



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA**

**“AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS DE
Aplysina clathrata (Demospongiae: Verongiida) DE PUNTA
ARENA DE LA VENTANA, BAJA CALIFORNIA SUR, MÉXICO”**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA:
BIOL. RICARDO MARTÍNEZ GÓMEZ**

**TUTOR PRINCIPAL:
DR. LEOVIGILDO QUIJANO
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR:
DR. ROBERTO ARREGUÍN ESPINOSA DE LOS MONTEROS
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM.**

**DRA. CLAUDIA JUDITH HERNÁNDEZ GUERRERO
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL- CICIMAR.**

**DR. JOSÉ LUIS CARBALLO CENIZO
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA-MAZATLÁN, UNAM.**

**DR. FRANCISCO CRUZ SOSA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA- IZTAPALAPA.**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. MARZO, 2019



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.



**“AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS DE
Aplysina clathrata (Demospongiae: Verongiida) DE PUNTA
ARENA DE LA VENTANA, BAJA CALIFORNIA SUR, MÉXICO”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:
BIOL. RICARDO MARTÍNEZ GÓMEZ

TUTOR PRINCIPAL:
DR. LEOVIGILDO QUIJANO
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

COMITÉ TUTOR:
DR. ROBERTO ARREGUÍN ESPINOSA DE LOS MONTEROS
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM.

DRA. CLAUDIA JUDITH HERNÁNDEZ GUERRERO
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL- CICIMAR.

DR. JOSÉ LUIS CARBALLO CENIZO
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA-MAZATLÁN, UNAM.

DR. FRANCISCO CRUZ SOSA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA- IZTAPALAPA.

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. MARZO, 2019


POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

DOCUMENTO FINAL DE TESIS PARA SER ENVIADO A
INTEGRANTES DEL JURADO DE EXAMEN DE GRADO PARA
REVISIÓN

NOMBRE DEL ALUMNO: RICARDO MARTÍNEZ GÓMEZ

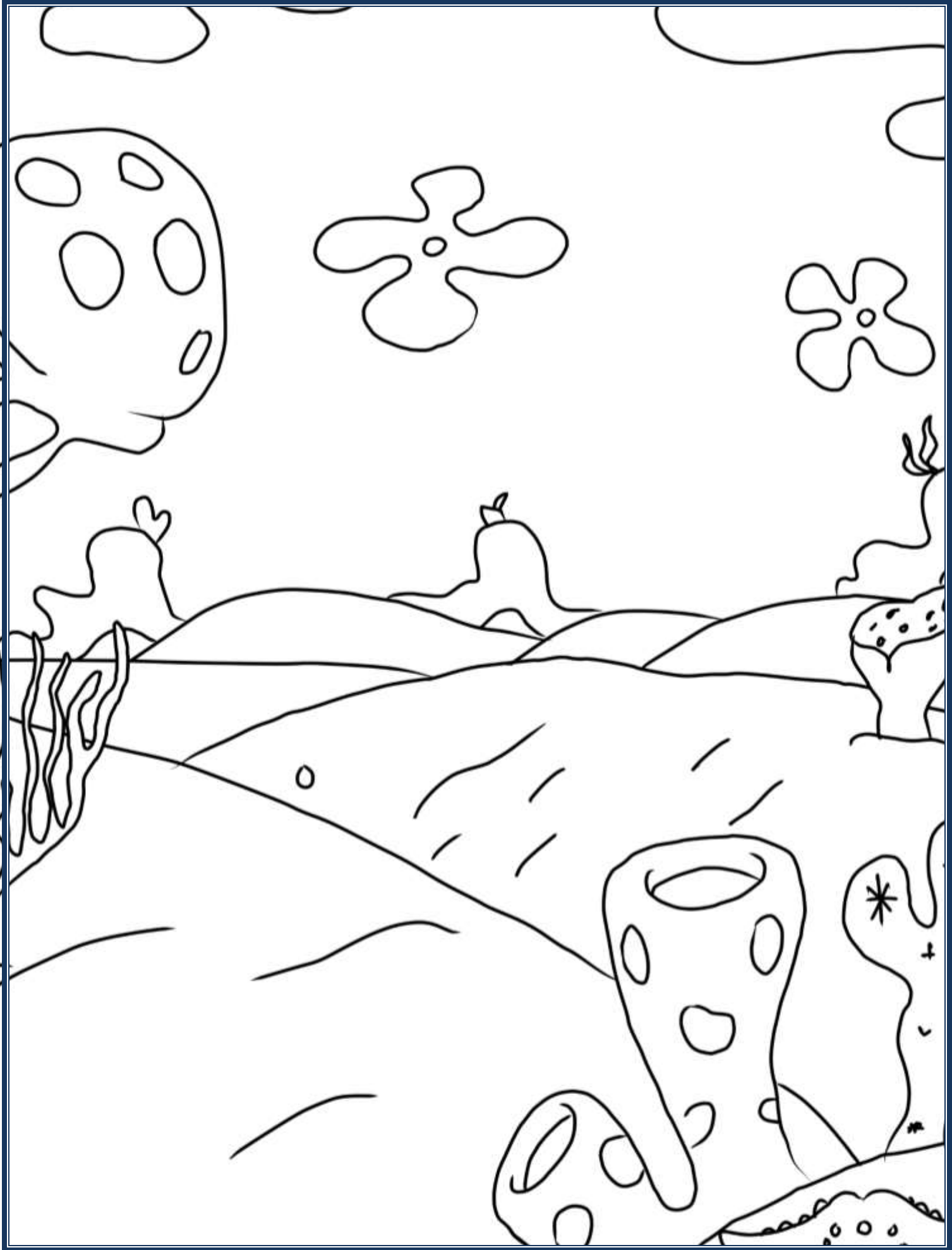
SEMESTRE ACTUAL (MAESTRÍA): 4º SEMESTRE

TITULO DE LA TESIS: "AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE
METABOLITOS DE *Aplysina clathrata* (Demospongiae: Verongiida)
DE PUNTA ARENA DE LA VENTANA, BAJA CALIFORNIA SUR,
MÉXICO"



DR. LEOVIGILDO QUIJANO
INSTITUTO DE QUÍMICA. UNAM

CDMX, 07 DE ENERO DE 2019





El presente trabajo se realizó en el laboratorio 2-6 del departamento de “Productos Naturales” del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (IQ-UNAM), bajo la dirección del Dr. Leovigildo Quijano y con beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo otorgado en la realización de este proyecto por medio de la beca (No. 823131) de posgrado durante mis estudios de maestría.

A mi tutor principal de tesis Dr. Leovigildo Quijano del Instituto de Química-UNAM, por su apoyo y guía en la realización de este trabajo y por brindarme el material requerido para poder llevar a cabo la parte experimental del trabajo.

A la Dra. Claudia Hernández Guerrero del Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR-IPN), por proporcionar las muestras de esponja y por las correcciones realizadas al presente trabajo.

A la Bióloga Patricia Gómez del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología-UNAM, por la identificación de la especie estudiada.

A los miembros del comité tutorial: Dr. Roberto Arreguín Espinosa De Los Monteros del Instituto de Química-UNAM, Dr. Francisco Cruz Sosa de la Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa y Dr. José Luis Carballo Cenizo del Instituto de Ciencias Del Mar y Limnología-Mazatlán, por el tiempo dedicado a la revisión y corrección realizadas a este trabajo.

Al Laboratorio Universitario de Resonancia Magnética Nuclear (LURMN) del Instituto de Química-UNAM, fundado por CONACyT-México (proyecto 0224747), y a los técnicos a cargo (Dra. Beatriz Quiroz García y Dra. Nuria Esturau Escofet).

Agradecimientos

A los técnicos académicos del Instituto de Química por la ayuda en la realización de los diferentes experimentos realizados: RMN (M. en C. Elizabeth Huerta, M. en C. María de los Ángeles Peña González, M. en C. Héctor Ríos Olivares y Dra. Isabel Chávez Uribe); EM (Dr. Francisco Javier Pérez Flores, I. Q. Luis Velasco Ibarra, Dra. María del Carmen García González, M. en C. Lucía del Carmen Márquez Alonso y M. en C. Lucero Mayra Ríos Ruiz).

Y un agradecimiento especial a la M. en C. Rocío Aguilar, por su apoyo y asesoría técnica en la realización de este trabajo.

ÍNDICE

Resumen	I
Abreviaturas	III
I. Introducción	1
II. Generalidades	3
II.1 Phylum Porifera	3
II.2 Morfología general	5
III. Antecedentes	11
IV. Justificación	23
V. Objetivos	25
V.1 General	25
V.2 Particulares	25
VI. Metodología	27
VI.1 Zona de estudio	27
VI.2 Muestreo	28
VI.3 Identificación taxonómica	28
VI.4 Obtención de extractos	29
VI.5 Separación y purificación de los componentes de los extractos	29
VI.6 Identificación química	30
VII. Parte experimental	33

VII.1 Taxonomía	33
VII.2 Extractos de <i>A. clathrata</i>	36
VII.2.1 Extracto hexánico	37
VII.2.2 Extracto de DCM	37
VII.2.3 Extracto de acetona	38
VII.2.4 Extracto metanólico	40
VIII. Resultados y Discusiones	41
VIII.1 Compuestos aislados	41
VIII.1.1 Ácidos grasos	41
VIII.1.2 Esteroles	46
VIII.1.3 Derivados de bromo tirosina	50
VIII.1.4 Derivado de bases nitrogenadas	65
IX. Conclusiones	69
X. Perspectivas	71
XI. Bibliografía	73
XII. Anexos	87

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura II-1. Ejemplo de formas de crecimiento en poríferos. (Modificado de Gómez, 2002).....	6
Figura II-2. Tipos morfológicos de esponjas (epidermis y mesohilo en blanco, coanoderma en negro). A Asnconoide. B Siconoide. C Leuconoide. (Modificado de Barnes, 1969).....	8
Figura II-3. Algunas espículas silíceas (macroscleras) de demosponjas. (Modificado de García-Moreno et al., 2011)	9
Figura II-4. Algunas espículas de esponjas calcáreas. (Modificado de García-Moreno et al., 2011).	9
Figura VI-1. Zona de colecta de los organismos en Punta Arena de la Ventana, B.C.S., México.....	27
Figura VII-1. Fotografía de <i>Aplysina clathrata</i>	35
Figura VII-2. Diagrama de flujo de la metodología general para la obtención de extractos.....	36
Figura VII-3. Diagrama de flujo de la separación del extracto hexánico.....	37
Figura VII-4. Diagrama de flujo de la separación del extracto de acetona. Se muestran solo las fracciones que se continuaron trabajando.....	38
Figura VIII-1. Cromatograma de Gases-Masas de la fracción HAc-C	42
Figura VIII-2. Cromatograma de Gases-Masas de la fracción HAc-E	47
Figura VIII-3. Espectro de RMN- ¹ H (400 MHz / CDCl ₃) de aplysterol (14)	49
Figura VIII-4. Correlaciones observadas en el espectro HMBC.	58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla III-1. Compuestos aislados de esponjas con posible uso farmacéutico.	12
Tabla III-2. Clasificación de los compuestos bromados según Silva-Lira et al., 2011.	15
Tabla III-3. Compuestos aislados de diferentes especies de <i>Aplysina</i>	17
Tabla III-4. Metabolitos derivados de bromotirosina con actividad biológica.	19
Tabla VIII-1. Ácidos grasos identificados en la fracción HAc-C.....	43
Tabla VIII-2. Datos de RMN- ¹³ C (125 MHz) y RMN- ¹ H (500 MHz) del compuesto 18 en acetona-d ₆	58

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Espectro de masas del ácido tetradecanoico (1)	87
Anexo 2. Espectro de masas del ácido pentadecanoico (2)	87
Anexo 3. Espectro de masas del ácido 11-hexadecenoico (3)	88
Anexo 4. Espectro de masas del ácido hexadecanoico (4)	88
Anexo 5. Espectro de masas del ácido heptadecanoico (5)	89
Anexo 6. Espectro de masas del ácido 13-heptadecenoico (6)	89
Anexo 7. Espectro de masas del ácido 9-octadecenoico (7)	90
Anexo 8. Espectro de masas del ácido nonadecanoico (8)	90
Anexo 9. Espectro de masas del ácido 13-nonadecenoico (9)	91
Anexo 10. Espectro de masas del colesterol (10)	91
Anexo 11. Espectro de masas del ergosta-5,22-dien-3-ol (11)	92
Anexo 12. Espectro de masas del ergosta-5-en-3-ol (12)	92
Anexo 13. Espectro de masas del 25-dehidroaplysterol (13)	93
Anexo 14. Espectro de masas del aplysterol (14)	93
Anexo 15. Espectro de RMN- ¹ H (400 MHz / acetona-d ₆) de aerothionina (15)	94
Anexo 16. Espectro de RMN- ¹³ C (125 MHz / acetona-d ₆) de aerothionina (15)	94
Anexo 17. Espectro de RMN- ¹ H (500 MHz / acetona-d ₆) de fistularina-3 (16)	95
Anexo 18. Espectro de RMN- ¹³ C (125 MHz / acetona-d ₆) de fistularina-3 (16)	95
Anexo 19. Espectro de RMN- ¹ H (500 MHz / CDCl ₃) de aplysinólida (17)	96
Anexo 20. Espectro de RMN- ¹³ C (125 MHz / CDCl ₃) de aplysinólida (17)	96
Anexo 21. Espectro de masas (EM-IE) de aplysinólida (17)	97
Anexo 22. Espectro de RMN- ¹ H (500 MHz / acetona-d ₆) de la lactona 18	98
Anexo 23. Espectro de RMN- ¹³ C (125 MHz / acetona-d ₆) de la lactona 18	98

Anexo 24- Espectro HMBC de la lactona 18	99
Anexo 25. Espectro de masas (EM-IE) de la lactona 18	99
Anexo 26. Espectro de RMN- ¹ H de la mezcla de compuestos 19, 20 y 21 (azul; 400 MHz / acetona-d ₆) y espectros separados con el programa MestreNova.....	100
Anexo 27. Espectro de RMN- ¹³ C de la mezcla de compuestos 19, 20 y 21 (azul; 125 MHz / acetona-d ₆) y espectros separados con el programa MestreNova.....	101
Anexo 28. Espectro COSY de la mezcla de compuestos 19, 20 y 21	102
Anexo 29. Espectro HMBC de la mezcla de compuestos 19, 20 y 21	102
Anexo 30. Espectro de masas (EM-IE) de la mezcla de compuestos 19, 20 y 21	103
Anexo 31. Espectro de RMN- ¹ H (500 MHz / acetona-d ₆) de aeroplysinina-2 (22)	104
Anexo 32. Espectro de RMN- ¹ H (500 MHz / acetona-d ₆) de aeroplysinina-2 (22)	104
Anexo 33. Espectro de masas (EM-IE) de aeroplysinina-2 (22)	105
Anexo 34. Espectro de RMN- ¹ H (500 MHz / acetona-d ₆) de subereafenol B (23)	106
Anexo 35. Espectro de RMN- ¹³ C (125 MHz / acetona-d ₆) de subereafenol B (23)	106
Anexo 36. Espectro de masas (EM-IE) de subereafenol B (23)	107
Anexo 37. Espectro de RMN- ¹ H (500 MHz / DMSO-d ₆) de uracilo (24) y timina (25)	108
Anexo 38. Espectro de RMN- ¹³ C (125 MHz / DMSO-d ₆) de uracilo (24) y timina (25)	108
Anexo 39. Espectro de masas (EM-IE) de uracilo (24) y timina (25)	109
Anexo 40. Espectro de RMN- ¹ H (500 MHz / MeOD) de timidina (26)	110

Anexo 41. Espectro de RMN-¹³C (125 MHz / MeOD) de **timidina (26)**..... 110

Anexo 42. Espectro de masas de alta resolución (HR-DART-MS) de **timidina (26)**.
..... 111

Resumen

Desde 1950 las investigaciones sobre aislamiento y la elucidación estructural de compuestos marinos han tomado gran importancia a tal punto que en la actualidad se conocen más de 18,000 sustancias bioactivas aisladas de organismos marinos, principalmente holoturias, esponjas, octocorales y tunicados, siendo las esponjas las fuentes más estudiadas y prometedoras de nuevas sustancias potenciales para el desarrollo de fármacos.

Los metabolitos secundarios de las esponjas marinas del orden Verongiida han mostrado gran interés debido a que son fuente de productos naturales bioactivos. Las esponjas del género *Aplysina* se caracterizan por presentar una gran variedad de compuestos derivados de la dibromotirosina.

Los ejemplares se recolectaron en Punta Arena de la Ventana, B.C.S., México. (23° 59'N y 109° 49'O). La identificación taxonómica se realizó por la Biol. Patricia Gómez del ICMYL-UNAM.

Se recolectaron 1.44 kg de esponja, peso húmedo, que se secaron por medio de liofilización, obteniendo 322 g de material seco liofilizado. Una muestra de 250 g se realizó la extracción por percolación con disolventes de polaridad ascendente (hexano, diclorometano, acetona y metanol).

Para la separación de los componentes se usaron técnicas cromatográficas convencionales [cromatografía en columna (CC) y cromatografía en capa fina preparativa (CCFp)] y para la identificación de los componentes: técnicas espectroscópicas principalmente RMN ¹H y ¹³C, y espectrometría de masas (EM).

Se aislaron e identificaron espectroscópicamente nueve ácidos grasos (ácido tetradecanoico, ácido pentadecanoico, ácido 11-hexadecenoico, ácido hexadecanoico, ácido heptadecanoico, ácido 13-heptadecenoico, ácido 9-octadecenoico, ácido nonedecanoico y ácido 13-nonedecenoico); cinco esteroides (colest-5-en-3-ol (colesterol), ergosta-5,22-dien-3-ol, ergosta-5-en-3-ol, 25-dehydroaplysterol y aplysterol); nueve compuestos derivados de la bromotirosina (aerotionina, fistularina-3, aplysinólida, las lactonas **18**, **20** y **21**, el ácido **19**, aeroplysinina-2 y subereaefenol B) y tres derivados de bases nitrogenadas (timina, uracilo y timidina).

Aplysina clathrata _____



Abreviaturas

Abreviatura	Significado
°C	Grados centígrados
¹³ C	Carbono 13
Ac	<i>Aplysina clathrata</i>
CC	Cromatografía en columna
CCFa	Cromatografía en capa fina analítica
CCFp	Cromatografía en capa fina preparativa
CD ₃ OD	Metanol deuterado
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CO ₂	Dióxido de Carbono
COSY	CORrelation Spectroscopy (Espectroscopía de Correlación ¹ H- ¹ H en dos dimensiones)
<i>d</i>	Señal doble
D ₂ O	Agua Deuterada
<i>da</i>	Señal doble ancha
DCM	Diclorometano
<i>dd</i>	Señal doble de dobles
<i>ddd</i>	Señal doble de doble de dobles
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer (Incremento de señal sin distorsión por transferencia de polarización)
DMSO	Dimetil sulfóxido
EM-APCI	Espectrometría de masas - de Ionización química a presión atmosférica (APCI)
EM-DART-HR	Mass Spectrometry - Direct Analysis in Real Time- High Resolution (Espectrometría de masas - análisis directo en tiempo real de alta resolución)
EM-EI	Espectrometría de masas - (Electron Ionization) de ionización por Impacto Electrónico
g	Gramo
H	Hexano
H ₂ O	Agua
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation (Correlación heteronuclear ¹³ C- ¹ H a larga distancia)
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation (Correlación heteronuclear ¹³ C- ¹ H a un enlace)
IR	Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento

Abreviatura	Significado
kg	kilogramo
<i>m</i>	Señal múltiple
m	Metro
MeOH	Metanol
Me ₂ CO	Acetona
mg	Miligramo
MHz	Mega Hertz
min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mult.	multiplicidad
<i>m/z</i>	Relación masa-carga
NOM	Norma Oficial Mexicana
pf	Punto de fusión
ppm	Partes por millón
RMN ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de carbono 13
RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de hidrógeno 1
<i>s</i>	Señal simple
<i>sa</i>	Señal simple ancha
<i>t</i>	Señal triple
UV	Ultravioleta
δ	Desplazamiento químico en ppm
%	porcentaje

I. Introducción

En los últimos años, el desarrollo de nuevas técnicas de aislamiento e identificación de compuestos químicos orgánicos y el nivel de las investigaciones mundiales han ido en crecimiento, lo que ha ocasionado que los trabajos en el área de los productos naturales se hayan incrementado considerablemente dentro del campo de la química (Brizuela *et al.*, 1998).

En un inicio los estudios de metabolitos secundarios se centraron en los biosintetizados por plantas y microorganismos y aunque han resultado una excelente fuente de metabolitos bioactivos (Cragg, 2008) desde 1950 las investigaciones sobre aislamiento y la elucidación estructural de compuestos marinos han tomado gran importancia a tal punto que en la actualidad hay más de 18,000 sustancias bioactivas aisladas de organismos marinos (Cragg, 2008; Patiño, 2013).

Los invertebrados marinos constituyen un grupo de organismos en los que se ha encontrado una fuente muy importante de sustancias bioactivas, las cuales en muchos casos se producen como mecanismos de defensa (Piñeiro, 2000). Actualmente, diversos compuestos químicos han sido aislados de holoturias, esponjas, octocorales y tunicados (Hatakeyama *et al.*, 1999, Clark 2000, El-Gamal *et al.*, 2004, Wang *et al.*, 2004). Muchos de estos organismos son de cuerpos blandos y relativamente vulnerables ante depredadores, por lo que las defensas especialmente químicas pueden ser muy importantes para ellos (Paul, 1992). Siendo las esponjas las fuentes más prometedoras de nuevas sustancias para el desarrollo de fármacos (Munro, 1999).

En México, el estudio de los productos naturales derivados de esponjas se inició entre las décadas de los 70 y 80 del siglo pasado, por el Dr. Gerardo Green del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología (Green y Bakus, 1975; Green, 1977a; Green *et al.*, 1990) y los Drs. Tirso Rios Castillo y Leovigildo Quijano del Instituto de Química de la UNAM (Quijano *et al.*, 1994). Posteriormente, otros investigadores realizaron algunos trabajos sobre el mismo tema (Cruz-Sosa *et al.*, 1990; Carballo *et al.*, 2006; Hernández-Guerrero *et al.*, 2006 y 2007; Hernández-Guerrero, 2007; Zubía *et al.*, 2008).

Diversos estudios indican que esponjas del género *Aplysina* tienen una gran importancia farmacológica (Kazanjian y Fariñas, 2006), debido a que contienen altas concentraciones de metabolitos bromados (hasta el 13% del peso seco) con actividad antimicrobiana, actividad citotóxica y con características antidepredadoras (Hentschel *et al.*, 2001). *Aplysina clathrata* es una esponja de reciente descripción (Cruz-Barraza *et al.*, 2012), por lo que en el presente trabajo se describe, por primera vez, el perfil químico de dicha esponja.

II. Generalidades

II.1 Phylum Porifera

Las esponjas son animales relativamente simples y se les considera uno de los grupos más primitivos, evolutivamente hablando, de todos los metazoarios (Gómez, 2002). Se les ubica en el subreino Parazoa ya que son animales que carecen de verdaderas capas embrionarias (Brusca y Brusca, 2005) y presentan células totipotenciales. Además se distinguen de los protozoos por presentar estructuras pluricelulares, y de los eumetazoos por la ausencia de verdaderos tejidos y por poseer un sistema alimentario acuífero muy bien desarrollado y único en los animales (Marshall y Williams, 1985). Este sistema de filtración es una característica que los distingue de los demás animales y está constituido por un amplio sistema de poros y canales a través de todo su cuerpo, por donde circula una corriente continua de agua, potenciada por la acción de células flageladas peculiares, llamadas coanocitos. De ahí proviene su nombre científico derivado del latín *porus*, que significa poro, y *ferre*, llevar (CONABIO, S.F.).

Particularmente el Phylum Porifera constituye uno de los grupos de invertebrados con mayor biodiversidad y más abundantes del planeta, con aproximadamente 8,350 especies (van Soest *et al.*, 2012) aunque se ha estimado que el número puede superar las 15,000 (van Soest, 2007). Es uno de los grupos más abundantes y diversos entre las comunidades litorales, se presentan en cualquier profundidad, desde la zona intermareal hasta la zona hadal (8000m), y desde los polos hasta los trópicos (Laubenfels, 1950). Una característica común de las esponjas es la de exhibir una gran variedad de formas que incluyen toda la gama de colores, son muy

exitosas compitiendo por el espacio, participan en la producción primaria y en la nitrificación mediante asociaciones simbióticas (con cianobacterias, zooxantelas, diatomeas, zooclorrelas, algas y bacterias); intervienen en los procesos de bioerosión y calcificación, también participan en la filtración de partículas suspendidas en la columna de agua por lo cual algunas especies se consideran como indicadores de contaminación (Alcolado y Herrera, 1987). Así mismo, algunas esponjas sintetizan sustancias bioactivas que han atraído el interés en el área de la farmacología y productos naturales (Wilkinson, 1987). También confieren protección a sus simbioses contra la depredación por medio de las estructuras esqueléticas y la síntesis de sustancias tóxicas (Westinga y Hoetjes, 1981; Hendler, 1984). Su actividad filtradora de plancton y partículas orgánicas es una fuente constante de alimento para algunos de sus hospederos (Westinga y Hoetjes, 1981).

Por otra parte la comercialización de las esponjas se basa principalmente en aplicaciones como: embalaje, en farmacología y como elementos de limpieza. En el embalaje han tenido una gran demanda debido a su alta resistencia, durabilidad, compresibilidad, elasticidad y absorción. En farmacología son motivo de investigación de sus compuestos para la elaboración de antivirales, antitumorales y antibióticos destinados al tratamiento de diversas enfermedades (Galeano-García *et al*, 2007).

En México no existe una explotación de las esponjas como tal, si bien, algunos pescadores las recolectan o explotan clandestinamente, en diferentes estados se prohíbe su extracción (Torruco-Gómez y González-Solís, 2010). Sin embargo, por falta de estudios se desconoce su abundancia y estado de conservación en costas

mexicanas. En la NOM-059 (categoría de riesgo) no existe ninguna especie de este grupo taxonómico bajo protección (Torruco-Gómez y González-Solís, 2010; SEMARNAT, 2010).

En la actualidad, la taxonomía de los Porifera está basada principalmente en la morfología de sus elementos esqueléticos (espículas) y en su disposición en el cuerpo de la esponja. Sin embargo, el poco conocimiento que se tiene sobre los procesos de formación de espículas y la verdadera función de estas en el esqueleto, dificulta el uso de estos caracteres (Uriz *et al.*, 2003). Además las esponjas presentan una escasa diferenciación celular que les confiere una gran plasticidad, con capacidad para adaptarse a distintos ambientes llevando implícita una gran variabilidad entre individuos de una misma especie, lo cual afecta los caracteres morfológicos utilizados en su clasificación (Erpenbeck y Wörheide, 2007).

II.2 Morfología general

Los poríferos o esponjas son metazoos, con simetría radial primaria que en la mayoría de los casos llega a desaparecer. Todos los adultos son sésiles, aunque a veces se pueden apreciar ligeros desplazamientos y contracciones de la superficie del cuerpo. Presentan formas muy diferentes (globosas, incrustantes, ramificadas, en copa, etc.) (Figura II-1) según el sustrato en el que viven, profundidad, espacio, tipos de agua, etc. Así mismo, muestran coloraciones muy variadas, y su tamaño puede oscilar entre 1-2 cm y 2 m de longitud (García-Moreno *et al.*, 2011).

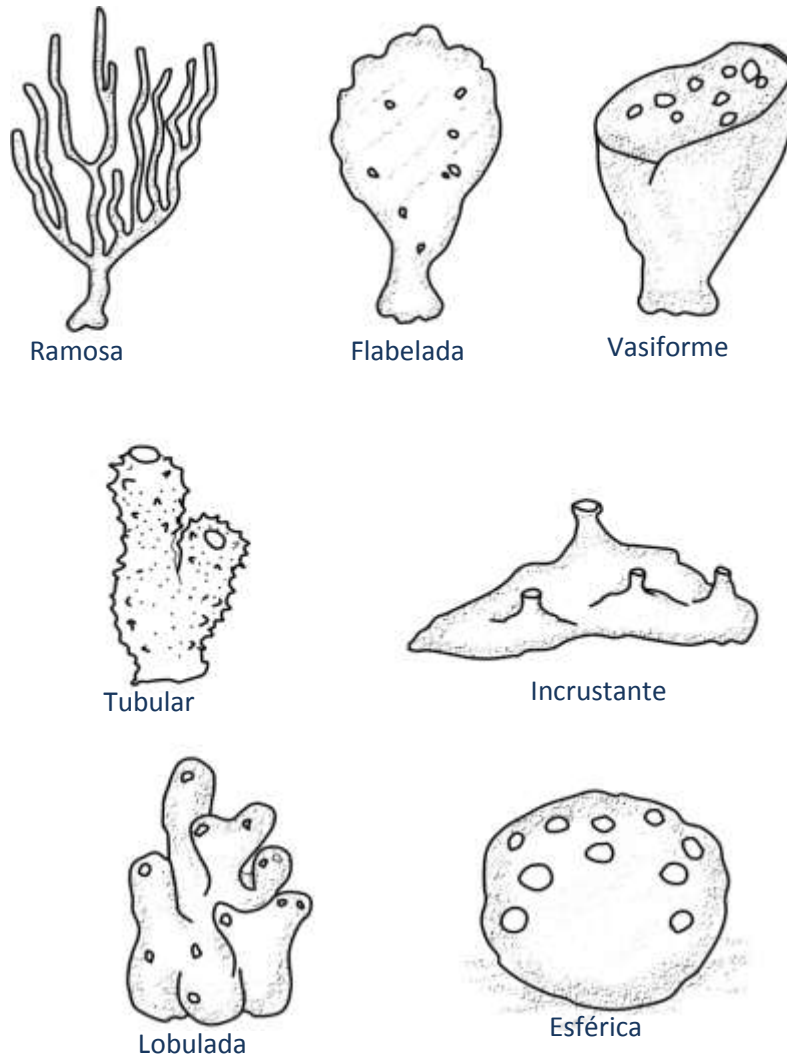


Figura II-1. Ejemplo de formas de crecimiento en poríferos. (Modificado de Gómez, 2002).

Las esponjas pueden ser de tres tipos (Figura II-2), dependiendo de la morfología del coanodermo (superficie interna de una esponja):

Ascón o asconoide: Es el tipo más simple de organización con el coanodermo en una sola capa de células. Son pequeñas y de aspecto tubuloso. El agua ingresa a través de los poros dermales microscópicos hacia el interior de la cavidad llamada espongocele o atrio, la cual está tapizada por células flageladas llamadas

coanocitos (forman el coanodermo). Los coanocitos flagelados empujan agua hacia el interior a través de los poros y la expulsan a través de un único ósculo grande. Forman colonias muy ramificadas.

Sycon o siconoide: Con coanodermo plegado. Tienen un cuerpo tubuloso y un ósculo único pero la pared del cuerpo comprende un sistema de canales radiales tapizados por cámaras coanocíticas. Las cámaras coanocíticas están formadas por coanocitos con los flagelos dirigidos en la misma dirección. El agua ingresa a través de un gran número de poros hacia los canales incurrentes y a través de ellos pasa por prosopilos (orificios finos) a las cámaras coanocíticas, que con los flagelos de los coanocitos la llevan al canal ecurrente. El resto está tapizado por pinacocitos.

No forman colonias demasiado ramificadas. Durante su desarrollo pasan por una fase asconoide y los canales flagelados se forman por invaginación de la pared del cuerpo.

Leucon o leuconoide: Es la organización más compleja, con el coanodermo dividido formando cámaras coanocíticas independientes. Constituyen masas coloniales grandes en las que cada elemento tiene su propio ósculo aunque los individuos no están bien definidos. Poseen plegamientos mayores. En este tipo, las cámaras se cierran y se transforman en un entramado de canales que comunican las cámaras coanocíticas entre sí y confluyen todos en un canal principal que va al ósculo.

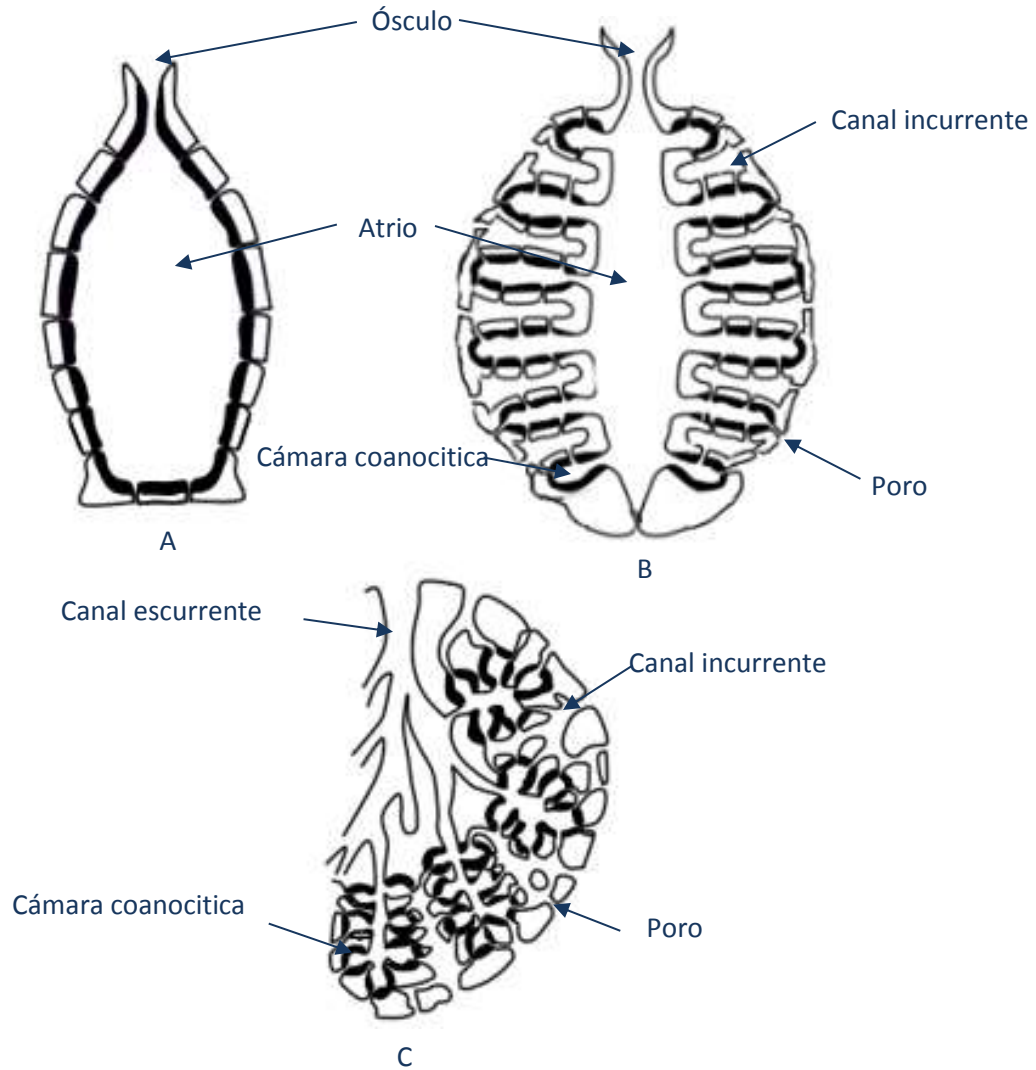


Figura II-2. Tipos morfológicos de esponjas (epidermis y mesohilo en blanco, coanoderma en negro). A) Asconcoide. B) Siconoide. C) Leuconoide. (Modificado de Barnes, 1969).

Una parte importante de la morfología de las esponjas son sus elementos esqueléticos., caracterizados por: A) numerosas fibras elásticas de colágeno que constituyen la parte proteica del esqueleto, y B) espículas que son la parte mineral del esqueleto y lo que le da la dureza. Estas pueden ser silíceas formadas por dióxido de silicio hidratado (Figura II-3) o calcáreas de carbonato de calcio (Figura II-4), dependiendo de la clase a la que pertenezca la esponja.

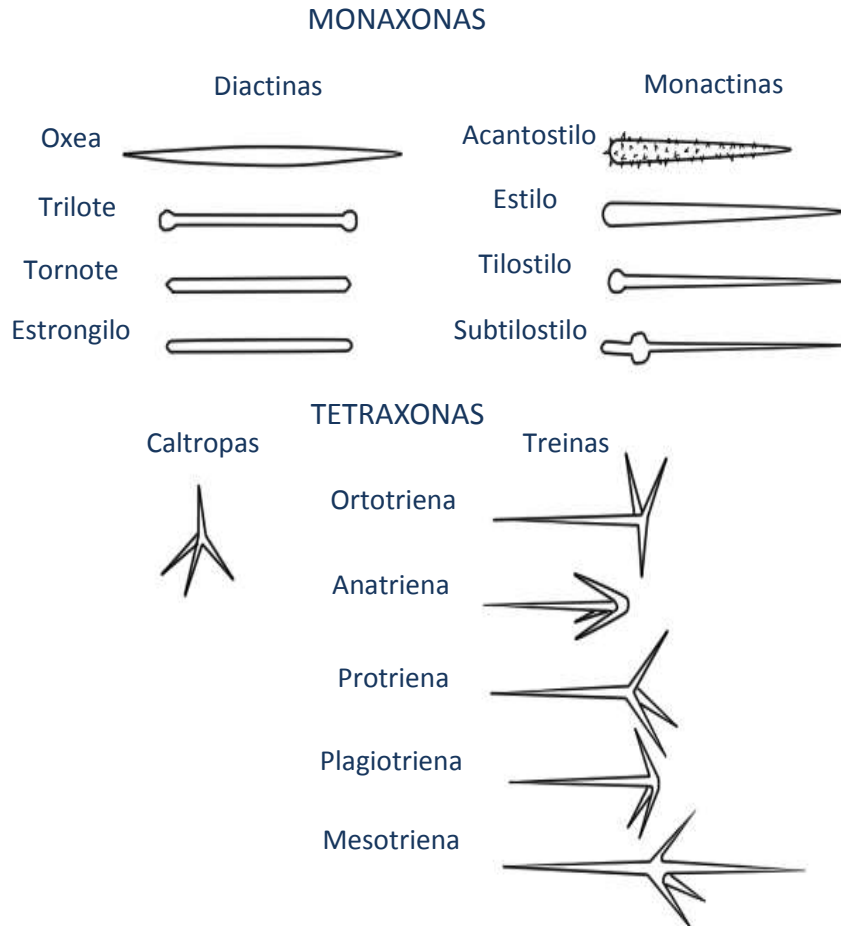


Figura II-3. Algunas espículas silíceas (macroscleras) de demosponjas. (Modificado de García-Moreno et al., 2011)

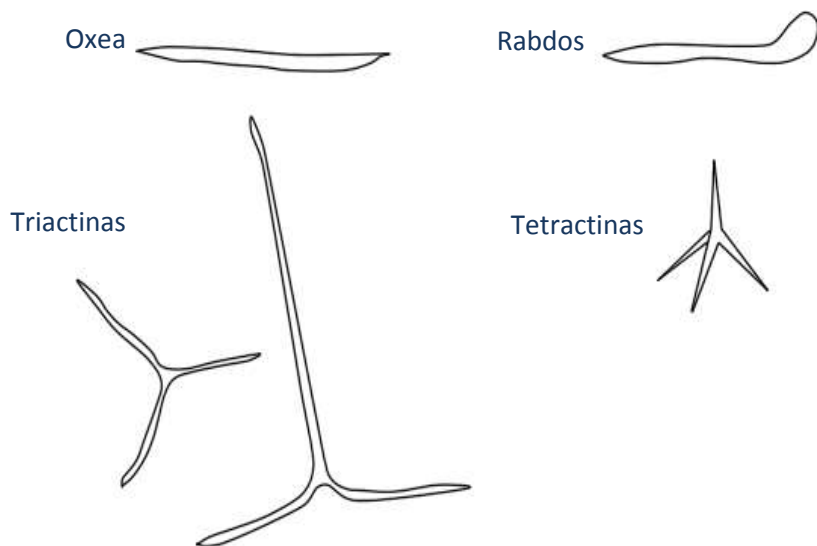


Figura II-4. Algunas espículas de esponjas calcáreas. (Modificado de García-Moreno et al., 2011).

