



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA
QUÍMICA ACUÁTICA

“AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS DE LA ESPONJA MARINA *Tethya californiana* (Laubenfels 1932), RECOLECTADA EN BAHÍA DE TODOS LOS SANTOS, BAJA CALIFORNIA NORTE”

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA
(Química acuática)

PRESENTA
QFB. JOSÉ RAYMUNDO LÓPEZ LÓPEZ

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

COMITÉ TUTOR:

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

DR. LEOVIGILDO QUIJANO. INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM.

DR. MANUEL B. AGUILAR RAMÍREZ. INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNIDAD
JURIQUILLA QUERÉTARO, UNAM.

DR. SERGIO RODRÍGUEZ MORALES. UNIDAD DE QUÍMICA SISAL, FACULTAD DE QUÍMICA,
UNAM.

DRA. ALEJANDRA ROJAS MOLINA. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO.

MÉXICO, D.F. ENERO 2013



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.

*ESTE TRABAJO ESTÁ DEDICADO A LA MEMORIA DEL
DR. TIRSO RIOS CASTILLO*

*Sus acciones estarán en nuestra memoria y siempre con nosotros,
porque como ser vital que fue llenó un espacio en nuestras mentes y
en nuestros corazones.*

28 DE ENERO DE 1930 – 17 DE JUNIO DE 2012

Agradecimientos.

- A mi familia por su apoyo incondicional durante estos años de estudio, especialmente a mi madre que nunca deja de creer en mí, este logro es para ustedes.
- Al Dr. Tirso Ríos Castillo, por ofrecerme su sincera amistad, aunque ya no está entre nosotros su memoria vivirá por siempre, gracias gran amigo.
- Al Dr. Leovigildo Quijano por su paciencia y enseñanza.
- A mi jurado de tesis: Dra. Ma. Alejandra Rojas Molina, Dr. José Luis Carballo Cenizo, Dr. Manuel B. Aguilar Ramírez, Dr. Sergio Rodríguez Morales y Dr. Leovigildo Quijano, por su tiempo y dedicación.
- Al M. C. Daniel Badillo Zapata, al Oc. Cervando Rueda López y M. C. Amara Thayde Sánchez Nava, por llevar a cabo la recolecta del material porífero.
- A la Bióloga Patricia Gómez por su apoyo en la identificación del material porífero.
- Al personal técnico del Instituto de Química-UNAM: Q. Ma. De los Ángeles Peña González, M. en C. Elizabeth Huerta Salazar, Dra. Beatriz Quiroz García, Dr. Rubén Gaviño Ramírez, Dra. María Isabel Chávez Uribe, M. en C. Héctor Ríos Olivarez (RMN), Dr. Rubén A. Toscano, M. en C. Simón Hernández Ortega (difracción de rayos X), I.Q. Luis Velazco Ibarra, Dr. Francisco Javier Perez Flores (EM), Q. F. B. Ma. Del Rocío Patiño Maya, Q. Eréndira García Ríos (IR y rotación óptica), por las facilidades prestadas para la realización de los análisis.
- Al CONACyT por la beca que permitió realizar estos estudios.
- A la Universidad Nacional Autónoma de México y el Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología por mi formación académica.
- A mis compañeros del laboratorio 2-6 del instituto de química-UNAM, por acompañarme y apoyarme en esta etapa de mi vida, se les recordará por siempre.
- A todos mis compañeros y amigos que reuní durante estos dos años de estudio se les aprecia enormemente, gracias por su amistad.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS	III
ÍNDICE DE ESQUEMAS	III
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ABREVIATURAS, FÓRMULAS Y ACRÓNIMOS	VI
GLOSARIO	VIII
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
2. GENERALIDADES	4
3. ANTECEDENTES	9
4. HIPÓTESIS	19
5. OBJETIVOS	19
6. PARTE EXPERIMENTAL	20
6.1 MATERIAL PORÍFERO	20
6.1.1 ÁREA DE RECOLECTA	20
6.1.2 RECOLECTA E IDENTIFICACIÓN DEL MATERIAL PORÍFERO	20
6.1.3 DISTRIBUCIÓN Y DESCRIPCIÓN DEL ESPÉCIMEN	21
6.1.4 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICOS	23
6.1.5 DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES FÍSICAS, ESPECTROSCÓPICAS, ESPECTROMÉTRICAS Y EQUIPO UTILIZADO	24
6.1.6 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS	24
6.1.7 EXTRACTO HEXÁNICO	25
6.1.8 REUNIÓN Y SEPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS DE BAJA POLARIDAD	26
6.1.8.1 ACETILACIÓN DE LA MEZCLA DE ESTEROLES	27
6.1.8.2 ACETILACIÓN DE LA MEZCLA DE EPIDIOXI-ESTEROLES Y ÁCIDOS GRASOS	27
6.1.9 FRACCIONAMIENTO DE RESIDUO BUTANÓLICO-ACUOSO	27
6.1.9.1 FRACCIÓN INSOLUBLE EN METANOL (TCRAQINSMEOH)	28
6.1.9.2 FRACCIÓN SOLUBLE EN METANOL (TCRAQSOLMEOH)	28
6.1.9.3 SEPARACIÓN DE LA FRACCIÓN TCRAQAM3 EN COLUMNA DE OCTADECILSILANO (C-18)	30
6.1.9.4 ACETILACIÓN DEL COMPONENTE TCRAQAM3C18-1A	30

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
7.1 TAURINA (1)	32
7.2 α -METIL-D-GLUCOPIRANÓSIDO (2)	35
7.2.1 MONOSACÁRIDO TETRAACETILADO (3)	38
7.3 HOMARINA (4)	42
7.4 TRIGONELINA (5)	45
7.5 SULCATINA (6)	48
7.6 URIDINA (7)	53
7.7 COLESTEROL (8)	56
7.8 OSTREASTEROL (9)	58
7.9 Δ^{22} -DEHIDROCOLESTEROL (10)	60
7.10 BRASSICASTEROL (11)	62
7.11 CLIONASTEROL (12)	64
7.12 DERIVADOS 5,8-EPIDIOXI DE LOS ESTEROLES (13-17)	66
7.13 ESTERES METÁLICOS DE ÁCIDOS GRASOS (18-33)	71
8. CONCLUSIONES	75
9. BIBLIOGRAFÍA	76
10. ANEXO	87

