phospholipids of the sponge families Spirastrellidae and Clionidae. *Biochem Syst Ecol* 17(4): 311-141.
- Carballeira NM, Reyes ED. 1990. Identification of the new 23-methyl-5,9-pentacosadienoic acid in the sponge *Cribrochalina vasculum*. *Lipids* 25(1): 69-71.
- Carballo JL, Cruz-Barraza JA, Gómez P. 2004. Taxonomy and description of clionaid sponges (Hadromerida, Clionidae) from the Pacific Ocean of Mexico. *Zoological Journal of the Linnean Society* 141:353-397
- Castellanos L, Duque C, Rodríguez J, Jiménez C. 2006. Synthesis of acetylhomogmatine. *Marine Drugs* 4(4): 286-289.
- Castellanos L, Duque C, Zea S, Espada A, Rodriguez J, Jimenez. 2006. Isolation and Synthesis of (-)-(5S)-2-Imino-1-methylpyrrolidine-5-carboxylic Acid from *Cliona tenuis*: Structure Revision of Pyrostatins. *Org Lett* 8(21): 4967-4970
- Castellanos L, Duque C. 2008. Chemical composition and antifouling activity of the lipid fraction of the Caribbean marine sponge *Cliona tenuis* (Clionidae). *Rev Colomb Quim* 37(3): 259-274.
- Chaves-Fonnegra A, Castellanos L, Zea S, Duque C, Rodríguez J, Jiménez C. 2008. Clionapyrrolidine A-A Metabolite from the Encrusting and Excavating Sponge *Cliona tenuis* that Kills Coral Tissue upon Contact. *J Chem Ecol* 34(12): 1565-1574.
- Christomanos AA, Norton AB. 1974. Pigments of the sponges *Aplysina aerophoba* and *Cliona schmidtii*. *Folia Biochimica et Biologica Graeca* 11(1-2): 10-20.
- Cordeiro da Silva A, Kratz JM, Farias FM, Henriques AT, dos Santos J, Leonel RM, Lerner C, Mothes B, Barardi CRM, Simoes CMO. 2006. In vitro antiviral activity of marine sponges collected off Brazilian coast. *Biol Pharm Bull* 29(1): 135-140.

-
- Della Greca M, Mangoni L, Molinaro A, Monaco P, Previtera L. 1990. 5 β ,8 β -Epidioxyergosta-6,22-dien-3 β -ol from *Typha latifolia*. *Gazzeta Chimica Italiana*, 120: 391-392.
- Duarte IF, Marques J, Ladeira AF, Rocha C, Lamago I, Calheiros R, Silva TM, Marques MPM, Melo JB, Carreira IM, Gil AM. 2009. Analytical Approaches toward Successful Human Cell Metabolome Studies by NMR Spectroscopy. *Anal Chem* 81: 5023-5032.
- Erdman TR, Thomson RH. 1978. Sterols from the sponges *Cliona celata* and *Hymeniacidon perleve*. *Tetrahedron* 28(20): 5123-73.
- Fattorusso E, Tagliatela-Scafati O, Petrucci F, Bavestrello G, Calcinai B, Cerrano C, Di Meglio P, Ianaro A. 2004. Polychlorinated androstanes from the burrowing sponge *Cliona nigricans*. *Org Lett* 6(10): 1633-1635.
- Findlay JA, Patil AD. 1985. Novel sterols from the finger sponge *Haliclona oculata*. *Can J Chem* 63: 2406-2410.
- Garson MJ. 2001. Ecological Perspectives on marine natural products biosynthesis. En: *Marine Chemical Ecology*. McClintock JB, Baker BJ. (Ed.). United States of America: CRC Press. p 71-72.
- Gauvin A, Smadja J, Aknin M, Faure R, Gaydou EM. 2000. Isolation of bioactive 5 α ,8 α -epidioxy sterols from marine sponge *Luffariella cf. variabilis*. *Can J Chem* 78: 986-992.
- Giner JL, Zhao H, Beach DH, Parish EJ, Jayasimhulu K, Kaneshiro ES. 2002. Comprehensive and definitive structural identities of *Pneumocystis carinii* sterols. *J Lipid Res* 43: 1114-1124.
- Granato AC, de Oliveira JHHL, Selegim MHR, Berlinck RGS, Macedo ML, Ferreira AG, da Rocha RM, Hajdu E, Peixinho S, Pessoa CO, Moraes MO, Cavalcanti BC. 2005. Natural products from the ascidian *Botrylloides giganteum*, from the sponges *Verongula gigantea*, *Ircinia felix*, *Cliona delitrix* and from the nudibranch *Tambja eliora*, from the Brazilian coastline. *Quim Nova* 28(2): 192-198.