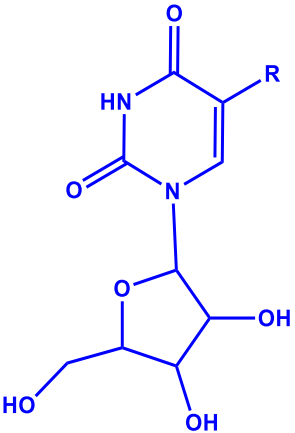
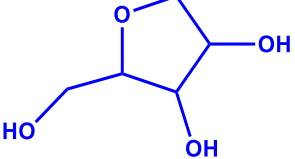
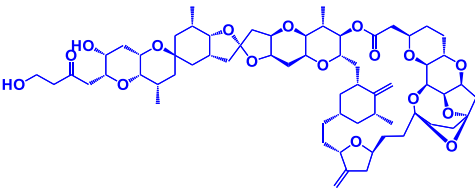
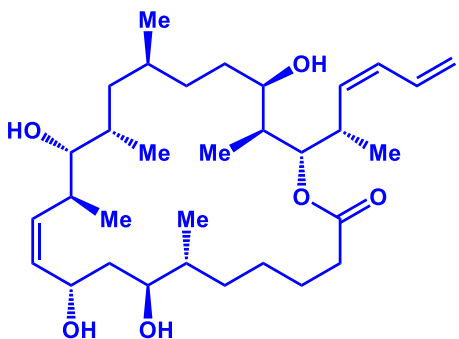
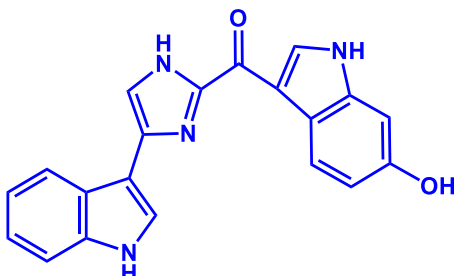
La rigidez de la pared corporal varía según la proporción en la que encuentren la parte proteica y mineral, a mayor parte proteica más flexible y, contrariamente, a mayor parte mineral, más dura y rígida. Con frecuencia, espículas y fibras no están dispuestas al azar sino que forman estructuras ordenadas y variadas, que responden a su información genética y al medio.

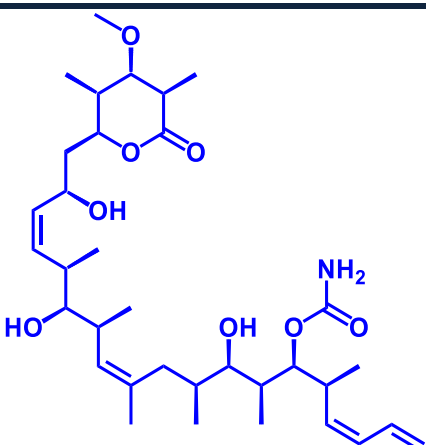
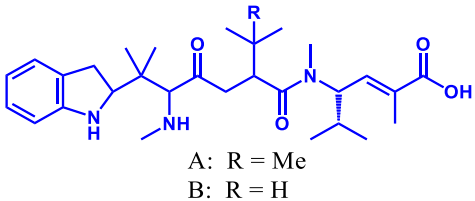
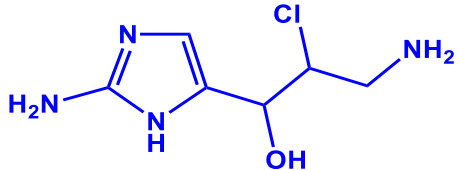
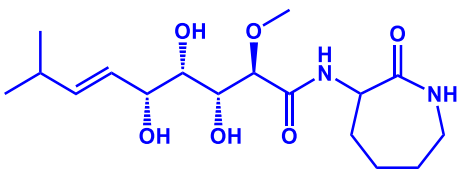
III. Antecedentes

Las esponjas marinas son una fuente prolífica de una gran variedad de metabolitos secundarios. A menudo son una fuente abundante de esteroides comunes y de esteroides que poseen cadenas laterales novedosas y/o núcleos esteroidales no convencionales (Duque *et al.*, 1983). El primero en reportar esta gran variedad de esteroides producidos por esponjas fue Dorée en 1909. Sin embargo, el primer esteroide aislado de esponjas fue obtenido por Henze (1904,1908) quien aisló por primera vez el espongesteroide de *Suberites domuncula*. Desde entonces y hasta 1970 las investigaciones en el campo de esteroides en esponjas se encuentran dentro de los trabajos de Bergmann y Brooks (1962 y 1970). 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) y las variaciones del núcleo en el anillo A (Bakus *et al.*, 1986).

También se han aislado compuestos del tipo de los nucleósidos como la espongotimidina y espongouridina que llevaron a la síntesis del Ara-C, un agente anticancerígeno y a la vidarabina o Ara-A el primer fármaco antiviral (Bergmann y Feeney, 1951). Además de los anteriores, se han aislado otros metabolitos que se han utilizado como base para la producción de nuevos fármacos como: la isohomohalicondrina B, dictistatina, topsentina, discordemolida, bengamida, hemiasterlinas A y B, y el girolline (ver Tabla III-1) (Board, 2002; De la Calle, 2007; Somavarapu, 2017)

Tabla III-1. Compuestos aislados de esponjas con posible uso farmacéutico.

Metabolito	Esponja	Estructura	Estatus (Actividad)
Espongouridina	<i>Tectitethya crypta</i> (Demospongiae; Tethyida)	R = H 	Precursor de Ara-C; aprobado. (Anticancerígeno)
Espongotimidina		R = Me 	Precursor de Ara-A; aprobado. (Antiviral)
Isohomohalicondrina B	<i>Lyssodendrox sp.</i> (Demospongiae; Poecilosclerida) y <i>Halichondria okadae</i> (Demospongiae; Suberitida)		Licenciado por Pharma Mar S. A.; en pruebas preclínicas. (Anticancerígeno)
Dictiostatina 1	<i>Esponja no identificada</i>		Citotoxicidad similar al taxol. (antitumoral y tratamiento del Alzheimer)
Topsentina	<i>Spongosorites ruetzeri</i> (Demospongiae; Suberitida)		Desarrollo preclínico. (Antiinflamatorio y tratamiento del Alzheimer)

Metabolito	Esponja	Estructura	Estatus (Actividad)
Discordemolida	<i>Discodermia dissoluta</i> (Demospongiae; Tetractinellida)		Licenciado por Novartis; en fase I. (Anticancerígeno)
Hemiassterlinas A y B	<i>Cymbastela sp.</i> (Demospongiae; Axinellida)	 A: R = Me B: R = H	Licenciado por Wyeth-Ayerst; en fase I. (Anticancerígeno)
Girollina	<i>Cymbastela cantharella</i> (Demospongiae; Axinellida)		Licenciado por Rhone Poulence; en fase I. (Antitumoral)
Bengamida	<i>Jaspis sp.</i> (Demospongiae;		Derivado sintético, licenciado por Novartis; en pruebas preclínicas. (Antitumoral)

Board, 2002; De la Calle, 2007; Somavarapu, 2017

Dentro de las esponjas, la clase Demospongiae es la que más atención ha recibido en estudios químicos y bioquímicos. Hasta el 2001 se habían reportado 2,578 metabolitos provenientes de esta clase (Harper *et al.*, 2001), de los cuales los terpenos representan los metabolitos no esteroidales más abundantes

(pallescensina-1, axisonitrilo-1, anhidrofurospongina-1, escalarina, ircinina-1, etc.), estos contienen múltiples unidades de grupos prenilo y anillos de furano.

Un grupo en particular de demosponjas que se ha estudiado como una fuente de productos naturales bioactivos, son las esponjas marinas del orden Verongiida (Silva *et al.*, 2010). Actualmente se ha reportado el aislamiento de más de 300 metabolitos a partir de esponjas pertenecientes a este orden (Blunt y Munro, 2005; Silva *et al.*, 2010).

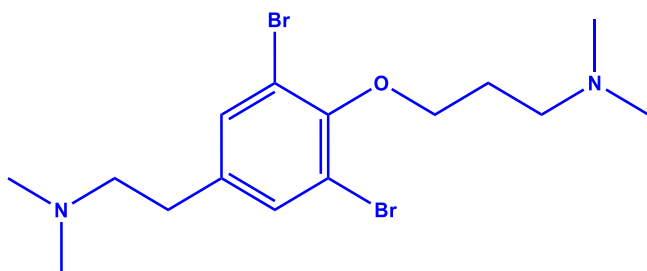
Las esponjas del género *Aplysina* (Demospongiae, Verongiida), se caracterizan por presentar una gran variedad de compuestos derivados de la dibromotirosina, siendo los más comunes, los conformados por cuatro átomos de bromo, seguidos de los que contienen tres átomos y en menor cantidad se encuentran los que presentan dos o un átomo de bromo (Silva *et al.*, 2010; Silva-Lira, *et al.*, 2011).

Los metabolitos secundarios que se encuentran en las esponjas marinas del género *Aplysina* pueden clasificarse, según su núcleo principal, como: (A) Bromotiraminas, (B) Cavernicolinas, (C) Hidroverongiaquinoles, (D) Bromotirosinacetales, (E) derivados de Bromotirosina lactona, (F) Oxazolidonas, (G) Espiroisoxazolininas, (H) Verongiabenoides, (I) Verongiaquinoles y (J) Dibromociclohexadienos (ver Tabla III-2) (Silva-Lira *et al.*, 2011).

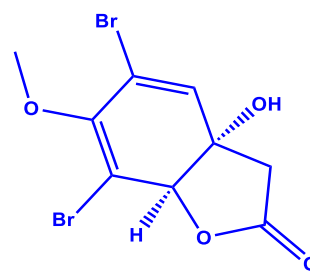
Tabla III-2. Clasificación de los compuestos bromados según Silva-Lira et al., 2011.

Bromotiraminas

Cavernicolinas



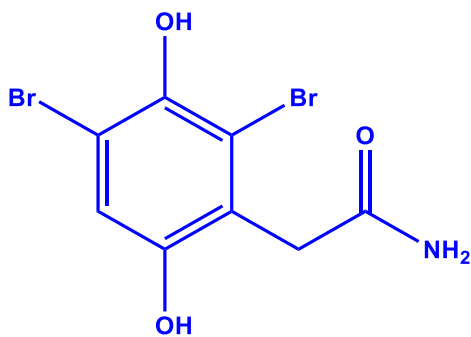
aplysinona



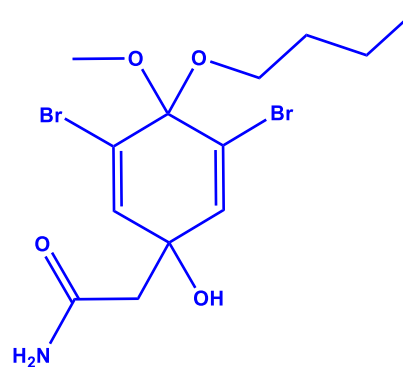
aeroplysinina-2

Hidroverongiaquinoles

Bromotirosinacetales



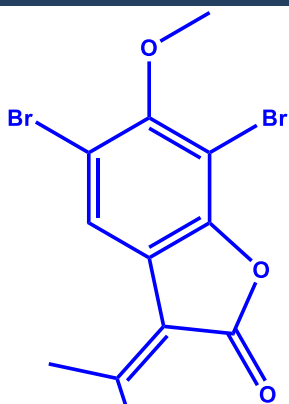
2-(2,4 dibromo- 3,6 dihidroxifenil) acetamida



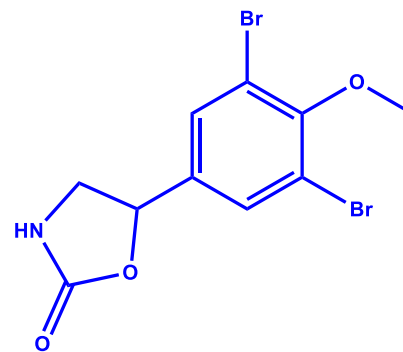
aplysinacetal A

derivados de Bromotirosina lactona

Oxazolidonas

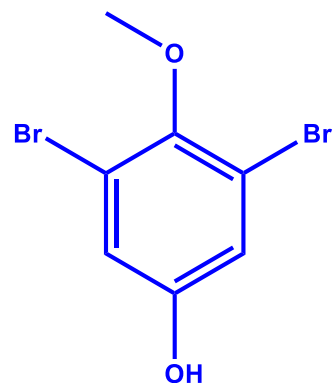
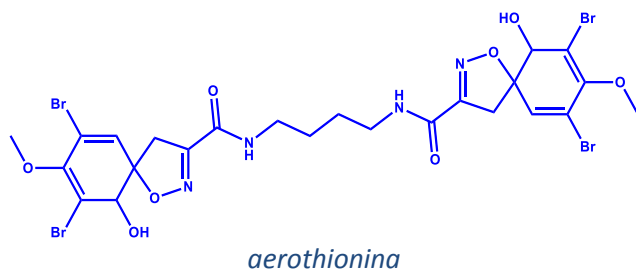


Aplysinolida



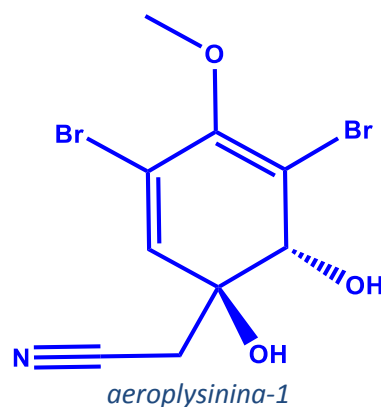
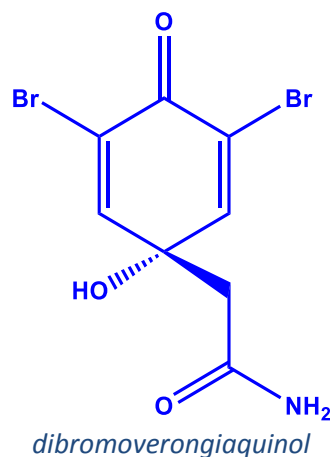
Espiroisoxazolinas

Verongiabencenoides



Verongiaquinoles

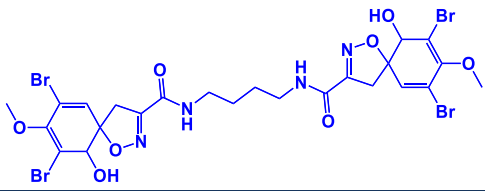
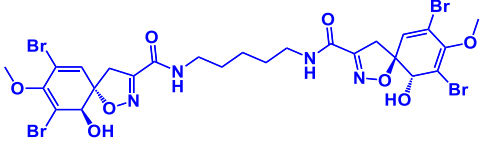
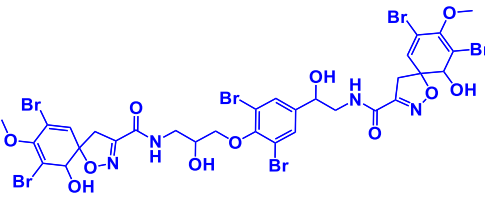
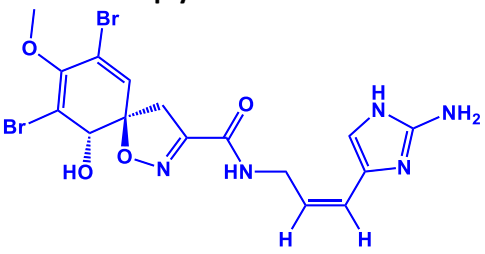
Dibromociclohexadienos

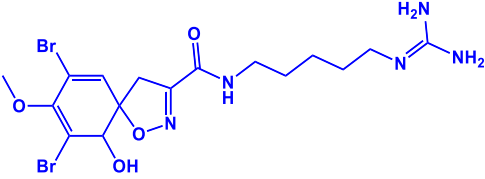
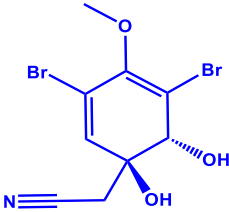
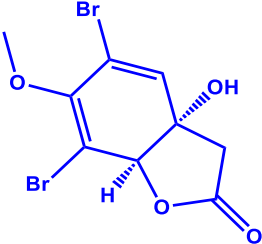
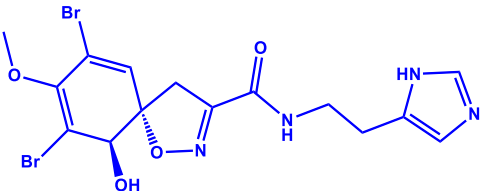
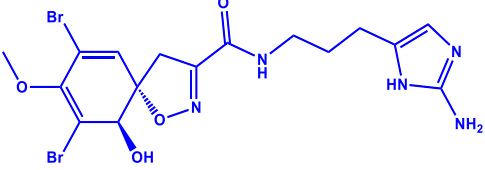


Los metabolitos de *Aplysinas* que se han aislado con mayor frecuencia son: aethionina, homoaethionina, fistularina-3, aplysinamisina-1, aplysinamisina-2, aeroplysinina-1, aeroplysinina-2, aerophobina-1 y aerophobina-2 (ver Tabla III-3) (Fattorusso *et al.*, 1970; Fattorusso *et al.*, 1972; Gopichand y Smith, 1979; Makarieva *et al.*, 1981; Cimino *et al.*, 1983; Walker *et al.*, 1985; Rodríguez *et al.*, 1987; Gunasekera y Gunasekera, 1989; Cruz *et al.*, 1990; Acosta y Rodríguez, 1992; Rodríguez y Piña, 1993; Ciminiello *et al.*, 1994; Carney *et al.*, 1995; Ciminiello *et al.*, 1996; Ciminiello *et al.*, 1997; Ciminiello *et al.*, 1999; Compagnone *et al.*, 1999;

Fendert *et al.*, 1999; Encarnación-Dimayuga *et al.*, 2003; Thoms *et al.*, 2004; Pereira *et al.*, 2006; Hernández-Guerrero *et al.*, 2007; Klöppel *et al.*, 2008; Núñez *et al.*, 2008; Gandolfi *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2010.).

Tabla III-3. Compuestos aislados de diferentes especies de *Aplysina*

	<i>A. aerophoba</i>	<i>A. archeri</i>	<i>A. caissara</i>	<i>A. cauliformis</i>	<i>A. cavernicola</i>	<i>A. cunulosa</i>	<i>A. fistularis</i>	<i>A. fulva</i>	<i>A. gerardogreeni</i>	<i>A. insularis</i>	<i>A. lactuca</i>	<i>A. solangeae</i>	<i>A. thiona</i>	<i>A. lacunosa</i>
<p>aerothionina</p> 	X				X		X	X	X	X	X	X	X	X
<p>homoaerothionina</p> 	X		X	X	X			X	X	X	X		X	X
<p>fistularina-3</p> 	X	X	X	X	X		X	X	X	X			X	X
<p>aplysinamisina-1</p> 								X						

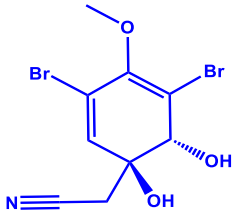
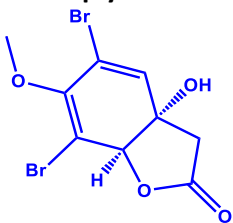
	<i>A. aerophoba</i>	<i>A. archeri</i>	<i>A. caissara</i>	<i>A. cauliformis</i>	<i>A. cavernicola</i>	<i>A. cunulosa</i>	<i>A. fistularis</i>	<i>A. fulva</i>	<i>A. gerardogreeni</i>	<i>A. insularis</i>	<i>A. lactuca</i>	<i>A. solangeae</i>	<i>A. thiona</i>	<i>A. lacunosa</i>
<p>aplysinamisina-2</p> 	X			X	X									
<p>aeroplysinina-1</p> 	X	X		X	X			X						
<p>aeroplysinina-2</p> 							X	X	X					
<p>aerofobina-1</p> 	X							X		X				
<p>aerofobina-2</p> 	X				X			X		X				

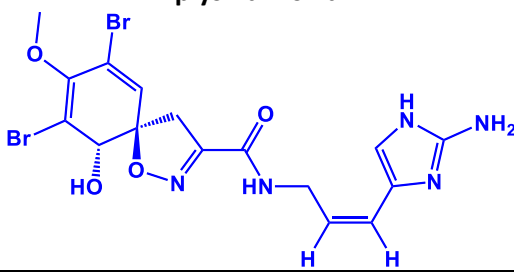
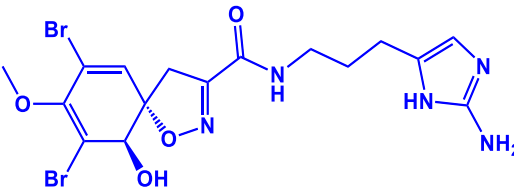
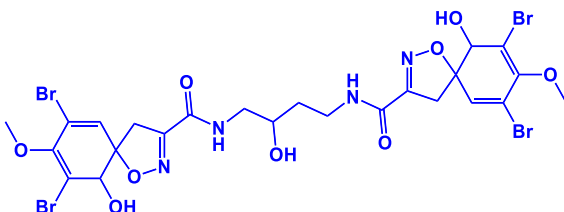
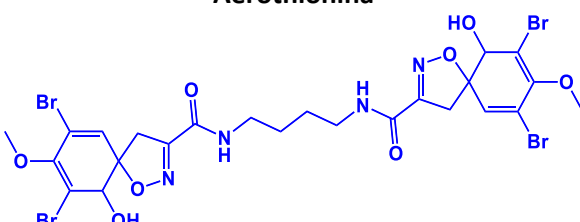
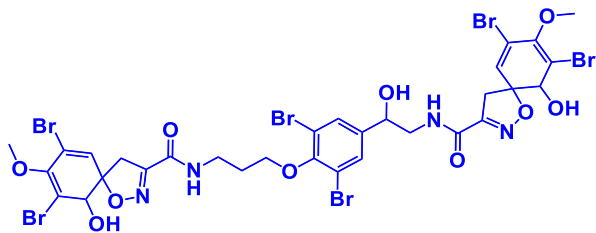
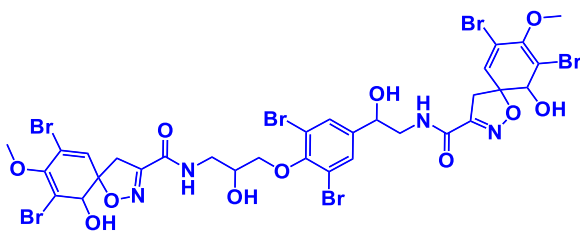
Fattorusso et al., 1970; Fattorusso et al., 1972; Gopichand y Smith, 1979; Makarieva et al, 1981; Cimino et al., 1983; Walker et al., 1985; Rodríguez et al., 1987; Gunasekera y Gunasekera, 1989; Cruz et al., 1990; Acosta y Rodríguez, 1992; Rodríguez y Piña, 1993; Ciminiello et al., 1994; Carney et al., 1995; Ciminiello et al., 1996; Ciminiello et al., 1997; Ciminiello et al., 1999; Compagnone et al., 1999; Fendert et al., 1999; Encarnación-Dimayuga et al., 2003; Toms et al., 2004; Pereira et al., 2006; Hernández-Guerrero et al., 2007; Köppel et al., 2008; Núñez et al., 2008; Gandolfi et al., 2010; Silva et al., 2010.

Los estudios de la variación de estos metabolitos en el género *Aplysina* son más escasos, pero han dejado ver que las esponjas de este género presentan una amplia variabilidad química dentro de la especie a nivel espacial (a mediana y gran escala) y temporal, entre especímenes y tejidos (Putz *et al.*, 2009; Sacristan-Soriano *et al.*, 2011; 2012).

Los compuestos aislados del género *Aplysina* tienen gran importancia en el área de productos naturales ya que han presentado diferentes tipos de actividad biológica (ver Tabla III-4), desde inhibidores enzimáticos (Koulman *et al.*, 1996), actividad antiprotozoaria (Gutiérrez *et al.*, 2005), antiviral (Gunasekera y Cross, 1992), antibacteriana (Encarnacion-Dimayuga *et al.*, 2000; Encarnacion-Dimayuga *et al.*, 2003; León-Deniz, 2003), antiangiogénica (Rodríguez-Nieto *et al.*, 2002), inmunosupresora (Gunasekera *et al.*, 1991) y antitumoral (Gopichand y Schmitz, 1979; Cimino *et al.*, 1983; Acosta y Rodríguez, 1992; Rodríguez y Piña, 1993; Ciminiello *et al.*, 1999; Compagnone *et al.*, 1999; Hernández-Guerrero *et al.*, 2007)

Tabla III-4. Metabolitos derivados de bromotirosina con actividad biológica.

Metabolito	Actividad	Referencia
Aeroplysinina-1 	antiinflamatoria, antiangiogénica, antitumoral, antiprotozoaria y antibacterial	Fattorusso <i>et al.</i> , 1972; Koulman <i>et al.</i> 1996; García-Vilas <i>et al.</i> , 2013, 2015, 2018; Kang <i>et al.</i> , 2016.
Aeroplysinina-2 	antibacterial y antioxidante	Minale <i>et al.</i> , 1972 y Abou- Shoer <i>et al.</i> , 2008.

Metabolito	Actividad	Referencia
<p>Aplysinamisina-1</p> 	antibacterial, antiinflamatorio y antitumoral	Acosta y Rodríguez, 1992 y Rodríguez y Piña, 1993;
<p>Aerofobina-2</p> 	antibacterial	Ávila-Nuñez, 2000; Gotsbacher y Karuso, 2015
<p>11-oxoaereothionina</p> 	antibacterial, antiinflamatorio y antitumoral	Acosta y Rodríguez, 1992; Ivo de Medeiros <i>et al.</i> , 2012
<p>Aerothionina</p> 	antibacterial	Encarnacio- Dimayuga <i>et al.</i> , 2003
<p>11-desoxifistularina-3</p> 	antibacterial y anticancerígeno	Compagnone <i>et al.</i> , 1999; De Lira <i>et al.</i> , 2006
<p>Fistularina-3</p> 	antibacterial, antiviral y anticancerígeno	Gunasekera <i>et al.</i> , 1992; Ávila- Nuñez, 2000; Mijares <i>et al.</i> , 2013

En cuanto a la importancia ecológica de los metabolitos bromados se ha comprobado que las esponjas del género *Aplysina* tienen una fuerte defensa química contra depredadores (Thoms 1985; Walker *et al.*, 1985; Proksch, 1994; Pawlik *et al.*, 1995; Ebel *et al.*, 1997; Thoms *et al.*, 2004, 2006; Ruzicka y Gleason, 2009; Loh y Pawlik, 2014 y Puyana *et al.*, 2015), también se han evidenciado que los metabolitos secundarios de estas esponjas tienen una potente actividad antimicrobiana que evita la colonización de bacterias patógenas marinas después de una lesión (Weiss *et al.*, 1996; Kelly *et al.*, 2005; Thoms *et al.*, 2006, 2007 y Reverter *et al.*, 2016), además de efectos alelopáticos contra corales, algas y otras esponjas (Weiss *et al.*, 1996; Pawlik *et al.*, 2007 y Puyana *et al.*, 2015).

IV. Justificación

Los invertebrados marinos constituyen un grupo de organismos a partir de los cuales se han aislado una gran cantidad de compuestos de diversos tipos estructurales y que presentan interesantes actividades biológicas por las que podrían ser utilizados en la industria farmacéutica, cosmética y naviera. Es así como en las últimas décadas, las grandes compañías farmacéuticas han considerado los productos naturales, principalmente los marinos, como una alternativa para la búsqueda de nuevos medicamentos.

En las costas de Baja California Sur, existe una alta diversidad de invertebrados y son pocos los estudios que se han realizado desde un punto de vista químico enfocados en la búsqueda de productos naturales marinos, por lo que resulta importante ampliar el conocimiento sobre sustancias bioactivas de origen marino.

Por lo tanto debido a que las investigaciones en el ámbito de la química, biología y biotecnología han demostrado la importancia de la investigación en esponjas, se tiene la necesidad de continuar e impulsar los estudios sobre la química de la gran variedad de esponjas que habitan el inmenso mar territorial de nuestro país.

V. Objetivos

V.1 General

Contribuir al conocimiento de los recursos marinos de México mediante el estudio químico de la esponja marina *Aplysina clathrata*, proveniente de las costas del estado de Baja California Sur.

V.2 Particulares

- Separar los componentes poco polares y polares, por extracción con disolventes de diferente polaridad.
- Separar y purificar los componentes de las fracciones polares y poco polares mediante técnicas cromatográficas.
- Identificar los componentes aislados y determinar las estructuras moleculares de los posibles nuevos componentes.

VI. Metodología

VI.1 Zona de estudio

La colecta de los ejemplares se realizó en el Golfo de Baja California, en el arrecife rocoso de Punta Arena de la Ventana. El cual se ubica en Bahía de la Ventana, en la costa sur-oriental de Baja California Sur, frente a la isla Cerralvo, a los 23°59' de latitud N y 109°49' de longitud O (Mateo-Cid *et al.*, 2000). El área está formada por un macizo batolítico llamado Bloque de Los Cabos, constituido principalmente de rocas graníticas metamórficas y clásticas originadas en el cretácico (Suárez, 2002).

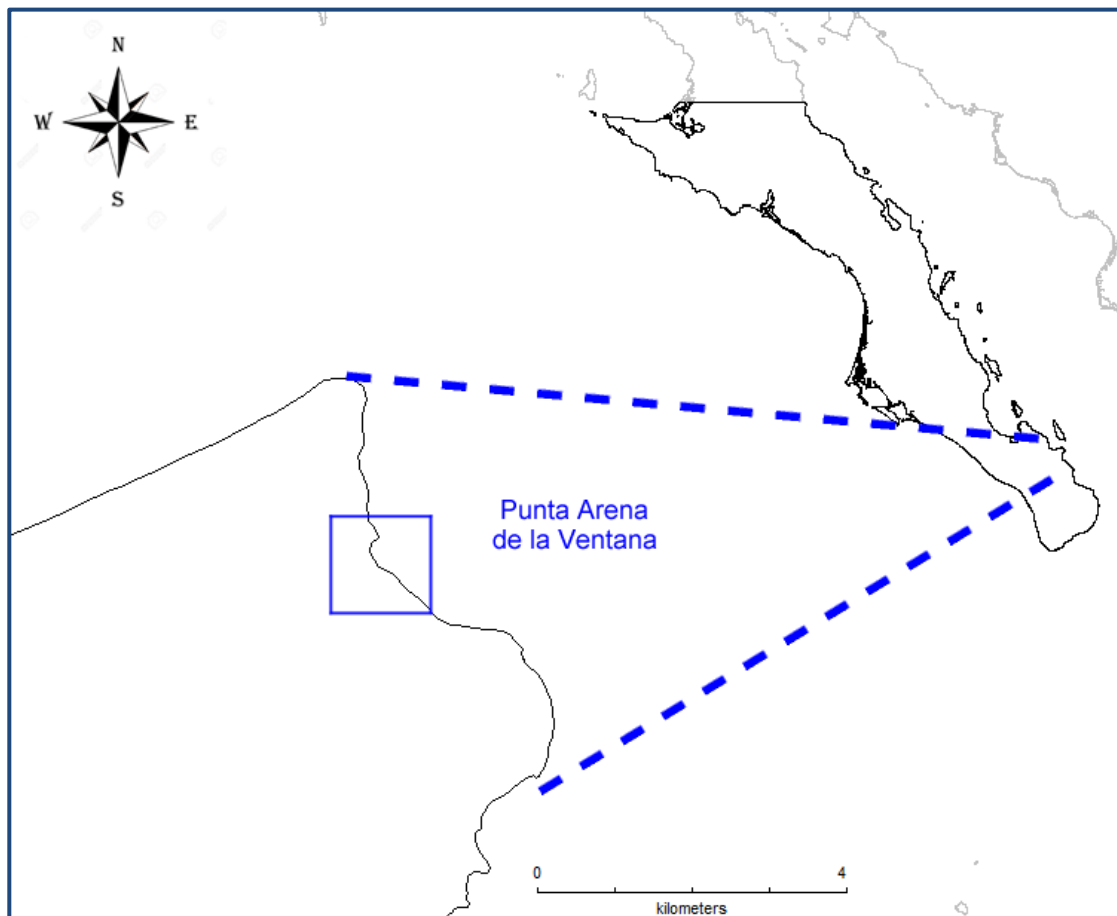


Figura VI-1. Zona de recolecta de los organismos en Punta Arena de la Ventana, B.C.S., México.

En Punta Arena de la Ventana se observa una plataforma rocosa submarina paralela a la costa, que tiene por su parte más ancha 70 m y una profundidad máxima de 3 m; al término de la plataforma se advierte un borde vertical que desciende a una profundidad no mayor a 7 m (Suárez, 2002).

VI.2 Muestreo

Las esponjas fueron recolectadas con la ayuda de la Dra. Claudia Judith Hernández Guerrero y el Dr. José Borges del Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas del IPN (CICIMAR-IPN).

El material se recolectó manualmente mediante buceo autónomo, el 21 de agosto de 2012. Las esponjas se trasladaron en hielo al CICIMAR donde se mantuvieron congeladas. Posteriormente fueron transportadas vía aérea a la Ciudad de México y posteriormente al Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Una muestra de la esponja se fijó en etanol al 90% para la corroboración taxonómica de la especie.

VI.3 Identificación taxonómica

La identificación de género y especie del material biológico se realizó con base en la nueva clasificación sistemática propuesta por Morrow y Cárdenas (2015), con la asesoría de la Bióloga experta en sistemática de esponjas Patricia Gómez López

del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología (ICMyL) de la Universidad Autónoma de México (UNAM), unidad Ciudad Universitaria.

VI.4 Obtención de extractos

El total de la esponja liofilizada (322g) se cortó en pequeños trozos y se molió con ayuda de un molino de cuchillas. La esponja molida se extrajo por percolación exhaustiva con diferentes disolventes en polaridad ascendente (hexano, acetato de etilo, acetona y metanol); posteriormente se concentró cada uno de los extractos, a presión reducida en un evaporador rotatorio a un 20% del volumen aproximadamente.

Los extractos, fracciones y muestras se concentraron en un evaporador rotatorio BÜCHI R-11.

VI.5 Separación y purificación de los componentes de los extractos

La separación y purificación de los componentes de los extractos se realizó mediante técnicas cromatográficas convencionales, que incluyen cromatografía en columna (CC) y en placa fina (CCF) y en caso necesario cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC, por sus siglas en inglés).

Cromatografías en columna abierta (CC): Se realizaron en columnas de vidrio empacadas con gel de sílice para cromatografía en capa fina (malla 230 - 400), o sephadex LH-20, según el caso.

Cromatografía en capa fina (CCF): Para cromatografía en capa fina analítica (CCFa), se utilizaron cromatofolios de sílica gel de 0.20 mm de espesor, con indicador fluorescente. Para cromatografía en capa fina preparativa (CCFp), se

utilizaron placas, de 20 x 20 cm y 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 mm de espesor, según el caso, con indicador fluorescente. La visualización de las placas se llevó a cabo mediante exposición a luz UV a longitudes de onda de 254 nm y 336 nm y/o utilizando como revelador una solución de sulfato cérico al 3% en ácido sulfúrico 2N seguido del calentamiento en parrilla durante 1 minuto a 100°C aproximadamente.

VI.6 Identificación química

Para la identificación de los componentes aislados se hizo uso de técnicas espectroscópicas modernas en el infrarrojo (IR), de resonancia magnética nuclear (RMN), espectrometría de masas (EM).

Resonancia Magnética Nuclear (RMN): Los espectros de RMN se determinaron en espectrómetros Bruker (Avance III 400 MHz) y Bruker (Ascend 500 MHz), utilizando disolventes deuterados como: cloroformo (CDCl_3), dimetilsulfóxido (DMSO-d^6), acetona ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) y metanol (CD_3OD). Se determinaron espectros de hidrógeno (RMN- ^1H) y carbono-13 (RMN- ^{13}C), incluidos experimentos homo- y heteronucleares, en una (1D) y dos (2D) dimensiones (DEPT, COSY, HSQC y HMBC). El procesamiento de los espectros se realizó utilizando el software MestReNova® v.12.0.2, utilizando las señales del disolvente residual no deuterado como referencia.

Espectrometría de Masas (EM): Los espectros de masas por Impacto Electrónico (IE) se determinaron en un espectrómetro de masas, Joel, MStation JMS-700. Los espectros por DART (Direct Analysis in Real Time – Análisis Directo en Tiempo Real) se realizaron en un espectrómetro de masas Jeol, The AccuTOF JMS-

T100LC. Las determinaciones por CG / EM en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas, Jeol GCMate II.

Espectroscopia en el Infrarrojo: Los espectros en el infrarrojo se realizaron en un espectrofotómetro IR Brucker Tensor 27. Las muestras se realizaron en disolución y película, de acuerdo a su solubilidad.

VII. Parte experimental

VII.1 Taxonomía

Clase Demospongiae Sollas, 1885

Las Demosponjas (Porifera) tienen elementos celulares discretos, larvas de parenquimula o blastula, con estrategias reproductivas vivíparas u ovíparas. El esqueleto está compuesto de espículas silíceas monaxiaicas o tetraxónicas (nunca triaxónicas) unidas con fibras de espongina o filamentos pegajosos y filamentos colágenos que forman la sustancia fundamental de la matriz intercelular. Las espículas y/o fibras, o ambos, pueden estar ausentes.

