

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO QUIMICO DE ESPONJAS. HALICLONA
RUBENS E IRCINIA CAMPANA

T E S I S
QUE PARA OBTENER
EL TITULO DE:
QUIMICO
PRESENTA
FRANCISCA ACOSTA RUIZ



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CLAS tesis 1977
ABO M-3
FECHA _____
PRGC _____
S _____



QUIMICA

J U R A D O

Presidente - Dr. Tirso Ríos Castillo

Vocal - Dr. Alfredo Ortega Hernández

Secretario - Dr. Federico Gómez Garibay

1er. Suplente - Dr. José S. Calderón Pardo

2do. Suplente - Dr. Carlos Guerrero Ruíz.

ESTA TESIS SE REALIZO EN EL INSTITUTO DE-
QUIMICA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTOU
NOMA DE MEXICO, BAJO LA DIRECCION DE LOS
DOCTORES TIRSO RIOS CASTILLO Y JOSE S. CALL
DERON PARDO, CON UNA BECA DEL CONSEJO -
NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA.

A la memoria de mis padres

Manuel Acosta Rogel

y

Victorina Ruíz Lagunes

por el amor y apoyo que me brindaron.

A mis hermanos, con cariño

A mis sobrinos

A Arturo

con amor

A los Dres. Tirso Ríos C.

y

José S. Calderón P.

por su ayuda tan valiosa.

I. - INTRODUCCION.

En los últimos 50 años, el hombre ha empezado a estudiar con más intensidad el mar, con el objeto de aprovechar sus amplios recursos, sobre todo como fuente de alimentos y materias primas industriales. Actualmente, el mar ha adquirido gran importancia como fuente de recursos naturales, ya que en la tierra hay gran necesidad de ellos.

Las esponjas constituyen una parte de esos recursos que tienen gran interés desde un punto de vista químico, porque contienen una gran variedad de sustancias como esteroides, terpenoides, antibióticos, proteínas, lípidos, etc.

Como una contribución a la investigación y conocimiento de las esponjas, en el presente trabajo se describe el estudio químico de algunos de los componentes de las esponjas Haliclona rubens e Ircinia campana, recolectadas en el litoral del Golfo de México.

II. - GENERALIDADES.^(1,2,3)

Las esponjas son animales sedentarios generalmente marinos pertenecientes al grupo de los Porífera que son los organismos pluricelulares más primitivos y de categoría más baja en la escala biológica. Tienen su cuerpo con simetría radial o asimétrica y se les agrupa con los Fitozoarios debido a su parecido con los Celentéreos; como éstos, se reducen a un saco digestivo pero con numerosos orificios y pelos minúsculos por medio de los cuales introduce agua en su cavidad interna central, donde las células absorben las materias nutritivas. Además, están provistas de un orificio llamado poro inhalante u ósculo, por el cual sale el agua.

Forma y Tamaño.

La forma de las esponjas es muy variada, puede ser: ramosa, tubular, cilíndrica, en forma de copa o de abanico, etc. Algunas miden unos cuantos milímetros, en cambio otras llegan a medir más de un metro.

Color.

Presentan una gran variedad de colores. Las hay rojas, verdes, amarillas, moradas, azules, etc.; algunas cambian de color aún vivas, otras después de haber muerto.

Consistencia.

Algunas son compresibles y suaves, otras, duras y quebradizas.

Su pared comprende tres partes que son:

a) - ectodermo, b) - endodermo y c) - mesodermo.

a) - El ectodermo está formado por células lisas, algunas de las cuales se extienden en forma de tubo hasta el endodermo y constituyen los poros inhalantes.

b) - El endodermo está formado por células muy características de todas las esponjas. A estas células se les da el nombre de coanocitos, porque en su extremidad llevan un largo flagelo rodeado de una gorguera en forma de tubo que tiene por función provocar una corriente de agua a través de la esponja y apoderarse de las partículas alimenticias, que ceden después a las células digestivas del mesodermo.

c) - El mesodermo es una capa gelatinosa, similar a la de los Celentéreos, pero que contiene una gran variedad de células: estrelladas, ameboides digestivas, reproductoras y esqueletógenas.

El esqueleto de las esponjas puede ser de dos tipos:

1) - Orgánico. - formado por fibras de espongina compactas o huecas, e

2) - Inorgánico. - formado por elementos independientes -

llamados espículas que pueden ser de sílice o de carbonato de calcio. Las espículas se dividen en: megascleras y microscleras. Las megascleras son mucho más grandes que las microscleras y constituyen el esqueleto mineral de las esponjas.

Fisiología.

Las principales funciones que se realizan en una esponja son: nutrición, reproducción y respiración.

La nutrición va a depender de las corrientes de agua que entren y salgan de la esponja.

La reproducción puede ser asexual y sexual.

La respiración se realiza con mayor intensidad cuando las plantas simbiontes se encuentran realizando su máxima actividad fotosintética, es decir, en presencia de la luz solar.

CLASIFICACION.

De acuerdo a De Laubenfels⁽³⁾, las esponjas se clasifican de la siguiente manera;

CLASE	ORDEN
CALCISPONGIAE	ASCONOSA SICONOSA
HYALOSPONGIAE	HEXASTEROPHORA AMPHIDISCOPHORA
DEMOSPONGIAE	KERATOSA HAPLOSCLERINA POECILOSCLERIDA HALICHONDRINA HADROMERINA EPIPOLOSIDA CHORISTIDA CARNOSA

CLASE CALCISPONGIAE.

A esta clase pertenecen todas aquellas esponjas que presentan esqueleto formado por espículas de carbonato de calcio. Sus -

células son dos o tres veces más grandes en comparación con las otras clases. Suelen habitar fondos poco profundos.

CLASE HYALOSPONGIAE.

También recibe el nombre de Hexactinellida por poseer espículas con radios dirigidos en cinco o seis direcciones desde un punto central. Su esqueleto está formado por espículas de sílice. Habitan aguas profundas.

CLASE DEMOSPONGIAE.

Presentan una gran variedad de colores, formas y tamaños. Su esqueleto está formado por espongina (proteína fibrosa que forma parte del tejido extra celular) y espículas silíceas de forma variada que pueden estar ausentes. Se encuentran a cualquier profundidad, desde la zona de las mareas, hasta profundidades de más de siete mil metros.