-
- Grasselli JG, Ritchey WM. 1975. Atlas of spectral data and physical constants for organic compounds. Vol. II. (2da. Ed.) CRC Press: USA. p 386.
- Green G, Gómez P. 1984. Sistemática de las esponjas de Puerto Morelos, Quintana Roo, México. Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología: Universidad Nacional Autónoma de México 11(1): 65-90.
- Gunatilaka AAL, Gopichand Y, Schmitz FJ, Djerassi C. 1981. Minor and trace sterols in marine invertebrates. 26. Isolation and structure elucidation on nine new 5 α ,8 α -Epidioxy sterols from four marine organisms. J Org Chem 46: 3860-3866.
- Harper MK, Bugni TS, Copp BR, Janes RD, Lindsay BS, Richardson AD, Schnabel PC, Tasdemir D, VanWagoner RM, Verbitski SM, Ireland CM. 2001. Introduction to the Chemical Ecology of Marine Natural Products. En: Marine Chemical Ecology. McClintock JB, Baker BJ. (Ed.) Unites Stated of America: CRC Press. p 10-47.
- Hahn S, Stoilov IL, Ha TBT, Raederstorff D, Doss GA, Li HT, Djerassi C. 1988. Biosynthetic studies of marine lipids. 17. The curse of chain elongation and desaturation in long-chain fatty acids of marine sponges. J Am Chem Soc 110: 8117-8124.
- Hossain MB, Van der Helm D, Sanduja R, Alam M. 1988. Structure of 3-O-acetylgibberellin A3. Acta Crystallogr, Sect C: Cryst Struct Commun C44(6): 1022-1024.
- Kehraus S, Gorzalka S, Hallmen C, Iqbal J, Miller CE, Wright AD, Wiese M, Knig G. 2004. Novel Amino Acid Derived Natural Products from Ascidian *Antrium robustus*: Identification and Pharmacological Characterization of a Unique Adenosine Derivative. J Med Chem 47(9): 2243-2255.
- Keyzers RA, Daoust J, Davies-Coleman MT, Van Soest R, Balgi A, Donohue E, Roberge M, Andersen RJ. 2008. Autophagy-Modulating Aminosteroids Isolated from the Sponge *Cliona celata*. Org Lett 10(14): 2959-2962.

-
- Kupchan SM, Britton RW, Lacadie JA, Ziegler MF, Sigel CW. 1975. Tumor inhibitors. 100. Isolation and structural elucidation of bruceantin and bruceantanol, new potent antileukemic quassinoids from *Brucea antidysenterica*. *J Org Chem* 40(5): 648-654.
- Lara-Guadarrama JC. 1985. Extracción e identificación de compuestos químicos de las gónadas de erizo de mar *Strongylocentrotus franciscanus*. Tesis de Licenciatura. Escuela Superior de Ciencias Marinas:Universidad Autónoma de Baja California.
- Li G, Li B, Liu G, Zhang G. 2005. Sterols from *Aspergillus ochraceus* 43. *Chin J Appl Environ Biol* 11(5): 67-70.
- Litchfield C, Tyszkiewicz J, Marcantonio EE, Noto G. 1979. 15,18,21,24-triacontatetraenoic and 15,18,21,24,27-triacontapentaenoic acids: new C30 fatty acids from the marine sponge *Cliona celata*. *Lipids* 14(7): 619-22.
- Lemke TL, Sanduja R, Morue MM, Iyer S, Alam M, Hossain MB, Van der Helm D. 1990. Isolation, synthesis, and evaluation of a series of indenecarbazates as hypotensive agents. *J Pharm Sci* 79(9): 840-844.
- Lenis LA, Nunez L, Jiménez C, Riguera R. 1996. Isonitenin and acetylhomogmatine, new metabolites from the sponges *Spongia officinalis* and *Cliona celata* collected at the Galician coast (N.W. Spain). *Nat Prod Lett* 8(1): 15-23.
- Lo JM, Wang WL, Chiang YM, Chen CM. 2001. Ceramides from Taiwan red alga *Ceratodictyon spongiosum* and symbiotic sponge *Sigmatocia symbiotica*. *J Chin Chem Soc* 48: 821-826.
- Lu W, Zhang C, Zeng L, Su J. 2004. Synthesis of polyhydroxysterols (V): efficient and stereospecific synthesis of 24-methylene-cholest-5-ene-3 β ,7 α -diol and its C-7 epimer. *Steroids* 69: 803-808.
- Marques D, Esteves AI, Xavier J, Almeida M, Humanes M. 2006. Marine sponge *Cliona celata* as a potential bioindicator. *Metal Ions in Biology and Medicine* 9: 451-456.
- Marques D, Esteves AI, Almeida M, Xavier J, Humanes M. 2008. Superoxide dismutase in the marine sponge *Cliona celata*. *Mar Biol* 153(5): 807-813.