Subclase Verongimorpha Erpenbeck, Sutcliffe, De Cook, Dietzel, Maldonado, van Soest, Hooper y Wörheide, 2012

Las Verongimorpha comprenden taxones de morfologías heterogéneas ya que pueden poseer espículas, solamente esqueleto de espongina o ningún esqueleto en absoluto.

Orden Verongiida (Bergquist, 1978)

El orden Verongiida se caracteriza por presentar un esqueleto anastomoso de mallas poligonales que no tienen tendencia a organizarse. Las fibras tienen elementos normales de la corteza y de la médula, no contienen ninguna partícula foránea y son de dimensiones uniformes a través de la esponja. Las cámaras coanocíticas son diplodales, pequeñas y esféricas, y se encuentran en una matriz de colágeno densa. Todas las especies muestran un cambio oxidativo en el color cuando mueren o con la exposición al aire, cambiando rápidamente de amarillo o amarillo verdoso a azul, marrón oscuro o púrpura. Los metabolitos secundarios

incluyen una gama de derivados bromados de tirosina con una fuerte actividad antimicrobiana.

Familia Aplysinidae Carter, 1875

La familia Aplysinidae se caracteriza por la posesión de fibras de un solo tipo sin detritus extraños y con de médula gruesa. Las fibras forman un retículo regular con grandes mallas poligonales y ninguna disposición superficial especializada

Género Aplysina Nardo, 1834

El género se caracteriza por tener un esqueleto de fibras en una sola categoría, formando un retículo regular de mallas poligonales sin una estructura especial ectosómica. En contraste con otras esponjas queratosas, el esqueleto de *Aplysina* en su mayoría no es espongina, sino de α -quitina. Especies de *Aplysina* también se reconocen por la posesión de compuestos alcaloides bromados con actividades citotóxicas y simbioses microbianas que producen compuestos con actividad antibiótica.

Especie Aplysina clathrata Cruz-Barraza, Carballo, Rocha-Olivares, Ehrlich y Hog, 2012

Es una esponja incrustante masiva con protuberancias redondeadas de 5 a 10 mm de diámetro, los ósculos visibles se abren en la cima de estas protuberancias. Al preservarla en alcohol se colapsa la dermis quedando cierto enrejado o un cuerpo clatrado. Su color en vivo es guinda oscuro a rojizo o amarillo en el exterior y siempre amarillo en su interior, preservada en alcohol o al extraerla del agua se torna negro violáceo. Presenta un esqueleto anastomosado de fibras meduladas y estratificadas típicas del género, sin distinción de primarias o secundarias. Estas miden 30 a 60

Aplysina clathrata

µm de diámetro. Su distribución comprende casi toda la costa del Pacífico mexicano, desde Oaxaca, Guerrero, Nayarit y Sinaloa hasta el interior del Golfo de California (Comm. Personal de Patricia Gómez).



Figura VII-1. Fotografía de Aplysina clathrata.

VII.2 Extractos de *A. clathrata*

Se colectaron 1.44 kg de esponja que posteriormente se cortó en pequeños trozos, se liofilizó y se molió, obteniéndose 322 g de esponja seca y molida. Parte del material (250 g) se extrajo por percolación con disolventes en polaridad ascendente (hexano, diclorometano, acetona y metanol). El disolvente de los extractos obtenidos se eliminó por evaporación a presión reducida en un rotavapor, obteniendo al final cuatro extractos crudos: hexano (H; 5.31 g), diclorometano (D; 5.57 g), acetona (A; 6.04 g) y metanol (M; 26.83) (Figura VII-1).

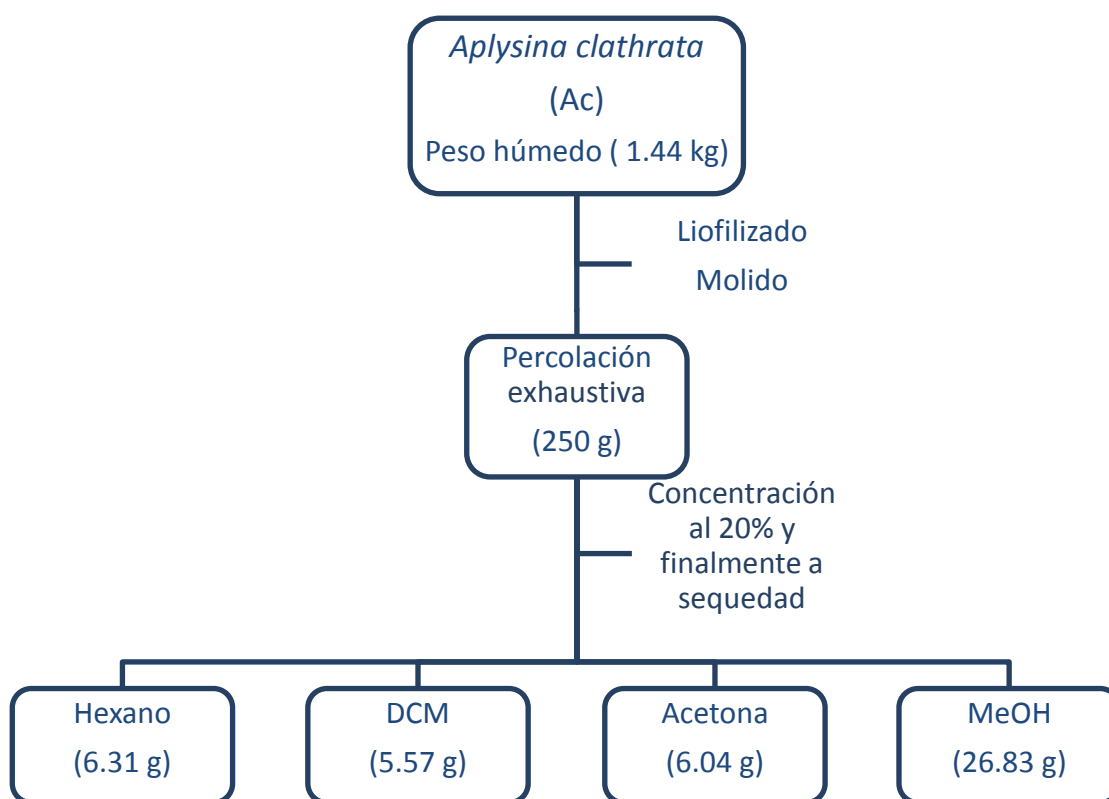


Figura VII-2. Diagrama de flujo de la metodología general para la obtención de extractos.

VII.2.1 Extracto hexánico

El extracto hexánico se sometió a una cromatografía en columna utilizando sílica gel como adsorbente. Como eluyente se utilizaron mezclas de hexano / AcOEt de polaridad ascendente (9:1, 8:2, 6:4 y 4:6), AcOEt y finalmente metanol. Se obtuvieron 96 fracciones que se reunieron de acuerdo a su similitud en cromatografía en capa fina en nueve fracciones primarias: **HAc-A**, **HAc-B**, **HAc-C**, **HAc-D**, **HAc-F**, **HAc-G** y **HAc-H** (Figura VII-2). De acuerdo a datos espectroscópicos, cromatográficos y rendimientos de las diferentes fracciones, se seleccionaron las fracciones **HAc-C** y **HAc-E** para continuar con su estudio químico.

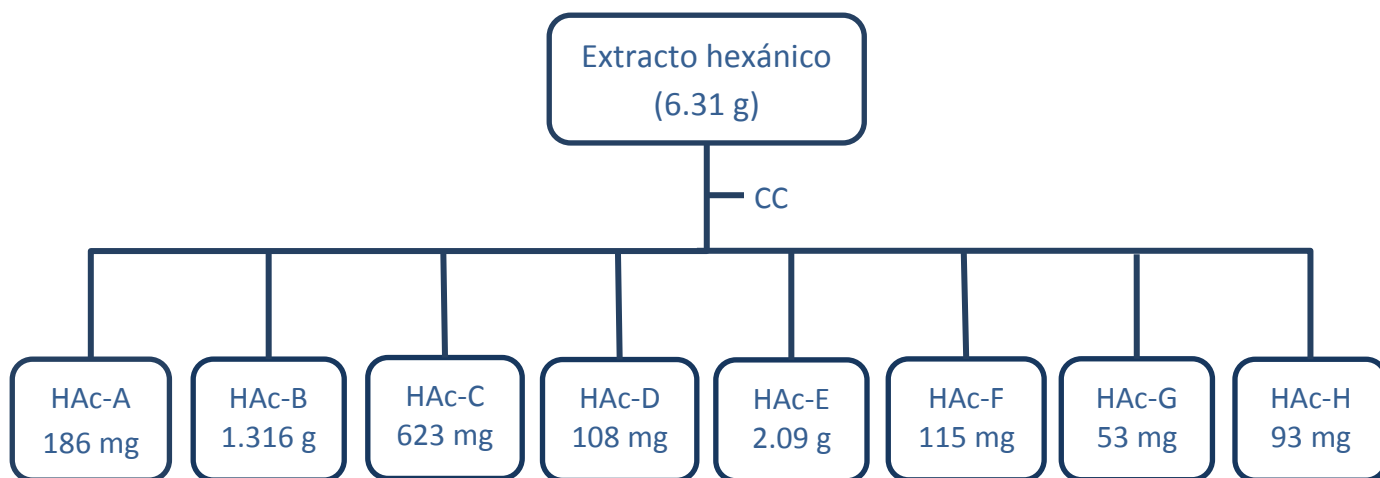


Figura VII-3. Diagrama de flujo de la separación del extracto hexánico.

VII.2.2 Extracto de DCM

En el extracto de DCM se obtuvo un precipitado color amarillo (**DAc-pp**). El cual se separó por cromatografía en placa fina preparativa (CCFp) en sílica gel de 20x20 cm y 1mm de espesor, utilizando como eluyente hexano / acetona (6:4). Obteniéndose en las fracciones **DAc-ppb** y **DAc-ppc**, aerothionina (**15**, 5 mg) y fistularina-3 (**16**, 5 mg) respectivamente.

VII.2.3 Extracto de acetona

El extracto de acetona se separó por una cromatografía en columna (CC) utilizando como adsorbente sílica gel, y como eluyente mezclas de hexano/acetona (7:3, 6:4, 1:1, 4:6, 3:7, 2:8 y 1:9), acetona, mezclas de acetona / MeOH (9:2, 8:2, 7:3, 6:4 y 1:1) y finalmente metanol. Se obtuvieron 132 fracciones que se agruparon de acuerdo con su similitud en CCFa en 33 fracciones.

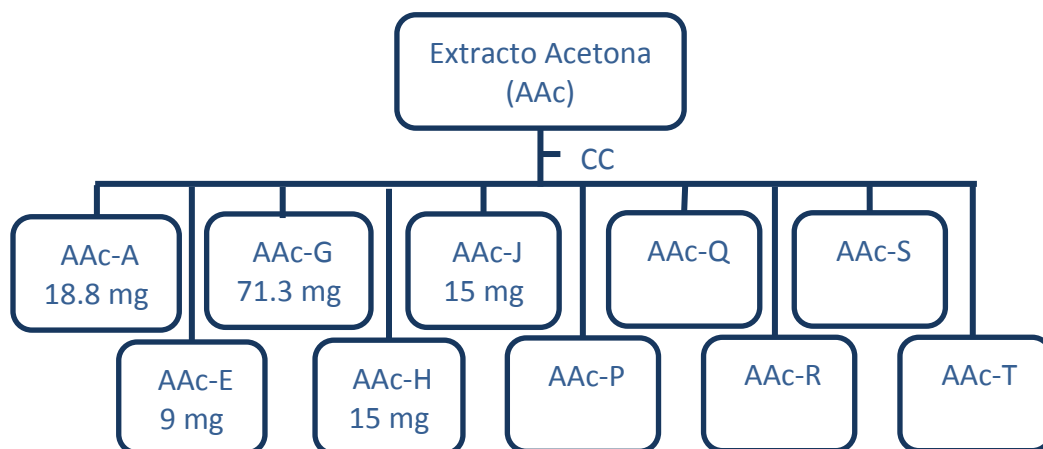


Figura VII-4. Diagrama de flujo de la separación del extracto de acetona. Se muestran solo las fracciones que se continuaron trabajando.

De acuerdo con sus datos preliminares, se continuó trabajando con las fracciones **A, E, G, H, J y P-T** (ver Figura VII-4).

Fracción AAc-A. Se separó y purificó por CCFp en una placa de sílica gel, de 20x20 y 0.5 mm de espesor. Como fase móvil se utilizó hexano/acetona en proporción 9:1 obteniéndose en la fracción **AAc-Aa** el compuesto conocido como aplysinólida (**17**, 9.4 mg).

Fracción AAc-E. El análisis espectroscópico por RMN de la fracción indicó la presencia de la lactona **18** (9 mg).

Fracción AAc-G. Se separó mediante CCFp en sílica gel, de 20x20 y 1 mm de espesor. Como eluyente se utilizó hexano/acetona en proporción 9:1. La fracción **AAc-Gc** se identificó espectroscópicamente como una mezcla de los compuestos **19, 20 y 21** (29 mg).

Fracción AAc-H. El análisis espectroscópico de la fracción indicó la presencia de aeroplysinina 2 (**22**, 15 mg).

Fracción AAc-J. El análisis espectroscópico de la fracción indicó la presencia del subereafenol B (**23**, 15 mg).

Fracción AAc-P. De la fracción **AAc-P** se obtuvieron cantidades adicionales de arothionina (**15**, 110 mg).

Fracción AAc-Q y R. El análisis en CCFa indicó la presencia de arothionina (**15**) y fistularina-3 (**16**).

Fracción AAc-S. Se obtuvo por cristalización cantidades adicionales de arothionina (**15**). De la misma fracción, se obtuvo un precipitado el cual fue identificado por técnicas espectroscópicas como una mezcla de uracilo (**24**) y timina (**25**).

Fracción AAc-T. Se purificó mediante CCFp en una placa de sílica gel, de 20x20 cm y 1 mm de espesor. Como fase móvil se utilizó DCM/MeOH en proporción 9:1, obteniéndose un sólido que se identificó como la timidina (**26**, 4.9 mg).

VII.2.4 Extracto metanólico

El extracto metanólico de la esponja se fracciono mediante cromatografía en columna por exclusión molecular utilizando Sephadex LH-20 como soporte y como eluyente MeOH. Se obtuvieron 75 fracciones que se reunieron de acuerdo con su similitud por CCFa se reunieron en 12 fracciones primarias que se nombraron **MAc-A a MAc-L**.

VIII. Resultados y Discusiones

De los extractos de la esponja *Aplysina clathrata*, se aislaron e identificaron espectroscópicamente nueve ácidos grasos (ácido tetradecanoico, ácido pentadecanoico, ácido 11-hexadecenoico, ácido hexadecanoico, ácido heptadecanoico, ácido 13-heptadecenoico, ácido 9-octadecenoico, ácido nonedecanoico y ácido 13-nonedecenoico); cinco esteroides (colest-5-en-3-ol (colesterol), ergosta-5,22-dien-3-ol, ergosta-5-en-3-ol, 25-dehydroaplysterol y aplysterol); nueve compuestos derivados de la bromotirosina (aerotionina, fistularina-3, aplysinólida, las lactonas **18**, **20** y **21**, el ácido **19**, aeroplysinina-2 y subereafenol B) y tres derivados de bases nitrogenadas (timina, uracilo y timidina). La identificación de los metabolitos aislados se llevó a cabo mediante técnicas de RMN, EM y CG-EM, principalmente.

VIII.1 Compuestos aislados

VIII.1.1 Ácidos grasos

La fracción **HAc-C**, se identificó como una mezcla de ácidos grasos, de acuerdo con su espectro de RMN-¹H. El análisis de la mezcla por CG-EM, condujo a la identificación de nueve ácidos grasos (C₁₄ - C₁₉), cinco de ellos saturados y cuatro monoinsaturados que se describen a continuación (Tabla VIII-1). La identificación de los ácidos grasos se llevó a cabo mediante la comparación de los espectros de masas y patrones de fragmentación con los de la base de datos del NIST (National Institute of Standards and Technology) y datos reportados en la literatura, los cuales concordaron satisfactoriamente (ver anexos 1-9).

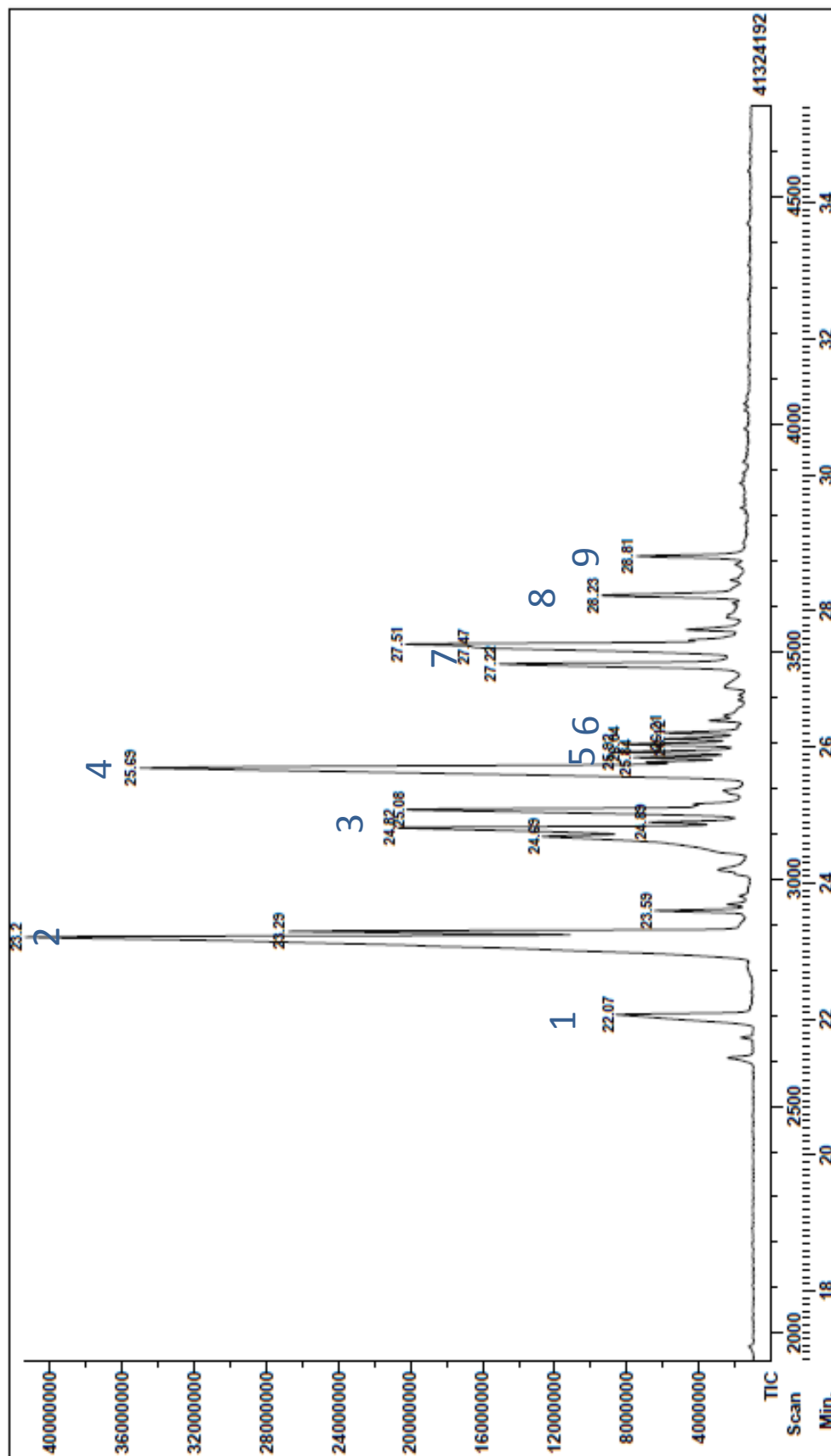
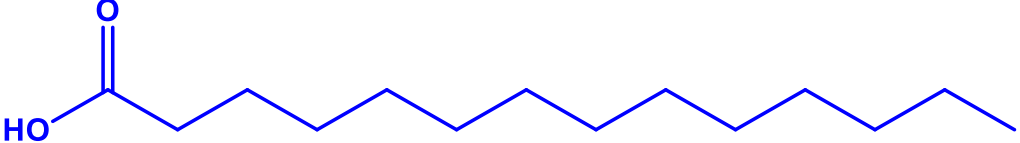

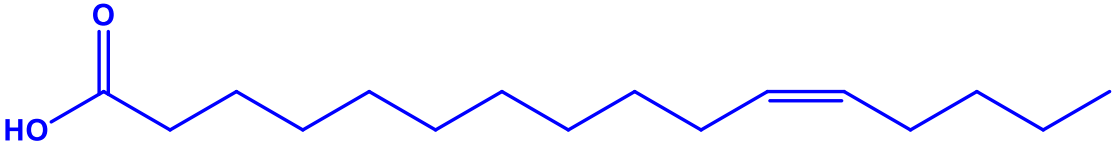
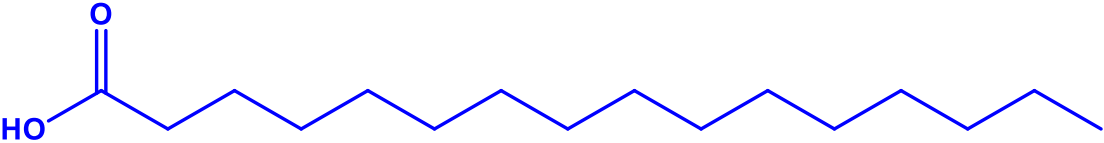
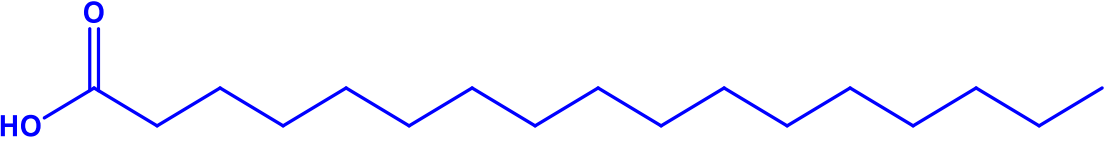
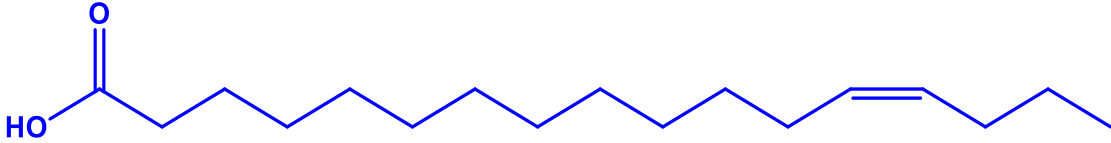
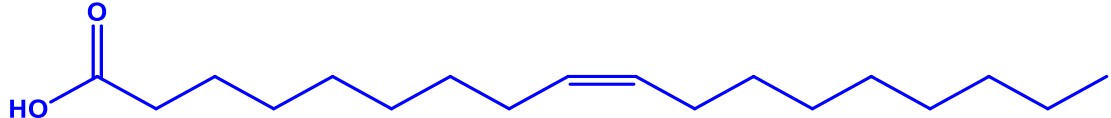
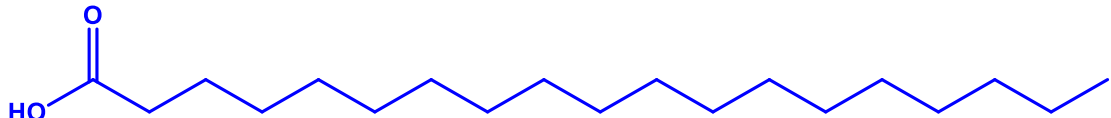
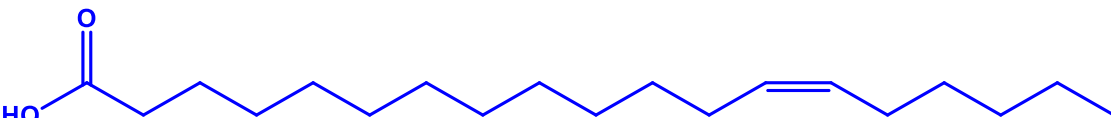


Figura VIII-1. Cromatograma de Gases-Masas de la fracción HAC-C

Tabla VIII-1. Ácidos grasos identificados en la fracción HAc-C.

No.	Nombre	T.R.	%	Estructura	P.M.
1	ácido tetradecanoico (C 14:0)	22.07	3.3		228
2	ácido pentadecanoico (C 15:0)	23.2	26		242
3	ácido 11-hexadecenoico (C 16:1)	24.82	7.2		254
4	ácido hexadecanoico (C 16:0)	25.08	6.2		256
5	ácido heptadecanoico (C 17:0)	25.92	1.5		270

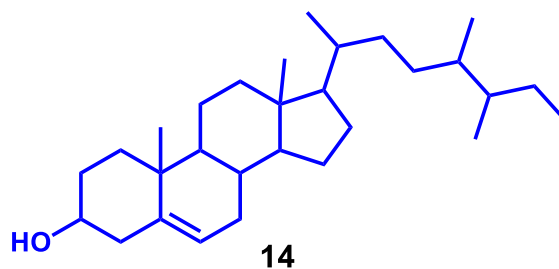
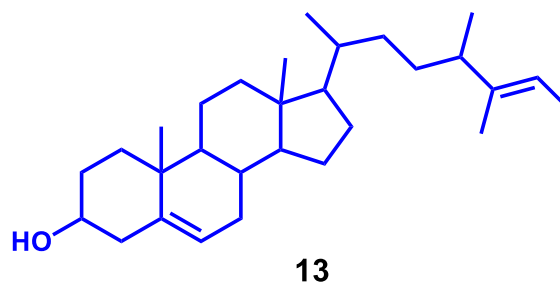
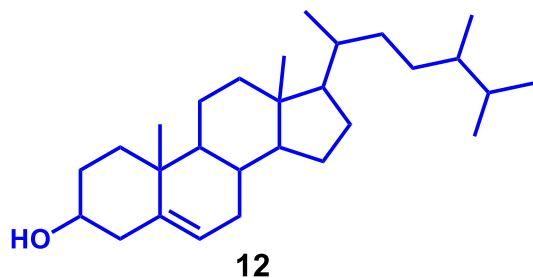
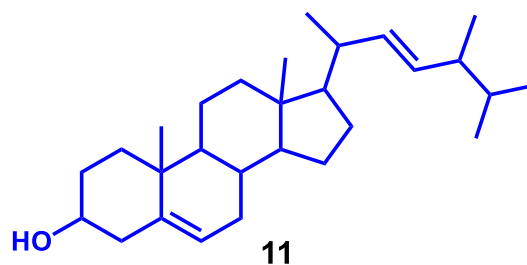
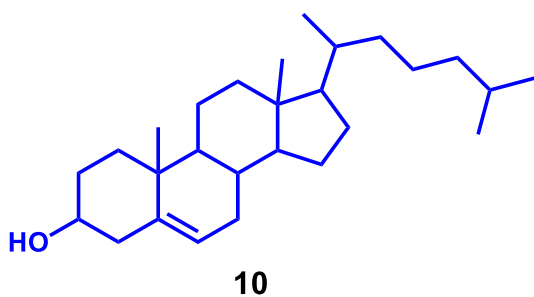
Resultados y discusiones

No.	Nombre	T.R.	%	Estructura	P.M.
6	ácido 13-heptadecenoico (C 17:1)	26.12	0.8		268
7	ácido 9-octadecenoico (C 18:1)	27.47	9.8		282
8	ácido nonedecanoico (C 19:0)	28.23	2.6		298
9	ácido 13-nonadecenoico (C 19:1)	28.81	1.5		296

Los ácidos grasos **6** y **9**, con tiempos de retención (T.R.) de 26.12 y 28.81 min, no mostraron sus correspondientes iones moleculares. En sus espectros se observaron *pseudo* iones moleculares de m/z 258 y 278, respectivamente, que deben corresponder a la pérdida de una molécula de agua del ion molecular, i.e. $(M-H_2O)^+$ (ver Anexo 9). Los datos anteriores concuerdan con los patrones de fragmentación de los ácidos 13-heptadecenoico y 13-nonadecenoico de fórmula molecular $C_{17}H_{32}O_2$ (P.M. 268) y $C_{19}H_{36}O_2$ (P.M. 296), respectivamente, reportados por Walkup *et al.* (1981) y Lawson *et al.* (1988).

VIII.1.2 Esteroles

De la fracción E del extracto hexánico de *A. clathrata* (HAc-E), se obtuvo una mezcla de cinco esteroides que se identificaron mediante CG-EM como: **colest-5-en-3-ol (colesterol) (10)**, **ergosta-5,22-dien-3-ol (11)**, **ergosta-5-en-3-ol (12)**, **25-dehydroaplysterol (13)** y **aplysterol (14)**.



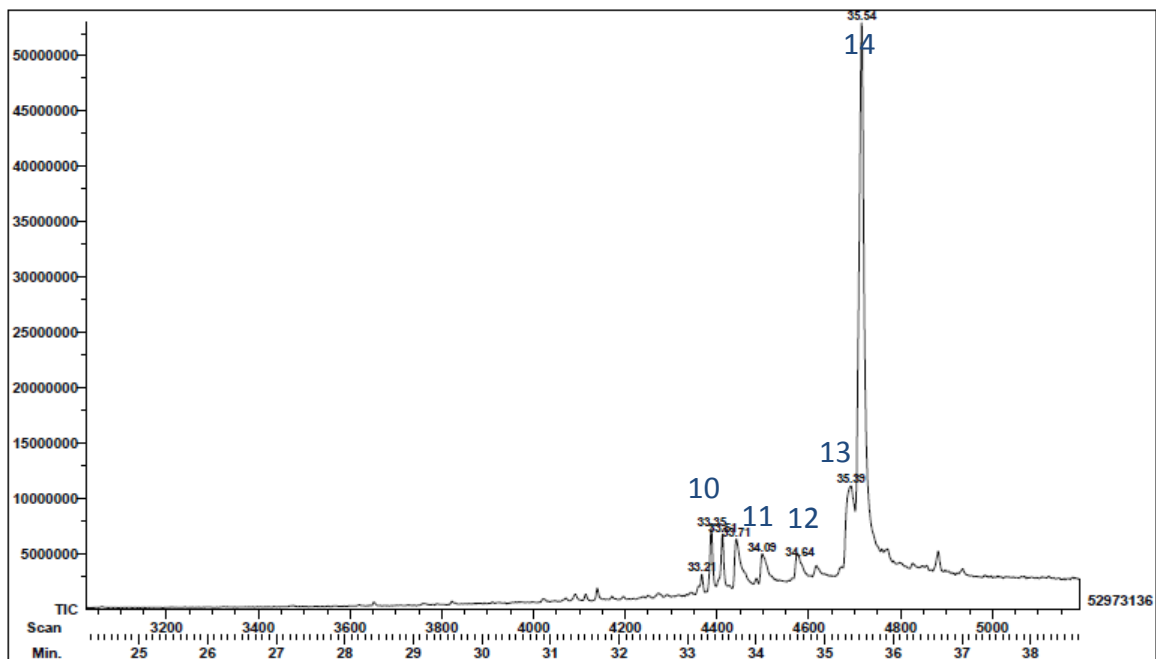


Figura VIII-2. Cromatograma de Gases-Masas de la fracción HAc-E

Los componentes con tiempos de retención (T.R.): 33.71, 34.09 y 34.64 min, en el cromatograma de Gases (CG-EM), se identificaron como los esteroides **10**, **11** y **12**, por comparación con sus espectros y patrones de fragmentación de la base de datos del NIST, mientras que el componente mayoritario (T.R. 35.54), fue identificado por RMN como el aplysterol (**14**), y por comparación con los datos de EM reportados en la literatura (Carballeira y Bou, 1989), así como su dehidro derivado (**13**) con T.R. 35.39 min. (ver Figura VIII-2).

Identificación de **25-dehydroaplysterol (13)**:

En el cromatograma se observa un pico con T.R. 35.39 min y un ion molecular $[M]^+$ de m/z 412 (ver Anexo 13) que corresponde con una fórmula molecular $C_{29}H_{48}O$ y un patrón de fragmentación similar al compuesto **14**. En el espectro de masas se observaron picos de m/z 299, 314 y 328; $[M-113]^+$, $[M-98]^+$ y $[M-84]^+$

respectivamente que corresponden a fragmentos de esteroides con cadena lateral insaturada. La comparación con la base de datos del NIST no arrojó ninguna coincidencia, sin embargo, el patrón de fragmentación está de acuerdo con lo reportado para el **25-dehydroaplysterol (13)** por Carballeira y Bou (1989).

Identificación del **aplysterol (14)**:

El componente mayoritario de la mezcla de esteroides mostró un pico con TR 35.54 min en el cromatograma. El espectro de masas mostró un ion molecular $[M]^+$ de m/z 414 (ver Anexo 14) que corresponde con la fórmula molecular $C_{29}H_{50}O$. Además, se observan picos característicos de un esteroide con núcleo Δ^5 -3-hidroxiandrosteno, como son: $[M-CH_3]^+$, $[M-H_2O]^+$, $[M-Me+H_2O]^+$, $[M-C_6H_{13}]^+$, $[M-C_8H_{15}]^+$ de m/z 399, 396, 381, 329 y 303 respectivamente, así como otros picos característicos de m/z 273, 255, 231.

El espectro de RMN- 1H (400 MHz / $CDCl_3$) (ver Figura VIII-3) mostró dos señales simples agudas en δ 0.68 y 1.01 correspondientes a los protones de los metilos 18 y 19 respectivamente, tres señales dobles en δ 0.80 ($J = 6.6$ Hz), 0.81 ($J = 6.6$ Hz) y 0.91 ($J = 6.5$ Hz) correspondientes a los protones de los metilos 27, 28 y 21 y una señal triple en δ 0.86 ($J = 7.33$ Hz) que corresponde al metilo 29. Una señal múltiple en δ 3.5 es asignable al protón (H-3) del metino unido al grupo OH.

Los datos anteriores concuerdan con las señales en RMN del aplysterol, además del patrón de fragmentación correspondiente reportado por Carballeira y Bou (1989). Sin embargo, la comparación con la base de datos del NIST indicó que se

trataba del β -sitosterol, debido a que tienen el mismo PM y patrón de fragmentación ya que la única diferencia con este último se encuentra en la posición del metilo-29 en la cadena lateral, que en el caso del β -sitosterol se encuentra en C-28 y en el aplysterol sobre C-26, lo que origina diferencias en los desplazamientos químicos de RMN que los pueden diferenciar.

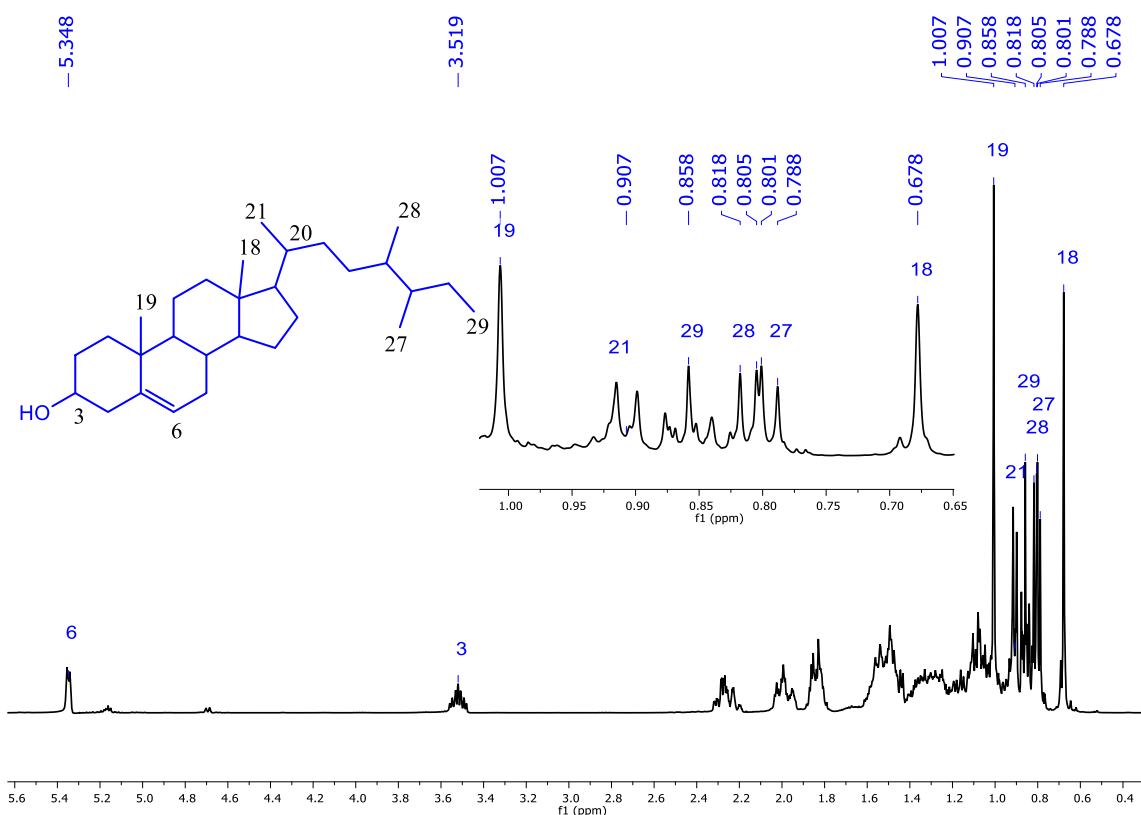
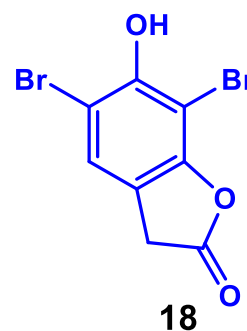
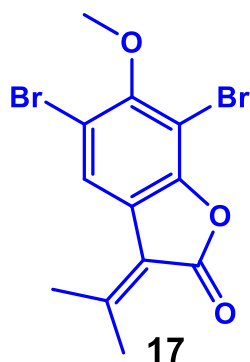
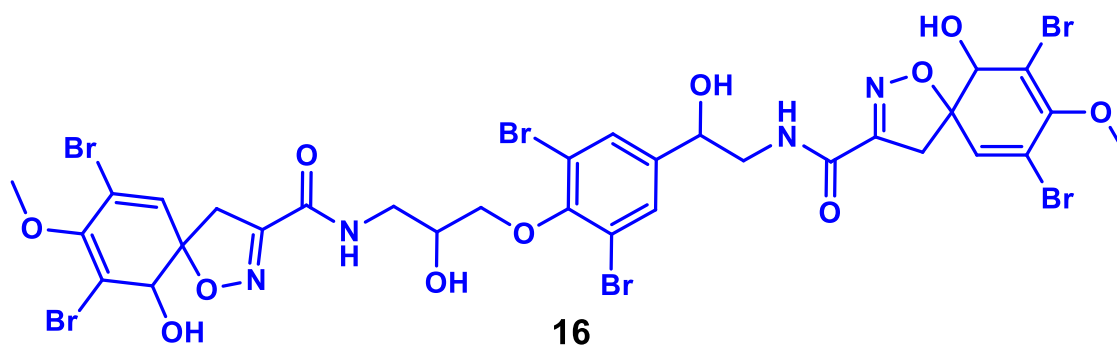
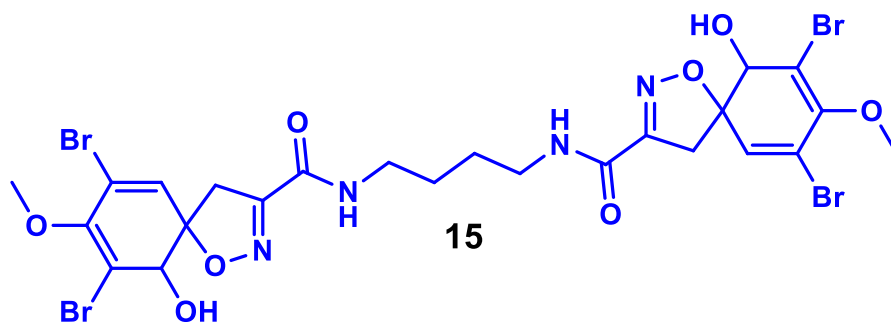


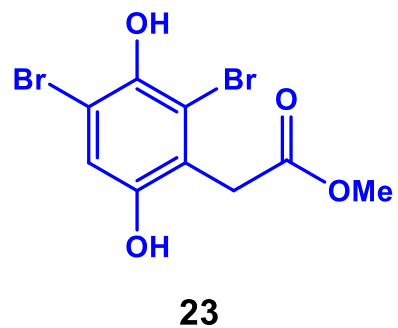
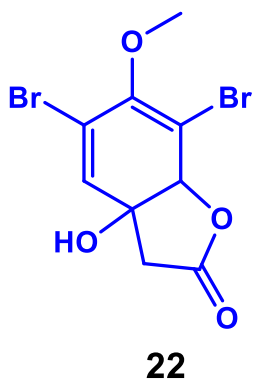
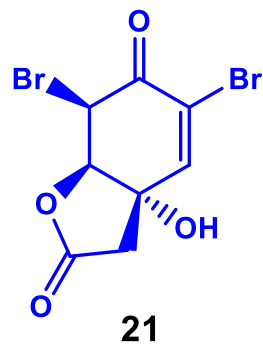
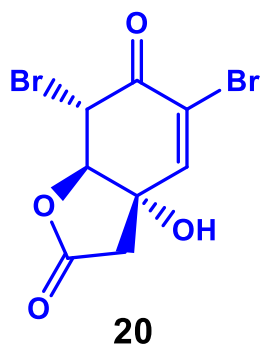
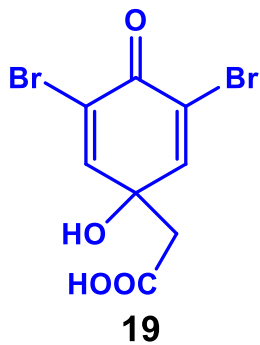
Figura VIII-3. Espectro de RMN-¹H (400 MHz / CDCl₃) de aplysterol (14)

Los cinco esteroides han sido reportados con anterioridad en especies del género *Aplysina* por De Luca *et al.* (1972), Lawson *et al.* (1988) y Carballeira y Bou (1989).