Cabe mencionar algunas características del orden - - - Haplosclerina, ya que en él queda comprendida la esponja Haliclona rubens, tema central de nuestro estudio y que presenta la siguiente taxonomía:

CLASE	ORDEN	FAMILIA	GENERO	ESPECIE
<u>Demospongiae</u>	<u>Haplosclerina</u>	<u>Haliclondae</u>	<u>Haliclona</u>	<u>rubens</u>

ORDEN HAPLOSCLERINA.

Las especies de éste orden presentan fibras de espongi-
na, espículas silíceas del tipo más simple. El esqueleto de espongi-
na forma redes de malla bastante cerrada.

FAMILIA HALICLONDAE.

Tienen una espiculación simple; la cantidad de espongi-
na varía mucho, en algunas especies es muy abundante y en otras
muy escasa, sin embargo, en todas, el arreglo del esqueleto es reticu-
lar. Una característica muy importante es la referente a la estructu-
ra superficial, prácticamente no hay ectosoma ni cavidad subdérmica
que separe a la dermis. Esta familia comprende dos géneros:

Neopetrosia y Haliclona.

GENERO HALICLONA.

Se distingue del resto de la familia por la forma de las
especies que es generalmente ramosa, en ocasiones lobada o masiva y
en algunas formas jóvenes, puede ser incrustante. Las espículas son
oxeas pequeñas. La estructura del endosoma es definitivamente reticu-
lar.

El género Haliclona comprende las especies siguien-
tes:

(a) - H. doria (Laubenfels), (b) - H. rubens, (c) - H. variabi-

- lis, (d) - H. oculata, (e) - H. rosea, (f) - H. viridis,
(g) - H. permollis, (h) - H. elegans, (i) - H. longleyi,
(j) - H. coerulescens.

Químicamente se han estudiado las especies rubens, --
variabilis, permollis, longleyi y coerulescens; aislándose de ellas --
una serie de esteroides.

Esteroides.

Son sólidos cristalinos que poseen un esqueleto tetracíclico de perhidrociclopentano fenantreno y se hallan en las fracciones --
insaponificables de la mayoría de los invertebrados marinos (equinodermos, esponjas, etc.) e insectos, así como también en materias vegetales. Estos alcoholes se presentan en estado libre y esterificados con --
ácidos grasos de elevado peso molecular. Poseen un oxhidrilo secundario en el carbono 3 y pueden tener dobles enlaces en varias partes --
del núcleo y de la cadena lateral. La mayor parte de los esteroides, --
son compuestos que contienen en su molécula de veintisiete a veintinueve átomos de carbono.

DISTRIBUCION Y RECOLECCION.

De las casi 5,000 especies de esponjas conocidas hasta la fecha, la mayoría son marinas y se distribuyen desde la zona de las mareas, hasta grandes profundidades. Algunas especies (150) viven en agua dulce y todas son de la clase Demospongiae.

La recolección de las esponjas se efectúa, generalmente, de junio a octubre. Esta, al igual que la preservación, almacenamiento y extracción, se deben hacer rápidamente. Por lo general, se pescan a profundidades no superiores a 20 metros en aguas limpias; los buzos las recogen directamente del fondo, aunque también pueden pescarse con redes.

USOS.

Tienen aplicación en la industria y en cirugía (orden Keratosa) y en el comercio como la Euspongia officinalis que proporciona la esponja de baño; y la Hippospongia equina que se utiliza para la limpieza de las caballerizas.