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Ácidos grasos identificados en <i>Tethya californiana</i>	16-18
Tabla 2	Datos de recolecta del material porífero a estudiar	20
Tabla 3	Fraccionamiento del extracto hexánico de la partición	25
Tabla 4	Recromatografía de la fracción TcHB	26
Tabla 5	Cromatografía en columna de gel de sílice de las fracciones reunidas de baja polaridad	26
Tabla 6	Fracciones finales obtenidas dependiendo del estudio por CCF	29
Tabla 7	Datos de RMN ^1H (400 MHz) y ^{13}C (100 MHz) del compuesto 1 determinados en CD_3OD	33
Tabla 8	Datos de RMN ^1H (400 MHz) y ^{13}C (100 MHz) del compuesto 2 determinados en CD_3OD	37
Tabla 9	Datos de RMN ^1H (400 MHz) y ^{13}C (100 MHz) del compuesto 3 determinados en CDCl_3	40
Tabla 10	Datos de RMN ^1H (400 MHz) y ^{13}C (100 MHz) del compuesto 4 determinados en CD_3OD	44
Tabla 11	Datos de RMN ^1H (400 MHz) y ^{13}C (100 MHz) del compuesto 5 determinados en CD_3OD	47
Tabla 12	Datos de RMN ^1H (400 MHz) y ^{13}C (100 MHz) del compuesto 6 determinados en CD_3OD	50
Tabla 13	Datos de RMN ^1H (400 MHz) y ^{13}C (100 MHz) del compuesto 7 determinados en CD_3OD	55
Tabla 14	Ácidos y ésteres metílicos de los ácidos de <i>T. californiana</i> de la fracción de hexano identificadas por CG/EM	73

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1	Diagrama de flujo de la obtención de los diferentes extractos de <i>T. californiana</i>	25
Esquema 2	Diagrama experimental. Tratamiento preliminar del residuo acuoso final de la esponja	28

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Tipos de grados de organización del sistema acuífero. A, asconoide. B, sinconoide. C, leuconoide	5
Figura 2	Grado de organización del sistema acuífero tipo sileíbide	6
Figura 3	Estructura molecular del Ara-A y Ara-C	9
Figura 4	Compuestos aislados de la esponja <i>T. aurantium</i>	11-12
Figura 5	Compuestos aislados de hongos asociados a la esponja <i>T. aurantium</i>	12-13
Figura 6	5 α ,8 α epidioxi-esterol aislado de <i>Tethya sp</i>	13
Figura 7	Compuestos aislados de <i>Tethya amanensis</i>	14
Figura 8	Esteroles identificados en <i>Tethya californiana</i>	15
Figura 9	Localización de la zona de recolecta	20
Figura 10	Ubicación de <i>T. californiana</i>	22
Figura 11	<i>Tethya californiana</i> , corte longitudinal y estrongiloxias vistas en microscopio	23
Figura 12	Fraccionamiento de TcRAqSolMeOH en Amberlita XAD-4. Cromatografía en capa fina de las fracciones (eluyente MeOH, visualizadas bajo luz UV, 254 nm)	29
Figura 13	Estructura de la β -alanina	32
Figura 14	Espectros de RMN ^1H (400 MHz) y ^{13}C (100 MHz) en CD_3OD de taurina (1) obtenida de <i>T. californiana</i>	33
Figura 15	Espectros de RMN ^1H y ^{13}C del α -metilglucopiranosido (2)	36
Figura 16	Correlaciones observadas en el experimento COSY del α -metilglucopiranosido (2)	36
Figura 17	Correlaciones observadas en el experimento HSQC del α -metilglucopiranosido (2)	36
Figura 18	Experimentos DEPT del tetracetato del α -metilglucopiranosido	39
Figura 19	Espectros de RMN ^1H y ^{13}C del tetracetato del α -metilglucopiranosido	39
Figura 20	Correlaciones observadas en el experimento HSQC del tetracetato del α -metilglucopiranosido (3)	40
Figura 21	Estructura del ácido picolínico	42
Figura 22	Experimentos DEPT de Homarina	43

Figura 23	Correlaciones observadas en el experimento HSQC de Homarina (4)	43
Figura 24	Experimentos de RMN ^1H y ^{13}C de Homarina (4)	44
Figura 25	Experimentos DEPT de Trigonelina (5)	46
Figura 26	Espectros de RMN ^1H y ^{13}C de Trigonelina (5)	46
Figura 27	Experimentos DEPT de Sulcatina (6)	49
Figura 28	Espectros de los experimentos de RMN ^1H y ^{13}C de Sulcatina (6)	49
Figura 29	Experimentos de RMN ^1H y ^{13}C de Uridina (7)	54
Figura 30	Experimentos DEPT de Uridina (7)	54
Figura 31	Espectro de RMN ^1H de la fracción de esteroides obtenidos y acetilados de los diferentes extractos poco polares	57
Figura 32	Expansión de las señales de ostreasterol, del espectro de RMN ^1H de la fracción de esteroides	59
Figura 33	Expansión de las señales de Δ^{22} -dehidrocolesterol, del espectro de RMN ^1H de la fracción de esteroides	61
Figura 34	Expansión de las señales de brassicasterol, del espectro de RMN ^1H de la fracción de esteroides	63
Figura 35	Expansión de las señales de clionasterol, del espectro de RMN ^1H de la fracción de esteroides	65
Figura 36	Espectro de RMN ^{13}C de la fracción de esteroides	65
Figura 37	Expansión del espectro de RMN ^1H de la fracción de epidioxi	66
Figura 38	Numeración de la estructura fundamental de los esteroides	68
Figura 39	Algunos ejemplos de esteroides naturales	69
Figura 40	Cromatogramas de CG-EM de la fracción HTcBB	72
Figura 41	Espectro de RMN ^1H de la fracción HTcBB	72

ABREVIATURAS, FÓRMULAS Y ACRÓNIMOS

δ	Desplazamiento químico
λ	Longitud de onda
Δ	Doble enlace
H	Hexano
DCM	Diclorometano
AcOEt	Acetato de Etilo
MeOH	Metanol
BuOH	<i>n</i> -Butanol
CDCl₃	Cloroformo Deuterado
CD₃OD	Metanol Deuterado
D₂O	Agua Deuterada
RMN¹H	Resonancia Magnética Nuclear Protónica
s	Señal simple
d	Señal doble
da	Señal doble ancha
ta	Señal triple ancha
m	Señal Múltiple
J	Constante de Acoplamiento
ppm	Partes por millón
MHz	Mega Hertz
RMN¹³C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13
CG-EM	Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas
EM-IE	Espectrometría de masas por Impacto Electrónico
m/z	Relación masa-carga
COSY	Correlated Spectroscopy
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation Spectroscopy
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence

IR	Infrarrojo
Hz	Hertz
H₂O	Agua
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
ICMyL	Instituto de Ciencias del Mar y Limnología
p. f.	Punto de fusión
TR	Tiempo de retención
ZEE	Zona Económica Exclusiva
CCFa	Cromatografía en Capa Fina analítica
CCFp	Cromatografía en Capa Fina preparativa
UV	Ultravioleta
nm	Nanómetro
CC	Cromatografía en Columna abierta
ODC	Octadecilsilano
CSD	Cambridge Structural Database

GLOSARIO

Ácido carboxílico: Compuesto que contiene el grupo funcional -COOH .