VIII.1.3 Derivados de bromo tirosina

De los extractos de DCM y de acetona, se aislaron nueve compuestos derivados de la bromotirosina, que se identificaron espectroscópicamente como: aerotionina (15), fistularina-3 (16), aplysinólida (17), las lactonas 18, 20 y 21, el ácido 19, aeroplysinina-2 (22) y subereafenol B (23).



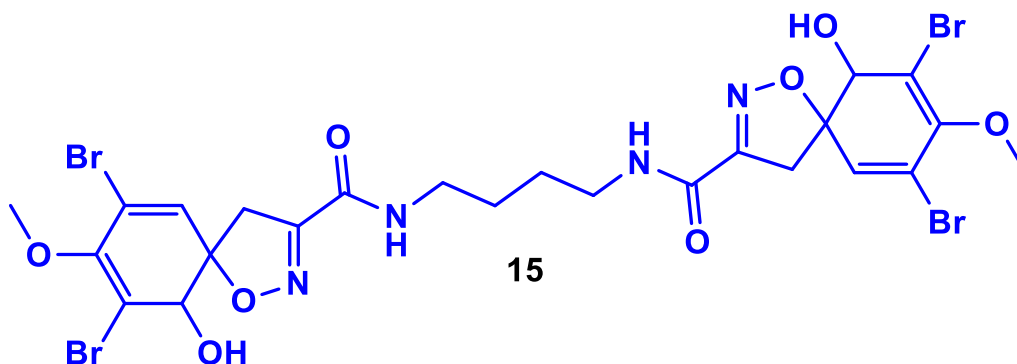


A continuación se discuten los aspectos más importantes para la elucidación estructural de los compuestos aislados.

Caracterización de la aerotionina (15):

El compuesto **15**, fue aislado del extracto de DCM como un sólido con punto de fusión de 130 °C, cuyo espectro de masas por ionización química a presión reducida (EM-APCI), mostro iones moleculares $[M]^+$, $[M]^{+2}$, $[M]^{+4}$, $[M]^{+6}$ y $[M]^{+8}$: de m/z 814, 816, 818, 820 y 822 con intensidades relativas 1:4:6:4:1, indicando la presencia de cuatro átomos de bromo en la molécula.

El espectro de RMN- ^1H (400 MHz / acetona- d_6) mostró señales que son asignables a un grupo metoxilo en δ 3.72 (d, $J = 0.8$ Hz); un metino olefínico a δ 6.52 (s); un sistema AB debido a un metileno diasterotópico, con señales en δ 3.83 (d, $J = 18.2$ Hz) y δ 3.17 (d, $J = 18.2$ Hz), así como una señal doble asignable al protón de un hidroxilo en δ 5.41 (d, $J = 8.1$ Hz) el cual muestra acoplamiento con la señal de un oximetino en δ 4.18 (dd, $J = 7.8, 0.8$ Hz), se observan además las señales de los protones del grupo amino en δ 7.65 (t, $J = 5.7$ Hz) y dos metilenos en δ 3.34 y 1.62 como señales múltiples (ver Anexo 15).



En el espectro de RMN-¹³C (125 MHz / acetona-d₆) muestra doce señales asignables a un metilo (δ_C 60.3 / δ_H 3.72), tres metilenos (δ_C 40.3 / δ_H 3.83 y δ 3.173, δ_C 39.6 / δ_H 3.34 y δ_C 27.5 / δ_H 1.62), dos metinos (δ_C 132.5 / δ_H 6.52 y δ_C 75.2 / δ_H 4.18) que se asignaron a un CH olefínico y un oximetino, así como seis carbonos totalmente sustituidos (δ_C 160.1, 155.4, 148.8 122.1, 113.9 y 91.6), de acuerdo con los experimentos DEPT, COSY y HSQC (ver Anexo 16).

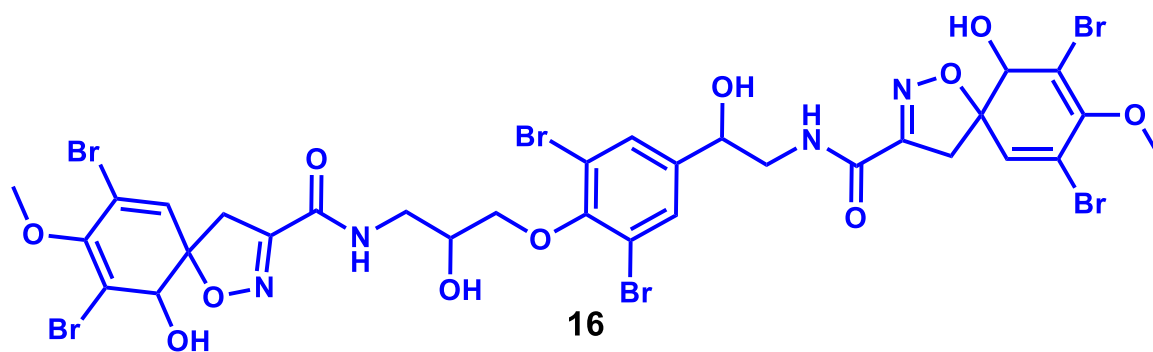
Los datos anteriores, así como las correlaciones observadas en el experimento HMBC son consistentes con los reportados en la literatura para la **aerothionina (15)**, uno de los metabolitos derivados de la dibromotirosina más comunes encontrados en especies del género *Aplysina*, (Fattorusso *et al.*, 1970).

🌿 Caracterización de la **fistularina-3 (16)**:

El segundo compuesto aislado fue identificado como **fistularina-3 (16)**, otro derivado de dibromotirosina aislado de especies del género *Aplysina*. Su espectro de masas (EM-APCI) mostró iones moleculares $[M]^+$, $[M]^{+2}$, $[M]^{+4}$, $[M]^{+6}$, $[M]^{+8}$, $[M]^{+10}$ y $[M]^{+12}$ de m/z 1108, 1110, 1112, 1114, 1116, 1118 y 1120 con intensidades relativas 1:6:15:20:15:6:1 indicando la presencia de seis átomos de bromo en la molécula.

En los espectros de RMN, presentó señales asignables a dos unidades cilcohexadieno-dihidroisoxazol, de manera similar a la **aerotionina (15)** (ver Anexo 17 y Anexo 18) [dos metoxilos en δ_C 60.2 / δ_H 3.73 (s); dos metinos olefínicos a δ_C 132.3 y 132.2 / δ_H 6.53 (d, $J = 0.8$ Hz) y 6.51 (d, $J = 0.8$ Hz); dos oximetinos en δ_C 75.3 y 75.2 / δ_H 4.19 (dd, $J = 8.1, 0.8$ Hz) y 4.18 (dd, $J = 8.1, 0.8$ Hz); dos hidroxilos en δ 5.47 (d, $J = 8.1$ Hz) y 5.47 (dd, $J = 8.18, 1.48$ Hz); y dos sistema AB debidos a dos metilenos diasterotópicos en δ_C 40.1 y 40.0 / δ_H 3.85 (d, $J = 18.3$ Hz) y 3.20 (d, $J = 18.3$ Hz); y 3.83 (d, $J = 18.3$) y δ 3.16 (d, $J = 18.3$ Hz).

Además se observa una señal simple correspondiente a dos protones aromáticos equivalentes de un anillo aromático tetra-sustituido; otras señales son asignables a dos hidroxilos en δ 4.49 (d, $J = 5.2$ Hz) y δ 5.06 (d, $J = 4.3$ Hz), dos oximetinos en δ 4.24 (m) y 4.90 (dt, $J = 8, 4.4$ Hz) y tres metilenos con señales en δ 3.57 (m)/ 3.77 (m), 4.02 (dd, $J = 9.0$ y 5.4 Hz)/ 4.06 (dd, $J = 9.0$ y 5.9 Hz) y δ 3.59 (m)/ 3.47 (m) correspondientes al resto de la estructura.



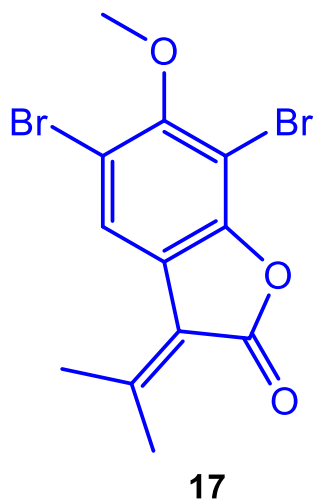
Los acoplamientos ^1H - ^{13}C a dos y tres enlaces observados en el espectro HMBC confirman la presencia de los sistemas cilcohexadieno-dihidroisoxazol y están de acuerdo con los datos reportados para **fistularina-3** (Gopichand y Schmitz, 1979; y Rogers *et al.*, 2005)

🌿 Caracterización de la **aplysinólida (17)**:

El compuesto **17**, se obtuvo de la fracción AAC-A por CCFp como un sólido color café, cuyo espectro de masas por impacto electrónico (EM-IE), mostró iones moleculares $[M]^+$, $[M]^{+2}$ y $[M]^{+4}$: de m/z 360, 362 y 364 con intensidades relativas 1:2:1 (ver Anexo 21), característicos de compuestos di-bromados, y que están de acuerdo para un compuesto de fórmula molecular $C_{12}H_{10}O_3Br_2$.

El espectro de RMN- 1H (500 MHz / $CDCl_3$) mostró solamente cuatro señales simples, que se asignaron a un metoxilo en δ 3.92, dos metilos en δ 2.39 y 2.59 y un metino olefínico en δ 7.66 (ver Anexo 19). Mientras que en el espectro de RMN- ^{13}C (125 MHz / $CDCl_3$) se observaron 12 señales (ver Anexo 20) que están de acuerdo con el peso y la fórmula molecular obtenidos por espectrometría de masas.

Los datos anteriores permitieron identificar el compuesto **17**, como la **aplysinólida**, la cual fue aislada con anterioridad de la especie *A. thiona* por Cruz *et al.* (1990).



🌿 Caracterización de la lactona **18**:

La lactona **18**, se aisló del extracto de acetona en la fracción **AAc-E** como un sólido de color café.

En el espectro de masas por impacto electrónico (EM-IE) presentó el ion molecular $[M]^+$ y sus contribuciones isotópicas $[M]^{+2}$ y $[M]^{+4}$: de m/z 306, 308 y 310 con intensidades relativas 1:2:1 (ver Anexo 25), característicos de compuestos di-bromados. Su espectro de masas de alta resolución obtenido por la técnica DART (HR-DART-MS), indicó una masa molecular exacta de 306.86142 uma, que corresponde a la formula molecular $C_8H_5^{79}Br_2O_3$ $[M+H]^+$ (calculada para $C_8H_5^{79}Br_2O_3$, 306.86054).

Su espectro de RMN- 1H (500 MHz / acetona- d_6) mostró, como en el caso anterior, solo tres señales simples en δ 3.83, 7.37 y 8.55, que se asignaron a un metileno, un metino olefínico y un hidroxilo respectivamente (ver Anexo 22), mientras que en el espectro de RMN- ^{13}C (125 MHz / acetona- d_6) (ver Anexo 23) se observan 8 señales que están de acuerdo con la formula molecular propuesta por EM. Las señales de ^{13}C se asignaron a un metileno en δ 35.5 y un metino olefínico en δ 114.4 así como seis carbonos totalmente sustituidos δ 148.3, 108.5, 148.6, 110.2, 127.6 y 172.8 (Tabla VIII-2). Las correlaciones observada por HMBC se muestran en la Figura VIII-4.

Los datos anteriores permitieron proponer la estructura de la **2,4-dibromo-3-hidroxi-1-benzofuranona**, para el compuesto **18**. La revisión de la literatura indicó que la lactona **18**, no ha sido aislada como producto natural, pero si como producto

intermediario en la síntesis de un compuesto derivado de la bromotirosina llamado aplysinadina por Norte *et al.* (1987, 1988).

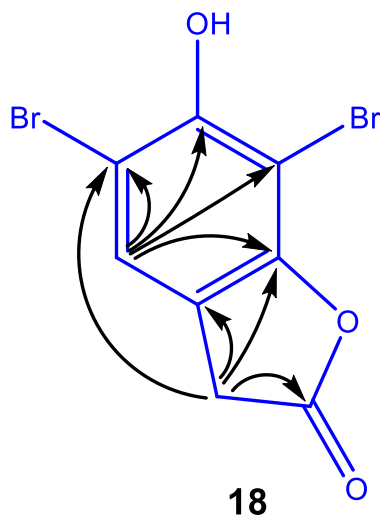


Figura VIII-4. Correlaciones observadas en el espectro HMBC.

Tabla VIII-2. Datos de RMN-¹³C (125 MHz) y RMN-¹H (500 MHz) del compuesto **18** en acetona-d₆.

#C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (multi., J en Hz)	HMBC
1	148.3	-	-
2	108.5	-	-
3	148.6	-	-
4	110.2	-	-
5	114.4	7.37 (s)	1, 2, 3 y 4
6	127.6	-	-
7	35.5	3.83 (s)	1, 4, 6 y 8
8	172.8	-	-
-OH	-	8.55 (sa)	-

🌿 Caracterización de los compuestos **19**, **20** y **21**:

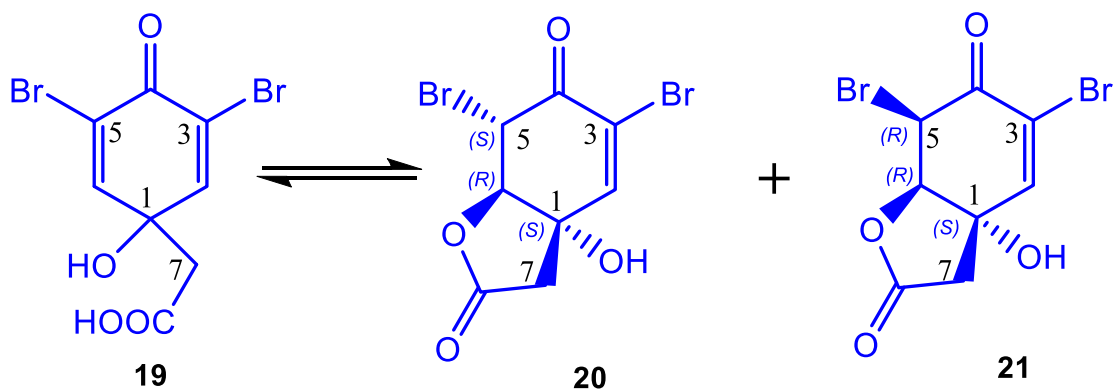
De la fracción **AAC-Gc** se obtuvo una mezcla inseparable de los compuestos **19**, **20** y **21**, los cuales se identificaron principalmente por RMN y espectrometría de masas. El espectro de masas por IE mostró iones moleculares $[M]^+$, $[M]^{+2}$ y $[M]^{+4}$ de m/z 324, 326 y 328 con intensidades relativas 1:2:1, lo que indicó como en los casos anteriores la presencia de dos átomos de bromo en la molécula, de acuerdo con la fórmula molecular $C_8H_6Br_2O_4$ para los tres compuestos.

Sin embargo, los espectros de RMN mostraron más señales de las esperadas para un compuesto C_8H_6 , especialmente el espectro de RMN ^{13}C , el cual mostró 22 señales; cinco de ellas asignables a grupos metino (δ 152.5, 148.7, 147.4, 88.8 y 85.0), otras tres a grupos metileno (δ 43.8, 43.5 y 41.3) y las restantes a carbonos cuaternarios, de acuerdo con los experimentos DEPT y HSQC. Lo que sugiere que se trata de una mezcla de tres compuestos de similar naturaleza (isómeros).

El espectro de RMN- 1H (400 MHz / acetona- d_6) muestra dos señales prominentes de intensidades similares en δ_H 7.66 (s) / δ_C 152.5, y δ_H 2.95 (s) / δ_C 43.8, asignables a dos metinos olefínicos y un metileno, así como un grupo hidroxilo en δ 5.53. En el experimento HMBC la señal en 7.66 ppm mostró correlaciones con las señales de los carbonos del metileno en 43.8 ppm, con el carbono olefínico en 152.5 ppm, así como con los carbonos cuaternarios en 121.4 y 172.8 ppm. Las señales descritas anteriormente sugieren la presencia del ácido dibromado **19** (de fórmula molecular $C_8H_6Br_2O_4$, de acuerdo con el espectro de masas) como componente mayoritario (ver Anexo 26 y Anexo 27). Los datos de RMN- 1H concuerdan con los

del ácido **19**, obtenido por hidrólisis de la amida, obtenida de *Verongia (Aplysina) fistularis* (Sharma *et al.* 1970) y a partir de la **aeroplisinina-2 (22)**, aislada de *Verongia (Aplysina) aerophoba* (Minale *et al.* 1972)

Recientemente, durante la identificación del ácido **19** por RMN, se encontró que este se encuentra en equilibrio tautomérico y conformacional con las γ -lactonas **20** y **21** (Santalova *et al.* 2011). En nuestro caso, un cuidadoso análisis, de los acoplamiento a larga distancia en el espectro HMBC de las señales en la región de los protones olefínicos, mostró que el protón en δ_H 7.56 (H-2, d, $J = 1.1$ Hz / δ_C 148.7), está acoplado con los carbonos, δ_C : 41.3(C-7), 53.2(C-6), 76.4(C-1), 88.8(C-3), 121.4(C-5) y 182.3(C-4). Mientras que el protón en δ_H 7.42 (H-2, t, $J = 1.2$ Hz / δ_C 147.4), lo está con los carbonos, δ_C : 43.5(C-7), 50.2(C-6), 75.9(C-1), 85.0(C-3), 121.5(C-5) y 182.1(C-4). Los datos anteriores y correlaciones en los experimentos COSY, HSQC y HMBC permitieron identificar la presencia del ácido (3,5-dibromo-1-hidroxi-4-oxociclohexa-2,5-dien-1-il)-acético (**19**) y las 3,5-dibromo-1-hidroxi-tetrahydro-benzofuran-4,8-dionas (**20** y **21**).



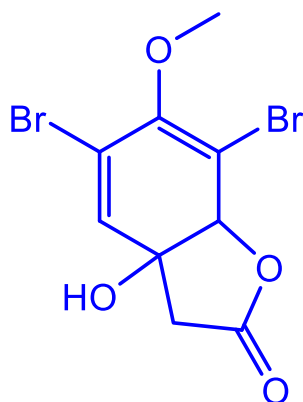
Los compuestos **20** y **21** son γ -lactonas epiméricas en C-5 (1*S*, 5*S*, 6*R*) y (1*S*, 5*R*, 6*R*), respectivamente. La comparación de los datos de RMN con los publicados por Santalova *et al.* (2011), están de acuerdo con los obtenidos en este trabajo.

🌿 Caracterización de la **aeroplisinina-2 (22)**:

La **aeroplisinina-2 (22)**, se aisló de la fracción **AAc-H** como un sólido color café cuyo espectro de masas (EM-IE) mostro los iones $[M]^+$, $[M]^{+2}$ y $[M]^{+4}$: de m/z 338, 340 y 342 con una intensidades isotopicas 1:2:1 (ver Anexo 33), lo que confirmó la presencia de dos átomos de bromo en la molécula y de acuerdo con la formula molecular $C_9H_8Br_2O_4$.

El espectro de RMN- 1H (500 MHz / acetona- d_6) mostró señales que se asignaron a un metoxilo en δ 3.75, un hidroxilo en δ 7.67, un metino olefínico en δ 6.60, un oximetino en δ 5.21 y un metileno diasterotópico en δ 2.96 (d, $J = 17.04$) y 3.01 (d, $J = 17.04$) (ver Anexo 31).

El espectro de RMN- ^{13}C (125 MHz / acetona- d_6) muestra nueve señales, las cuales corresponden con la formula molecular propuesta de acuerdo con el espectro de masas (ver Anexo 32).



22

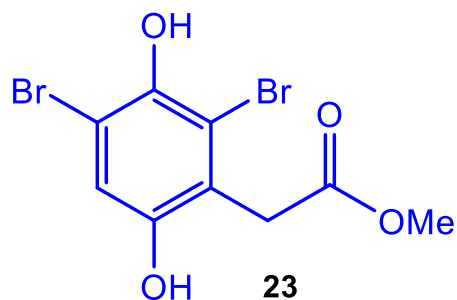
Los datos anteriores permitieron establecer la estructura del compuesto **22** como la **aerophysinina-2**, los cuales coinciden con los datos reportados para el compuesto aislado de *Aplysina aerophoba* (Minale y Sodano en 1972).

🌿 Caracterización de **subereafenol B (23)**:

El espectro de masas (EM-IE) del compuesto **23**, muestra iones moleculares $[M]^+$, $[M]^{+2}$, y $[M]^{+4}$: m/z 338, 340 y 342 con una relación 1:2:1, respectivamente, que como en los casos anteriores indicó la presencia de dos átomos de bromo en la molécula, de acuerdo con la fórmula molecular $C_9H_8Br_2O_4$. Se observan además picos correspondientes a los fragmentos $[M-MeOH]^+$: m/z 304, 306, 308 y $[M-AcOH]^+$: 278, 280, 282 con la misma relación 1:2:1.

El espectro de RMN- 1H (500 MHz / acetona- d_6) muestra señales para un metoxilo en δ 3.63, dos hidroxilos en δ 8.89 y 7.93, un metino olefínico en δ 7.11 y un metileno en δ 3.82 (ver Anexo 22). En el espectro de RMN- ^{13}C (125 MHz / acetona- d_6) se observan nueve señales lo que corresponde con la fórmula molecular de acuerdo con el EM.

Los datos anteriores y la comparación con datos reportados en la literatura, permitieron la identificación del compuesto **23** como el **subereafenol B**, aislado de *Subera sp.* (Shaker *et al.* 2010) y *Aplysina lacunosa* (Göthel *et al.* 2015).



VIII.1.4 Derivado de bases nitrogenadas

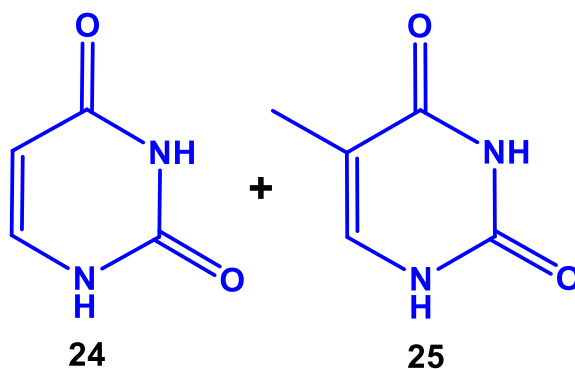
☛ Caracterización de **timina (24)** y **uracilo (25)**:

De la fracción **AAc-S** se separó un precipitado color negro, que se identificó como una mezcla de las bases pirimidicas, timina (**24**) y uracilo (**25**). El espectro de masas (IE) muestra el ion molecular m/z 112 $[M]^+$ para el compuesto mayoritario (**24**), y el ion molecular m/z 126 $[M]^+$ para el compuesto minoritario (**25**) (ver Anexo 39).

El espectro de RMN- 1H (500 MHz / DMSO- d_6) para el compuesto mayoritario (**24**) muestra dos señales simples anchas para los grupos -NH en δ 11.01 y 10.81, este último como la parte X de un sistema ABX acoplado con los metinos olefínico en δ 7.38 (dd, $J = 7.6, 5.7$) y δ 5.44 (dd, $J = 7.6, 1.3$).

En el espectro de RMN- ^{13}C (125 MHz / DMSO- d_6) se observan cuatro señales, dos carbonos cuaternarios en el área de carbonilos (δ 164.4 y 151.5) y dos correspondientes a los carbonos olefínicos (δ 142.2 y 100.2).

Para el compuesto minoritario (**25**) en el espectro de RMN- 1H (500 MHz / DMSO- d_6) se observan las señales para dos -NH en δ 11.01 (sa) y 10.58 (sa) y un protón olefínico en δ 7.24 (dd, $J = 5.7, 1.2$) acoplado con un metilo δ 1.72 (d, $J = 1.2$).



Los datos anteriores están de acuerdo con los reportados por Zhang-Gui *et al.* (2008) para la **timina (24)** y el **uracilo (25)**.

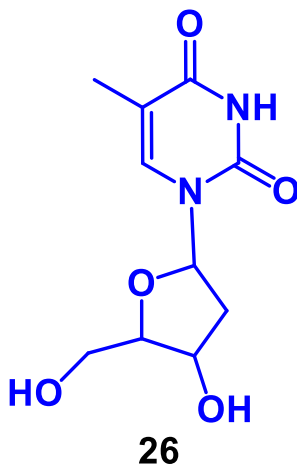
🌿 Caracterización de **timidina (26)**:

El espectro de masas de alta resolución (HR-DART-MS)⁺ del compuesto **26** indicó una masa exacta de 243.09732 uma [M+H]⁺ (ver Anexo 42) que está de acuerdo con la fórmula molecular C₁₀H₁₅N₂O₅ con cinco grados de insaturación.

El espectro de RMN-¹H (500 MHz / MeOD) (ver Anexo 40) muestra señales para un metino olefínico en δ 7.82 (d, *J* = 1.1), un metilo en δ 1.88 (d, *J* = 1.1), un metino en δ 6.28 (t, *J* = 7), un metileno de δ 2.18-2.27 (m), un oximetino en 4.40 (dt, *J* = 6.5, 3.4) y un sistema ABX conformado por un metino en δ 3.91 (dd, *J* = 3.4, 3.3) acoplado con un metileno diasterotópico en δ 3.73 (dd, *J* = 12, 3.7) y 3.80 (dd, *J* = 12, 3.2).

El espectro de RMN-C¹³ (125 MHz / MeOD) muestra diez señales que corresponden con la fórmula molecular C₁₀H₁₅N₂O₅ propuesta de acuerdo con el espectro de masas (ver Anexo 41).

Con los datos anteriores se identificó el compuesto **26** como la **timidina**, los cuales concuerdan con los reportados por Moyroud *et al.* (2000).



IX. Conclusiones

El estudio químico de la esponja de mar *Aplysina clathrata*, recolectada en el Golfo de California, llevó al aislamiento e identificación de veintiséis compuestos detallándolos a continuación:

- En una de las fracciones menos polares (**HAc-C**) del extracto de hexano de la esponja *A. clathrata* se identificaron nueve ácidos grasos: ácido tetradecanoico (1), ácido pentadecanoico (2), ácido 11-hexadecenoico (3), ácido hexadecanoico (4), ácido heptadecanoico (5), ácido 13-heptadecenoico (6), ácido 9-octadecenoico (7), ácido nonadecanoico (8), ácido 13-nonadecenoico (9).
- En la fracción **HAc-E** (fracción de polaridad baja) del extracto de hexano, se identificaron cinco esteroides: colest-5-en-3-ol "colesterol" (10), ergosta-5,22-dien-3-ol (11), ergosta-5-en-3-ol (12), 25-dehydroaplysterol (13) y aplysterol (14).
- Del extracto de acetona (fracciones polares) se aislaron nueve compuestos derivados de la bromotirosina: arothionina (15), fistularina-3 (16), aplysinólida (17), lactona (18), ácido (19), lactona (20), lactona (21), aeroplysinina-2 (22), subereafenol B (23).
- De las fracciones más polares se aislaron tres compuestos derivados de bases nitrogenadas en el extracto de acetona: timina (24), uracilo (25) y timidina (26).

Conclusiones

- La lactona **18** se reporta por primera vez como compuesto de origen natural, anteriormente fue reportado como producto de síntesis..
- Este trabajo constituye el primer estudio químico de la esponja de mar *A. clathrata*, por lo que contribuye al conocimiento del género.

X. Perspectivas

- Continuar con el estudio de los extractos más polares como el extracto de acetona y metanol.
- Evaluar las actividades biológicas que pudieran presentar los compuestos aislados de la esponja *A. clathrata* mediante la realización de diferentes bioensayos (antibacterial, antiparasitario, anticancerígeno, etc.).

XI. Bibliografía

- ABOU-SHOER, M. I., L. A. SHAALA, D. T. YOUSSEF, J. M. BADR y A. A. M. HABIB. 2008. Bioactive brominated metabolites from the Red Sea sponge *Suberea mollis*. *Journal of natural products*, 71(8). pp 1464-1467.
- ACOSTA, A. L. y A. D. RODRÍGUEZ. 1992. 11-oxoaerotionin: a cytotoxic antitumor bromotyrosine derived alkaloid from the Caribbean marine sponge *Aplysina lacunosa*. *Journal of Natural Products*, 55. pp 1007-1012.
- ALCOLADO, P. y A. HERRERA. 1987. Efectos de la contaminación sobre las comunidades de esponjas en el litoral de la Habana, Cuba. Reporte de Investigación. Instituto de Oceanología Academia de Ciencias de Cuba. 68, pp 1-17.
- ÁVILA-NÚÑEZ R. 2000. Estudio químico y actividad biológica en esponjas del género *Aplysina*. Tesis de Doctorado. Universidad Central de Venezuela. 125 pp.
- BAKUS, G. J., TARGETT, N. M., y SCHULTE, B. 1986. Chemical ecology of marine organisms: an overview. *Journal of Chemical Ecology*, 12(5), 951-987.
- BARDHAN, S., D. C. SCHMITT y J. A. PORCO. 2006. Total synthesis and stereochemical assignment of the spiroisoxazoline natural product (+)-calafianin1. *Organic letters*, 8(5), pp 927-930.
- BARNES, D. 1969. Zoología de los Invertebrados. Editorial Interamericana. México D.F. 761 pp.
- BERGMANN W. y R.J. FEENEY. 1951. Contributions to the study of marine products. XXXII. The nucleosides of sponges. *Org. Chem. Vol. 16*. pp 981-987.
- BERGMANN, W. 1962. Sterols: Their structure and distribution. pp 123-130. En: Florkin, M. y H.S. Masón (eds). *Comparative biochemistry*. Vol. 3. New York. Academic Press. 958 pp.
- BLUNT, J. W., y M. H. G. MUNRO. 2005. MarinLit database. University of Canterbury. Disponible en: <http://pubs.rsc.org/marinlit/>. Consultado el 28 de Agosto de 2016.
- BOARD, O. S., y NATIONAL RESEARCH COUNCIL. 2002. *Marine biotechnology in the twenty-first century: problems, promise, and products*. National Academies Press. 117 pp.

- BRIZUELA, M. A., L. GARCÍA, L. PÉREZ y M. MANSUR. 1998. Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios. *Rev Iberoam Micol.* Vol.15. pp 69-74.
- BROOKS, C.J.W. 1970. Steroids: Sterols and Bile Acids. pp 1. En: Coffey S. (ed) *Rodd's Chemistry of carbon compounds.* Vol. 110. Elsevier Publishing Company.
- BRUSCA, R. C. y G. BRUSCA. 2005. *Invertebrates.* Sinauer Assoc. Inc. Publ. U.S.A. 922 pp.
- CARBALLEIRA, N. S. M., y C. R. BOU. 1989. The sterol composition of the marine sponge *Aplysina* (= *Verongia*) *archeri*: a comparative study of the Verongidae. *Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry,* 93(1), pp 175-179.
- CARBALLO, J. L., E. ZUBÍA Y M. J. ORTEGA. 2006. Biological and chemical characterization of three new species of *Dysidea* (Porifera: Demospongiae) from the Pacific Mexican coast. *Biochemical, Systematics and Ecology* 34, pp 498-508.
- CARNEY, J. R. y K. L. RINEHART. 1995. Biosynthesis of brominated tyrosine metabolites by *Aplysina fistularis*. *Journal of Natural Products,* 58. pp 971-985.
- CIMINIELLO P., V. COSTANTINO, E. FATTORUSSO, S. MAGNO y M. PANSINI. 1999. Chemistry of Verongida sponges. Secondary metabolite composition of the Caribbean sponge *Aplysina cauliformis*. *Journal of Natural Products,* 62(4). pp 590-593.
- CIMINIELLO, P., C. DELL'AVERSANO, E. FATTORUSSO, S. MAGNO, L. CARRANO y M. PANSINI. 1996. Chemistry of Verongida sponges. VII bromocompounds from the Caribbean sponge *Aplysina archeri*. *Tetrahedron,* 52. pp 9863-9868.
- CIMINIELLO, P., E. FATTORUSSO, M. FORINO, S. MAGNO y M. PANSINI. 1997. Chemistry of Verongida sponges VIII- Bromocompounds from the Mediterranean sponges *Aplysina aerophoba* and *Aplysina cavernicola*. *Tetrahedron,* 53. pp 6565-6572.
- CIMINIELLO, P., V. CONSTANTINO, E. FATTORUSSO, S. MAGNO, A. MANGONI y M. PANSINI. 1994. Chemistry of Verongida sponges, II. Constituents of the Caribbean sponge *Aplysina fistularis*. *Journal of Natural Products,* 57. pp 705-712.

- CIMINO, G., S. DE ROSA, S. DE STEFANO, R. SELF y G. SODANO. 1983. The bromo-compounds of the true sponge *Verongia aerophoba*. Tetrahedron Letters, 24(29), pp 3029-3032.
- CLARK R. 2000. The chemistry and chemical ecology of marine sponges. PhD Diss., Univ. Queensland, Queensland, Australia. 112 pp.
- COMPAGNONE R. S., R. AVILA, A. I. SUÁREZ, O. V. ABRAMS, H. R. RAGEL, F. ARVELO, I. C. PIÑA y E. MERENTES. 1999. 11-Deoxyfistularin-3, a new cytotoxic metabolite from the Caribbean sponge *Aplysina fistularis insularis*. Journal of Natural Products, 62(10). pp 1143-1444.
- CONABIO. S.F. Biodiversidad Mexicana. Consultado el 5 de Enero del 2015 en <http://www.biodiversidad.gob.mx/>
- CRAGG, G. 2008. Marine natural products. Gordon Research Conference. <http://www.grc.org>. Ventura Beach Marriott, California.
- CRUZ-SOSA, F., L. QUIJANO, F. GÓMEZ-GARIBAY y T. RÍOS. 1990. Brominated metabolites from the sponge *Aplysina* (*Verongia*) *thiona*. Journal of Natural Products 53, pp 543-548
- DE LA CALLE, F. 2009. Fármacos de origen marino. Treballs de la Societat Catalana de Biologia, pp 141-155.
- DE LIRA, T. O., R. G. S. BERLINCK, G. G. F. NASCIMENTO y E. HAJDU. 2006. Further dibromotyrosine-derived metabolites from the marine sponge *Aplysina caissara*. Journal of the Brazilian Chemical Society, 17(7). pp 1233-1240.
- DE LUCA, P., M. DE ROSA, L. MINALE y G. SODANO. 1972. Marine sterols with a new pattern of side-chain alkylolation from the sponge *Aplysina* (= *Verongia*) *Aerophoba*. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1, pp 2132-2135.
- DE MEDEIROS, A. I., R. C. GANDOLFI, A. SECATTO, R. M. FALCUCCHI, L. H. FACCIOLI, E. HAJDU, y R. G. BERLINCK. 2012. 11-Oxoerothionin isolated from the marine sponge *Aplysina fistularis* shows anti-inflammatory activity in LPS-stimulated macrophages. Immunopharmacology and immunotoxicology, 34(6). pp 919-924.
- DUQUE C., A. MARTÍNEZ y G. PEÑUELA. 1983. Esteroles en esponja. Revista Colombiana de Química. Vol. 12 no. 1. pp 55-68.