Esteroles aislados de algunas especies de esponjas del género
Haliclona

Especie

Esterol

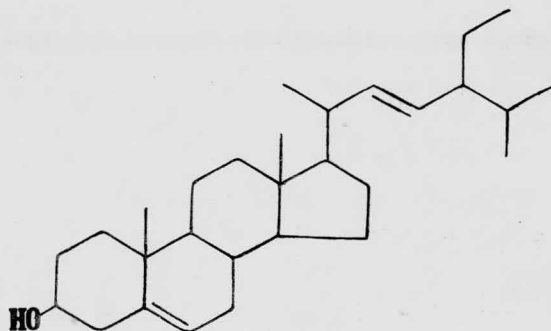
P.f.
acetato

H. specie

H. viridis

H. variabilis

H. permollis

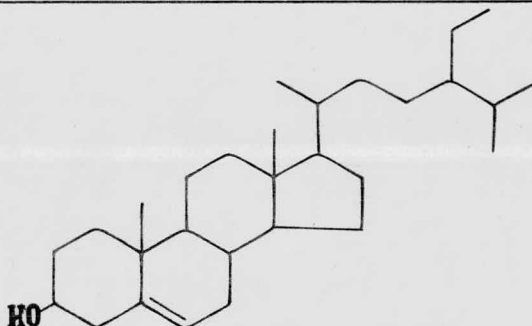


Poriferasterol p.f. 155-6°
I ref. 4

147-8°
ref.4

H. permollis

H. coeruleus



Clionasterol p.f. 137.5-8.5°
II ref.12c

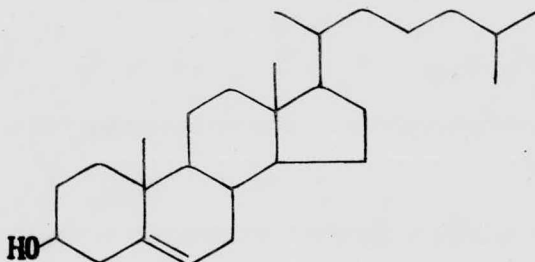
133-4°
ref.4

H. permollis

H. viridis

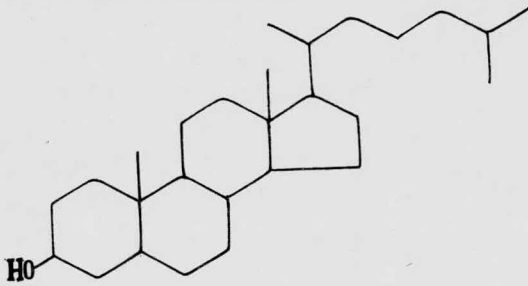
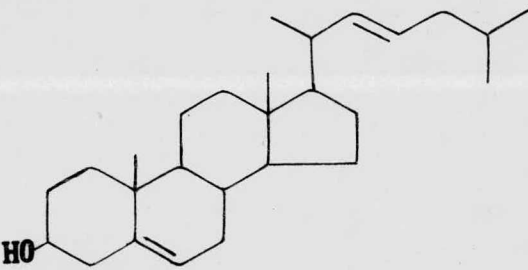
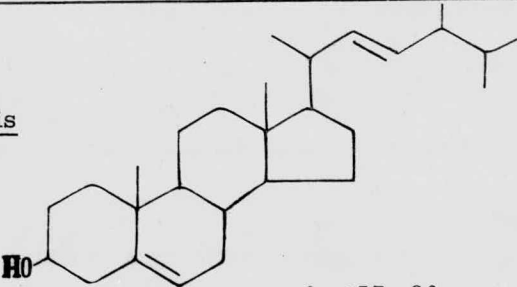
H. rubens

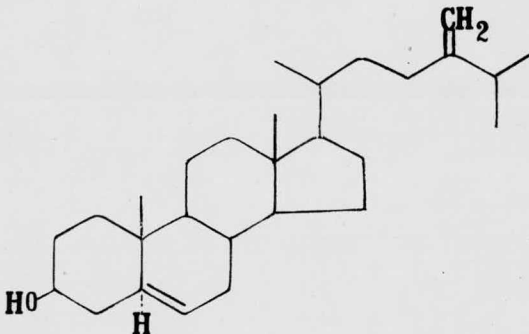
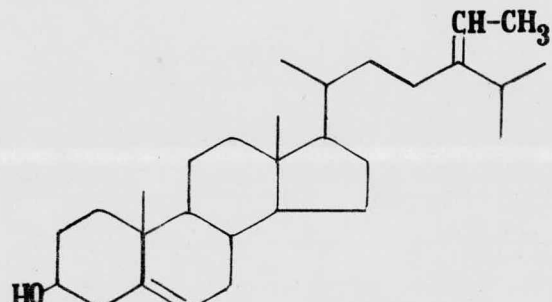
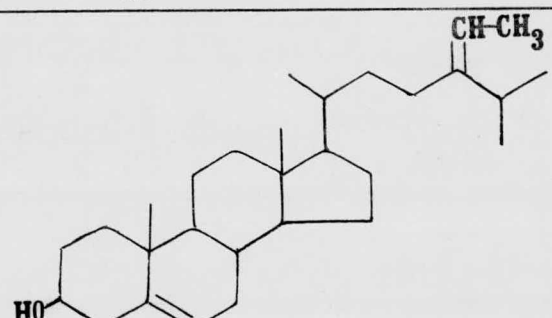
H. specie



Colesterol p.f. 150-1°
III ref.12a

135-6°
ref. 4

<u>Especie</u>	<u>Esterol</u>	<u>P.f.</u> <u>acetato</u>
<u>H. longleyi</u>	$C_{30}H_{50}O$ Halicionasterol p.f. 137° IV ref. 4	140 - 1° ref. 4
<u>H. specie</u>	 Colestanol p.f. 142° V ref. 6	
<u>H. permollis</u> <u>H. specie</u>	 24-Nor-colesta-5, 22 (trans)-dien-3β-ol. p.f. 137-8° VI ref. 6	
<u>H. permollis</u> <u>H. specie</u>	 Ergosta-5,22- dien-3β-ol. p.f. 157-8° VII ref. 6	

<u>Especie</u>	<u>Esterol</u>	<u>P.f.</u> <u>acetato</u>
<u>H. permollis</u> <u>H. specie</u>	 <p>Ergosta-5, 24(28)- dien-3β -ol. VIII</p>	130-1° ref.6
<u>H. permollis</u> <u>H. specie</u>	 <p>(E)-Stigmasta-5, 24(28)- dien-3β -ol. IX</p>	p.f. 124° ref.6
<u>H. permollis</u> <u>H. specie</u>	 <p>(Z)-Stigmasta-5, 24(28)- dien-3β -ol. X</p>	p.f. 127-8° ref.6

III. - PARTE TEORICA .

Las esponjas Haliclona rubens e Ircinia campana, -- fueron recolectadas en el arrecife de la Blanquilla, Veracruz y clasificadas por el Dr. Gerardo Green M.*

La esponja Haliclona rubens es de color rojo, de consistencia gruesa y grande; de forma ramosa y se encuentra sobre rocas de coral muerto. Es una de las especies más abundantes y la única ampliamente distribuída en todo el arrecife. Se encuentra desde - los 3 a 13 metros, haciéndose más abundante a los 11 metros.

Esta especie fué estudiada en 1949⁽⁴⁾, obteniéndose de - la fracción insaponificable, el acetato de colesterilo.

Posteriormente, en el año de 1974⁽⁵⁾, se logró aislar - una substancia tóxica denominada Halitoxina-R, proponiendo dos es - tructuras posibles que están de acuerdo con los datos espectroscópi -- cos y llegando a la conclusión que la Halitoxina-R contiene un anillo de piridonio el cual forma parte de un gran sistema anillado.

* Agradecemos al Dr. Gerardo Green M., del Centro de Ciencias del Mar y Limnología, de la Universidad Nacional Autónoma de México, la recolección y clasificación del material.

Además se aislaron varios pigmentos rojos de ésta especie, cuyos espectros en el visible se compararon con los espectros de otros pigmentos carotenoides, llegándose a la conclusión que el grupo-cromóforo de éstos es de naturaleza carotenoides.

De las esponjas Haliclona rubens e Ircinia campana, se obtuvieron los siguientes extractos:

<u>Extractos de Haliclona rubens</u>	<u>Extractos de Ircinia campana</u>
Extracto A (acetato de etilo)	Extracto E (acetato de etilo)
Extracto B (butanol)	Extracto F (butanol)
Extracto C (acetona)	Extracto G (acetona)
Extracto D (metanólico-acuoso)	Extracto H (metanólico-acuoso)

Del extracto A (acetato de etilo) de la Haliclona rubens, se aisló una mezcla de dos productos que una vez separados — por cromatografía en capa delgada, se identificaron como sigue:

El producto menos polar, resultó ser β sitosterol (XI).