-
- Martin GE, Sanduja R, Alam M. 1985. Two-dimensional NMR studies of marine natural products. 2. Utilization of two-dimensional proton double quantum coherence NMR spectroscopy in natural products structure elucidation on - determination of long-range couplings in plumericin. *J Org Chem* 50(13): 2383-2386.
- Massey IJ, Djerassi C. 1979. Structural and stereochemical applications of mass spectrometry in the marine sterol field. Synthesis and electron impact induced mass spectral fragmentation of Δ^{24} - and $\Delta^{24(28)}$ - 3β -Hydroxy- Δ^5 -sterols. *J Org Chem* 44(14): 2448-2456.
- Matsui M, Kamiya K, Shibata K, Muramatsu H. 1990. Ozonolysis of substituted uracils. *J Org Chem* 55(4): 1396-1399.
- McLaughlin JL, Chang C, Smith DL. 1988. Simple Bioassays for the Detection and Isolation of Bioactive Natural Products. In: Proceedings Argens, France Meeting. France.
- Mena PL, Pilet O, Djerassi C. 1984. Phospholipids studies of marine organisms. 7. Stereospecific synthesis of (5Z,9Z)-, (5Z,9E)-, (5E,9Z)-, and (5E,9E)-5,9-Hexacosadienoic acid. *J Org Chem* 49: 3260-3264.
- Miyamoto T, Honda M, Sugiyama S, Higuchi R, Komori T. 1988. Isolation and structure of two 5,8 α -Epidioxysterols and a Cholesteryl Ester Mixture from the Albumen Gland of *Aplysia juliana*. *Liebigs Ann Chem* 589-592.
- Morel JL, Drobecq H, Sautiere P, Tartar A, Mironneau J, Qar J, Lavie JL, Hugues M. 1997. Purification of a new dimeric protein from *Cliona vastifica* sponge, which specifically blocks a non-L-type calcium channel in mouse duodenal myocytes. *Mol Pharmacol* 51(6): 1042-1052.
- Moura RM, Queiroz AFS, Fook JMSLL, Dias ASF, Monteiro NKV, Ribeiro JKC, Moura GEDD, Macedo LLP, Santos EA, Sales MP. 2006. CvL, a lectin from the marine sponge *Cliona varians*: isolation, characterization and its effects on pathogenic bacteria and *Leishmania promastigotes*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular and Integrative Physiology* 145A(4): 517-523.

-
- Norton A. 1971. Nature of the sponge *Cliona schmidtii*. *Folia Biochimica et Biologica Graeca* 8(3-4): 137.
- Notaro G, Piccialli V, Sica D, Corriero G. 1991. 3β , 5α , 6β -Trihydroxylated sterols with a saturated nucleus from two populations of the marine sponge *Cliona copiosa*. *J Nat Prod* 54(6): 1570-1575.
- Notaro G, Piccialli V, Sica D. 1992. New steroidal hydroxyketones and closely related diols from the marine sponge *Cliona copiosa*. *J Nat Prod* 55(11): 1588-1594.
- Palermo JA, Rodriguez Brasco MF, Seldes AM. 1996. Storniamides A-D: alkaloids from a Patagonian sponge *Cliona sp.* *Tetrahedron* 52(8): 2727-34.
- Palermo JA, Rodriguez Brasco MF, Cabezas E, Balzaretti V, Seldes AM. 1998. Celenamide E, a tripeptide alkaloid from the Patagonian sponge *Cliona chilensis*. *J Nat Prod* 61(4): 488-490.
- Paul VJ. 1992. Chemical Defenses of Benthic Marine Invertebrates. En: *Ecological Roles of Marine Natural Products*. Paul VJ. Ithaca and London: Cornell University Press. p 164-188.
- Pouchert CJ, Behnke J. 1993. *The Aldrich Library of ^{13}C and ^1H FT NMR Spectra*. Aldrich Chemical Company, Inc. USA, Vol. 3: 563-617.
- Pruchnik FP, Pruchnik H, Ostropolska L, Ciunik LZ. 2008. Tris(2-cyanoethyl)tin(IV) bromide and tris(2-cyanoethyl)tin(IV) iodine, their structure, properties and reactions with adenosine, AMP and ATP. *Polyhedron* 27: 1093-1101.
- Queiroz AFS, Moura RM, Ribeiro JKC, Lyra IL, Cunha DCS, Santos E, de-Sales MP. 2008. Pro-inflammatory effect in mice of CvL, a lectin from the marine sponge *Cliona varians*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology and Pharmacology* 147C(2): 216-221.
- Rovirosa J, Munoz O, San Martin A. 1984. Sterols from the sponge *Cliona chilensis*. *Anales de Quimica, Serie C: Quimica Organica y Bioquimica* 80(2): 193-194.