- EBEL, R., M. BREZINGER, A. KUNZE, H. J. GROSS y P. PROKSCH. 1997. Wound activation of protoxins in marine sponge *Aplysina aerophoba*. *Journal of Chemical Ecology*, 23(5). pp 1451-1462.
- EL-GAMAL A., S. WANG, C. DAI y C. DUH. 2004. New nardosinanes and 19-oxygenated ergosterols from the soft coral *Nephthea armata* collected in Taiwan. *J. Nat. Prod.* Vol. 67. pp 1455-1458.
- ENCARNACION-DIMAYUGA R., E.S. OLACHEA, J. MALMSTROM y C. CHRISTOPHERSEN. 2000. Calafianine a bromotyrosine derivative from the marine sponge *Aplysina gerardogreeni*. *Journal of Natural Products*, 63(6): 874-875.
- ENCARNACION-DIMAYUGA, R., M. R. RAMÍREZ y J. LUNA-HERRERA. 2003. Aerothionin, a bromotyrosine derivative with antimycobacterial activity from the marine sponge *Aplysina gerardogreeni* (Demospongia). *Pharmaceutical Biology*, 41(5). pp 384-387.
- ERPENBECK, D. y G. WÖRHEIDE. 2007. On the molecular phylogeny of sponges. *Zootaxa* 1668. pp 107-126.
- FATTORUSSO, E., L. MINALE y G. SODANO. 1972. Aeroplysinin-1, an antibacterial bromo-compound from the sponge *Verongia aerophoba*. *Journal Chemical Society Perkin I*. pp 16-18.
- FATTORUSSO, E., L. MINALE, G. SODANO, K. MOODY Y R: H. THOMSON. 1970. Aerothionin, a tetrabromo-compound from *Aplysina aerophoba* and *Verongia thiona*. *Journal of the Chemical Society D: Chemical Communications*, (12), pp 752-753.
- FENDERT, T., V. WRAY, R. W. M. VAN SOEST y P. PROKSCH. 1999. Bromoisoxazoline alkaloids from the Caribbean sponge *Aplysina insularis*. *Zeitschrift für Naturforschung*, 54C. pp 246–252.
- GALEANO-GARCÍA, P., O. TORRES, J. ZULUAGA, A. ANGULO y G. SANTAFE. 2007. Obtención de sustancias antimicrobianas a partir de esponjas de la bahía de Cispatá. *Scientia Et Technica*, XIII (33): 221-224.
- GANDOLFI, R. C.; M. B. MEDINA, R. G. S. BERLINCK, S. P. LIRA, F. C. S. GALETTI, C. L. SILVA, K. VELOSO, A. G. FERREIRA, E. HAJDU y S. PEIXINHO. 2010. Metabólitos secundários das esponjas *Aplysina fistularis* e *Dysidea* sp. e atividade antituberculose da 11-cetofistularina-3. *Quimica Nova*, 33: pp 1853-1858.

- GARCÍA-MORENO, A., R. OUTERELO, E. RUIZ, J. I. AGUIRRE, A. ALMODÓVAR, J. A. ALONSO y F. J. CABRERO-SAÑUDO. 2011. Prácticas de Zoología Estudio y diversidad de los Poríferos. Reduca (Biología). Serie Zoología. 4 (2), pp 7-18,
- GARCÍA-VILAS, J. B., B. MARTÍNEZ-POVEDA, C. CARDENAS, E. MELGAREJO, A. R. QUESADA y M. A. MEDINA. 2013. The brominated compound aeroplysinin-1 inhibits proliferation and the expression of key pro-inflammatory molecules in human endothelial and monocyte cells. PloS one, 8(1).
- GARCÍA-VILAS, J., B. MARTÍNEZ-POVEDA, A. QUESADA y M. MEDINA. 2015. Aeroplysinin-1, a sponge-derived multi-targeted bioactive marine drug. Marine drugs, 14(1). 1 pp.
- GARCÍA-VILAS, J., B. MARTÍNEZ-POVEDA, A. QUESADA, y M. MEDINA. 2018. (+)-Aeroplysinin-1 Modulates the Redox Balance of Endothelial Cells. Marine drugs, 16(9), 316 pp.
- GÓMEZ, P. 2002. Esponjas marinas del Golfo de México y el Caribe. AGT Editor, S.A., México D.F. 134 pp.
- GOPICHAND, Y., y F. J. SCHMITZ. 1979. Marine natural products: Fistularin-1,-2 and-3 from the sponge *Aplysina fistularis* forma *fulva*. Tetrahedron Letters, 20(41), pp 3921-3924.
- GÖTHEL, Q., T. SIRIRAK y KÖCK, M. 2015. Bromotyrosine-derived alkaloids from the Caribbean sponge *Aplysina lacunosa*. Beilstein journal of organic chemistry, 11, 2334 pp.
- GOTSBACHER, M. P., y P. KARUSO. 2015. New antimicrobial bromotyrosine analogues from the sponge *Pseudoceratina purpurea* and its predator *Tylodina corticalis*. Marine drugs, 13(3). pp 1389-1409.
- GREEN, G. 1977a. Ecology of toxicity in marine sponges. Marine Biology 40, pp 207-215.
- GREEN, G. y G. J. BAKUS. 1975. Toxicidad en esponjas y holoturias. Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México 2: pp 61-66
- GREEN, G., P. GÓMEZ y G. J. BAKUS. 1990. Antimicrobial and ichthyotoxic properties of marine sponges from Mexican waters. En: New perspectives in

- sponge biology, K. Rützler (ed). Smithsonian Institution Press. Washington, D.C. pp 109-114.
- GUNASEKERA, M. y S. P. GUNASEKERA. 1989. Dihydroxyaerotherionin and aerophobin1. Two brominated tyrosine metabolites from the deep-water marine sponge *Verongula rigida*. *Journal of Natural Products*, 52(4). pp 753-756.
- GUNASEKERA, S. P. y S. S. CROSS. 1992. Fistularin 3 and 11-ketofistularin 3. Feline leukemia virus active bromotyrosine metabolites from the marine sponge *Aplysina archeri*. *Journal of Natural Products*, 55. pp 509-512.
- GUNASEKERA, S. P., M. GUNASEKERA, R. E. LONGLEY y G. K. SCHULTE. 1991. Discodermolide: a new bioactive polyhydroxylated lactone from the marine sponge *Discodermia dissoluta*. *The Journal of Organic Chemistry*, 56. pp 1346.
- GUTIÉRREZ, M., T. CAPSON, H. M. GUZMÁN, J. GONZÁLEZ, E. ORTEGA-BARRÍA, E. QUIÑOÁ y R. RIGUERA. 2005. Antiprotozoal activity against *Plasmodium falciparum* and *Trypanosoma cruzi* of Aeropylsinin-1 isolated from the new sponge *Aplysina chiriquensis*. *Pharmaceutical Biology*, 43(9): pp 762-765.
- HARPER, M. K., T. S. BUGNI, B. R. COPP, R.D. JANES, B. S. LINDSAY, A. D. RICHARDSON, P. C. SCHNABEL, D. TASDEMIR, R. M. VANWAGONER, S. M. VERBITSKI y C. M. IRELAND. 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. pp 10-47.
- HATAKEYAMA T., T. SATO, E. TAIRA, H. KUWAHARA, T. NIIDOME y H. AOYAGI. 1999. Characterization of the interaction of hemolytic lectin CEL-III from the marine invertebrate, *Cucumaria echinata*, with artificial lipid membranes: involvement of neutral sphingoglycolipids in the pore forming process. *J. Biochem.*, 125: 277-284.
- HENDLER, G. 1984. The association of *Ophiothrix lineata* and *Callyspongia vaginalis*: a brittlestar- sponge cleaning symbiosis? *Marine Ecology*, 5(1), pp 9- 27.
- HENTSCHEL, U., M. SCHMID, M. WAGNER, L. FIESELER, C. GERNERT y J. HACKER. 2001. Isolation and phylogenetic analysis of bacteria with antimicrobial activities from the Mediterranean sponges *Aplysina aerophoba* and *Aplysina cavernicola*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 35: pp 305-312.

- HENZE, M. 1904. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. Vol 41.109 pp.
- HENZE, M. 1908. Hoppe-Seyler's Z Physiol. Chem. Vol. 55. 427 pp.
- HERNÁNDEZ-GUERRERO, C. J., E. ZUBIA, M. J. ORTEGA y J. L. CARBALLO. 2006. Sesterterpene metabolites from the sponge *Hyatella intestinalis*. *Tetrahedron*. 62(23):5392-5400.
- HERNÁNDEZ-GUERRERO, C. J., E. ZUBIA, M. J. ORTEGA y J. L. CARBALLO. 2007. Cytotoxic dibromotyrosine-derived metabolites from the sponge *Aplysina Gerardogreeni*. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 15(15), pp 5275-5282.
- KANG, J. S., S. J. OH, J. E. YOON, E. JI EUN, C. U. LEE y M. R. KANG. 2016. Pharmaceutical composition for preventing and treating inflammatory diseases comprising aeroplysinin-1 as active ingredient. KR 2016007108 A 20160120.
- KAZANJIAN, A., y M. FARIÑAS. 2006. Actividades biológicas del extracto acuoso de la esponja *Aplysina lacunosa* (Porifera: Aplysinidae). *Revista de Biología Tropical*. pp 189-200.
- KELLY S. R., E. GARO, P. R. JENSEN, W. FENICAL y J. R. PAWLIK. 2005. Effects of Caribbean sponge secondary metabolites on bacterial surface colonization. *Aquat. Microb. Ecol.*, 40. pp. 191-203
- KLÖPPEL, A., A. PUTZ, M. PFANNKUCHEN, G. FRITZ, A. JAKLIN, P. PROKSCH y F. BRÜMMER. 2009. Depth profile of *Aplysina* ssp. morphological, histological and biochemical aspects and their role in species distinction. *Marine Biodiversity*, C 39. pp 121-129.
- KOBAYASHI, J. I., K. HONMA, T. SASAKI, y M. TSUDA. 1995. Puralidins JR, new bromotyrosine alkaloids from the Okinawan marine sponge *Psammoplysilla pura*. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 43(3), pp 403-407.
- KOULMAN A., P. PROKSCH, R. EBEL, A. C. BEEKMAN, W. VAN UDEN, A. W. T. KONINGS, J. A. PEDERSEN, N. PRAS, y H. J. WOERDENBAG. 1996. Cytotoxicity and mode of action of aeroplysin-1 and a related dienone from the sponge *Aplysina aerophoba*. *Journal of Natural Products*, 59(6). pp 591-594.
- LAUBENFELS, M.W. de. 1950. The Sponges of Kaneohe Bay, Oahu. *Pacific Science*. 4(1), pp 3-36.

- LAWSON, M. P., J. E. THOMPSON y C. DJERASSI. 1988. Localization of long-chain fatty acids and unconventional sterols in spherulous cells of a marine sponge. *Lipids*, 23(11), pp 1037-1048.
- LEÓN-DENIZ, L. V. 2003. Búsqueda de compuestos con actividad biológica en *Aplysina gerardogreeni* Gómez y Bakus 1992 (Porifera; Demospongia: Verongida). Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma De Baja California Sur, área interdisciplinaria de ciencias del mar departamento de biología marina. 56pp.
- LIRA, T. O. D., R. G. BERLINCK, G. G. NASCIMENTO y E. HAJDU 2006. Further dibromotyrosine-derived metabolites from the marine sponge *Aplysina caissara*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 17(7), pp 1233-1240.
- LOH, T. L., y J. R. PAWLIK. 2014. Chemical defenses and resource trade-offs structure sponge communities on Caribbean coral reefs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- MAKARIEVA, T. N., V. A. STONIK, P. ALCOLADO y .B. ELYAKOV. 1981. Comparative study of the halogenated tyrosine derivatives from Demospongiae (Porifera). *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 68. pp 481-484.
- MARSHALL, A. J. y W. D. WILLIAM. 1985. *Zoología de invertebrados*. Reverte. 7ª edición. vol. 1. España. 985 pp.
- MATEO-CID, L. E., A.C. MENDOZA-GONZÁLEZ, C.G. GARCÍA y L.H. MÚZQUIZ. 2000. Contribución al estudio de las algas marinas bentónicas de Punta Arena y Cabo Pulmo, Baja California Sur, México. *Acta Botanica Mexicana*, (52), 55-73.
- MIJARES, M. R., M. OCHOA, A. BARROETA, G. P. MARTINEZ, A. I. SUAREZ, R. S. COMPAGNONE y J. B. DE SANCTIS. 2013. Cytotoxic effects of Fisturalin-3 and 11-Deoxyfisturalin-3 on Jurkat and U937 cell lines. *Biomed. Pap*, 157. pp 222-226.
- MINALE, L., G. SODANO, W. R. CHAN, y A. M. CHEN. 1972. Aeroplysinin-2, a dibromolactone from marine sponges *Aplysina* (*Verongia*) *aerophoba* and *lanthella* sp. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, (11), pp 674-675.
- MORROW, C., y P. CÁRDENAS. 2015. Proposal for a revised classification of the Demospongiae (Porifera). *Frontiers in zoology*, 12(1), 7 pp.

- MUNRO M., J. BLUNT, E. DUMDEI, S. HICKFORD, R. LILL, S. LI, C. BATTERSHILL y A. DUCKWORTH. 1999. The discovery and development of marine compounds with pharmaceutical potencial. *J. Biotechnology*. Vol 70. pp 15-25.
- NORTE, M., M. L. RODRIGUEZ, J. J. FERNANDEZ, L. EGUREN y D. M. ESTRADA. 1988. Aplysinadiene and (R, R) 5 [3, 5-dibromo-4-[(2-oxo-5-oxazolidinyl)] methoxyphenyl]-2-oxazolidinone, two novel metabolites from *Aplysina aerophoba*. Synthes of aplysinadiene. *Tetrahedron*, 44(15), pp 4973-4980.
- NORTE, M., y J. J.FERNÁNDEZ. 1987. Isolation and synthesis of aplysinadiene, a new rearranged dibromotyrosine derivative from *Aplysina aerophoba*. *Tetrahedron letters*, 28(15), pp 1693-1696.
- NUÑEZ, C., E. V. R. DE ALMEIDA, A. C. GRANATO, S. O. MARQUES, K. O. SANTOS, F. R. PREREIRA, M. L. MACEDO, A. G. FERREIRA, E. HADJU, U. S. PINHEIRO, G. MURICY, S. PEIXINHO, C. J. FREEMAN, D. F. GLEASON y R. G. S. BERLINCK. 2008. Chemical variability within the marine sponge *Aplysina fulva*. *Biochemical Systematics and Ecology*. 36. pp 283-296.
- PATIÑO-CANO, L.P. 2013. Aislamiento y elucidación estructural de metabolitos secundarios a partir de esponjas, corales, tunicados y briozoos del Atlántico Sur y la Antártida. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 304 pp.
- PAUL, V.J. 1992. Chemical Defenses of Benthic Marine Invertebrates. En: *Ecological Roles of Marine Natural Products*. Paul VJ. Ithaca and London: Cornell University Press. pp 164-188.
- PAWLIK, J. R., B. CHANAS, R. J. TOONEN, y W FENICAL.1995. Defenses of Caribbean sponges against predatory reef fish. I. Chemical deterency. *Marine Ecology Progress Series*, 127, 183-194.
- PAWLIK, J. R., L. STEINDLER, T. P. HENKEL, S. BEER, y M. ILAN. 2007. Chemical warfare on coral reefs: sponge metabolites differentially affect coral symbiosis in situ. *Limnology and Oceanography*, 52(2). pp 907-911.
- PEREIRA, F. R., S. O. MARQUES, A. M. NASCIMENTO, R. C. GANDOLFI, E. HAJDU, S. PEIXINHO, M. R. CUSTÓDIO y R. G. S. BERLINCK. 2006. Metabólitos Derivados da Dibromotirosina das Esponjas *Aplysina fulva*, *A. conulosa* (sp. n.) and *A. fistularis*. In XXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química; Sociedade Brasileira de Química: Águas de Lindóia, Brazil; 335 pp.

- PIÑEIRO, C. 2000. Los medicamentos del mar. *Mar y Pesca*, 1 de Agosto 2000: 14.
- PROKSCH, P. 1994. Defensive roles for secondary metabolites from marine sponges and sponge-feeding nudibranchs. *Toxicon*, 32(6). pp 639-655.
- PUTZ, A., A. KLOEPPEL, M. PFANNKUCHEN, F. BRÜMMER y P. PROKSCH. 2009. Depthrelated alkaloid variation in Mediterranean *Aplysina* sponges. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung*, Tübingen, 64: 279-287.
- PUYANA, M., J. PAWLIK, J. BLUM y W. FENICAL. 2015. Metabolite variability in Caribbean sponges of the genus *Aplysina*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 25(6). pp 592-599.
- QUIJANO, L., F. CRUZ-SOSA, I. NAVARRETE, P. GÓMEZ y T. RÍOS. 1994. Alkyl Glycerol monoethers from the marine sponge *Desmapsamma anchorata*. *Lipids*, 29: 731-734.
- REVERTER, M., T. PEREZ, A. V. ERESKOVSKY y B. BANAIGS. 2016. Secondary metabolome variability and inducible chemical defenses in the Mediterranean sponge *Aplysina cavernicola*. *Journal of chemical ecology*, 42(1). pp 60-70.
- RODRÍGUEZ, A. D. y I. C. PIÑA. 1993. The structures of aplysinamisines I, II and III: New bromotyrosine-derived alkaloids from the Caribbean sponge *Aplysina cauliformis*. *Journal of Natural Products*, 56: 907-914.
- RODRÍGUEZ, A.D., R. K. AKEE y P. J. SCHEUER. 1987. Two bromotyrosine-cysteine derived metabolites from a sponge. *Tetrahedron Letters*, 28. pp 4989-4992.
- RODRÍGUEZ-NIETO, S., M. GONZÁLEZ-IRIARTE, R. CARMONA, R. MUÑOZ-CHÁPULI, M.A. Medina y A.R. QUESADA. 2002. Antiangiogenic activity of aeroplysinin-1, a brominated compound isolated from a marine sponge. *The Federation of American Society Experimental Biology Journal*, 16. pp 261-263.
- ROGERS, E. W., M. F. DE OLIVEIRA, R. G. BERLINCK, G. M. KÖNIG y T. F. MOLINSKI. 2005. Stereochemical heterogeneity in verongid sponge metabolites. Absolute stereochemistry of (+)-fistularin-3 and (+)-11-epi-fistularin-3 by microscale LCMS-Marfey's analysis. *Journal of natural products*, 68(6), pp 891-896.
- RUZICKA, R., y D. F. GLEASON. 2009. Sponge community structure and anti-predator defenses on temperate reefs of the South Atlantic Bight. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 380(1-2). pp 36-46.

- SACRISTÁN-SORIANO, O., B. BANAIGS y M. A. BECERRO. 2012. Temporal trends in the secondary metabolite production of the sponge *Aplysina aerophoba*. *Marine Drugs*, 10: pp 677-693.
- SACRISTÁN-SORIANO, O., B. BANAIGS y M.A. BECERRO. 2011. Relevant spatial scales of chemical variation in *Aplysina aerophoba*. *Marine Drugs*, 9: 2499-2513.
- SANTALOVA, E. A., V. P. GLAZUNOV y DENISENKO, V. A. 2011. Tautomeric and conformational equilibria of γ -lactones derived from (3, 5-dibromo-1-hydroxy-4-oxocyclohexa-2, 5-dien-1-yl) acetic acid. *Russian Journal of Organic Chemistry*, 47(10), pp 1487-1491.
- SEMARNAT. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-2010. Diario Oficial de la Federación (DOF).
- SHAKER, K. H., H. ZINECKER, M. A. GHANI, J. F. IMHOFF y B. SCHNEIDER. 2010. Bioactive metabolites from the sponge *Suberea* sp. *Chemistry & biodiversity*, 7(12), pp 2880-2887.
- SHARMA, G. M., B. VIG y P. R. Burkholder. 1970. Antimicrobial substances of sponges. IV. Structure of a bromine-containing compound from a marine sponge. *The Journal of organic chemistry*, 35(8), pp 2823-2826.
- SILVA, M.M., J. BERGAMASCO, S.P. LIRA, N. P. LOPES, E. HAJDU, S. PEIXINHO y R.G.S. BERLINCK. 2010. Dereplication of Bromotyrosine-derived Metabolites by LC-PDA-MS and Analysis of the Chemical Profile of 14 *Aplysina* Sponge Specimens from the Brazilian Coastline. *Australian Journal of Chemistry*, 63(6): 886–894.
- SILVA-LIRA, N., R. CARNEIRO MONTES, J. FECHINE TAVARES, M. SOBRAL DA SILVA, E.V.L. DA CUNHA, P. FILGUEIRAS DE ATHAYDE-FILHO, L.C. RODRIGUES, C. DA SILVA DIAS, y J.M. BARBOSA-FILHO. 2011. Brominated Compounds from Marine Sponges of the Genus *Aplysina* and a Compilation of Their ¹³C NMR Spectral Data. *Marine Drugs*, 9: 2316-2368.
- SOMAVARAPU, S. 2017. Marine Organisms as Biomedical Resources Enrich Quality of Life. *Computational Biology and Bioinformatics*, 5(5), 62 pp.
- SUÁREZ G.I. 2002. Estructura de las asociaciones de moluscos en corales del género *Pocillopora* Lamarck, 1818; en Punta Arena de la Ventana, B.C.S. México. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California Sur. 35 pp.

- THOMPSON, J. E., R. P. WALKER y D. J. FAULKNER. 1985. Screening and bioassays for biologically-active substances from forty marine sponge species from San Diego, California, USA. *Marine Biology*, 88(1). pp 11-21.
- THOMS, C., M. WOLFF, K. PADMAKUMAR, R. EBEL y P. PROKSCH. 2004. Chemical defense of Mediterranean sponges *Aplysina cavernicola* and *Aplysina aerophoba*. *Zeitschrift für Naturforschung*, 59. pp 113-122.
- THOMS, C., R. EBEL, y P. PROKSCH. 2006. Activated chemical defense in *Aplysina* sponges revisited. *Journal of chemical ecology*, 32(1). pp 97-123.
- THOMS, C., y P. J. SCHUPP. 2007. Chemical defense strategies in sponges: a review. *Porifera research: biodiversity, Innovation and sustainability*, 28. pp 627-637.
- TORRUCO-GÓMEZ, D. y A. GONZÁLEZ-SOLÍS. 2010. Las esponjas y su importancia. En: *Biodiversidad y desarrollo humano en Yucatán*. Duran-García, R. y M. Méndez-González (edts). CICY, PPD-FMAM, CONABIO, SEDUMA. pp 202-205.
- URIZ, M. J., X. TURON, M. A. BECERRO y G. AGELL. 2003. Siliceous spicules and skeleton frameworks in sponges: Origins, diversity, ultrastructural patterns, and biological functions. *Microscopy Research and Technique* 62, pp 279-299.
- VAN SOEST, R. W. M. 2007. Sponge biodiversity. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 87: pp 1345-1348
- VAN SOEST, R.W.M, N. Boury-Esnault, J.N.A. Hooper, K. Rützler, N.J. de Voogd, B. Alvarez de Glasby, E.Hajdeu, A.B.Pisera, R. Manconi, C.Schönenberg, D. JANUSSEN, K.R. Tabachnick, M.Klautau, B. Picton, M. Kelly y J.Vacelet. 2012. World porifera Database. Consultado el 5 de Enero del 2015 en <http://www.marinespecies.org/>
- WALKER, R. P., J. E. THOMPSON y D. J. FAULKNER. 1985. Exudation of biologically-active metabolites in the sponge *Aplysina fistularis*. *Marine Biology*, 88(1). pp 27-32.
- WALKER, R.P., J. E. THOMPSON y D. J. FAULKNER. 1985. Exudation of biologicallyactive metabolites in the sponge *Aplysina fistularis*. II. Chemical evidence. *Marine Biology*, 88. pp 27-32.
- WALKUP, R. D., G. C. JAMIESON, M. R. Ratcliff y C. Djerassi. 1981. Phospholipid studies of marine organisms: 2.1 Phospholipids, phospholipid-bound fatty

acids and free sterols of the sponge *Aplysina fistularis* (Pallas) forma fulva (Pallas) (= *Verongia thiona*) 2. Isolation and structure elucidation of unprecedented branched fatty acids. *Lipids*, 16(9), pp 631-646.

WANG Y., Z. LIU, S. CHEN y X. LIANG. 2004. Progress in the studies on antitumor natural product ecteinascidin-743. *Zhonggus*. Vol. 26. pp 474-478.

WEISS, B., R. EBEL, M. ELBRÄCHTER, M. KIRCHNER y P. PROKSCH. 1996. Defense metabolites from the marine sponge *Verongia aerophoba*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 24(1). pp 1-12.

WESTINGA, E. y P. HOETJES. 1981. The intrasponge fauna of *Sphaciospongia vesparia* (Porifera, Demospongiae) at Curacao and Bonaire. *Marine Biology*, 62, pp 139-150.

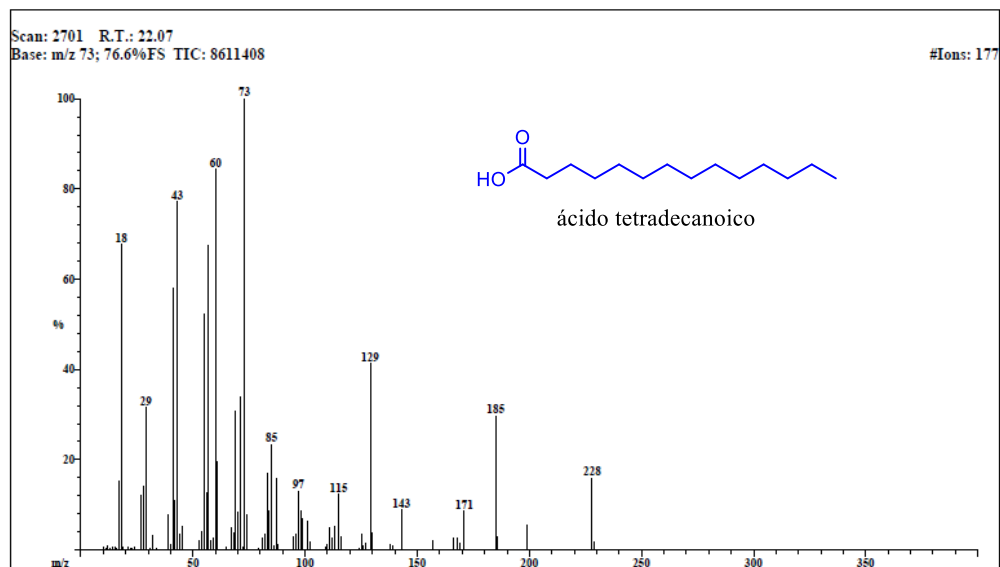
WILKINSON, C. R. 1987. Inter ocean differences in size and nutrition of coral reef sponge populations. *Science*, 236, pp 1654-1657.

ZUBÍA, E., M. J. ORTEGA, C. J. HERNÁNDEZ-GUERRERO y J. L. CARBALLO. 2008. Isothyocyanate sesquiterpenes from a sponge of the genus *Axinyssa*. *Journal of Natural Products* 71, pp 608-614.

XII. Anexos

Instituto de Química (UNAM)

File: 960 Rm-Hx-C= Date Run: 04-05-2017 (Time Run: 12:38:15)
Sample: Dr Quijano Leovigildo operador Javier Perez
Instrument: JEOL GCmate
Inlet: GC Ionization mode: EI+

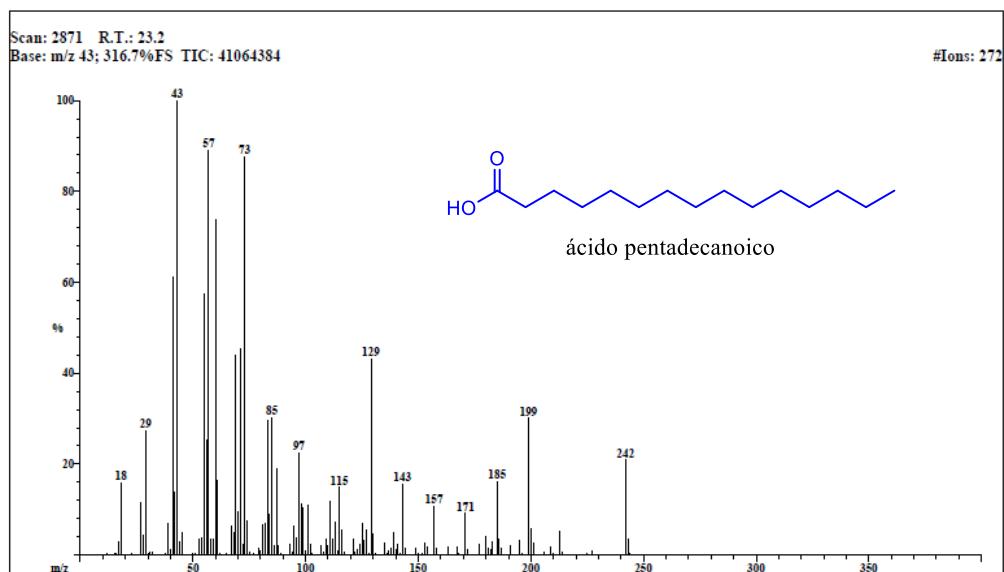


Anexo 1. Espectro de masas del ácido tetradecanoico (1).

Instituto de Química (UNAM)

page 100

File: 960 Rm-Hx-C= Date Run: 04-05-2017 (Time Run: 12:38:15)
Sample: Dr Quijano Leovigildo operador Javier Perez
Instrument: JEOL GCmate
Inlet: GC Ionization mode: EI+



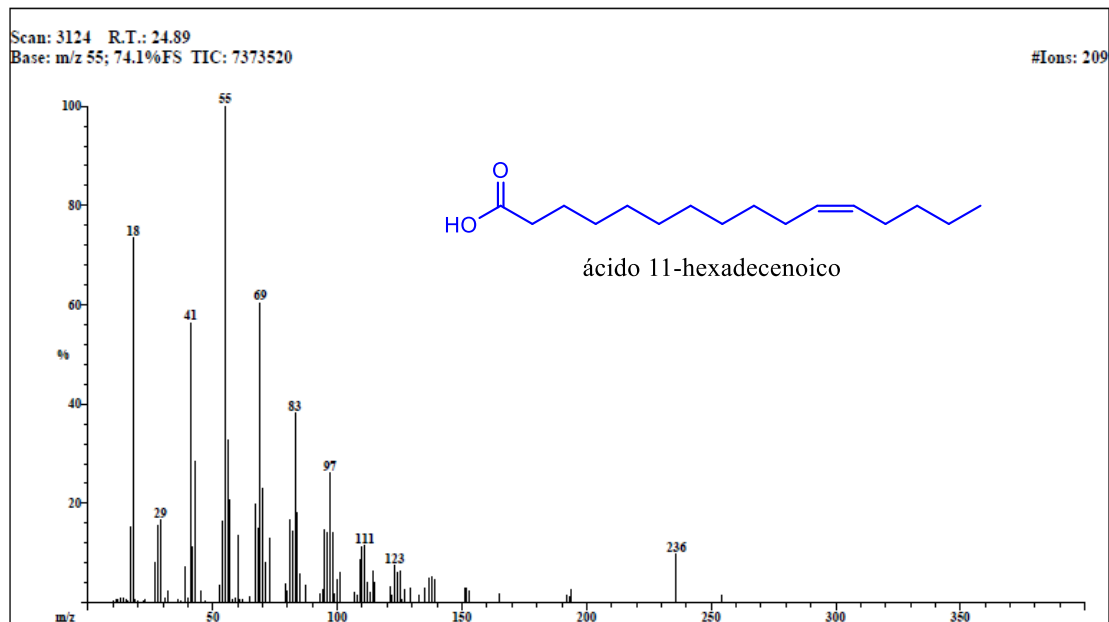
Anexo 2. Espectro de masas del ácido pentadecanoico (2).

Instituto de Química (UNAM)

File: 960 Rm-Hx-C=
Sample: Dr Quijano Leovigildo operador Javier Perez
Instrument: JEOL GCmate
Inlet: GC

Date Run: 04-05-2017 (Time Run: 12:38:15)

Ionization mode: EI+

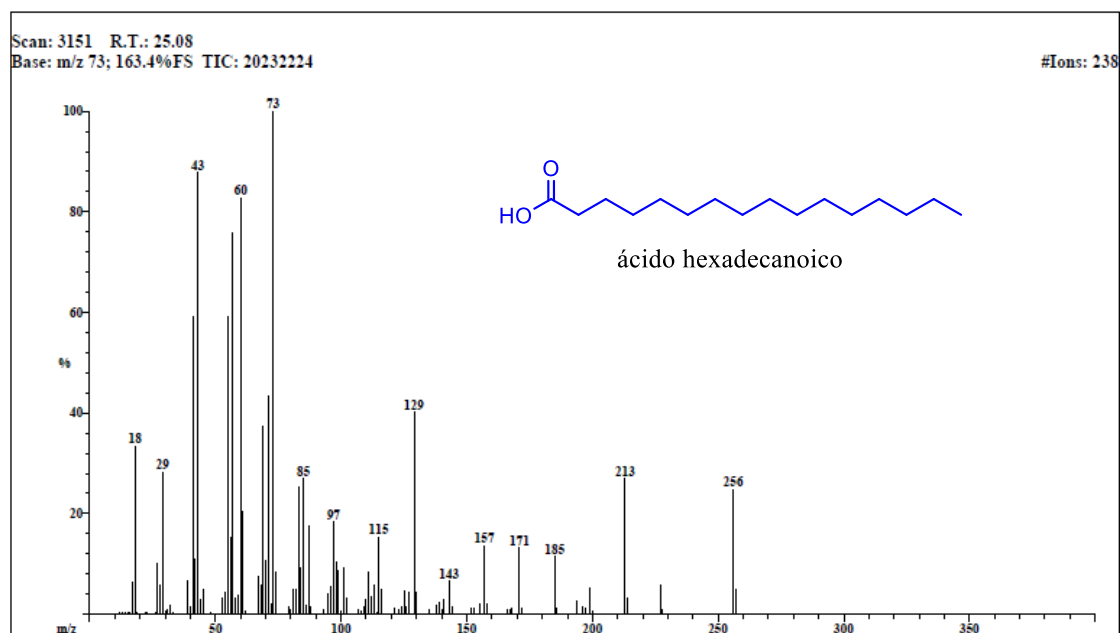
Anexo 3. Espectro de masas del **ácido 11-hexadecenoico (3)**.

Instituto de Química (UNAM)

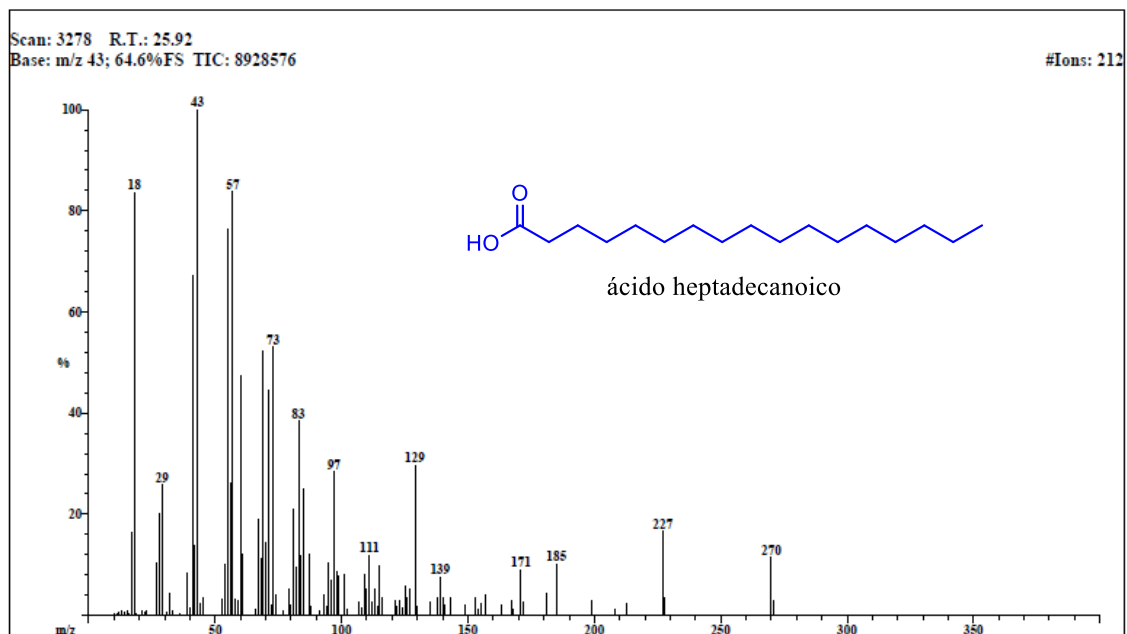
File: 960 Rm-Hx-C=
Sample: Dr Quijano Leovigildo operador Javier Perez
Instrument: JEOL GCmate
Inlet: GC

Date Run: 04-05-2017 (Time Run: 12:38:15)

Ionization mode: EI+

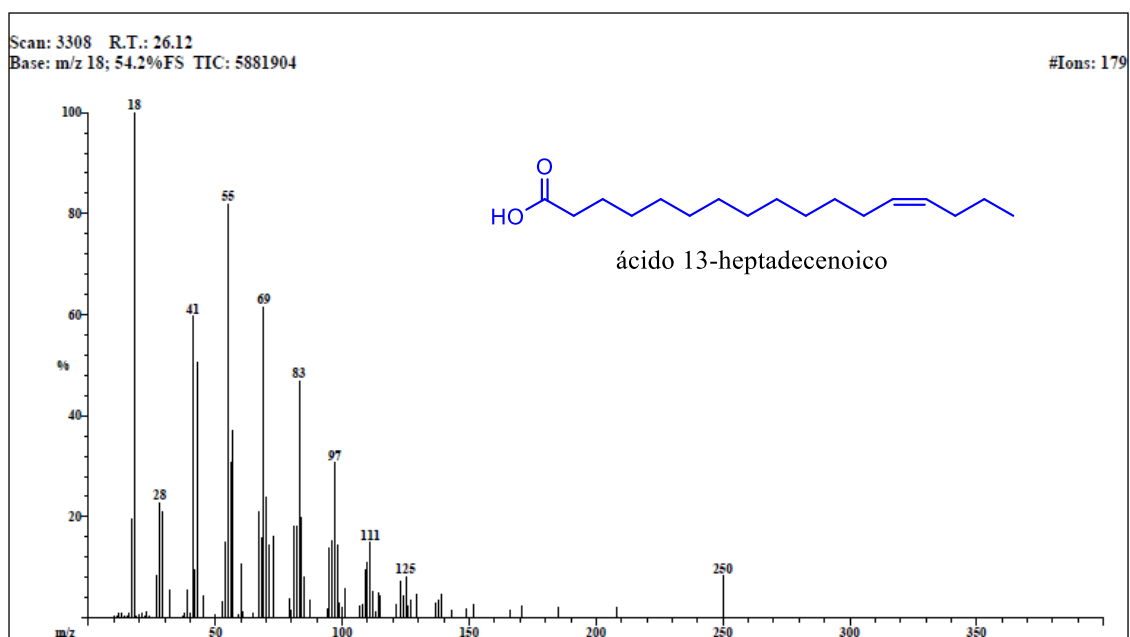
Anexo 4. Espectro de masas del **ácido hexadecanoico (4)**.