El producto más polar, resultó ser un sólido con p.f. - 88-90° (XII), que mostró en su espectro en el IR bandas en 3380 (OH) 1650 (C=C), 1485 (-CH₂-), 1440 (-CH₃), 1228 (C-O) cm⁻¹.

En su espectro de RMN aparece un sistema AB centrado en 6.38 ppm con una J=8 Hz que integra para dos protones.

Además, aparece una señal compleja y ancha centrada-

en 4.0 ppm asignada a la base del OH. Aparecen señales entre 0.75 -1.05 que corresponden a grupos metilo. En 5.2 ppm aparece una señal compleja que se asigna a los protones de un doble enlace.

A pesar de que el material mostró una sola mancha en cromatografía en capa delgada, se llegó a la conclusión mediante el estudio del espectro de masas, que se trataba de una mezcla ya que se observan los siguientes iones moleculares M^+ ; 444, 428 y 416, que corresponden a las fórmulas:

$C_{29}H_{48}O_3$ (XIIIa), $C_{28}H_{44}O_3$ (XIIIb) y $C_{27}H_{44}O_3$ (XIIIc), respectivamente.

De acuerdo a los datos anteriormente descritos, se pensó que se trataba de una mezcla de esteroides en diferentes estados de oxidación.

Para aclarar la naturaleza de los oxígenos presentes, la mezcla (XIIIa, XIIIb y XIIIc) se acetiló con anhídrido acético en piridina, obteniéndose la mezcla de acetatos (XIIIa, XIIIb y XIIIc) como un sólido cristalino de color blanco con p.f. 181-183° que presentó los siguientes datos espectroscópicos:

en el IR exhibió bandas en 2960 (C-H), 1730 (C=O de éster), 1450 (-CH₃), 1370 (isopropilo), 1250 (C-O de éster) cm^{-1} .

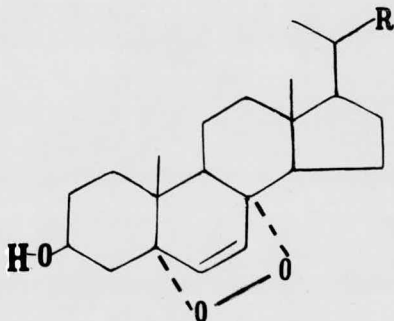
El espectro de RMN es muy similar al de la mezcla XIIIa, XIIIb y XIIIc, con la diferencia que la señal en 4.0 ppm correspondiente a la base del OH, desaparece; pero se presentan dos nue-

vas señales: un singulete en 1.95 ppm asignado al metilo del acetato - y una señal simple y ancha centrada en 5.1 ppm que corresponde a la base del acetato.

En el espectro de masas se observaron los iones moleculares M^+ ; 486, 470 y 458 que son congruentes para las fórmulas: $C_{31}H_{50}O_4$ (XIIIa), $C_{30}H_{46}O_4$ (XIIIb) y $C_{29}H_{46}O_4$ (XIIIc).

De lo anterior se concluye que cada uno de los compuestos tiene un grupo oxhidrilo.

Por otra parte, para explicar la naturaleza de los otros dos oxígenos restantes, se buscó la manera de acomodarlos en el núcleo esteroidal de tal forma que los datos espectroscópicos se cumplieran. Considerando las señales de los dos protones vinílicos que forman un sistema AB, se pensó que los compuestos podrían contener en sus estructuras un peróxido que puede formar parte del anillo B del esqueleto de un esteroide, como se muestra en el siguiente esquema:



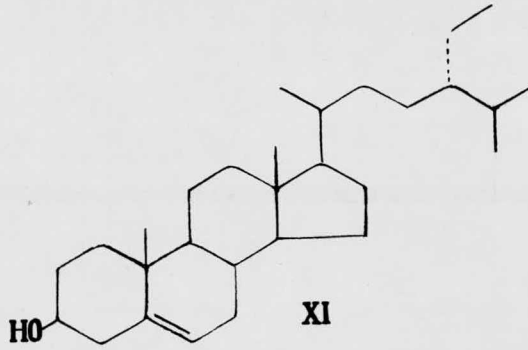
Tomando en consideración el aislamiento de ergosterol-
de productos marinos, es factible situar la función peróxido en el anillo B ya que el ergosterol mediante procesos biológicos, puede dar lugar a la formación de éste tipo de peróxidos⁽⁶⁾.

Al hidrogenar la mezcla de productos XIIIa, XIIIb y XIIIc, usando PtO_2 como catalizador, se obtuvo un sólido cristalino de color blanco con p.f. 198-200°. Su espectro en el IR presentó bandas en 2960 (C-H), 1730 (C=O de éster), 1460 (-CH₃), 1390 y 1370 (isopropilo), 1250 (C-O de éster) cm^{-1} .

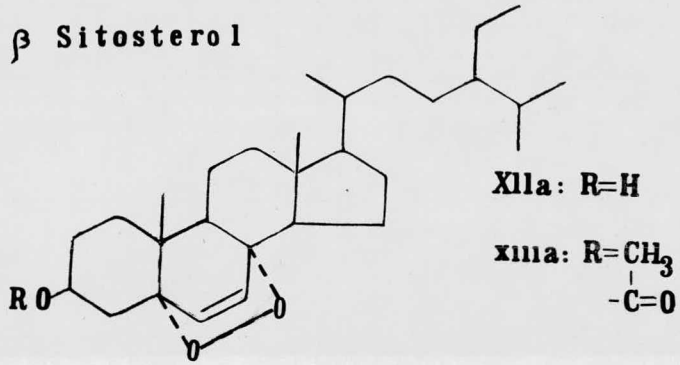
El espectro de RMN es muy similar al de la mezcla -- XIIIa, XIIIb y XIIIc, pero se diferencia de éste, en que el sistema-AB desaparece.

En el espectro de masas se observaron los iones moleculares M^+ ; 488, 472 y 460 que son congruentes para las fórmulas: $\text{C}_{31}\text{H}_{52}\text{O}_4$ (XIVa), $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_4$ (XIVb) y $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}_4$ (XIVc).