Actividad biológica: Referente a la respuesta que se puede generar en algún sistema biológico (antitumoral, hemolítico, antifúngico, antiviral, etc.).

Alcaloide: Compuestos orgánicos que contienen nitrógeno, frecuentemente son de carácter básico y poseen gran actividad biológica.

Arqueocito: Célula totipotencial, realizan la mayor parte de la función digestiva así como la excretora entre otras actividades, ya que su citoplasma siempre está cargado de fagosomas, que corresponden al mayor macrófago de la esponja. Se encuentra en el mesohilo.

Cámara coanocítica: Cualquier cavidad rodeada por coanocitos ubicada entre los canales inhalantes o exhalantes.

Cadena alifática: Unión de varios carbonos formando una cadena abierta.

Coanocitos: Células flageladas provistas de un collar de tentáculos citoplasmáticos, son las encargadas de producir la presión y la corriente de agua. Se encuentran delineando las cámaras coanocíticas, las cuales varían de tamaño y forma, así como en el número de coanocitos.

Coanodermo: Superficie delineada por coanocitos.

Coanosoma: Región interna de una esponja que incluye a las cámaras coanocíticas, denominado también endosoma, este último en desuso.

Cromatografía: Técnica de separación de una mezcla de solutos, entre dos fases inmiscibles.

Dioico: Organismos que tienen los órganos reproductores del macho y de la hembra en individuos separados.

Ectosoma: Región externa de la esponja, consiste en una membrana dérmica y espacios.

Espectro: Distribución de varias longitudes de onda de la energía radiante emitida o absorbida por un objeto.

Espículas: Estructura constituida de sílice o carbonato de calcio de formas variadas, que conforman el esqueleto de las esponjas junto con las fibras de espongina.

Espongina: Sustancia proteica hecha de colágena que se deposita y compacta para formar filamentos, fibras y tractos, también se encuentra sementado o uniendo a las espículas.

Espongocèle (atrio o cloaca): Cavidad preoscular o exhalante, en la región central del cuerpo, que recibe agua de uno o más apólipos y la conduce a una o más ósculos. Común en esponjas tubulares, cilíndricas o huecas.

Estrongiloxeas: Espículas con extremos agudos, ligeramente redondeados.

Fibra: Es cualquier columna cilíndrica de espongina, laminada (estratificada), medulada o empacada con partículas foráneas o de espículas propias que conforman un esqueleto reticular o dendrítico.

Frecuencia: Número de veces por segundo que una longitud de onda completa pasa por un punto dado.

Grupo carbonilo: El doble enlace $C=O$, un rasgo característico de varios grupos orgánicos, como cetonas y aldehídos.

Grupo carboxilato: Pérdida de un protón de un grupo carboxilo (COO^-)

Grupo éster: Son derivados de los ácidos carboxílicos. Son compuestos en los cuales el grupo OH de un ácido carboxílico se reemplaza por un grupo $-OR$.

Grupo metileno: Grupo funcional bivalente CH_2 , derivado del metano.

Grupo metoxilo: Grupo metilo unido a un oxígeno.

Heterotróficas: Se denomina a todas aquellas bacterias que se alimentan de restos de desechos.

Infrarrojo: Región del espectro electromagnético localizado aproximadamente entre 0.78 a 300 micrómetros.

Megasclera: Espícula relativamente grande, principal componente del esqueleto de la esponja tiene un tamaño de $> 100 \mu m$.

Mesohilo: Es la región que se encuentra entre el pinacodermo y el coanodermo de una esponja.

Metabolismo: Conjunto de reacciones bioquímicas, tanto catabólicas como anabólicas, que tiene lugar en una célula.

Metabolito: Sustancias que intervienen en los procesos metabólicos como intermediarios en las vías de degradación y biosíntesis; en ocasiones establecen nexos entre diversas vías.

Metabolito secundario: Producto excretado por un microorganismo al final de la fase exponencial o durante la fase estacionaria.

Glicósidos: Compuesto formado por la sustitución de un grupo hidroxilo (-OH) de un azúcar por otro grupo (si el compuesto es glucosa, el compuesto se conoce como glucósido).

Núcleo del ciclopentanoperhidrofenantreno: Estructura básica de las hormonas esteroides de 17 carbonos, que consiste en cuatro anillos indicados con las letras A a D.

Protones vinílicos: Son aquellos hidrógenos que están sustituidos sobre carbonos que mantienen un doble enlace (olefínicos).

RESUMEN.

Con el interés por contribuir al conocimiento de los recursos naturales marinos de México y con la intención de obtener nuevos metabolitos secundarios, se llevó a cabo el estudio químico de la esponja *Tethya californiana*, el cual condujo al aislamiento y la identificación de los compuestos mayoritarios de la especie.

T. californiana es una esponja perteneciente al phylum Demospongiae y a la familia Tethyidae que habita en la parte este de las costas americanas desde el norte de California, EUA, hasta el sur de la península de Baja California, México, para la cual solo existe un estudio químico donde se reporta la presencia de esteroides y ácidos grasos. La colecta del espécimen porífero se realizó por buceo autónomo en la bahía de Todos Santos en las costas de Ensenada, B. C. Se preparó un extracto primario usando metanol, de donde se obtuvieron mediante reparto líquido/líquido extractos de hexano, acetato de etilo, butanol y el residuo acuoso.

Utilizando técnicas cromatográficas convencionales, se identificaron en el residuo acuoso cinco compuestos no descritos en la literatura para este género de esponja: taurina (**1**), el α -metil-D-glucopiranosido (**2**), así como tres compuestos muy polares pertenecientes al grupo de las betaínas, los cuales se identificaron como homarina (**4**), trigonelina (**5**) y sulcatina (**6**) y un nucleósido identificado como uridina (**7**), cuyas estructuras fueron establecidas de acuerdo con sus datos espectroscópicos, principalmente de RMN¹H y RMN¹³C, incluidos experimentos 1D y 2D (DEPT, COSY, HSQC y HMBC) y espectrometría de masas.

El análisis por CG-EM de extractos y fracciones poco polares, permitió la identificación de una mezcla de esteroides los cuales ya habían sido reportados previamente de la misma especie, que fueron identificados como colesterol (**8**), ostreasterol (**9**), Δ^{22} -deshidrocolesterol (**10**), brassicasterol (**11**), clionasterol (**12**), además de sus respectivos derivados 5,8-epidioxy (**13-17**). También se identificaron 16 ésteres metílicos de ácidos grasos (**18-33**). La mayoría de los compuestos identificados de los extractos menos polares de *T. californiana* coinciden con estudios anteriores de otras especies del mismo género, sin embargo se reportan por primera vez los compuestos aislados de la fracción más polar.