File: 960 Rm-Hx-C= Date Run: 04-05-2017 (Time Run: 12:38:15)
Sample: Dr Quijano Leovigildo operador Javier Perez
Instrument: JEOL GCmate Ionization mode: EI+
Inlet: GC



Anexo 5. Espectro de masas del ácido heptadecanoico (5).

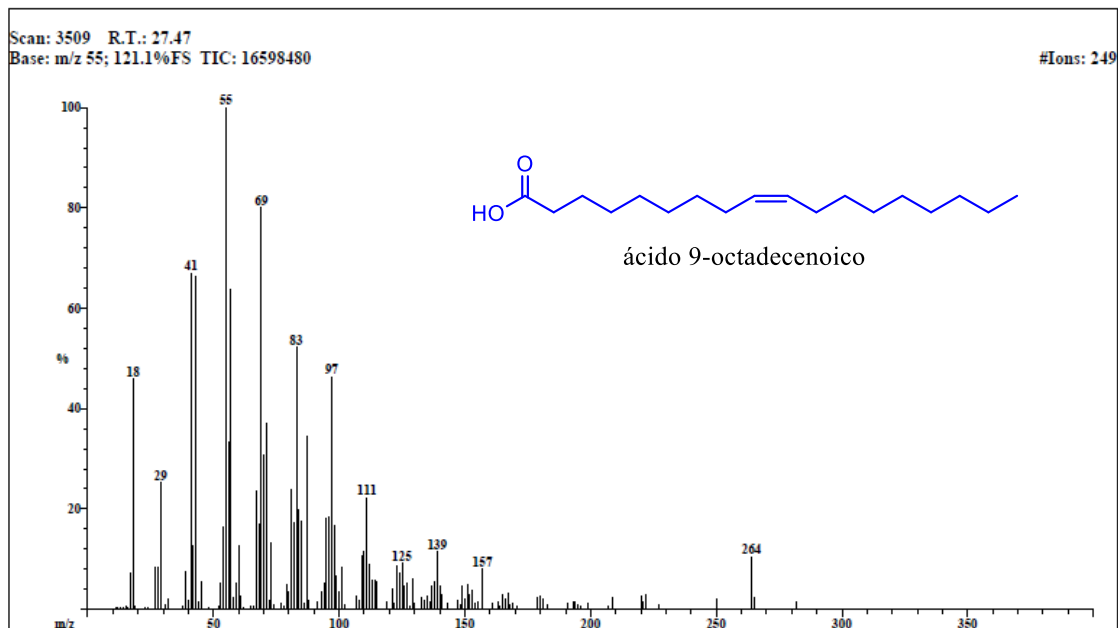
File: 960 Rm-Hx-C= Date Run: 04-05-2017 (Time Run: 12:38:15)
Sample: Dr Quijano Leovigildo operador Javier Perez
Instrument: JEOL GCmate Ionization mode: EI+
Inlet: GC



Anexo 6. Espectro de masas del ácido 13-heptadecenoico (6).

Instituto de Química (UNAM)

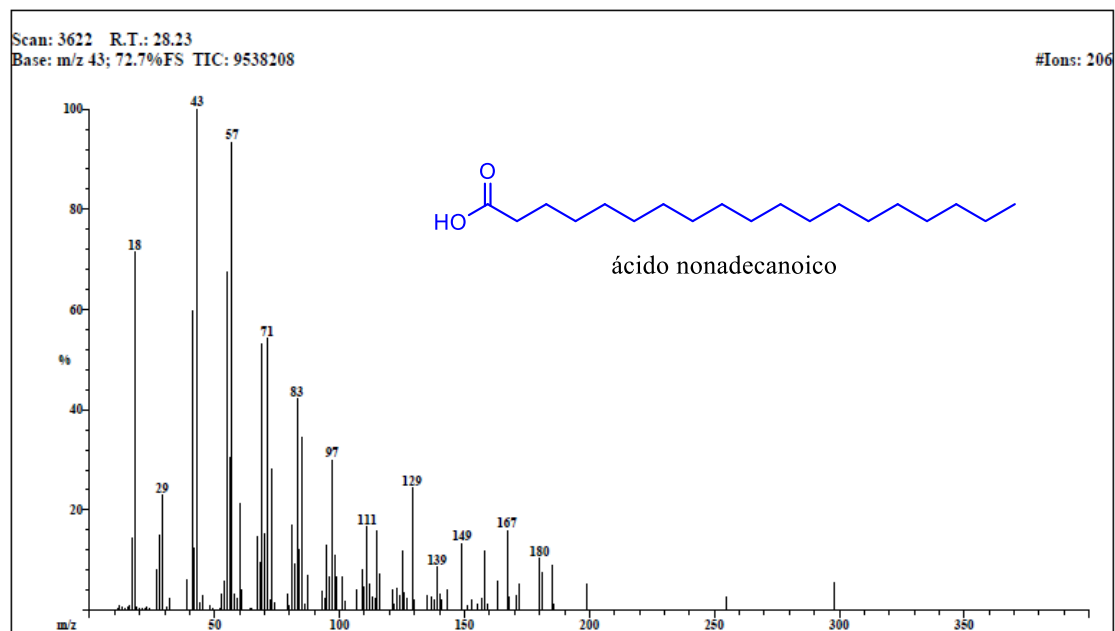
File: 960 Rm-Hx-C= Date Run: 04-05-2017 (Time Run: 12:38:15)
Sample: Dr Quijano Leovigildo operador Javier Perez
Instrument: JEOL GCmate Ionization mode: EI+
Inlet: GC



Anexo 7. Espectro de masas del ácido 9-octadecenoico (7).

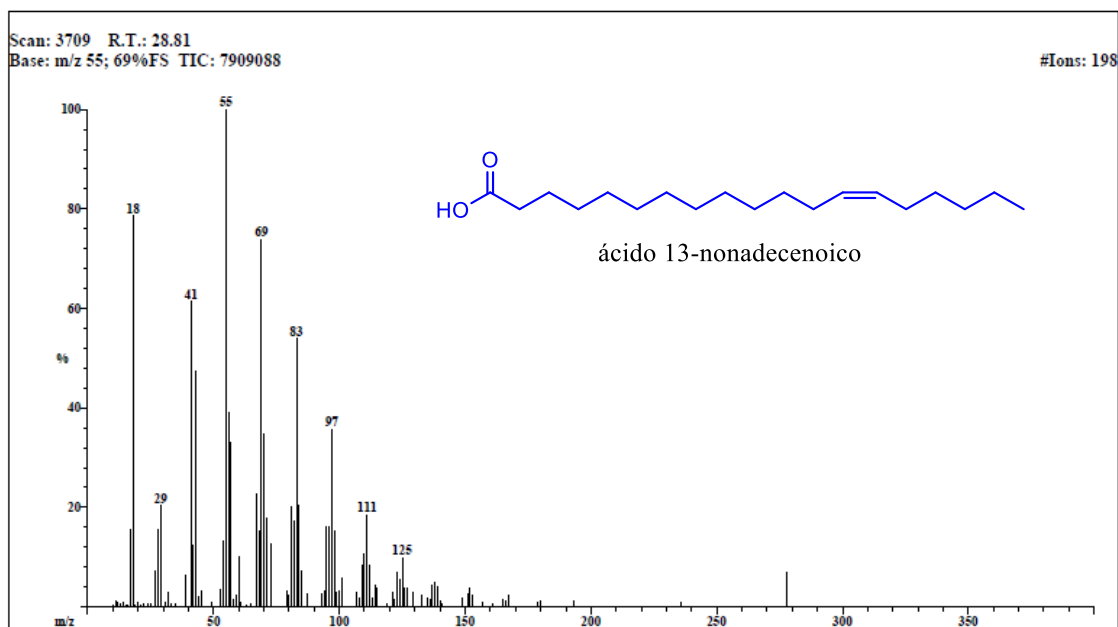
Instituto de Química (UNAM)

File: 960 Rm-Hx-C= Date Run: 04-05-2017 (Time Run: 12:38:15)
Sample: Dr Quijano Leovigildo operador Javier Perez
Instrument: JEOL GCmate Ionization mode: EI+
Inlet: GC



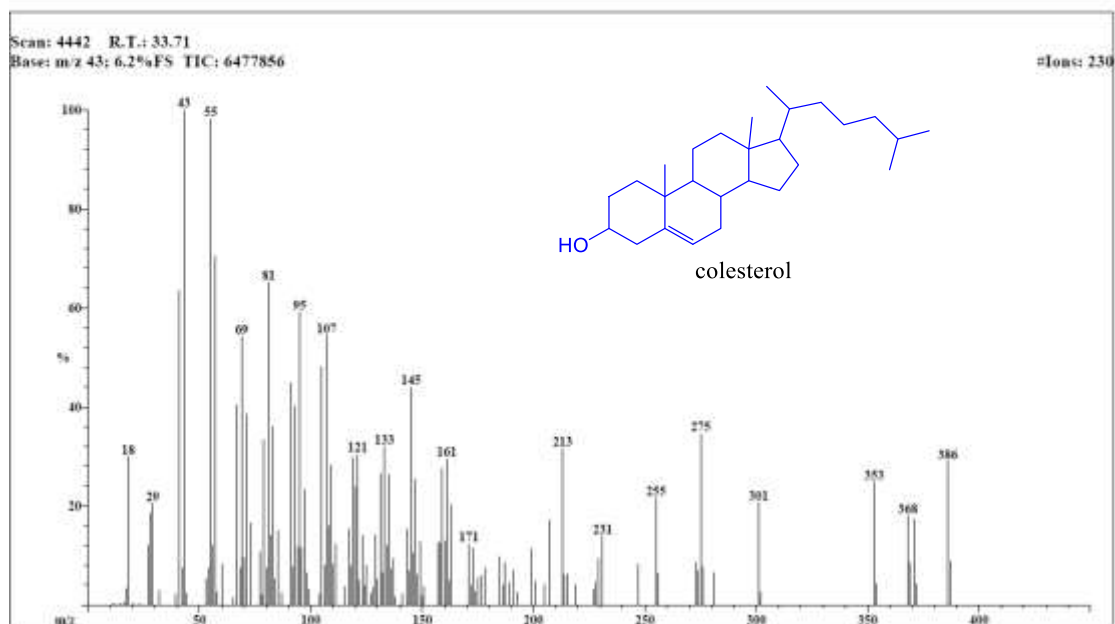
Anexo 8. Espectro de masas del ácido nonadecanoico (8).

File: 960 Rm-Hx-C= Date Run: 04-05-2017 (Time Run: 12:38:15)
Sample: Dr Quijano Leovigildo operador Javier Perez
Instrument: JEOL GCmate
Inlet: GC Ionization mode: EI+



Anexo 9. Espectro de masas del **ácido 13-nonadecenoico** (9).

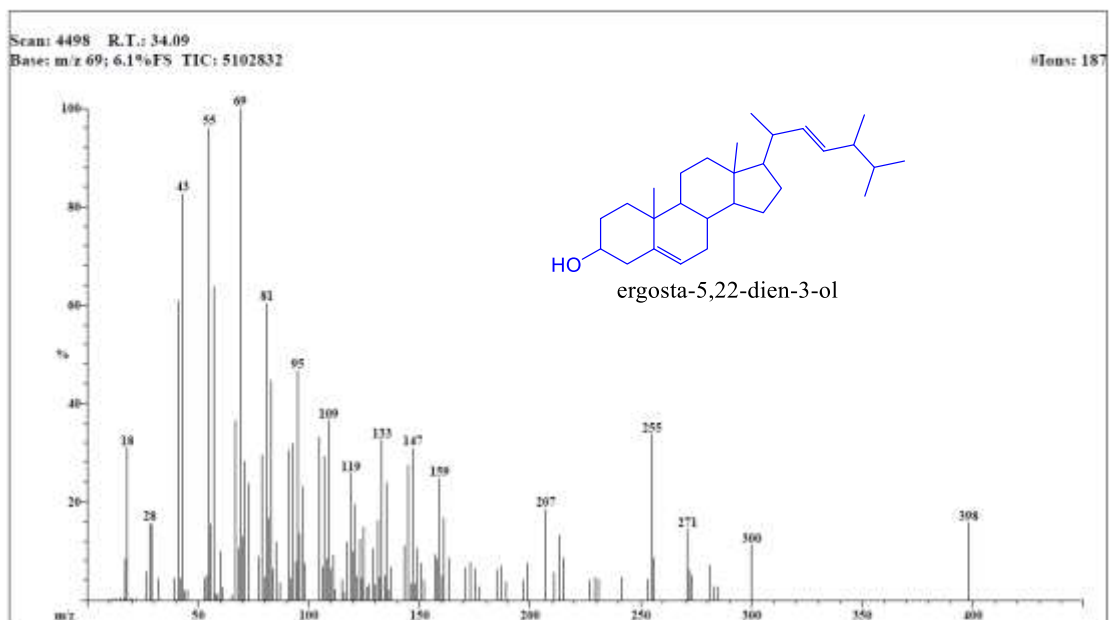
File: 336 Hx-E- Date Run: 09-02-2017 (Time Run: 13:48:24)
Sample: Dr Quijano Leovigildo operador Javier Perez
Instrument: JEOL GCmate
Inlet: GC Ionization mode: EI+



Anexo 10. Espectro de masas del **colesterol** (10).

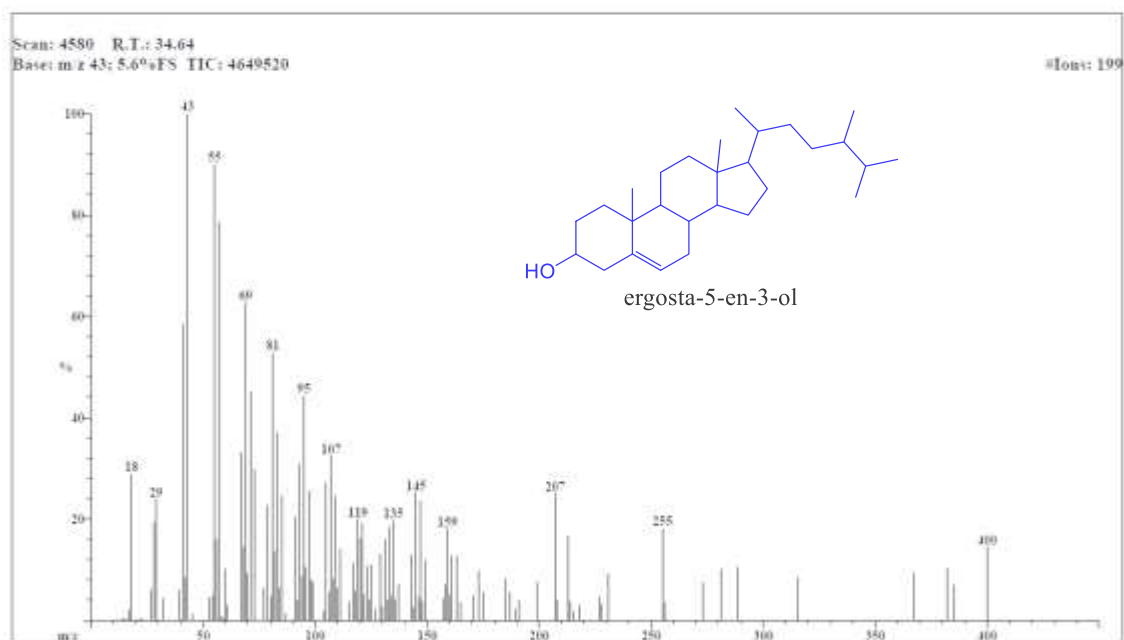
Instituto de Química (UNAM)

File: 336 Hx-E- Date Run: 09-02-2017 (Time Run: 13:48:24)
Sample: Dr Quijano Leovigildo operador Javier Perez
Instrument: JEOL GCmate
Inlet: GC Ionization mode: EI+

Anexo 11. Espectro de masas del *ergosta-5,22-dien-3-ol* (11).

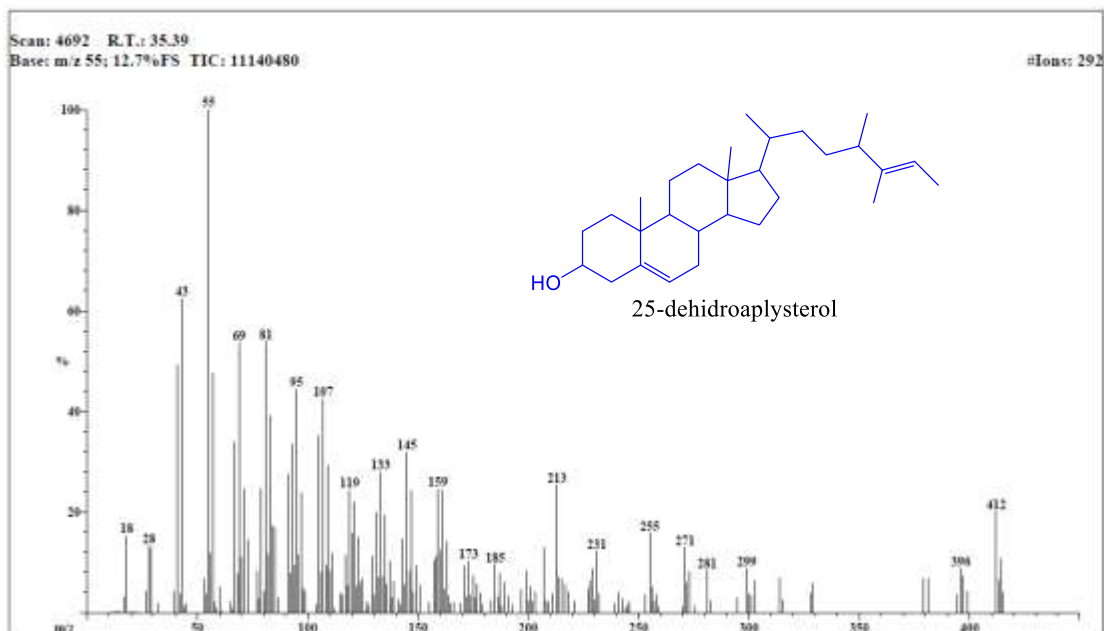
Instituto de Química (UNAM)

File: 336 Hx-E- Date Run: 09-02-2017 (Time Run: 13:48:24)
Sample: Dr Quijano Leovigildo operador Javier Perez
Instrument: JEOL GCmate
Inlet: GC Ionization mode: EI+

Anexo 12. Espectro de masas del *ergosta-5-en-3-ol* (12).

Instituto de Química (UNAM)

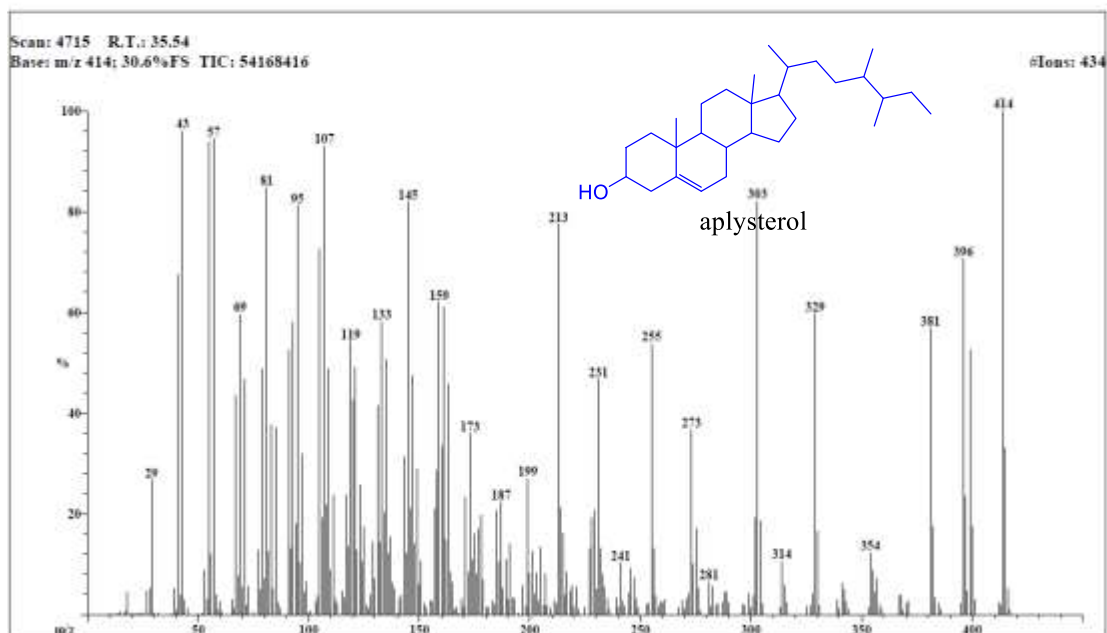
File: 336 Hx-E- Date Run: 09-02-2017 (Time Run: 13:48:24)
Sample: Dr Quijano Leovigildo operador Javier Perez
Instrument: JEOL GCmate
Inlet: GC Ionization mode: EI+



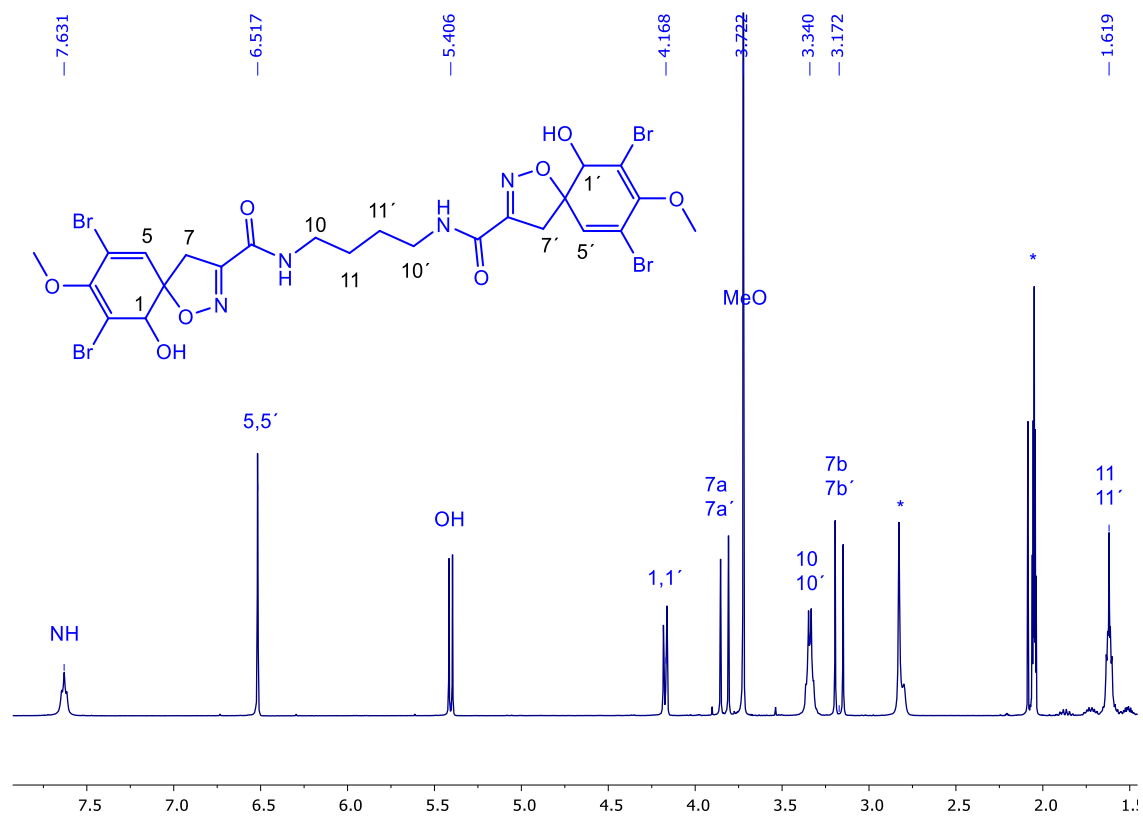
Anexo 13. Espectro de masas del **25-dehidroaplysterol (13)**.

Instituto de Química (UNAM)

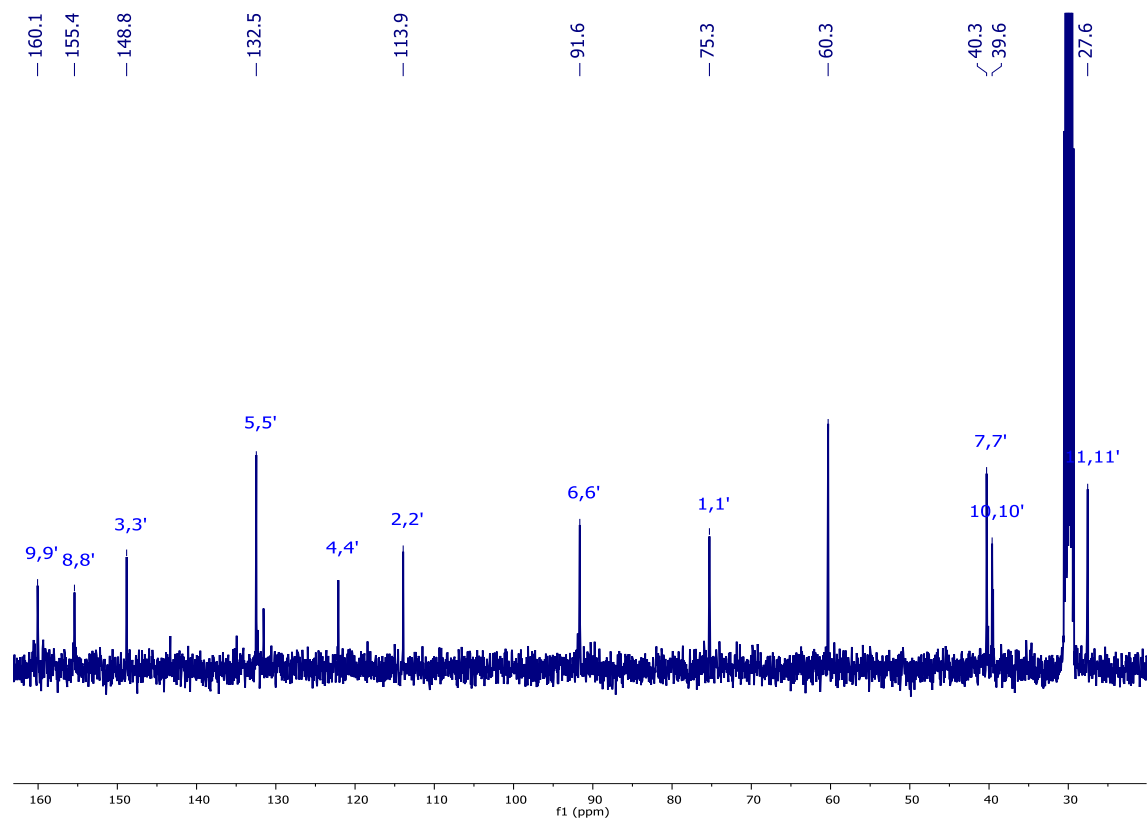
File: 336 Hx-E- Date Run: 09-02-2017 (Time Run: 13:48:24)
Sample: Dr Quijano Leovigildo operador Javier Perez
Instrument: JEOL GCmate
Inlet: GC Ionization mode: EI+



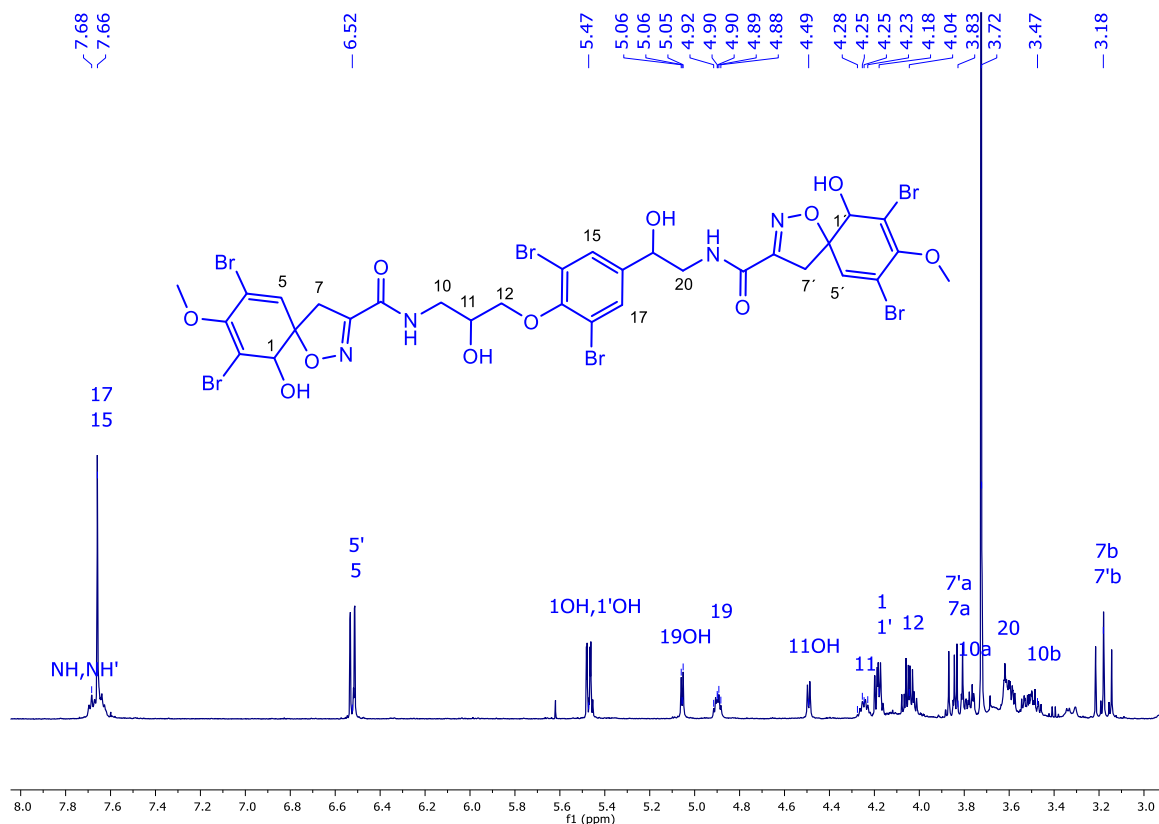
Anexo 14. Espectro de masas del **aplysterol (14)**.



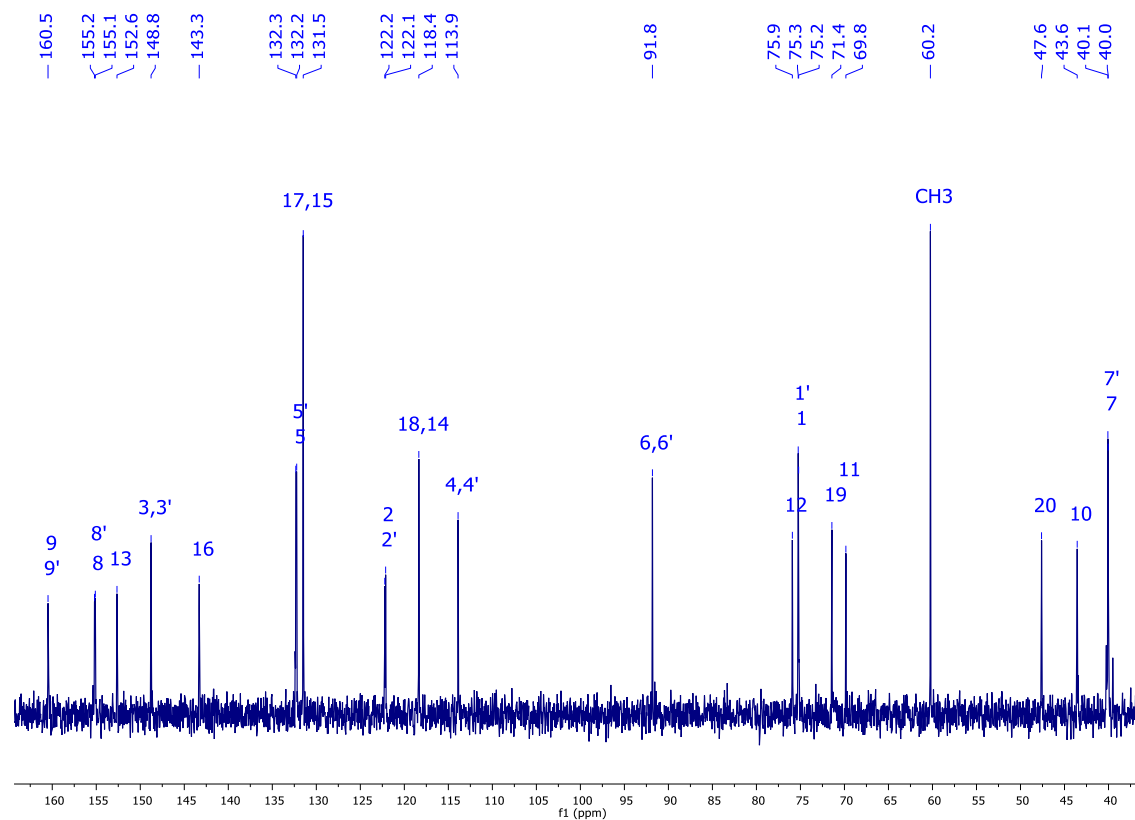
Anexo 15. Espectro de RMN-¹H (400 MHz / acetona-d₆) de *aerotionina* (15).



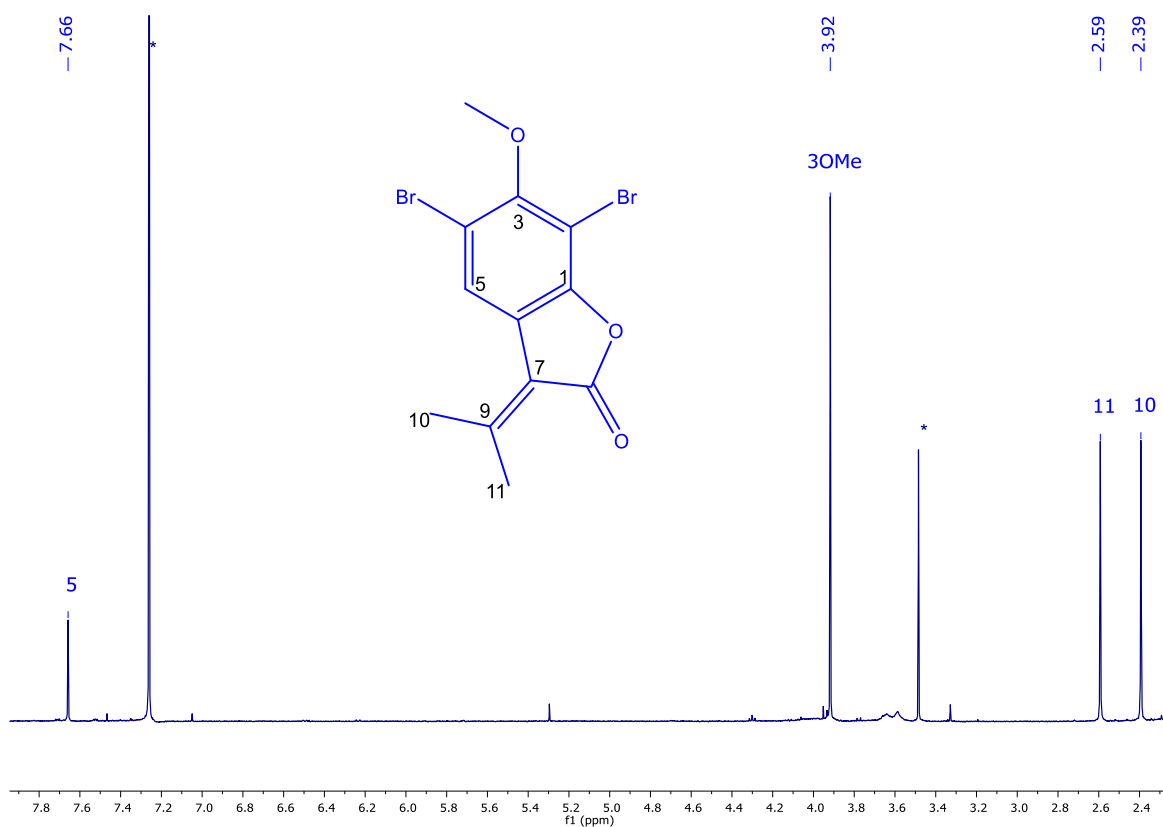
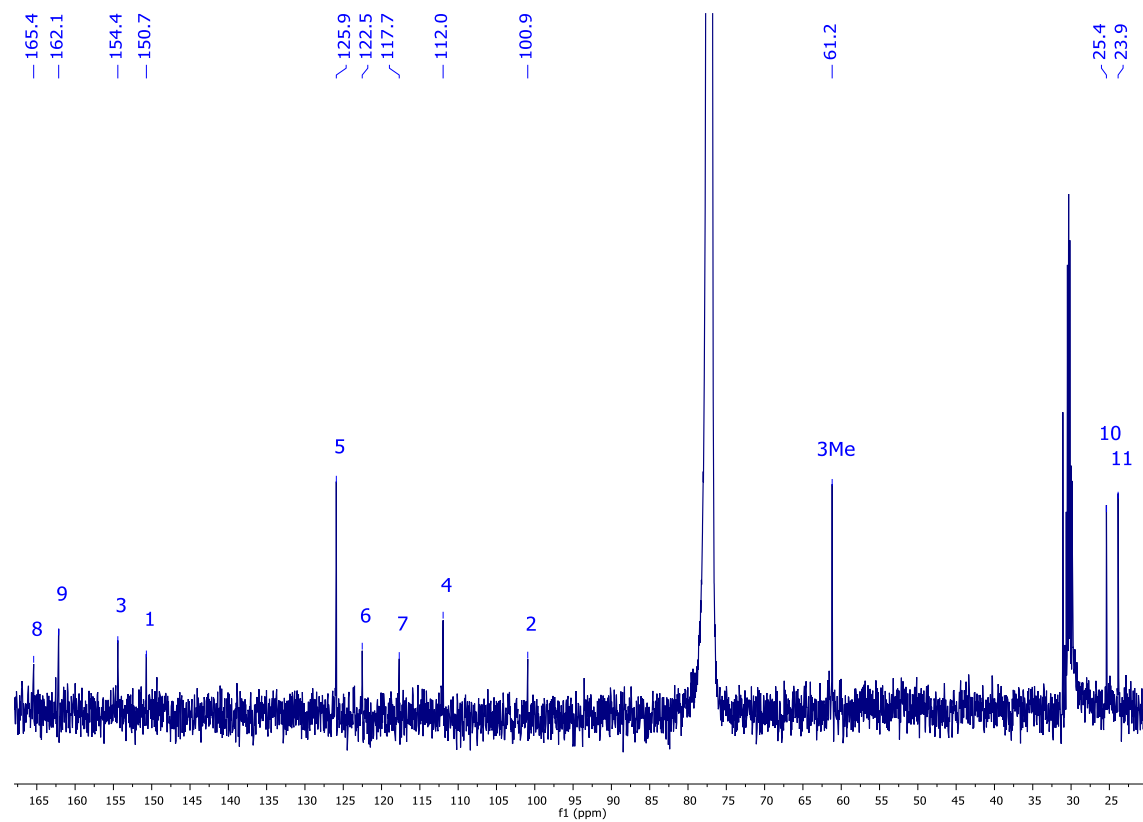
Anexo 16. Espectro de RMN-¹³C (125 MHz / acetona-d₆) de *aerotionina* (15).