Con los datos anteriormente descritos y principalmente por el estudio del espectro de masas de la mezcla XII y tomando en cuenta los datos obtenidos de los productos aislados de otras esponjas (Tethya aurantia, Leucetta losangelensis y Axinella cannabina)^(6,7,8) se logró identificar los compuestos que forman la mezcla y que se representan por las siguientes fórmulas:



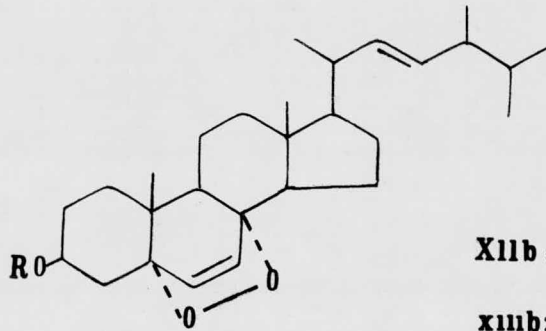
β Sitosterol



XIIa: R=H

XIIIa: R=CH₃
|
-C=O

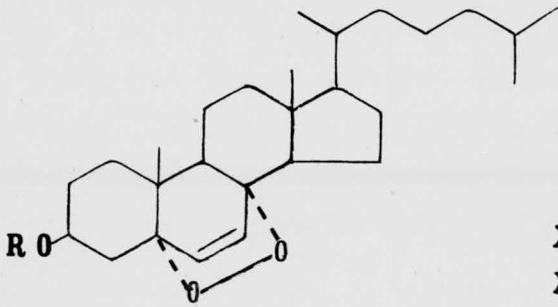
24 ξ -etil-colest-6-en-5 α ,8 α -epidioxi-3 β -ol



XIIb: R=H

XIIIb: R=H₃C-C=O
|

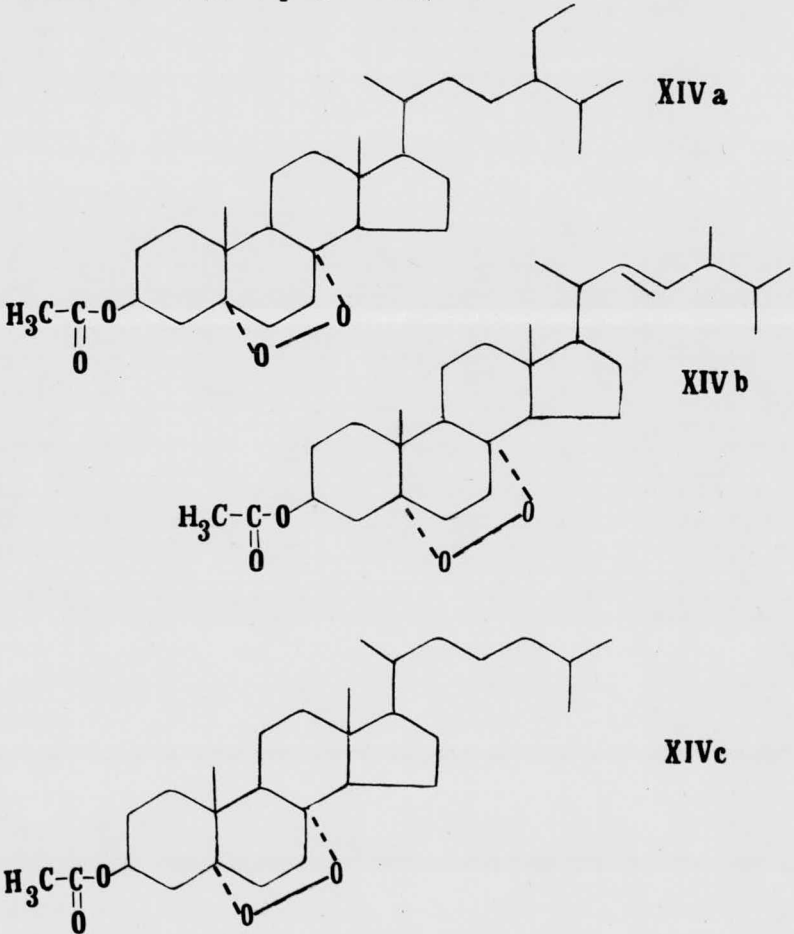
ergosta-6,22-dien-5 α ,8 α -epidioxi-3 β -ol



XIIc: R=H

XIIIc: R= $\text{H}_3\text{C}-\text{C}(=\text{O})-$

colest-6-en-5 α ,8 α -epidioxi-3 β -ol

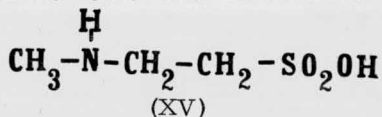


Del extracto B (butanol) de la Haliclona rubens, se aisló un producto sólido de color blanco con p.f. 228-232° , que una vez que se recristalizó de etanol-agua, su p.f. fué de 235-237° (XV).

Su espectro en el IR presentó bandas en 3410 (OH), -- 3100 (R-NH-R), 1460 (-CH₂-), 1425 (S-CH₂-), 1200 (S=O), 1033 - (SO₂), 600 (S-O) cm⁻¹.

Su espectro de RMN muestra una señal simple en 2.85 ppm asignada a un grupo metilo unido a nitrógeno; y dos tripletes sobrepuestos en 3.5 ppm J=6 Hz que integra para cuatro protones que corresponde a dos metilenos.

De acuerdo con su p.f. y sus datos espectroscópicos, - la sustancia se identificó como la N-metil taurina (p.f. reportado: -- 242°)⁽⁹⁾.



N-metil taurina

Esta sustancia fué aislada primeramente de la esponja Calix nereis⁽¹⁰⁾, pertenece al grupo de los ácidos aminosulfónicos y se encuentra dentro de los metabolitos secundarios de varios productos - marinos⁽¹¹⁾

Además de los productos antes descritos, de los extractos de acetato de etilo y de acetona de la Haliclona rubens se aisló un sólido de color blanco con p.f. 135-138° (XI), el cual fué identificado como β sitosterol de acuerdo a sus datos espectroscópicos y prepara-

ción de su acetato (sólido de color blanco con p.f. 128-130° (reportado-128-135°)⁽¹²⁾).