1. INTRODUCCIÓN.

El mar tiene una extensión que abarca el 70 por ciento del globo terráqueo y su diversidad biológica el 95 por ciento de la biosfera [1]. México cuenta con una importante riqueza marina dentro de su Zona Económica Exclusiva (ZEE). En una extensión de 2'946,825 kilómetros cuadrados de ZEE, se reconocen cinco ecosistemas marinos que abarcan una enorme diversidad de especies de la flora y fauna, tales como: Pacífico Norte, Golfo de California, Pacífico Centro-Sur, Golfo de México y Mar Caribe [2]. En el ambiente marino, existen ecosistemas con una densidad de especies mayor que la de una selva tropical; por ejemplo, los arrecifes de coral. En tales ecosistemas la competitividad es muy intensa, lo que favorece la supervivencia de quien mejora continuamente sus medios de defensa y de ataque [1].

Harper y colaboradores sugieren que debido a la intensa presión por competencia de espacio, luz y especialmente de nutrientes, los organismos marinos han desarrollado una variedad de mecanismos de defensa incluyendo comportamientos y estrategias físicas y químicas para sobrevivir, los cuales han sido adquiridos durante la evolución como adaptaciones ecológicas [3].

Las especies sésiles generan toxinas que impiden la colonización de otras. Para las especies que obtienen alimento mediante la filtración del agua, las toxinas operan como antibióticos frente a la multitud de organismos unicelulares con los que entran en contacto constante.

El mecanismo de acción de estas moléculas se dirige principalmente hacia motivos biológicos muy conservados en el curso de la evolución, por lo que resultan efectivas incluso contra especies terrestres. Estos compuestos pueden ser expulsados al agua en respuesta a una amenaza o inyectados al atacante por medio de un aguijón [1].

La evolución ha definido y seleccionado las diversas estrategias de supervivencia, defensa, ataque y comunicación entre organismos marinos que componen un verdadero arsenal de diversas moléculas (metabolitos secundarios) que es posible emplear en salud humana. Aunque los océanos contienen una biodiversidad muy superior a la de la tierra, su exploración desde el punto de vista de búsqueda de

nuevos compuestos químicos apenas se ha iniciado, y se conocen en la actualidad «únicamente» unos quince mil productos naturales de origen marino, que corresponden a una décima parte de los terrestres [4].

En la búsqueda de organismos marinos productores de moléculas de interés, la atención se centra en especies de cuerpo blando, sésiles o dotadas de un movimiento lento. La supervivencia de los organismos marinos que las producen no se basa en la velocidad de desplazamiento ni en defensas físicas (conchas o espinas), sino en la generación de arsenales químicos depurados, productos de un metabolismo secundario de elevada complejidad, que utilizan para el ataque y la defensa frente a otras especies [1].

Se ha sugerido además la posible implicación de microorganismos asociados ("endosimbiontes") en la biosíntesis de productos naturales marinos como pueden ser: cianobacterias, bacterias, algas unicelulares y hongos; estos microorganismos pueden residir en el espacio externo o intracelular de sus anfitriones y en ocasiones contribuyen de manera importante a la biomasa del invertebrado [5]. Los brotes de intoxicación por mariscos suelen ser esporádicas e impredecibles debido a que los peces o mariscos que las ocasionan no producen las toxinas por sí mismos, sino que las concentran a partir de los organismos de que se alimentan. La mayoría de las toxinas marinas son producidas por microorganismos tales como dinoflagelados marinos o bacterias y pueden pasar a través de varios niveles de la cadena alimentaria. La identificación de toxinas marinas ha sido una de las áreas más difíciles de la química de productos naturales marinos [6].

2. Generalidades.

Las esponjas (Phylum Porifera) son los metazoos más antiguos sobre el planeta; en esencia, una esponja es una agrupación de células que funcionan juntas, pero con poca integración y control de sus actividades celulares. Poseen un tipo de células llamadas arqueocitos, con una habilidad única en el reino animal, que es la capacidad de transformarse en cualquier otro tipo celular que necesite la esponja, además de servir como un sistema único de reparación celular. Este diseño estructural, aparentemente tan simple, les ha permitido sobrevivir a muchas crisis y extinciones durante los últimos 600 millones de años [7]. Las esponjas son un grupo de animales multicelulares sésiles de los más abundantes y diversos en los fondos marinos, cuya característica principal es poseer un sistema interno de canales, a través de los cuales bombean activamente agua de la que filtran su alimento, extraen el oxígeno, y en la que depositan sus excretas [8].

En el Phylum Porifera existe tanto reproducción sexual como asexual [11, 12]. Dentro de la reproducción sexual existen especies dioicas y monoicas, tanto sincrónicas como asincrónicas; mientras que en la reproducción asexual ocurren varios procesos tales como la fragmentación, regeneración, gemación y la presencia de cuerpos reproductores asexuales llamados gémulas; estas últimas son más comunes en las especies de agua dulce [9].

La organización del cuerpo de los poríferos o esponjas se basa en un sistema acuífero conformado por: ostios, ósculos, conductos acuíferos y diversas cámaras coanocíticas que producen una corriente del agua que entra del medio exterior al interior de la esponja. Este diseño corporal parece no haber cambiado significativamente después de millones de años, pues la similitud que tienen algunas de las especies ancestrales es casi idéntica. De acuerdo a la estructura de este sistema, se consideran cuatro grados de organización dentro de su sistema acuífero, según sea mayor o menor el grado de complicación estructural:

A) Asconoide. Es el tipo de organización más simple, presente, en las esponjas más primitivas pertenecientes a la clase calcárea, que están constituidas por un tubo

sencillo radialmente simétrico, con su pared delineada por una sola capa de coanocitos (**Fig. 1A**).

B) Siconoide. En este tipo, los pliegues primarios del pinacodermo y coanodermo de la pared sencilla de la organización ascon, producen el tipo de organización sicon, en el cual cada pliegue incluye a los coanocitos formando una cámara simple con una sola abertura y un conducto inhalante correspondiente. Esta estructura aumenta la superficie de captación de agua (**Fig. 1B**).

C) Leuconoide. En este tipo, con mayor número de pliegues del coanodermo se forma la organización leucon, cuyo sistema acuífero es más eficiente y complicado, permitiendo a la esponja la posibilidad de alcanzar un tamaño mayor, en contraste con las de los tipos ascon y sicon que no sobrepasan los 10 cm. En leucon se incrementa el número de cámaras coanocíticas que a su vez disminuyen en tamaño, el espongocelo se reduce surgiendo los conductos exhalantes y se engruesa el mesohilo (**Fig. 1C**).