Anexo 17. Espectro de RMN-¹H (500 MHz / acetona-d₆) de *fistularina-3* (16).



Anexo 18. Espectro de RMN-¹³C (125 MHz / acetona-d₆) de *fistularina-3* (16).

Anexo 19. Espectro de RMN-¹H (500 MHz / CDCl₃) de *alypsinólida* (17).Anexo 20. Espectro de RMN-¹³C (125 MHz / CDCl₃) de *alypsinólida* (17).

[Mass Spectrum]

Data : Dr-Quijano-Leovigildo-006 Date : 09-Nov-2017 14:40

Sample: 2399 AAc-Aa Jeol SX102A

Note : Operadores Carmen Garcia Javier Perez

Inlet : Direct

Ion Mode : EI+

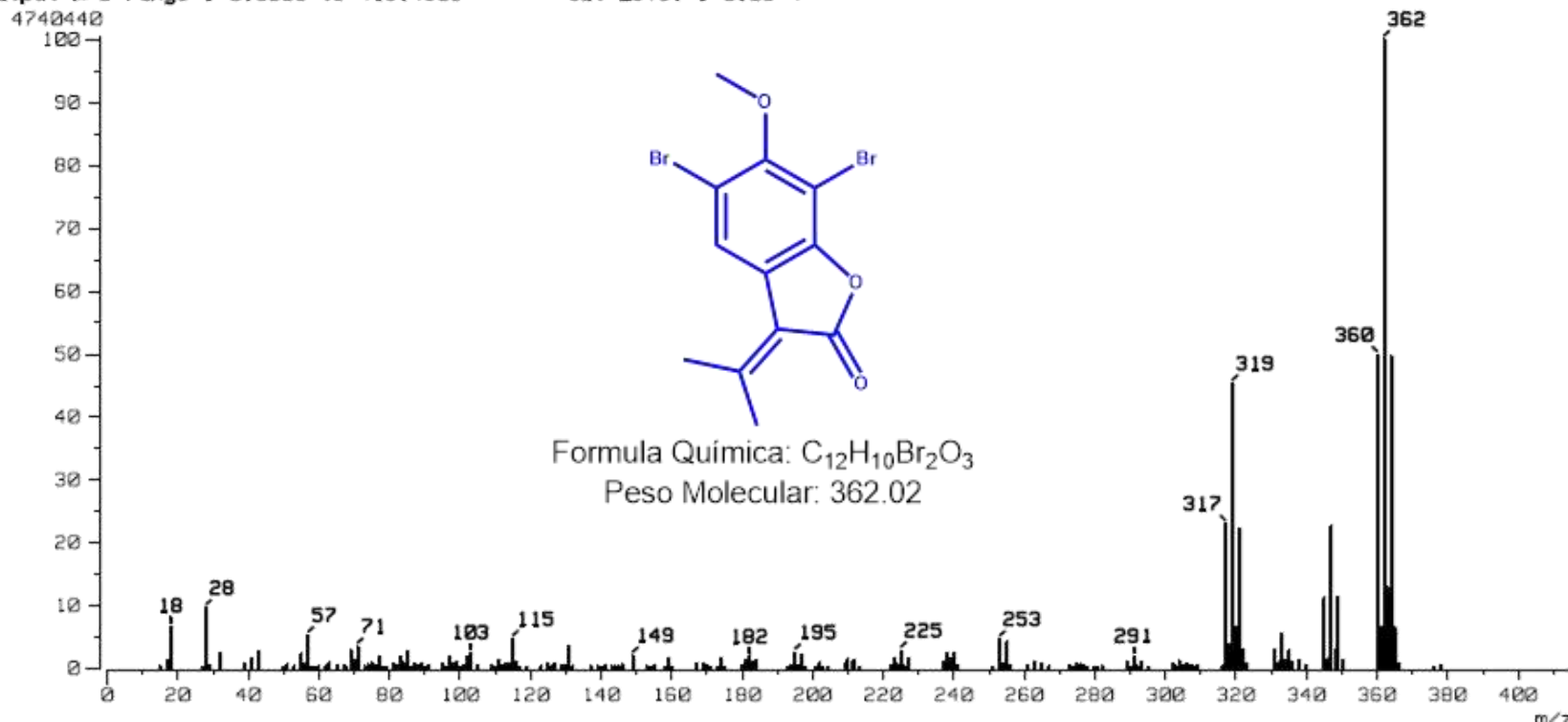
Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]

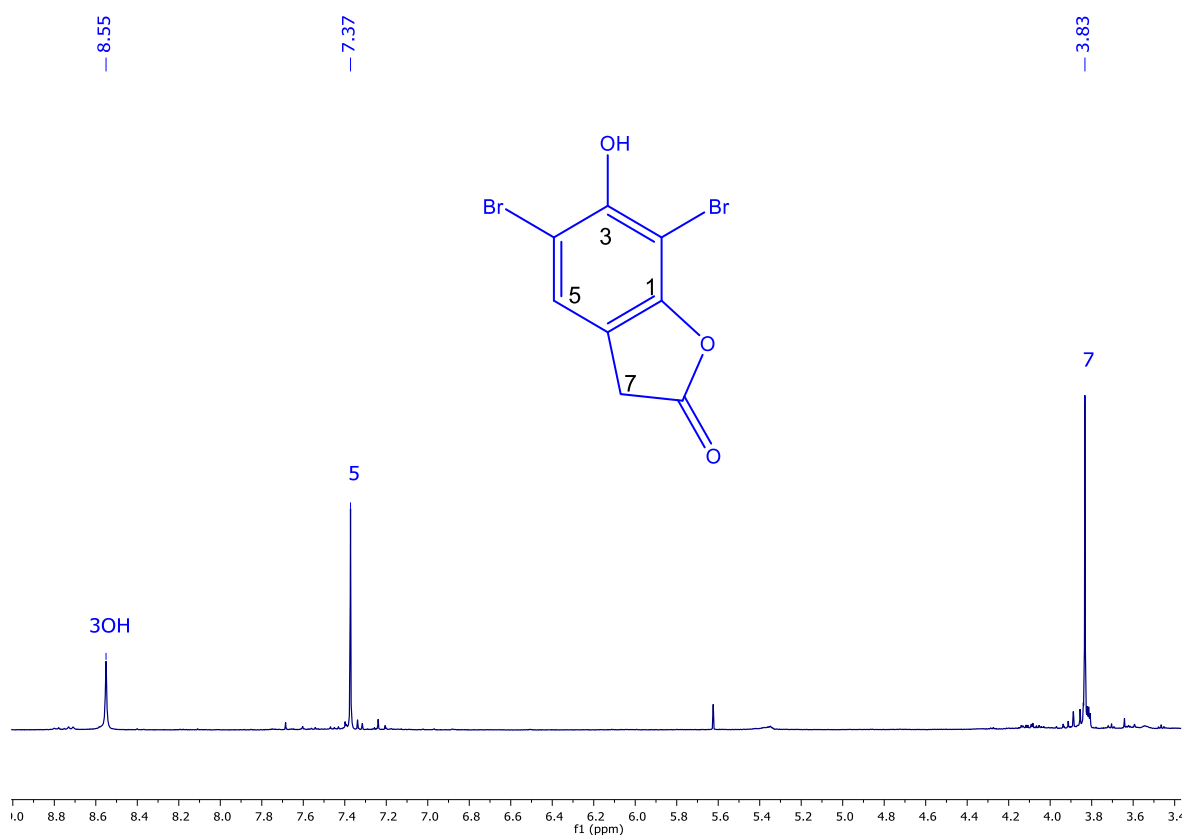
RT : 0.25 min Scan# : (6,7)

BP : m/z 362.0000 Int. : 449.49

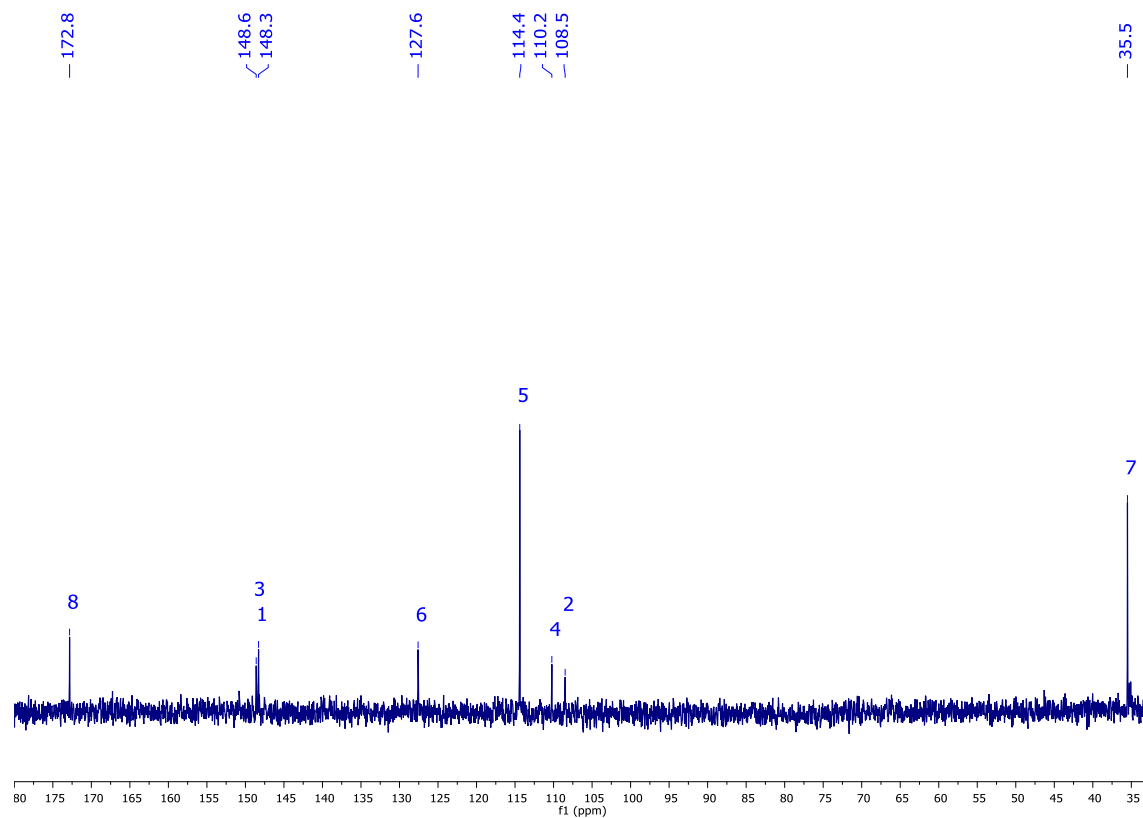
Output m/z range : 0.0000 to 415.4303

Cut Level : 0.00 %

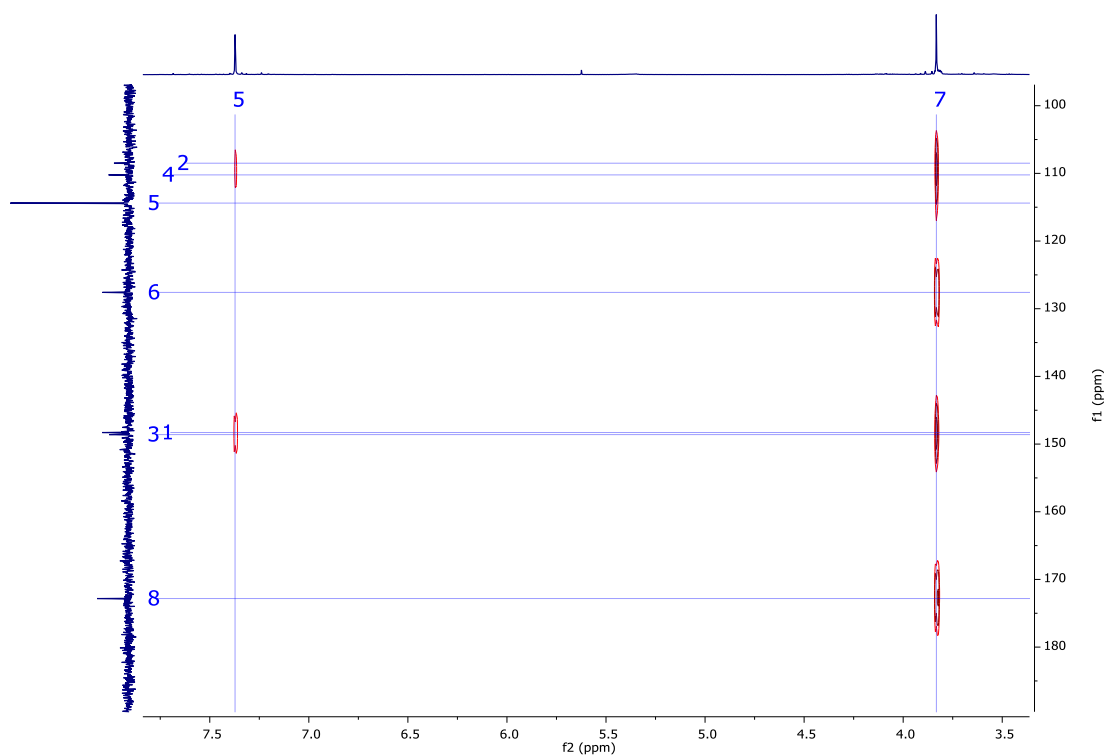
Anexo 21. Espectro de masas (EM-IE) de *aplysinólida* (17)



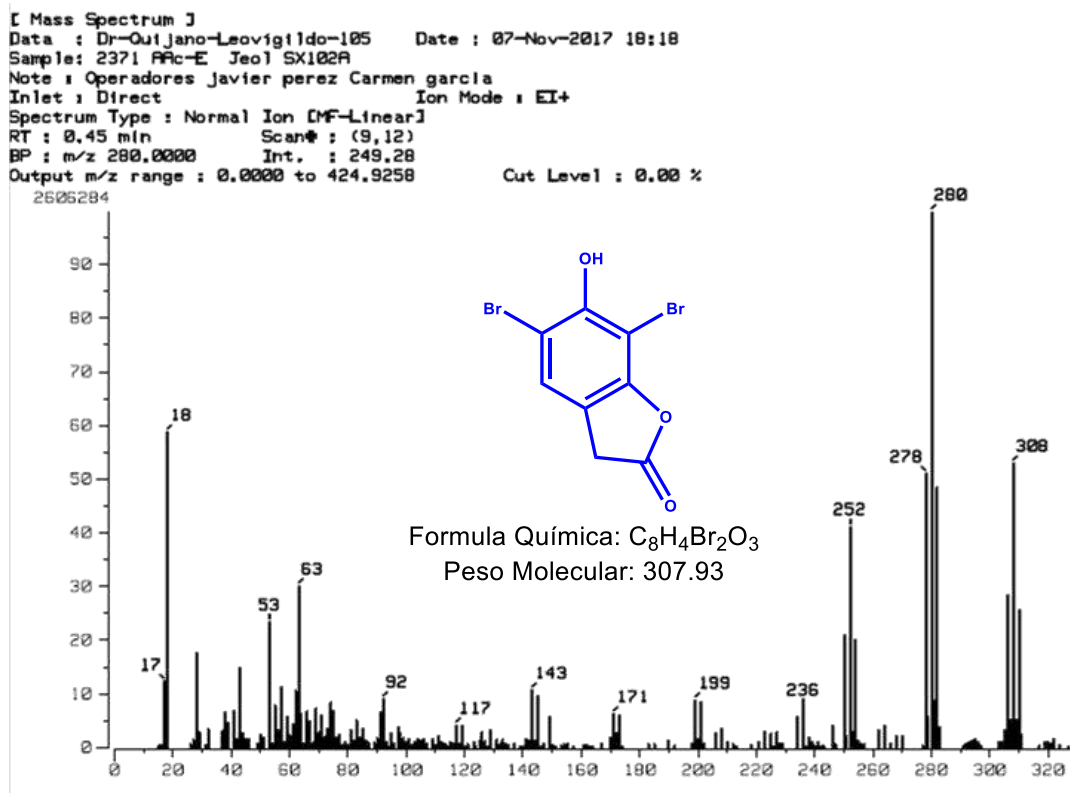
Anexo 22. Espectro de RMN- ^1H (500 MHz / acetona- d_6) de la lactona **18**.



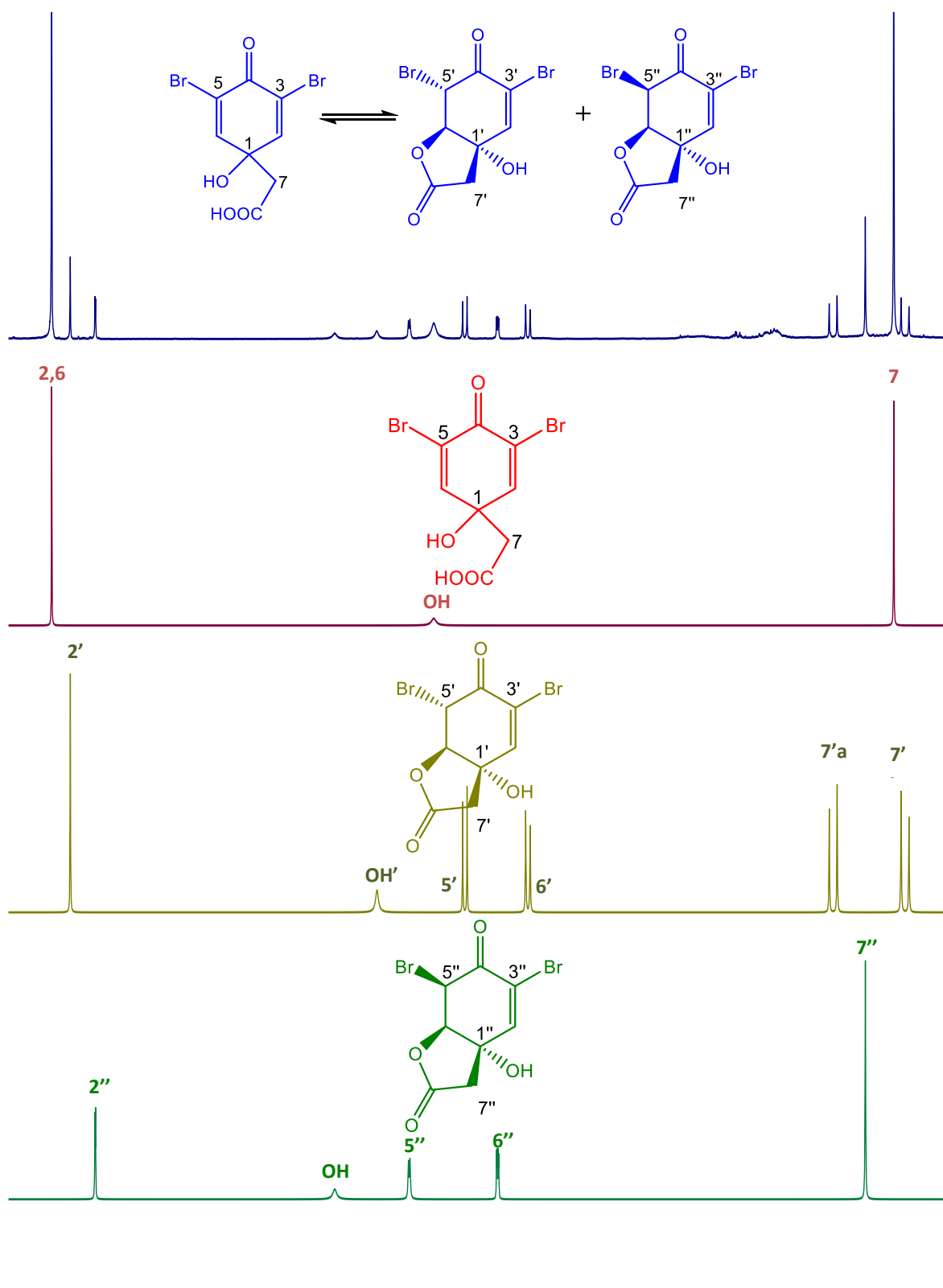
Anexo 23. Espectro de RMN- ^{13}C (125 MHz / acetona- d_6) de la lactona **18**.



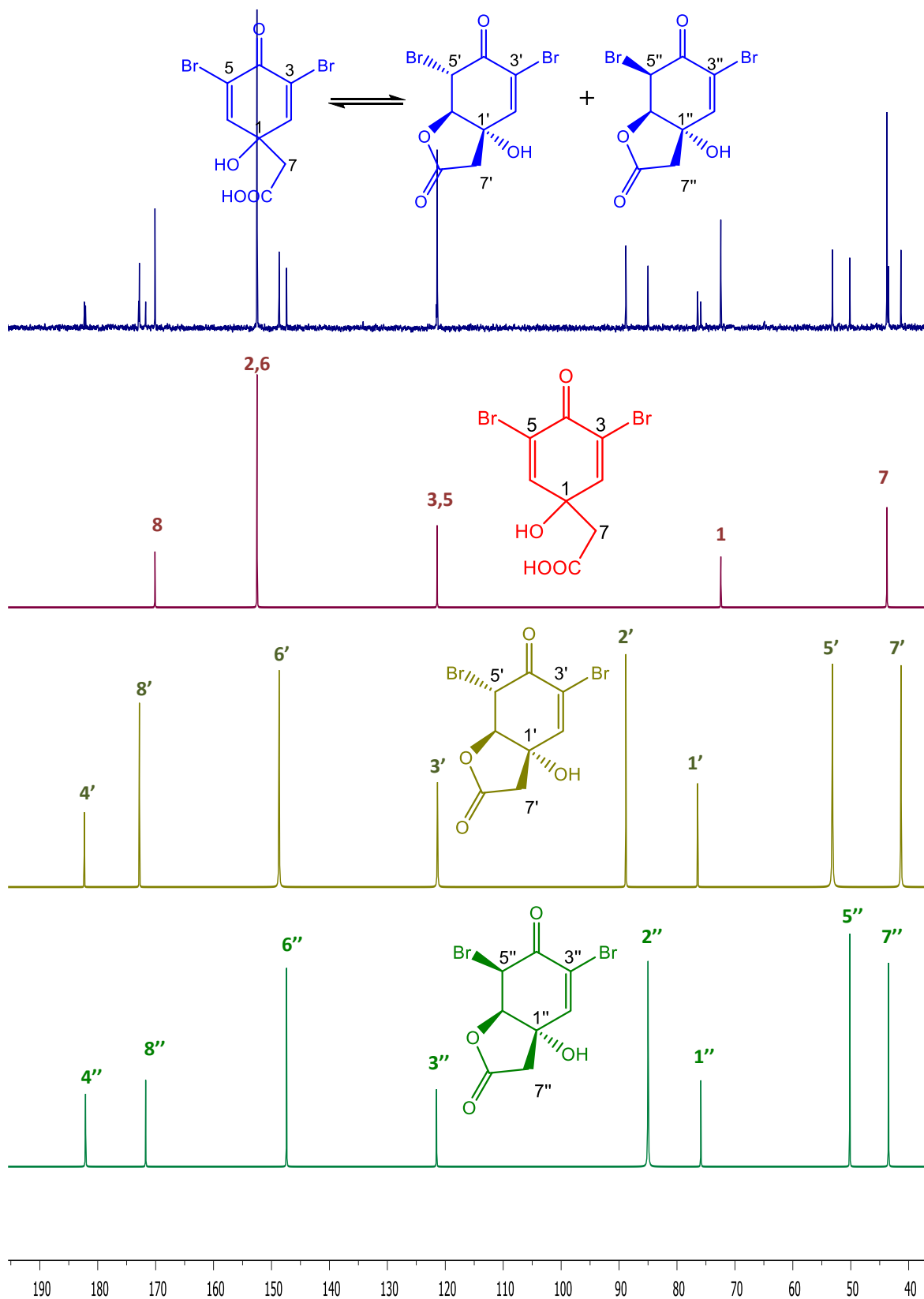
Anexo 24- Espectro HMBC de la lactona 18.



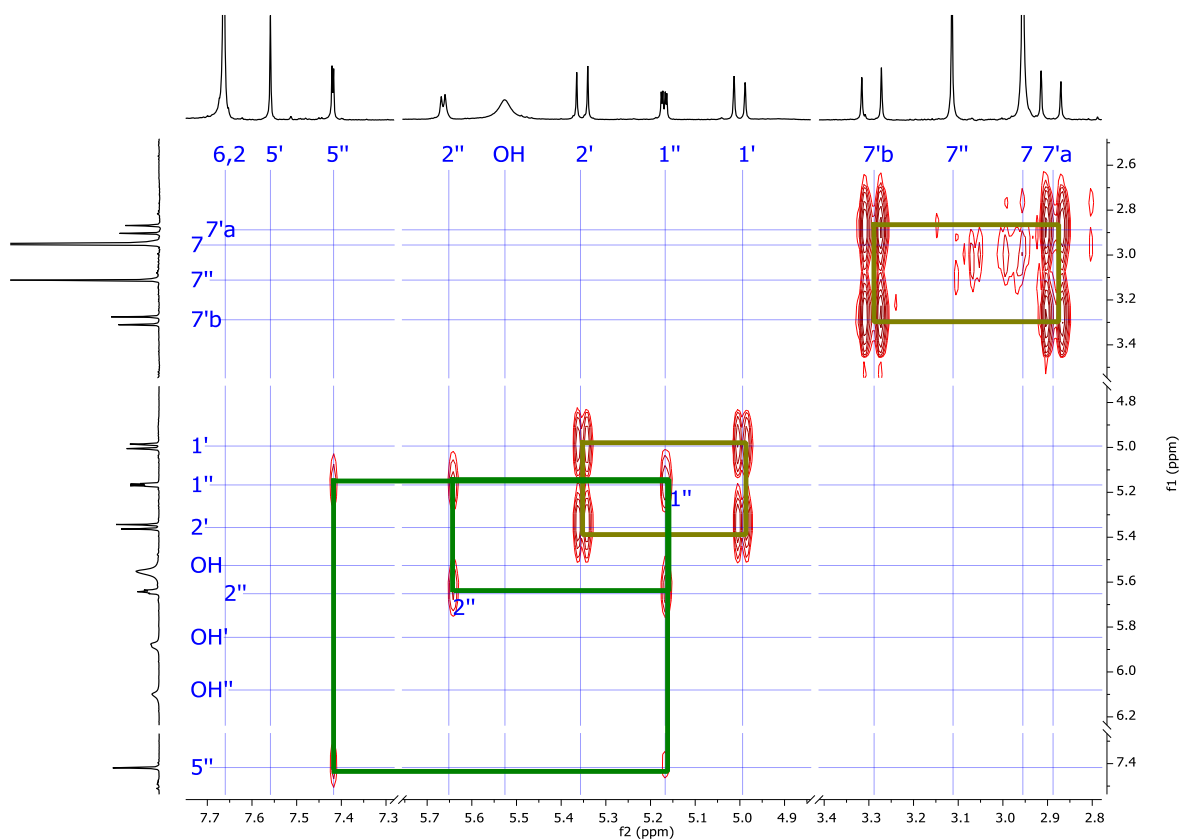
Anexo 25. Espectro de masas (EM-IE) de la lactona 18.



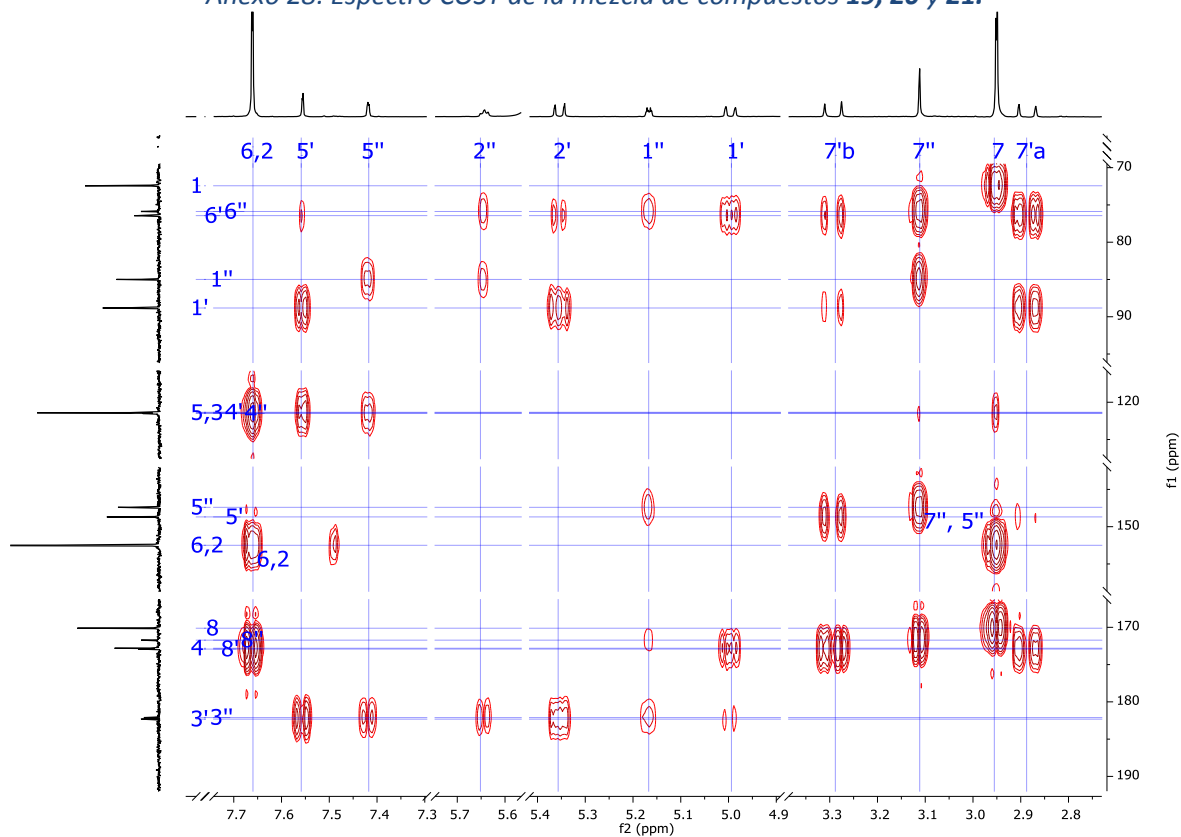
Anexo 26. Espectro de RMN- ^1H de la mezcla de compuestos **19**, **20** y **21** (azul; 400 MHz / acetona- d_6) y espectros separados con el programa MestreNova.



Anexo 27. Espectro de RMN- ^{13}C de la mezcla de compuestos **19**, **20** y **21** (azul; 125 MHz / acetona- d_6) y espectros separados con el programa MestreNova.

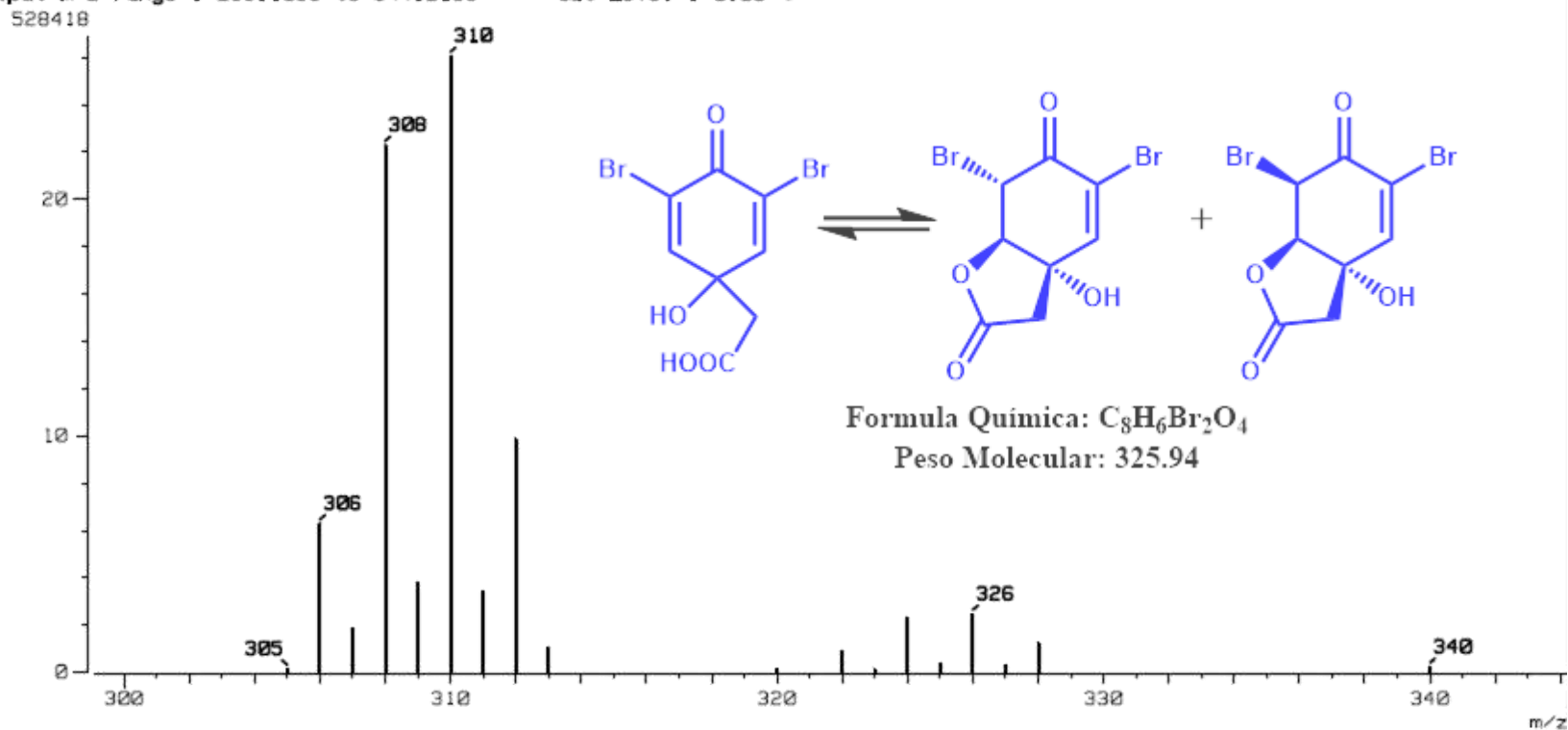


Anexo 28. Espectro COSY de la mezcla de compuestos 19, 20 y 21.

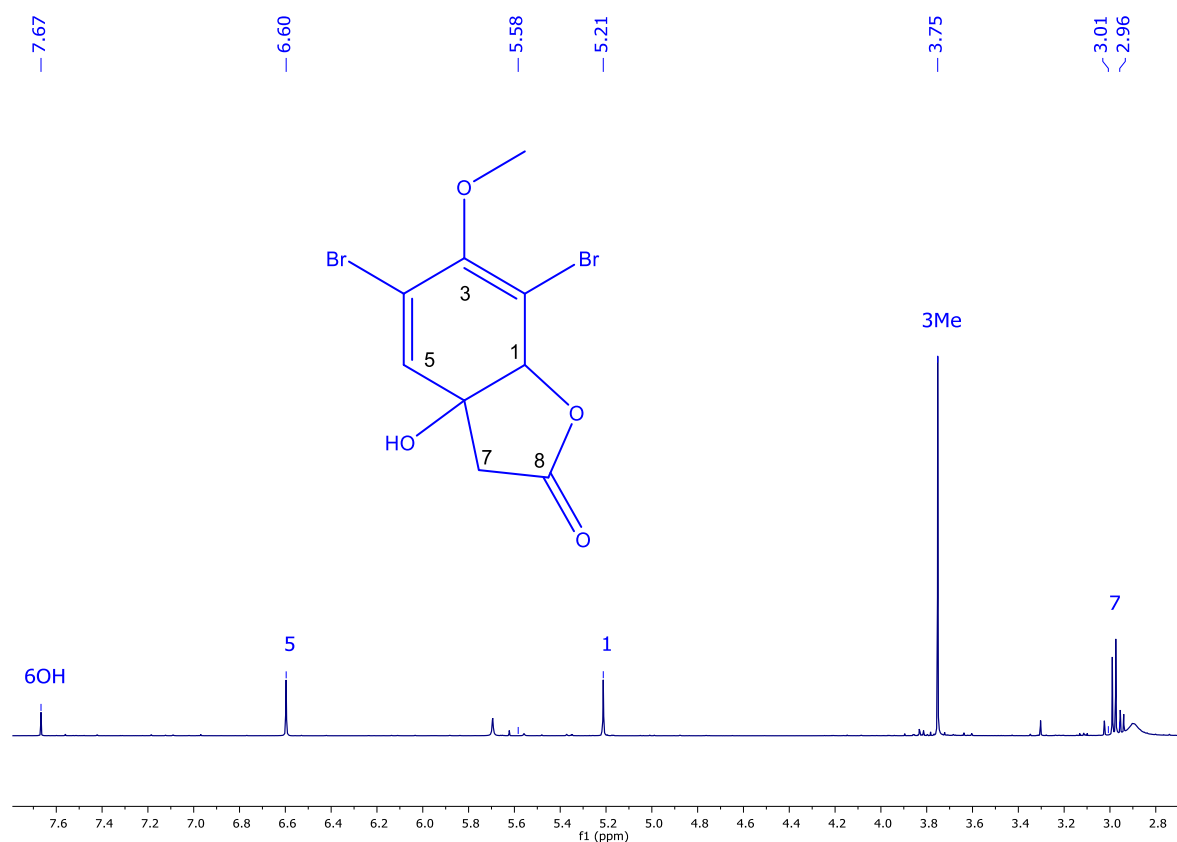


Anexo 29. Espectro HMBC de la mezcla de compuestos 19, 20 y 21.