Del extracto B (butanol) de la Haliclona rubens, se aisló un producto sólido de color blanco que funde con descomposición a -265-272°. Su espectro en el IR exhibió bandas en 3400 (O-H), 1540 (-NH-secundaria), 1465 (-CH₃), 1200 (S=O), 1050 (SO₂) cm⁻¹. El espectro de RMN presentó una señal simple en 3.5 ppm y una señal --triple centrada en 3.0 ppm.

No fué posible determinar la estructura de éste compuesto debido a que no se obtuvo suficiente cantidad.

IRCINIA CAMPANA

Del extracto E (acetato de etilo), se aisló una sustancia aceitosa de color amarillo que una vez que se purificó por cromatografía en capa delgada, se identificó como el éster metílico del ácido oleico al comparar sus datos espectroscópicos con los reportados en la literatura⁽¹³⁾.

De esta misma cromatografía (E), se obtuvo β sitosterol que fué identificado por comparación en cromatografía en capa delgada así como por la preparación de su acetato.

Se aisló un aceite de color ligeramente amarillo que fué identificado como ácido oleico por comparación de sus datos espectros

cópicos con los reportados en la literatura.

También se aisló un sólido de color blanco con p.f. 88-90°, que se identificó por sus datos espectroscópicos como la mezcla de peróxidos de esteroides XIIIa, XIIIb y XIIIc, aislada del extracto de acetato de etilo de la Haliclona rubens.

Finalmente, se aisló un producto sólido de color blanco con p.f. 226-230°, que posteriormente fué acetilado con anhídrido acético y piridina. El producto de la acetilación presentó en el IR -- bandas en 3440 (O-H), 2960 (C-H), 1730 (C=O de éster), 1450 - -- (-CH₂-), 1370 (CH₃), 1245 (C-O de acetato) cm⁻¹.

Su espectro de RMN mostró dos señales simples en - 2.05 ppm asignadas a metilos de acetatos; se observan señales en -- tre 0.5 - 1.0 ppm, correspondientes a grupos metilos; una señal sim ple y ancha centrada en 5.25 ppm, que corresponde a la base de los - acetatos. Su espectro de masas mostró un ión molecular M⁺; 436.

La determinación de la estructura continúa en estudio, ya que no se obtuvo suficiente cantidad de producto.

IV. - PARTE EXPERIMENTAL.

Las esponjas Haliclona rubens e Ircinia campana, fué-
ron recolectadas en el arrecife de la Blanquilla, frente al puerto de -
Veracruz.

En ambos casos, el material (96.13g de la Haliclona
rubens y 128.70g de la Ircinia campana ; peso obtenido después de
la extracción) se cortó en trozos pequeños y se dejó en metanol (5 li-
tros) durante dos días, al cabo de los cuales, se filtró, repitiéndose
una vez más ésta operación.

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

Los espectros de IR fuéron efectuados por el M.en C. Noé
Rosas, en un espectrofotómetro Perkin Elmer, Mod. 337 ó 567
en solución clorofórmica, película, o en KBr.

Los espectros de RMN fuéron determinados por el I. Ray
mundo Saucedo y por el Quím. Jaime Escobosa , en un espec--
trómetro analítico, Marca Varian A-60A y HA-100, en CDCl_3
o D_2O ; los desplazamientos químicos (δ) están dados en ppm,
tomando como referencia el tetrametilsilano.

Los espectros de masas fuéron efectuados por el Dr. Eduardo
Cortés, en un espectrómetro Marca Hitachi Perkin-Elmer, --
Modelo RMU-6D.

Las cromatografías se efectuaron en cromatoplasmas de sílica
gel 60 F₂₅₄ de 10 x 20 cm y 2 mm de espesor. La pureza de-
los productos se siguió en cromatoplasmas de silicagel de 0.25 -
mm de espesor, cromatoplasmas de silicagel impregnadas de -
 AgNO_3 al 10%, usando como revelador una solución de sulfato
cérico al 1%, en ácido sulfúrico y en algunas ocasiones, yodo-
metálico.

Los extractos fueron concentrados por evaporación hasta 1/3 de su volumen y la solución metanólico-acuosa restante, se extrajo tres veces con acetato de etilo. Después de la evaporación del disolvente se obtuvieron 9.5g de un residuo de color verde oscuro, en el caso de la Haliclona rubens y 10.4g de un residuo de color verde, de la Ircinia campana.

A continuación, la fase metanólico-acuosa de cada una de ellas, se extrajo con butanol, tres veces; después se evaporó el disolvente obteniendo de la Haliclona rubens 12.0g de un residuo de color café rojizo y por otra parte, de la Ircinia campana se obtuvieron 9.556g de un residuo de color café oscuro.

Finalmente, los fragmentos de cada una de las esponjas, se dejaron en acetona (5 litros) durante dos días, al cabo de los cuales se filtró y se evaporó el disolvente, obteniéndose 1.43g de un residuo aceitoso de color verde amarillento de la esponja Haliclona rubens y 0.73g de un residuo aceitoso de color café de la Ircinia campana.

En resumen, se obtuvieron los siguientes extractos:

<u>Extractos de Haliclona rubens</u>	<u>Extractos de Ircinia campana</u>
Extracto A (acetato de etilo) 9.5g	Extracto E (acetato de etilo) 10.4g
Extracto B (butanol) 12.0g	Extracto F (butanol) 9.5g
Extracto C (acetona) 1.4g	Extracto G (acetona) 0.73g
Extracto D (metanólico-acuoso) -. -	Extracto H (metanólico-acuoso) -. -

Posteriormente se hicieron las siguientes cromatografías:

CROMATOGRAFIA A

Se montó una columna con 300g de gel de sílice Merck (0.02-0.06 mm) en benceno y se virtió el extracto A (acetato de etilo) empezándose a eluir con benceno y aumentando acetato de etilo en un 5%.