-
- Rubinstein I, Goad LJ, Clague ADH, Mulheirn LJ. 1976. The 220 MHz NMR spectra of phytosterols. *Phytochemistry* 15: 195-200.
- Sánchez-Nava AT. 2006. Aislamiento y determinación estructural de los compuestos provenientes de la esponja marina *Sphaciospongia confoederata*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Marinas: Universidad Autónoma de Baja California. 52 p.
- Santafe G, Vargas Y, Hoyos L, Torres O, Zuluaga J. 2005. Chemistry of the lipid fraction of marine sponges from Cordoba (Colombia). *Actualidades Biologicas (Medellin, Colombia)* 27(Supl. 1): 95-100.
- Santalova EA, Makarieva TN, Gorshkova IA, Dmitrenok AS, Krasokhin VB, Stonik VA. 2004. Sterols from six marine sponges. *Biochem Syst Ecol* 32: 153-167.
- Sawangwong P, Wattanadilok R, Kijjoa A, Silva AMS, Eaton G, Herz W. 2008. Secondary metabolites from a marine sponge *Cliona patera*. *Biochem Syst Ecol* 36(5-6), 493-496.
- Schmitz FJ. 1978. Uncommon marine steroids. In: *Marine Natural Products: Chemical and Biological Perspectives*. Scheuer PJ. United States of America: Academic Press, Inc. p Vol. 1: 240-293.
- Selegim MHR, Lira SP, Kossuga MH, Batista T, Berlinck RGS, Hajdu E, Muricy G, da Rocha RM, do Nascimento GGF, Silva M, Pimenta EF, Thiemann OH, Oliva G, Cavalcanti BC, Pessoa C, de Moraes MO, Galetti FCS, Silva CL, de Souza AO, Peixinho S. 2007. Antibiotic, cytotoxic and enzyme inhibitory activity of crude extracts from Brazilian marine invertebrates. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 17(3): 287-318.
- Sica D, De Simone F, Ramundo E, Zollo F. 1978. Sterols from some sponges. *Biochem Syst Ecol* 6(1): 77-79.
- Still IW, Plavac N, McKinnon DM, Chauhan MS. 1978. Carbon 13-nuclear magnetic resonance spectra of *N*-, *O*-, and *S*-methylated uracil and thiouracil derivatives. *Can J Chem* 56 (5): 725-729.

-
- Stonard RJ, Andersen RJ. 1980. Linear peptide alkaloids from the sponge *Cliona celata* (Grant). Celenamides C and D. *Can J Chem* 58(20): 2121-2126
- Stonard RJ, Andersen RJ. 1980. Celenamides A and B, linear peptide alkaloids from the sponge *Cliona celata*. *J Org Chem* 45(18): 3687-3691.
- Shukla V, Negi S, Rawat MSM, Pant G, Nagatsu A. 2004. Chemical study of *Ramalina africana* (Ramalinaceae) from the Garhwal Himalayas. *Biochem Syst Ecol* 32: 449-453.
- Valentine FRJr, Bergmann W. 1941. Marine products. VIII. The sterols of sponges: clionasterol and poriferasterol. *J Org Chem* 6: 452-461.
- Vanden DA, Vlietinck AJ. 1991. Screening methods for antibacterial and antiviral agents from hight plants. En: *Methods in plant biochemistry*. Dey PM, Harborne JB. Academic Press London: England. p 47-69.
- Vázquez-Maldonado LE. 1998. Estudio químico de la esponja marina *Xestospongia subtriangularis*. Tesis de Maestría. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología: Universidad Nacional Autónoma de México. 144 p.
- Wang F, Tan JW, Liu JK. 2004. Vibraticilin: A novel compound from the Basidiomycete *Cortinarius vibratis*. *Helv Chim Acta* 87: 1912-1915.
- Wright JLC, McInnes AG, Shimizu S, Smith DG, Walter JA. 1978. Identification of C-24 alkyl epimers of marine sterols by ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Can J Chem* 56: 1898-1903.