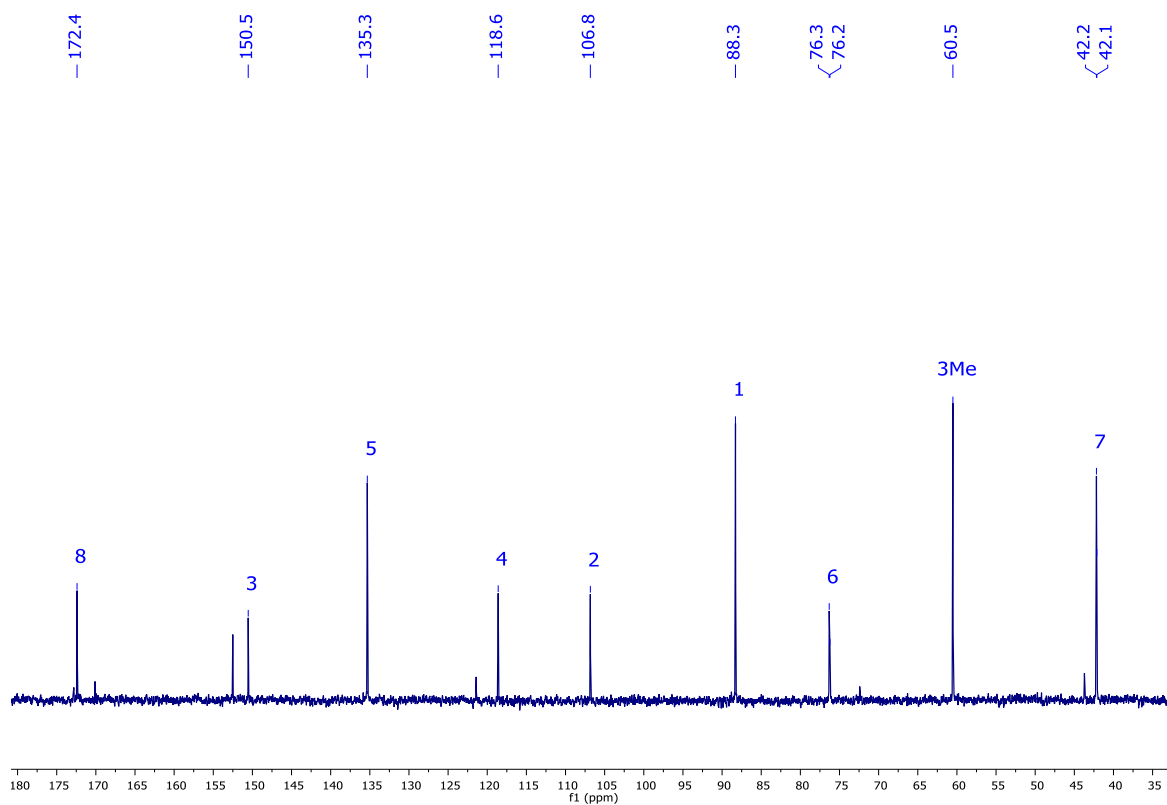
[Mass Spectrum]
 Data : Dr-Quijano-Leovigildo-087 Date : 22-Mar-2018 10:04
 Sample: 606 APc-Gc Jeol SX102A
 Note : Operadores Carmen Garcia Javier Perez
 Inlet : Direct Ion Mode : EI+
 Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]
 RT : 0.31 min Scan# : (9,12)
 BP : m/z 267.0000 Int. : 187.49
 Output m/z range : 299.1098 to 344.2136 Cut Level : 0.00 %



Anexo 30. Espectro de masas (EM-IE) de la mezcla de compuestos 19, 20 y 21.



Anexo 31. Espectro de RMN-¹H (500 MHz / acetona-d₆) de aeroplysinina-2 (22).



Anexo 32. Espectro de RMN-¹³C (500 MHz / acetona-d₆) de aeroplysinina-2 (22).

[Mass Spectrum]

Data : Dr-Quijano-Leovigildo-106 Date : 07-Nov-2017 18:23

Sample: 2372 FAc-H Jeol SX102A

Note : Operadores javier perez Carmen garcia

Inlet : Direct Ion Mode : EI+

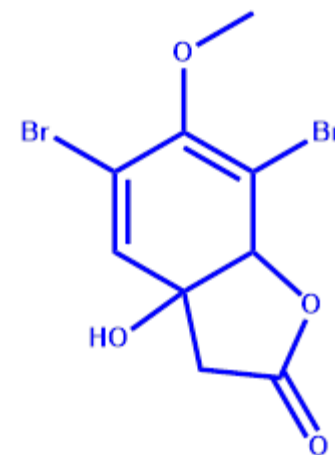
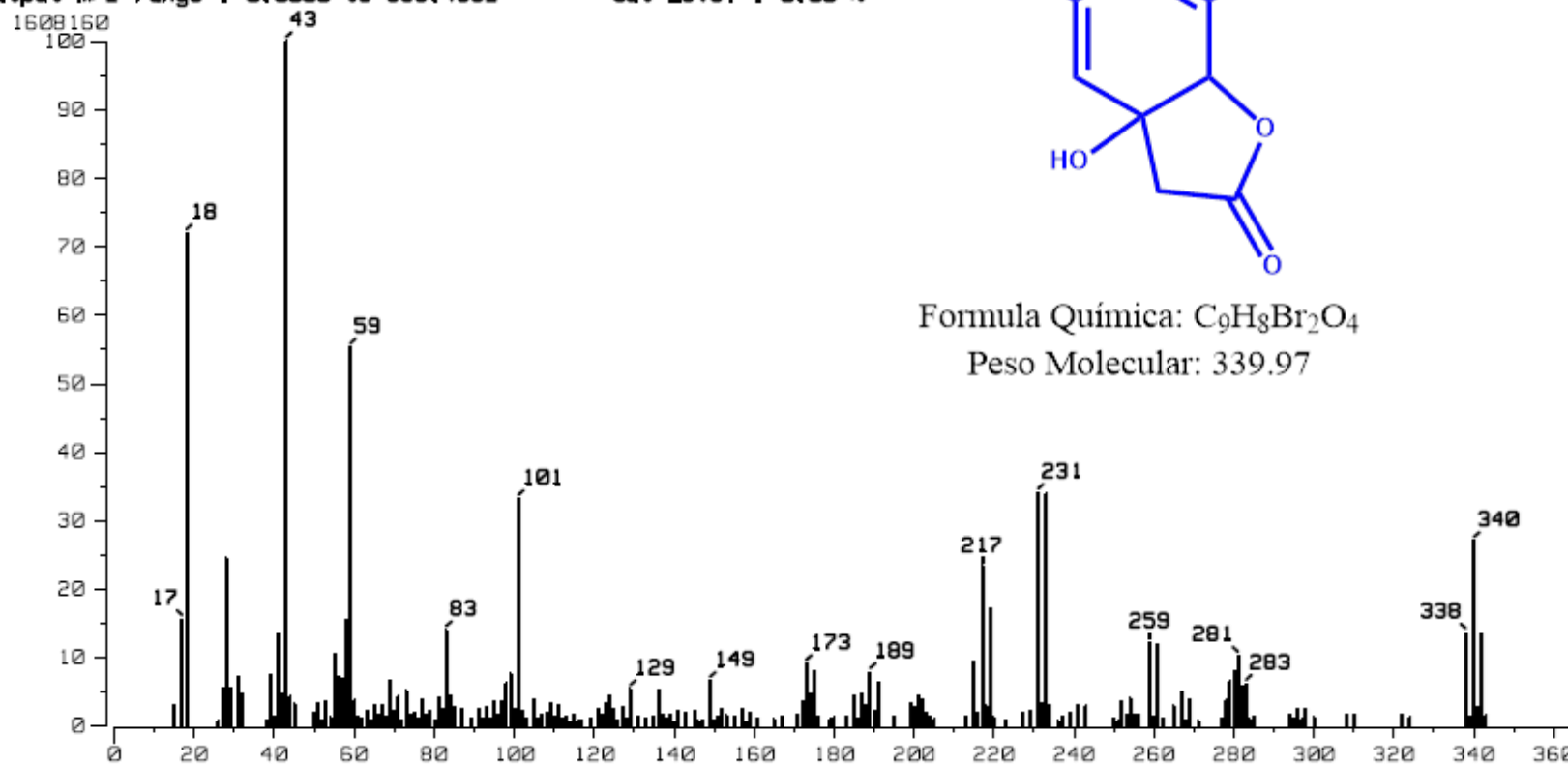
Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]

RT : 0.15 min Scan# : (4,5)

BP : m/z 43.0000 Int. : 153.37

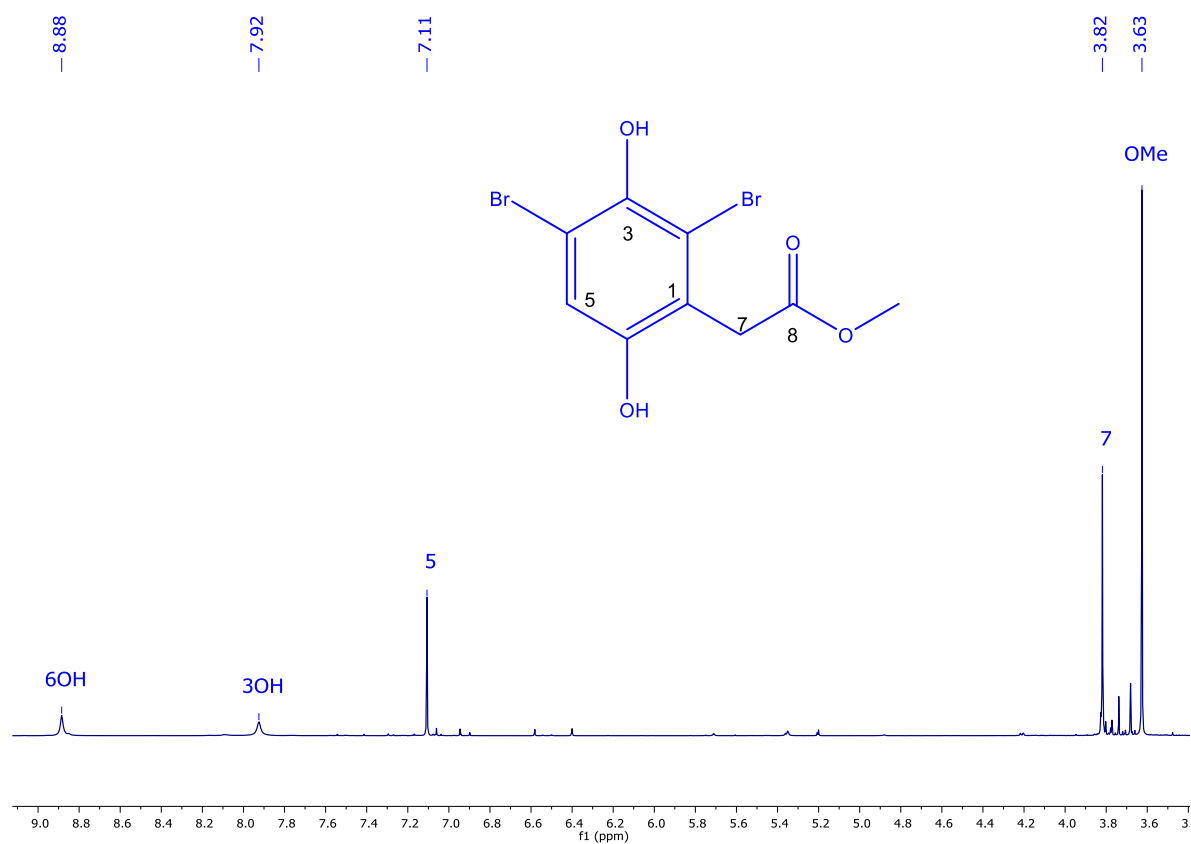
Output m/z range : 0.0000 to 396.4392

Cut Level : 0.00 %

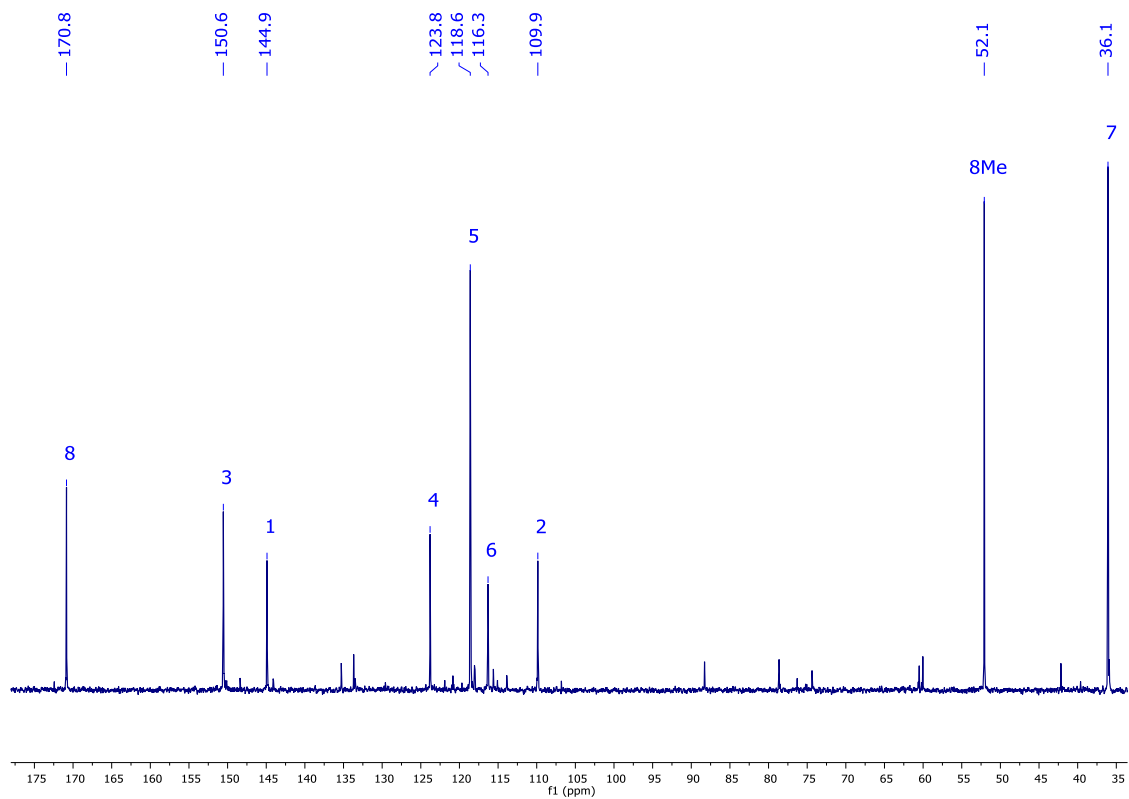
Formula Química: C₉H₈Br₂O₄

Peso Molecular: 339.97

Anexo 33. Espectro de masas (EM-IE) de aerplysinina-2 (22).



Anexo 34. Espectro de RMN-¹H (500 MHz / acetona-d₆) de **subereafenol B (23)**.



Anexo 35. Espectro de RMN-¹³C (125 MHz / acetona-d₆) de **subereafenol B (23)**.

[Mass Spectrum]

Data : Dr-Quijano-Leovigildo-107 Date : 07-Nov-2017 18:26

Sample: 2373 AAc-J Jeol SX102A

Note : Operadores javier perez Carmen garcia

Inlet : Direct

Ion Mode : EI+

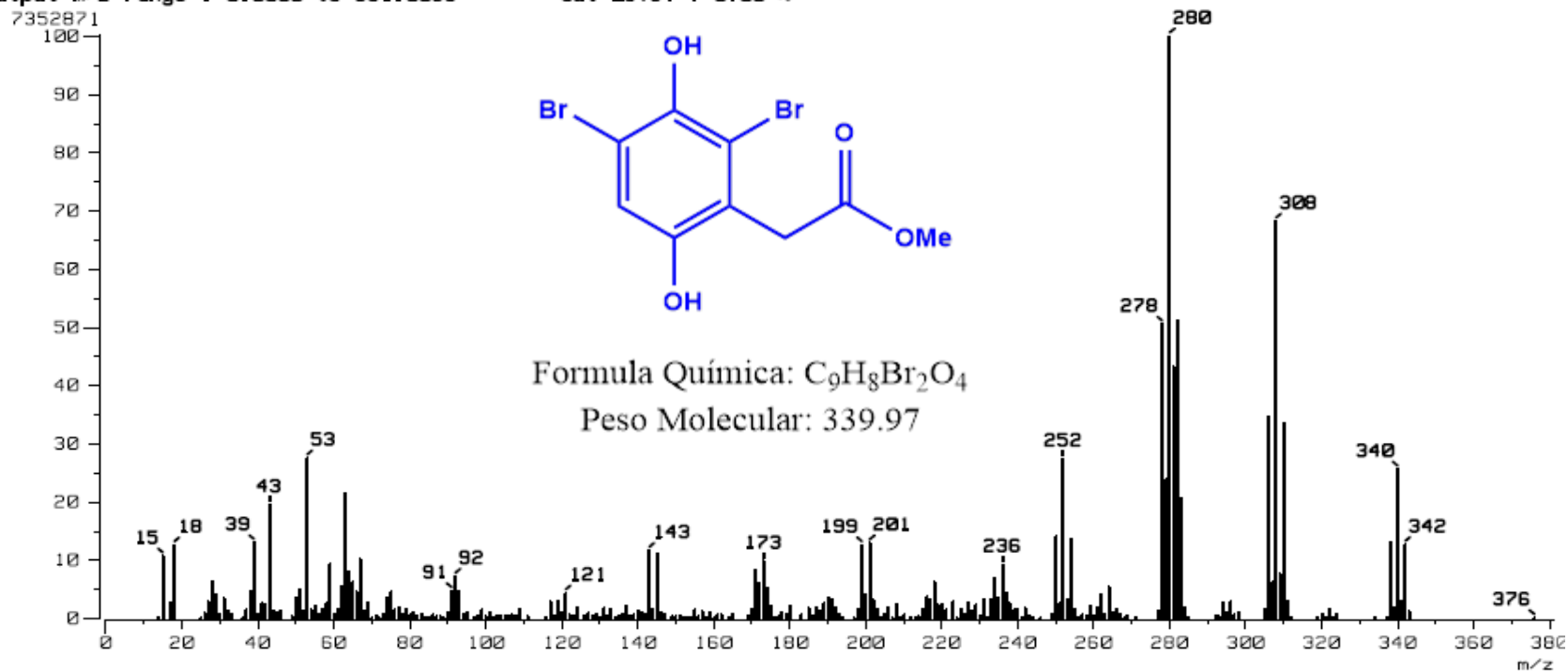
Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]

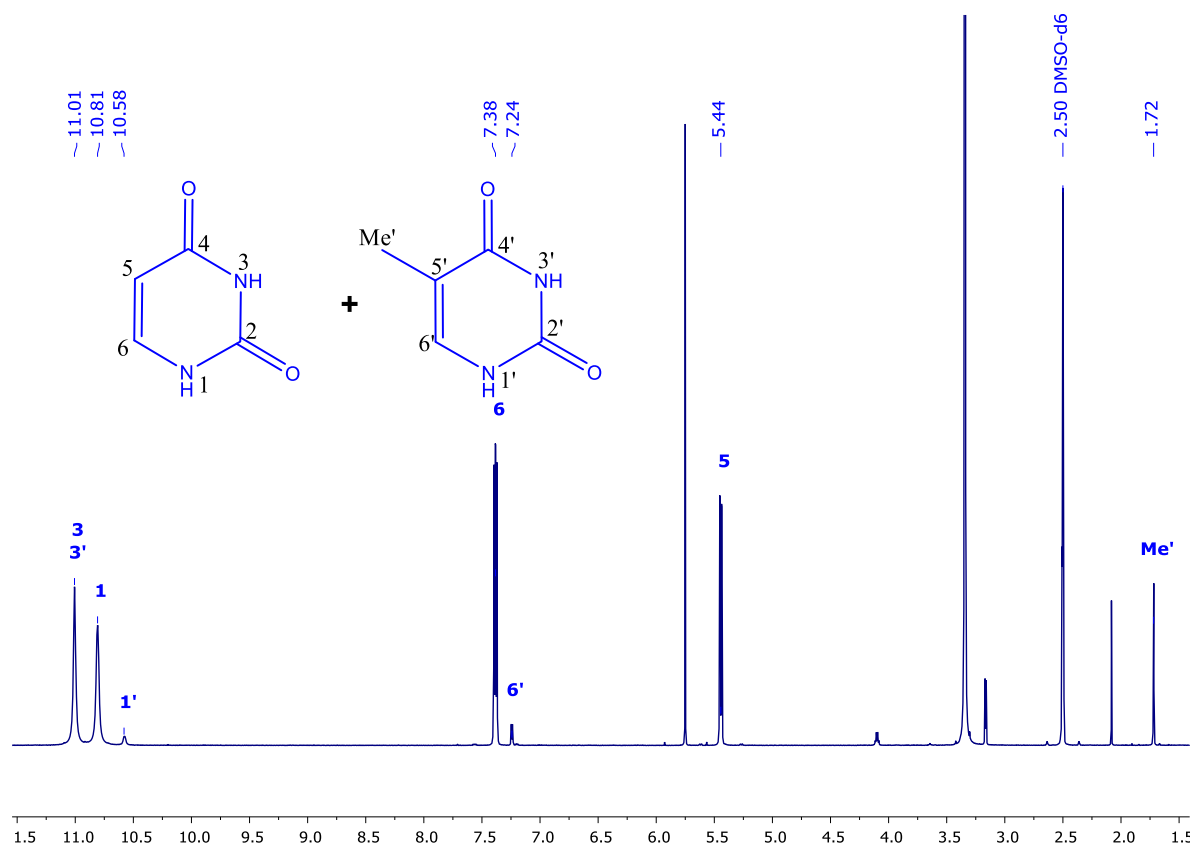
RT : 0.55 min Scan# : (11,14)

BP : m/z 280.0000 Int. : 699.20

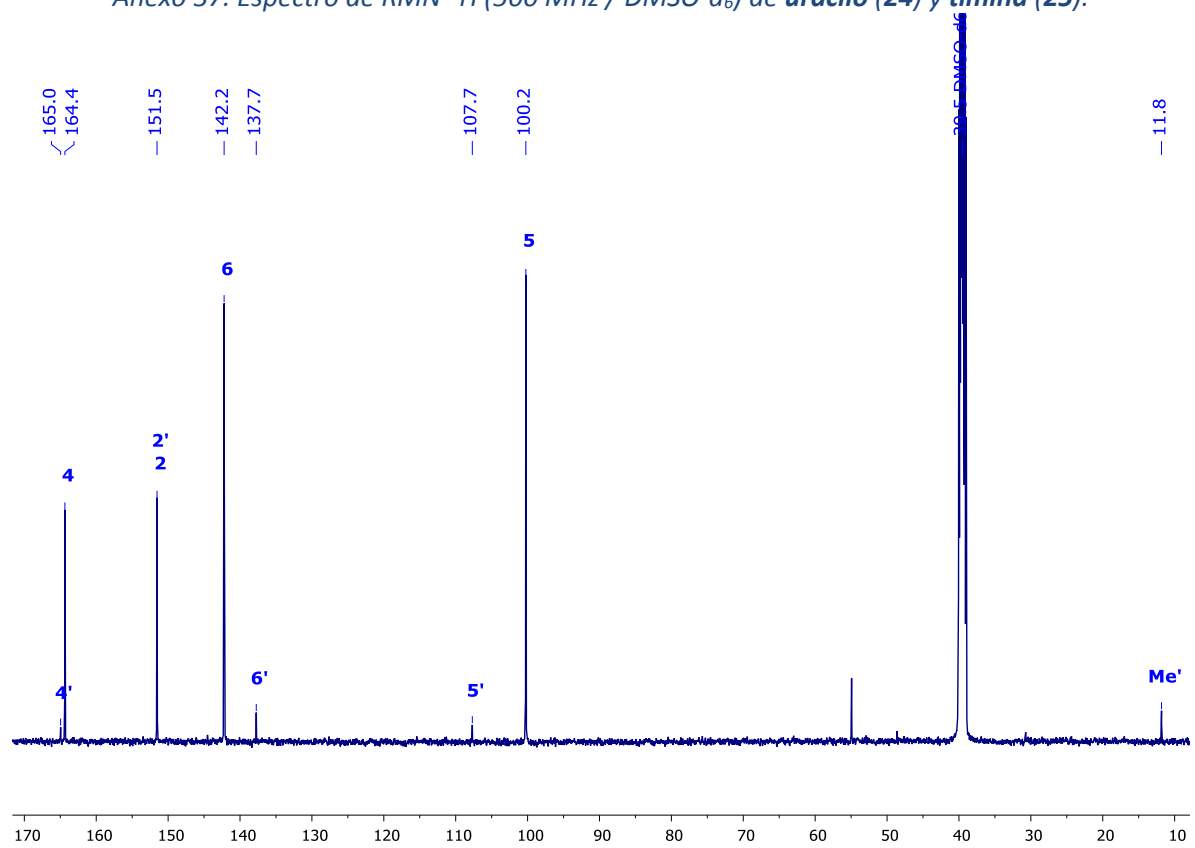
Output m/z range : 0.0000 to 381.0089

Cut Level : 0.00 %

Anexo 36. Espectro de masas (EM-IE) de *subereafenol B* (23).



Anexo 37. Espectro de RMN- ^1H (500 MHz / DMSO-d₆) de *uracilo* (24) y *timina* (25).



Anexo 38. Espectro de RMN- ^{13}C (125 MHz / DMSO-d₆) de *uracilo* (24) y *timina* (25).

[Mass Spectrum]

Data : Dr-Quijano-Leovigildo-061 Date : 20-Feb-2018 19:20

Sample: 343 AAc-S2pp Jeol SX102R

Note : Operadores Carmen Garcia Javier Perez

Inlet : Direct

Ion Mode : EI+

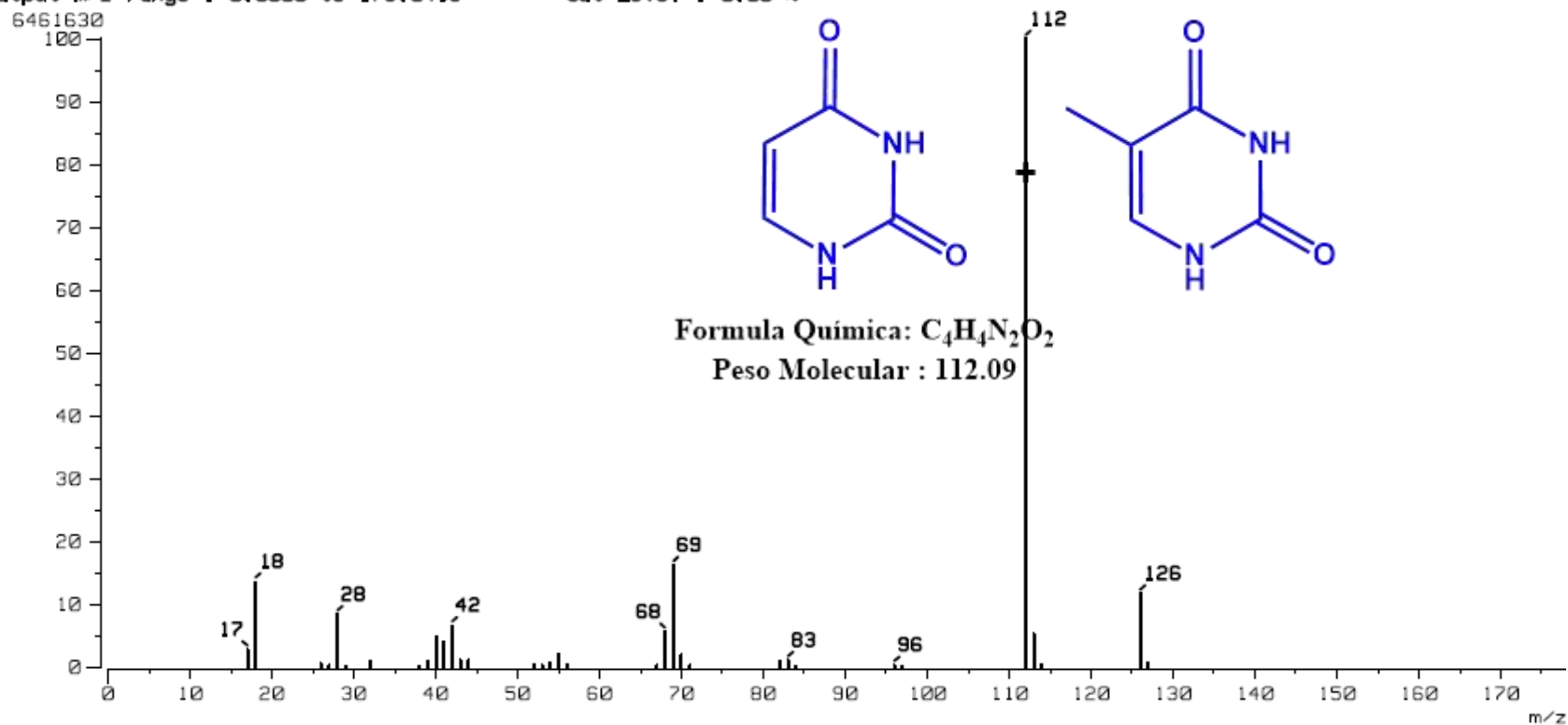
Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]

RT : 0.14 min Scan# : (5,6)

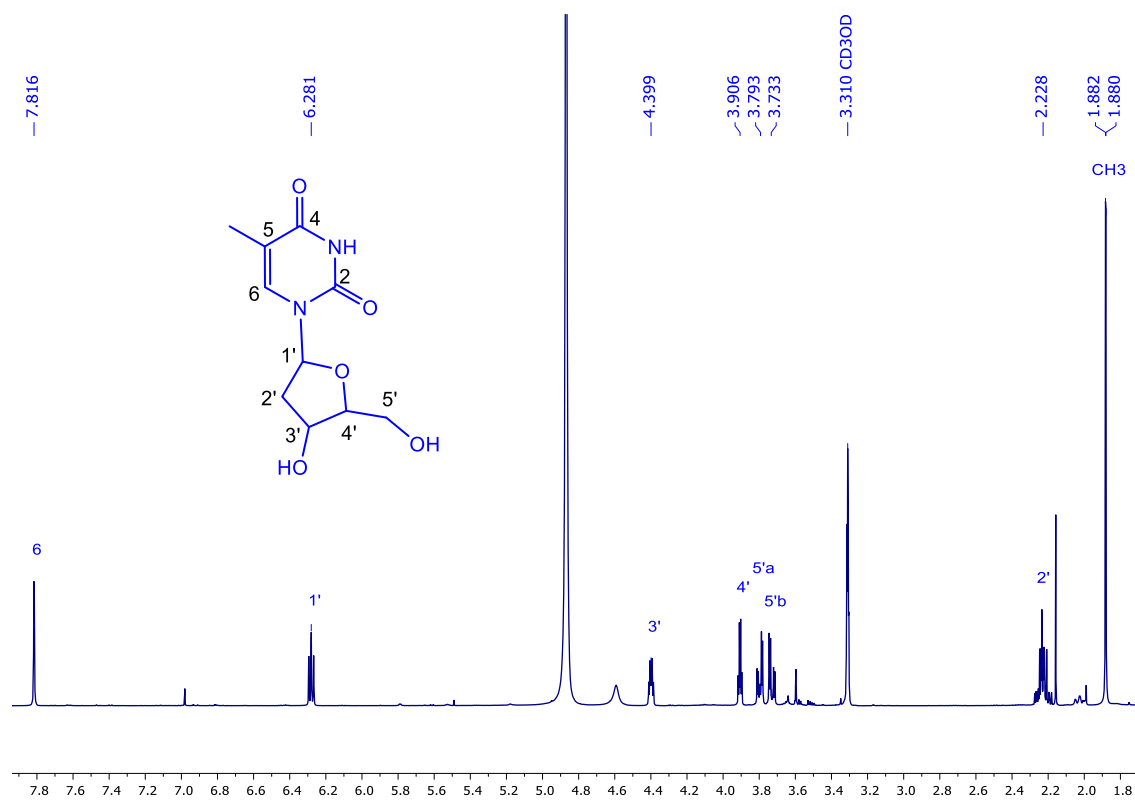
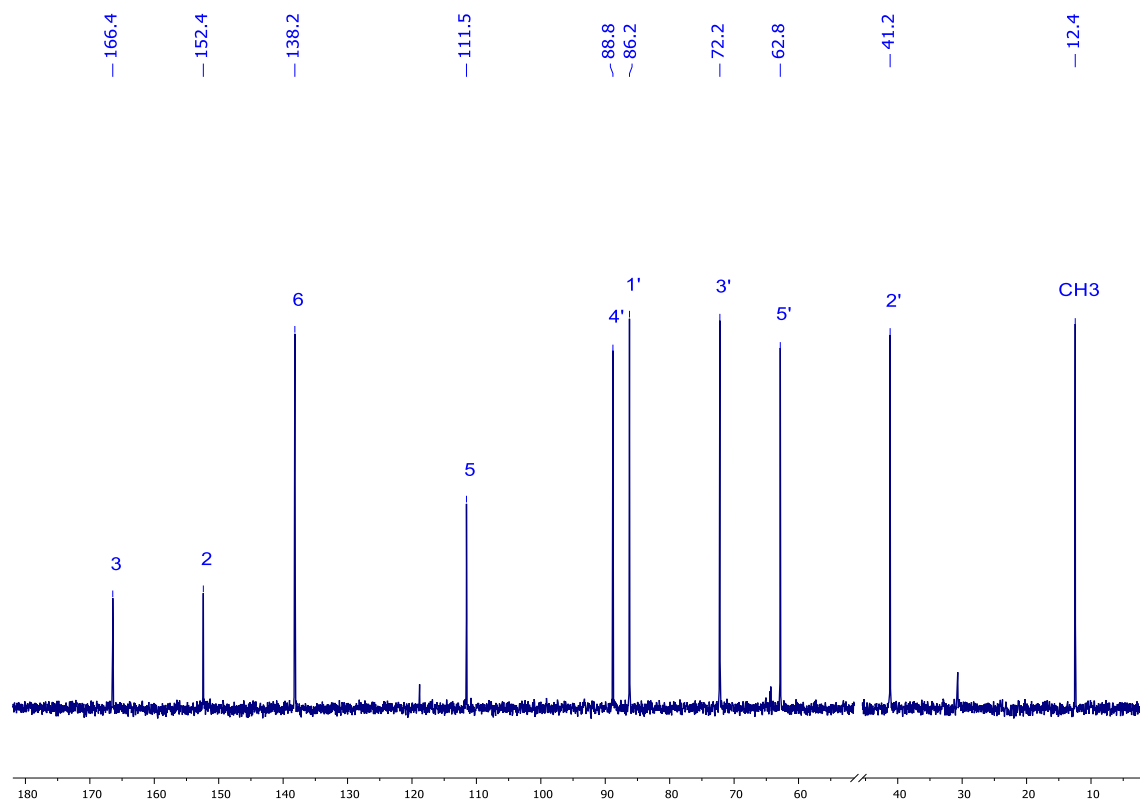
BP : m/z 112.0000 Int. : 614.45

Output m/z range : 0.0000 to 178.0415

Cut Level : 0.00 %



Anexo 39. Espectro de masas (EM-IE) de uracilo (24) y timina (25).

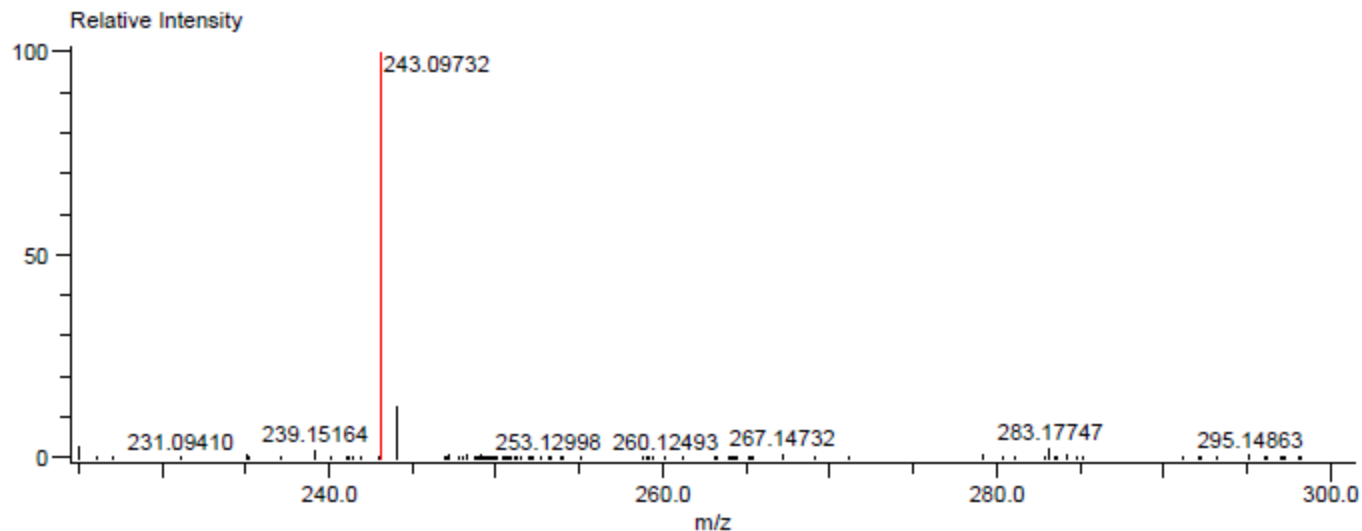
Anexo 40. Espectro de RMN-¹H (500 MHz / MeOD) de *timidina* (26).Anexo 41. Espectro de RMN-¹³C (125 MHz / MeOD) de *timidina* (26).

Data:U 952
 Sample Name:Ricardo mtz
 Description:
 Ionization Mode:ESI+
 History:Determine m/z[Peak Detect[Centroid,30,Area];Correct Base[1.0%]];Correc...

Acquired:5/9/2018 11:14:55 AM
 Operator:AccuTOF
 Mass Calibration data:Cal Peg 600
 Created:5/9/2018 11:49:04 AM
 Created by:

Charge number:1 Tolerance:1.00(mmu)
 Element:¹²C:10 .. 33, ¹H:14 .. 60, ¹⁴N:0 .. 7, ¹⁶O:5 .. 10

Unsaturation Number:1.0 .. 20.0 (Fracti.



Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula	Unsaturation Number
243.09732	76314.25	243.09810	-0.77	-3.18	¹² C ₁₀ ¹ H ₁₅ ¹⁴ N ₂ ¹⁶ O ₅	4.5

Anexo 42. Espectro de masas de alta resolución (HR-DART-MS) de *timidina* (26).