De las fracciones eluidas con benceno-acetato de etilo 95-5% se obtuvo 950 mg de una mezcla de dos productos, la cual fué posteriormente purificada en cromatoplasmas de sílice, usando como eluyente una mezcla de benceno-acetato de etilo 70-30% , obteniéndose 150 mg de un producto cristalino de color blanco con p.f 135-138° que se identificó como β sitosterol (XI).

Acetilación de XI.

El producto XI (100 mg) se disolvió en 0.5 ml de piridina, se le adicionó 0.5 ml de anhídrido acético. La mezcla de reacción se dejó durante una hora al baño de vapor, al cabo de éste tiempo, se virtió en agua, se extrajo con acetato de etilo; la fase orgánica se lavó con una solución de HCl al 5%, después con NaHCO₃ al 5% y finalmente con agua. Se secó con sulfato de sodio y se evaporó el disolvente al vacío, obteniendo 80 mg de acetato de β sitosterol con p.f. 128-130° (XIa).

Aislamiento de XII.

El producto XII se purificó por cromatografía en capa delgada, obteniéndose 10 mg de un producto sólido de color blanco, de p.f. 88-90°, el cual fué identificado como una mezcla de peróxidos de esteroides (XIIa, XIIb y XIIc).

λ máx. 212 nm (1603), ν máx. (película) 3380 (OH), 1650 (C=C) 1485 (-CH₂-), 1440 (-CH₃), 1228 (C-O). M⁺; 444 C₂₈H₄₈O₃ (XIIa), 428 C₂₈H₄₄O₃ (XIIb), 416 C₂₇H₄₄O₃ (XIIc).

Acetilación de XII.

El producto XII (39 mg) se disolvió en 0.5 ml de piridina, se le agregó 0.5 ml de anhídrido acético. La mezcla de reacción se dejó durante 30 minutos al baño de vapor, la reacción fué controlada por cromatografía en capa delgada. Al terminar la reacción, se le adicionó agua y se extrajo con acetato de etilo, la fase orgánica se lavó con HCl al 5%, después, con una solución de NaHCO₃ al 5% y, finalmente, con agua. Se secó con sulfato de sodio y se evaporó el disolvente al vacío, obteniéndose 34 mg de un producto cristalino de color blanco con p.f. 162-164° que fué recristalizado de cloroformo-metanol obteniéndose un producto sólido de color blanco en forma de agujas que funden a 181-183° (30 mg). ν máx. (CHCl₃) 1730 (C=O de éster), 1450 (-CH₃), 1370 (isopropilo), 1250 (C-O de éster) cm⁻¹. M⁺; 486 (C₃₁H₅₀O₄) (XIIIa), 470 (C₃₀H₄₆O₄) (XIIIb) y 458 (C₂₈H₄₆O₄) (XIIIc).

Hidrogenación de XIIIa, XIIIb y XIIIc.

La mezcla XIIIa, XIIIb y XIIIc (30 mg), se disolvió en acetato de etilo, se hidrogenó usando 5 mg de catalizador (PtO_2), previamente hidrogenado. Se dejó reaccionando durante tres horas, - siguiendo la reacción por cromatografía en capa delgada. Una vez -- terminada la reacción, se filtró y se evaporó el disolvente al vacío, - obteniendo 24 mg de una sustancia sólida de color blanco con p.f. -- 198-200° (XIVa, XIVb y XIVc), recristalizada de metanol. ν máx. (película), 1730 (C=O de éster), 1460 ($-\text{CH}_3$), 1390 y 1370 (isopropilo), 1250 (C-O de éster), 1040 (C-O-C de éster) cm^{-1} . M^+ ; 488 $\text{C}_{31}\text{H}_{52}\text{O}_4$ (XIVa), 472 $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_4$ (XIVb) y 460 $\text{C}_{29}\text{H}_{46}\text{O}_4$ (XIVc).

CROMATOGRAFIA B

El extracto B (butanol), (12.0 g) se fraccionó en una - columna con 450g de sílice (70-230 mallas), disolviendo la sustancia en una mezcla de cloroformo-metanol 70-30% y empezándose a eluir con cloroformo-metanol 70-30%, aumentando metanol en un 10%, obteniéndose un total de 104 fracciones.

De las fracciones eluidas con cloroformo-metanol 70 - 30% , se obtuvo un sólido de color blanco que funde con descomposi-- ción a 265-172°. ν máx. (KBr), 3420 (O-H), 1540 ($-\text{NH}-\text{sec.}$), - 1465 ($-\text{CH}_3$), 1200 (S=O), 1050 (SO_2) cm^{-1} .

De las fracciones eluidas con cloroformo-metanol - - - 70-30%, se obtuvieron 50 mg de un sólido de color blanco con p.f. 228-232° (XV). El producto fué recristalizado de etanol-agua y su p.f. fué de 235-237° (reportado 242°)⁽⁹⁾. máx. (KBr), 3410 (O-H), 3100 (R-NH-R), 1460 (-CH₂-), 1425 (-CH₂-S), 1200 (S=O), 1033 (SO₂), 600 (S-O) cm⁻¹.

Esta sustancia fué identificada como N-metil taurina, por comparación de sus datos espectroscópicos, con los reportados en la literatura⁽¹⁴⁾.

CROMATOGRAFIA C

Se montó una columna con 30g de sílice (0.02 - 0.06 mm) y se virtió 1.43g del extracto B (de acetona), de la Haliclona-rubens, empezándose a eluir con benceno.

En las fracciones eluidas con benceno-acetato de etilo-90%, se obtuvieron 10 mg de un producto cristalino de color blanco con p.f. 135-138°. Este producto fué identificado como β sitosterol al compararlo por cromatografía en capa delgada, con una muestra auténtica.

CROMATOGRAFIA E

El extracto E (acetato de etilo), de la Ircinia campana, se fraccionó en una columna con 300g de sílice (70-230 mallas),

en benceno.

De las fracciones eluidas con benceno se obtuvo 250 mg de un aceite que posteriormente se purificó por cromatografía en capa delgada, obteniéndose 150 mg de una sustancia aceitosa de color ligeramente amarillo, que fué identificada como el éster metílico del ácido oleico por comparación de sus datos espectroscópicos con los reportados en la literatura para dicha sustancia⁽¹³⁾. ν máx. (pelf u la) 2880 (C-H), 1740 (C=O de éster), 1450 ($-\text{CH}_2$) cm^{-1} .