Esta organización corporal básica de las esponjas es típica de la mayoría (Demospongiae) y ha sido la más exitosa, ya que poco han variado evolutivamente, pues existen desde el cámbrico temprano (hace 520 millones de años) hasta nuestros días.

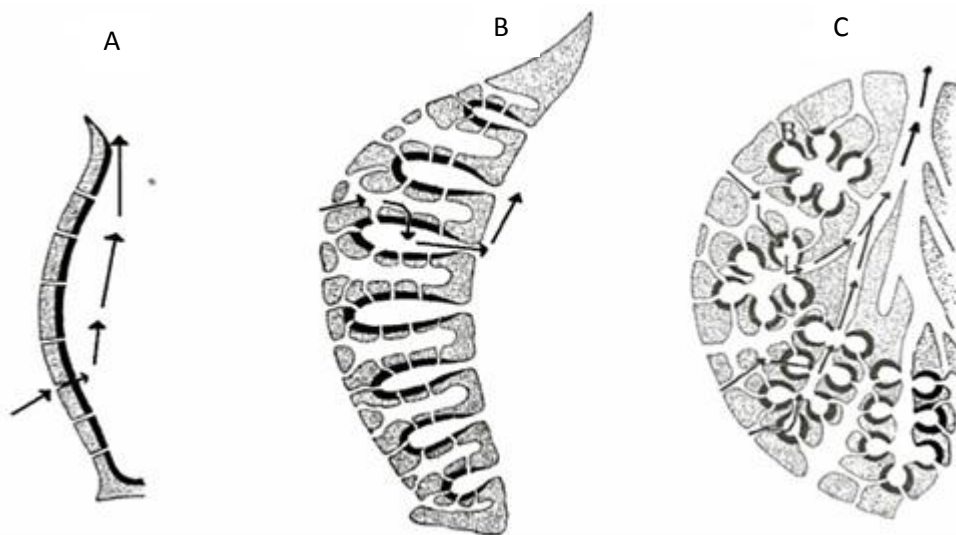


Figura 1). Tipos de grados de organización del sistema acuífero. A, asconoide. B, sinconoide. C, leuconoide.

D) Sileíbide. Es un sistema acuífero con las cámaras coanocíticas alargadas y dispuestas alrededor de cavidades exhalantes de manera radial. Presente en las clases Calcárea y Hexactinellida [10] (**fig. 2**).

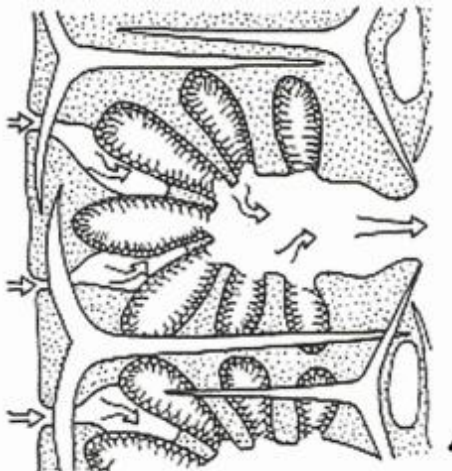


Figura 2). Grado de organización del sistema acuífero tipo sileíbide.

Dentro de las esponjas se pueden distinguir otros sistemas: el sistema epitelial y el sistema esquelético. El cuerpo puede dividirse en tres regiones: el ectosoma, que corresponde a la región más externa de la esponja (corteza-dermis); el coanosoma, donde se localizan las cámaras coanocíticas y el endosoma, que corresponde a la región interior de la esponja [9].

Aunque se cree que las esponjas son organismos filtradores no selectivos existe una selección de acuerdo con el tamaño de partícula ingerido, este tamaño oscila alrededor de 50 μm , en el que se pueden considerar bacterias, hongos, diatomeas, dinoflagelados y detritos [11].

El sistema esquelético da el soporte físico-mecánico al organismo y es utilizado como una de las características primarias para la identificación de las esponjas; puede estar constituido de materia orgánica y en muchos casos está reforzado por componentes inorgánicos. El componente orgánico está constituido por una proteína estructural caracterizada por un arreglo fibrilar llamada espongina, la cual suele arreglarse en fibras.

El material inorgánico que compone al esqueleto de la esponja recibe el nombre de espículas, que pueden estar formadas de carbonato de calcio o de óxido de silicio (sílice) y su tamaño y forma pueden ser muy variado [11, 12, 13].

Aunque hay otros datos importantes para la identificación de las esponjas: el tamaño, color, la forma, la consistencia y la textura; la mayoría de la sistemática porífera se basa en la composición química y estructural del esqueleto.

Se reconocen actualmente tres Clases dentro del Phylum: 1) Clase Calcárea o Calcispongiae, 2) Clase Hexactinellida o Hyalospongiae y 3) Clase Demospongiae [11,13].

En los mares actuales las esponjas dominan en la mayoría de los hábitats crípticos y poco iluminados como cuevas, túneles, bajo rocas y corales, de donde no son desplazadas por organismos fotosintéticos de crecimiento relativamente rápido; en los arrecifes coralinos dominan en general debajo de los 20 m, mientras que en los canales profundos de las formaciones de manglar, son el componente dominante de la fauna de las raíces adventicias [14]. Las esponjas juegan un papel importante en los ecosistemas marinos, gracias a que por filtración incorporan gran cantidad de material particulado de la columna de agua al fondo, contribuyen a la producción primaria [15], pues muchas especies albergan simbiontes fotosintéticos (fundamentalmente cianobacterias) y por albergar numerosas bacterias heterotróficas en sus tejidos devuelven, al medio, nutrientes remineralizados [16].

Las esponjas han sido consideradas como una mina de oro para los químicos [17] y se han descubierto hasta el 2004 a partir de estas, más de 6000 metabolitos novedosos, muchos de ellos con enormes potencialidades biotecnológicas [18] y un alto potencial en la búsqueda de medicamentos [19,21], particularmente contra el cáncer [19,20,22].

Las esponjas actúan además como bio-indicadores de la calidad ambiental debido a la gran sensibilidad que manifiestan ante algunos factores estresantes como la contaminación. De forma particular, las esponjas coralinas cuentan con un enorme potencial para registrar cambios ambientales en el mar, por lo que se consideran uno de los mejores indicadores de cambios climáticos. Las esponjas desempeñan una

función muy importante, ya que entrelazan las cadenas alimentarias entre los distintos organismos de los ecosistemas marinos, y son capaces de retirar hasta el 90% de las bacterias y entre el 23 y el 63% de los virus del agua. También regeneran los nutrientes y algunas especies de esponjas pueden causar cambios significativos en el equilibrio entre crecimiento y erosión de los arrecifes coralinos [7].

3. Antecedentes.

Los Invertebrados marinos a menudo son una fuente abundante de esteroides comunes y de esteroides que poseen cadenas laterales novedosas y/o núcleos esteroidales no convencionales [23].

El aislamiento del primer esteroide en esponjas fue hecho por Henze [24,25] quien a principios del siglo pasado (1904, 1908) obtuvo el espongosterol de la esponja *Suberites domuncula*. Sin embargo, quien primero reportó la gran variedad de esteroides producidos por esponjas fue Dorée en un trabajo clásico publicado en 1909 [26]. Desde entonces y aproximadamente hasta 1970 el progreso en el campo de investigación de esteroides en esponjas podría casi enmarcarse dentro de los trabajos de Bergmann quien también publicó dos revisiones sobre esta materia en 1949 y 1962 [27,28] y a la revisión hecha por Brooks en 1970 [29].

Sin embargo todo este trabajo fue hecho cuando aún no habían sido desarrollados métodos cromatográficos eficientes y espectroscópicos de alta resolución, además, como el mismo Bergmann lo reconoció, puede que la mayoría de estos datos aún se refieran a mezclas de esteroides y no a compuestos individuales [23].

El desarrollo del potencial de los productos naturales marinos como fármacos se inició en la década de 1950, cuando Bergmann y colaboradores aislaron la spongotimidina y spongouridina, los primeros compuestos aislados de una esponja marina. Esto llevó además a la síntesis del Ara-C, un agente anticancerígeno y a la vidarabina o Ara-A el primer fármaco antiviral [30] (**Fig. 3**). La actividad antiviral de este arabinósido de la adenina (vidarabina o Ara-A) fue descrita por primera vez por Privat-de-Garilhe y De Rudder en 1964 [31].

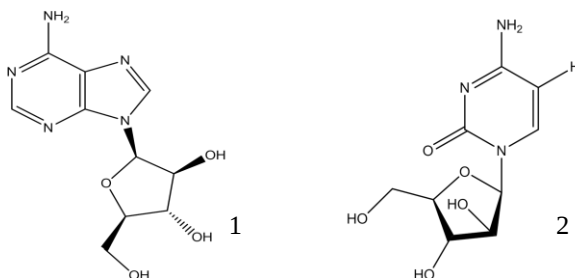


Figura 3) Estructura molecular del Ara-A (1) de Ara-C (2)

Dentro del phylum Porifera, la clase Demospongiae abarca la mayoría de las esponjas vivientes que mayor atención ha recibido de químicos y bioquímicos. Hasta el año 2001 se habían reportado 2578 compuestos provenientes de esta clase de esponjas [3].

Dentro de esta clase (Demospongiae), se encuentra la familia *Tethyidae* de la cual se han reportado estudios referentes al aislamiento de metabolitos secundarios de varias especies del género *Tethya*.

De *Tethya aurantium* se ha aislado un caroteno denominado tethyateno (**1**) [32], alantoina (**2**) y adenosina (**3**) [33], esteroides como Z-24-propiliden-colest-5-en-3 β -ol (**4**), 5 α ,8 α -peróxido de colest-5,7-dien-3 β -ol, ergosterol (**5**), ergosta-5,7,24(28)-trien-3 β -ol (**6**) y 24 ξ -etil-colest-5,7-dien-3 β -ol (**7**) [34], así como algunos fosfolípidos saturados e insaturados poco comunes como: 1,2-di-(5,9,19-octacosatrienoil)-sn-glicerol-3-fosfoetanolamina (**8**), 1,2-di-(5,9,23-triacontatrienoil)-sn-glicerol-3-fosfoetanolamina (**9**), 1,2-di-5,8,11,14-docosatetraenoil-sn-glicerol-3-fosfocolina (**10**) y 1,2-di-3,7,11,15-tetrametilhexadecanoil-sn-glicerol-3-fosfoetanolamina (**11**) [35], además de monoéteres de alquil glicerol como: (2S)-1-hexadeciloxi-2,3-propanodiol (**12**), (2S)-1-(16-metilheptadeciloxi)-2,3-propanodiol (**13**) y (2S)-1-(15-metilheptadeciloxi)-2,3-propanodiol (**14**) (**Fig. 4**) [36].

También se han estudiado algunos compuestos producidos por hongos asociados a esta especie de *Tethya*. Por ejemplo, de *Scopulariopsis brevicaulis* un hongo asociado a esta esponja, se aislaron los macrólidos escopuláridos A y B (**15**) [37]. Mientras que de *Penicillium chrysogenum* se han aislado los metabolitos secundarios denominados cilifuranona (**16**), sorbifuranonas A (**17**), B (**18**), y C (**19**), entre otros [38,39], y del hongo *Aspergillus spp*, los metabolitos llamados austáridos M (**20**), N (**21**), O (**22**), P (**23**), Q (**24**), además de 4-acetil-3,4-dihidro-6,8-dihidroxi-3-metoxi-5-metil-isocumarina (**25**), 2,3,4-trimetil-5,7-dihidroxi-2,3-dihidrobenzofurano (**26**), 4-acetil-3,4-dihidro-6,8-dihidroxi-5-metil-isocumarina (**27**), el ácido fenol A (**28**), butirolactona II (**29**), metil-3,4,5-trimetoxi-2-[2-(nicotinamido)benzamido]benzoato (**30**), citrinina (**31**) y dicitrinina (**32**) [40] (**Fig. 5**).