De las fracciones eluidas con benceno-acetato de etilo 80-20% se obtuvieron 41 mg de β sitosterol.

Las fracciones eluidas con benceno-acetato de etilo 80-20% se dividieron en dos partes: Ia y Ib.

Ia. - Se purificó 150 mg de éstas fracciones en cromatoplasmas de sílice, obteniéndose 52.0 mg de un aceite de color ligeramente amarillo y 9 mg de un producto de p.f. 88-90° que al compararlo por cromatografía en capa delgada con la mezcla de productos XIIa, XIIb y XIIc, mostraron ser iguales. Además sus datos espectroscópicos fueron idénticos.

Ib. - El resto de las fracciones se separó en ácidos y neutros, obteniendo 92 mg de ácidos y 55 mg de neutros. Ambos productos fueron purificados por cromatografía en capa delgada, obteniendo de los ácidos un aceite de color ligeramente amarillo, que resultó ser ácido oleico por comparación-

de sus datos espectroscópicos con los reportados en la literatura⁽¹⁵⁾.

De los neutros, se obtuvieron 20 mg de un producto sólido de color blanco con p.f. 88-90° que resultó ser la mezcla de peróxidos de esteroides XIIa, XIIb y XIIc.

De las fracciones eluidas con benceno-acetato de etilo 50% , se obtuvieron 60 mg de un aceite incoloro que posteriormente se purificó en cromatoplasmas de sílice, usando como eluyente una mezcla de cloroformo-acetona 30-70% , obteniéndose 15 mg de un producto sólido de color blanco con p.f. 226-230°.

El producto anterior se disolvió en piridina (0.4 ml) y se le adicionó 0.4 ml de anhídrido acético. La mezcla de reacción se dejó al baño de vapor durante 15 minutos, al cabo de los cuales se agregó hielo y se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con HCl al 5%, después con NaHCO₃ al 5% y por último, con agua; se secó con sulfato de sodio y se evaporó el disolvente al vacío, obteniendo 12 mg de un aceite ligeramente amarillo. ν máx. (película), 3440 (O-H), 1730 (C=O de éster), 1450 (-CH₂-), 1370 (CH₃), 1245 (C-O de acetato) cm⁻¹, M⁺; 436.

V. - RESUMEN Y CONCLUSIONES

1. - Se preparó los extractos de acetato de etilo, butanólico, cetónico y metanólico-acuoso de las esponjas Haliclona rubens e Ircinia campana, recolectadas en el arrecife de la Blanquilla, Veracruz.
2. - De la Haliclona rubens y de la Ircinia campana se aisló e identificó:
 - a) - β sitosteroly se determinó la estructura de los siguientes compuestos:
 - b) - 24 ξ etil-colest-6-en-5 α , 8 α -epidioxi-3 β -ol
 - c) - ergosta-6,22-dien-5 α , 8 α -epidioxi-3 β -ol
 - d) - colest-6-en-5 α , 8 α -epidioxi-3 β -ol.
3. - De la Haliclona rubens se aisló N-metil taurina y una sustancia cristalina de p.f. 265-272° cuya estructura continúa en estudio.
4. - De la Ircinia campana se aisló e identificó ácido oleico y su éster metílico. Además, se aisló una sustancia de p.f. 226-230° cuya estructura continúa en estudio, debido a que no se obtuvo cantidad suficiente de material.

VI. - BIBLIOGRAFIA .

1. - Hyman, L. The Invertebrates, Vol.I, Cap. 4 y 6, New York (1940).
2. - Weisz, Paul, B. La Ciencia de la Zoología. Ed. Barcelona (1971).
3. - Green, M. Gerardo. Contribución al conocimiento de la Sistemática y Ecología de las Esponjas del -- arrecife "La Blanquilla", en Veracruz, Ver. Tesis Profesional. Fac. de Ciencias. (1968).
4. - Bergmann, W. and Feeney, R. Contribution to the Study of Marine Products. XXIII. Sterols from -- Sponges of the Family Haliclondae. J. Org. Chem. 14, 1078-84 (1949).
5. - Campbell, D.C. New method for synthetizing - - methylene butyro lactones. Halitoxin-R. Isolation and partial structure determination of a toxic - - - material from sponge Haliclona rubens. Elistanol. Novel marine sterol. Dactylyne, Novel marine - - acetylenic oxetane. Diss. Abstr. Int. B. 35 4 - 1566 (1974).
6. - Sheik, Y.M. and Djerassi, C. Steroids from sponges. Tetrahedron 30, 4095-4103 (1974).
7. - Andersen, Raymond, J. Chemical studies of primitive marine organisms. Diss. Abstr. Int. B. 36 3 1213 (1975).

8. - Fattorusso, E. et al. Sterol peroxides from the sponge *Axinella cannabina*. Gazzeta Chimica Italiana. 104, -- 409-13 (1974).
9. - Lindberg, B. Methylated taurines and choline sulphate in red algae. Acta Chemica Scandinavica., 9, 1323-6 (1955).
10. - Ackermann, D. and Pant, R. Naturwissenschaften, - 48, 646 (1961).
11. - Paul, J. Sheuer. Chemistry on Marine Natural - - - Products. Cap. 4. Academic Press, N.Y. (1973).
12. - Elsevier's. Encyclopedia of Organic Chemistry, Suplemento 14, Parte I, a) pág. 1570, b) 1815, c) 1839. Ed. F. Radt. (1954).
13. - The Sadtler Standard Spectra,
Espectro de IR (Prism), No. 917,
Espectro de RMN, No. 71.
14. - The Sadtler Standard Spectra .
Espectro de IR (Prism) No. 40766, (Grating) No.20766.
15. - The Sadtler Standard Spectra,
Espectro de IR (Prism) No. 915,
Espectro de RMN, No. 70.

Esta Tesis se Imprimió en Junio de 1977
empleando el sistema de reproducción Foto-Offset,
en los Talleres de Impresos Offsali-G, S. A., Av.
Colonia del Valle No. 531 (Esq. Adolfo Prieto),
Tels. 523-21-05 y 536-57-54 México 12, D. F