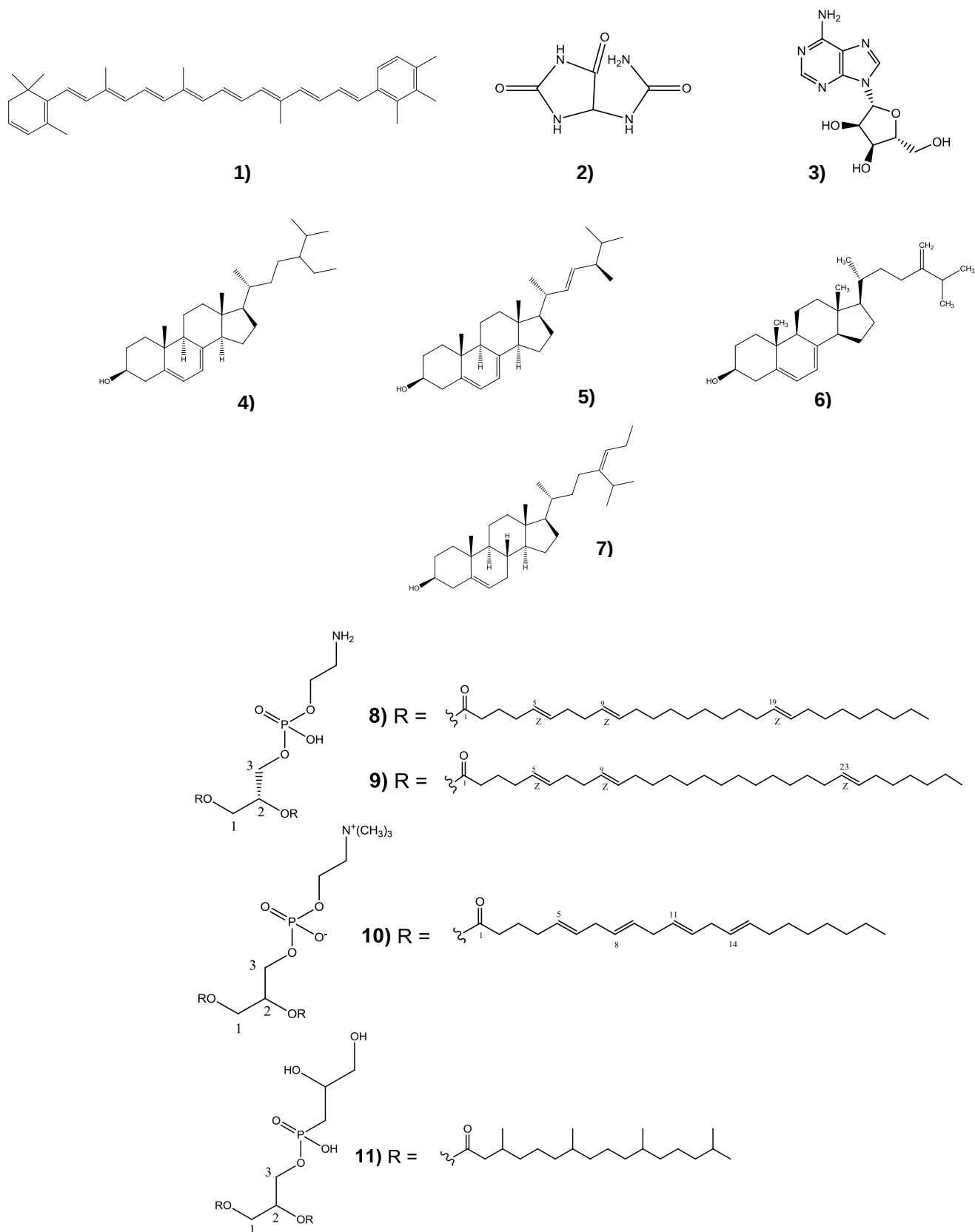


Figura 4) Compuestos aislados de la esponja *T. aurantium* (continúa).

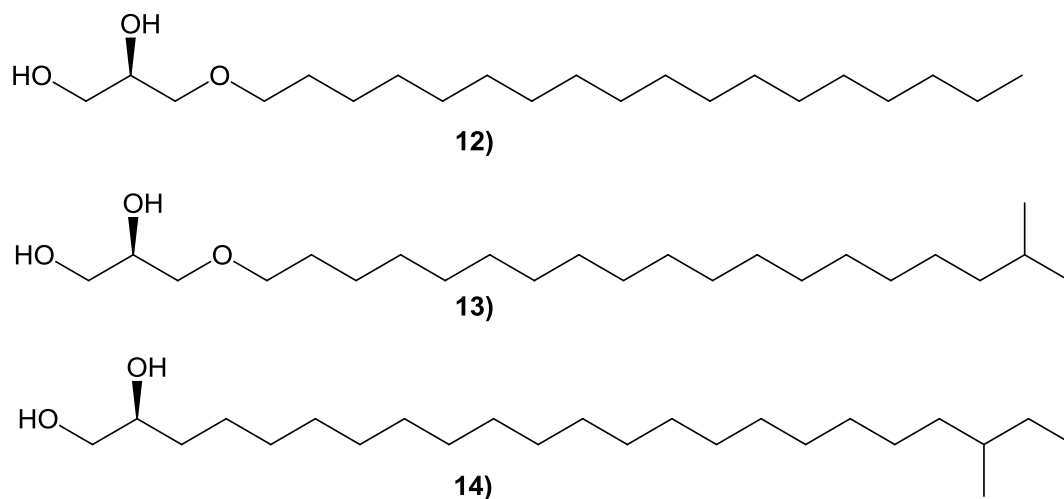


Figura 4) Compuestos aislados de la esponja *T. aurantium*.

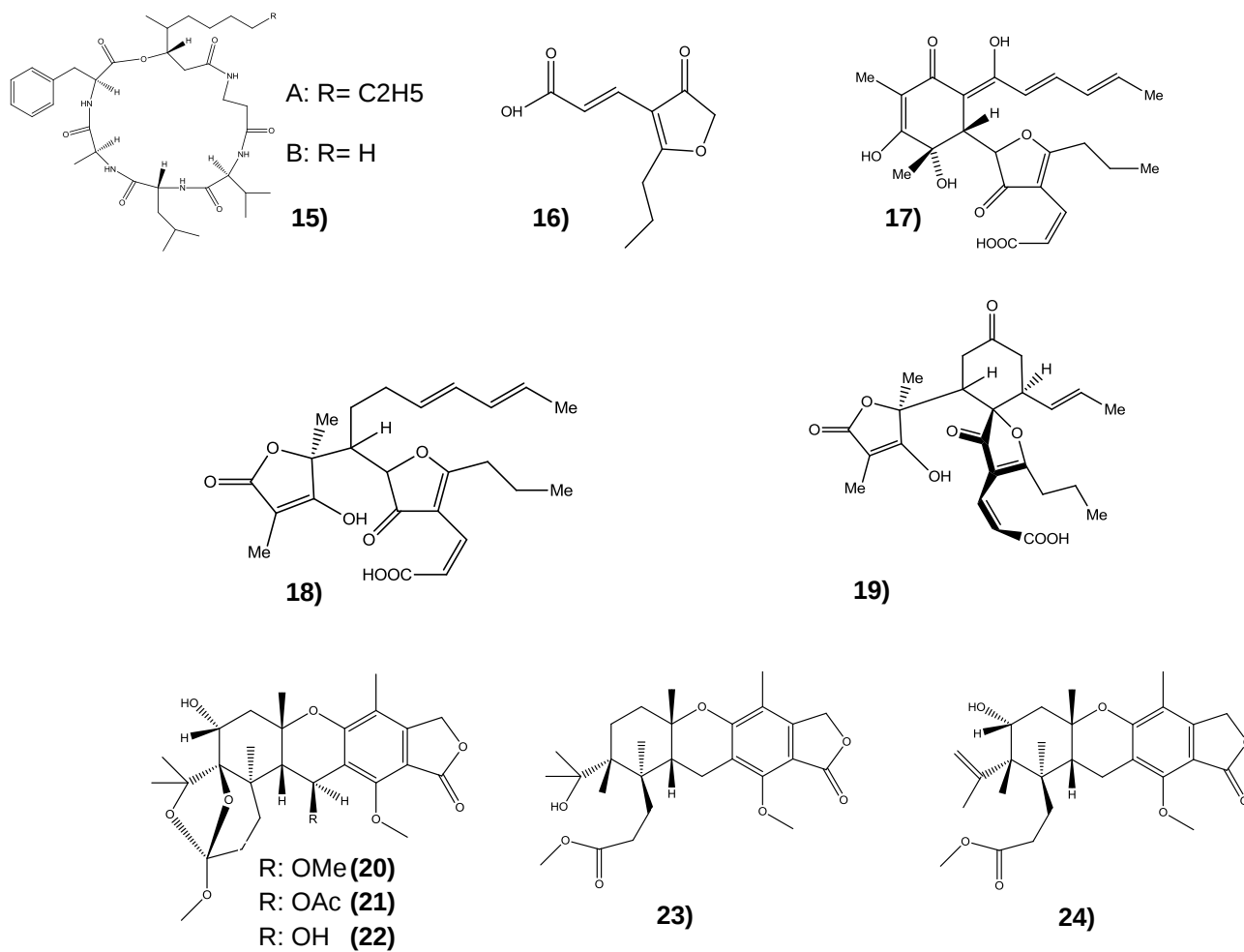


Figura 5) Compuestos aislados de hongos asociados a la esponja *T. aurantium*.

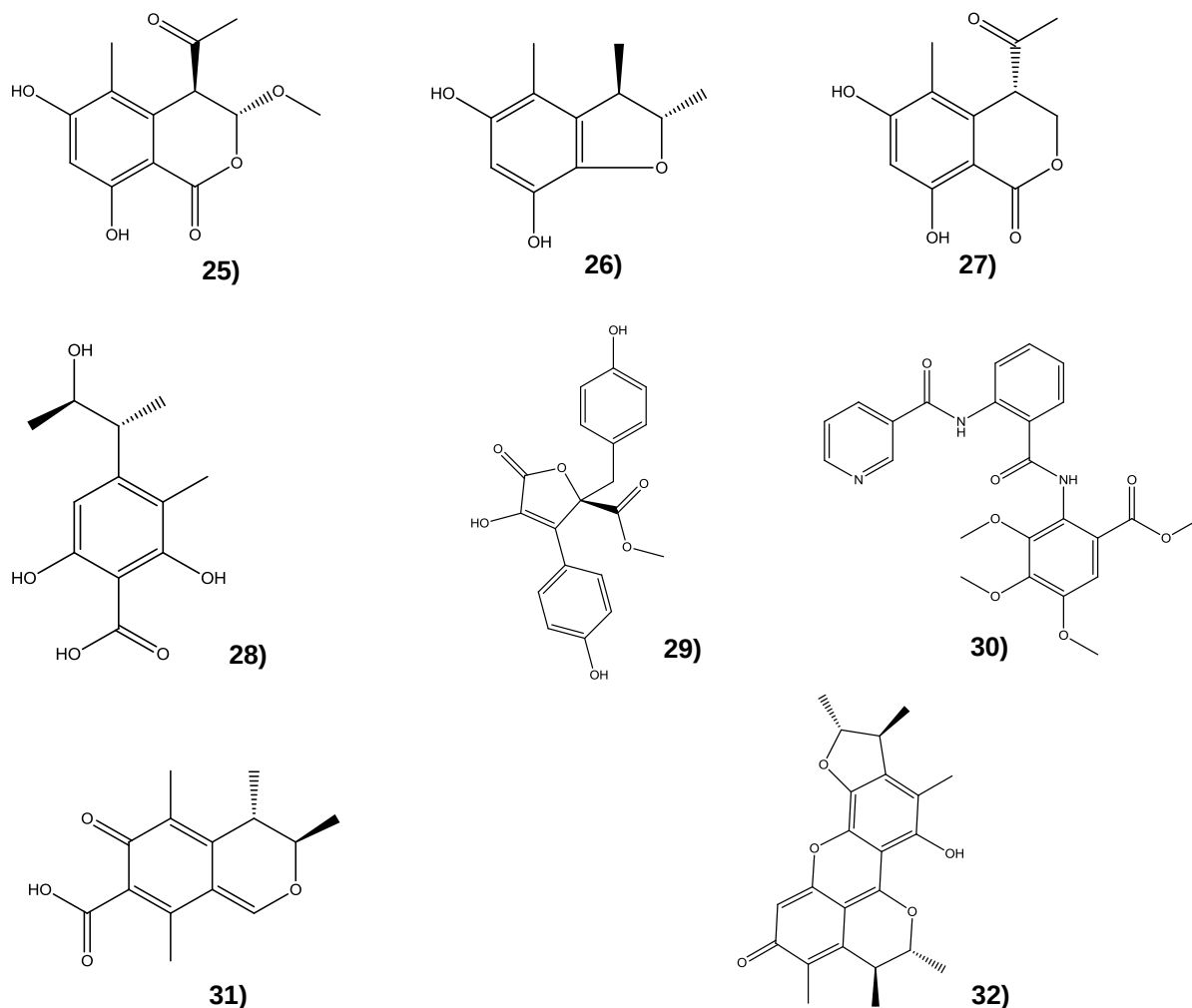


Figura 5) Compuestos aislados de hongos asociados a la esponja *T. aurantium*.

De una especie no identificada de *Tethya*, recolectada en aguas de las islas Koemun, Corea del Sur, se aisló un esteroide que se identificó como: el derivado 5 α ,8 α -epidioxi (33) [41] (**Fig.6**). Este tipo de compuesto también se ha aislado de la esponja *Tethya aurantium* [42].

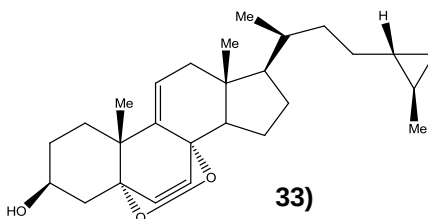


Figura 6) 5 α ,8 α epidioxi-esterol aislado de *Tethya* sp.

De *Tethya amamensis* se han aislado los carotenoides denominados tethyanina (**34**) [43], tethyateno (**35**) [44] y dos que poseen un doble enlace cis en la posición 7, denominados isorenieracisteno (**36**), y renieracisteno (**37**) [45], además de esteroides como los (24E)-24-etilidencolesta-5,7-dien-3 β -ol (**38**), (24E)-24-propilidencolesta-5,7-dien-3 β -ol (**39**) y (24Z)-24-propilidencolesta-5,7-dien-3 β -ol (**40**) [46] (**Fig.7**).

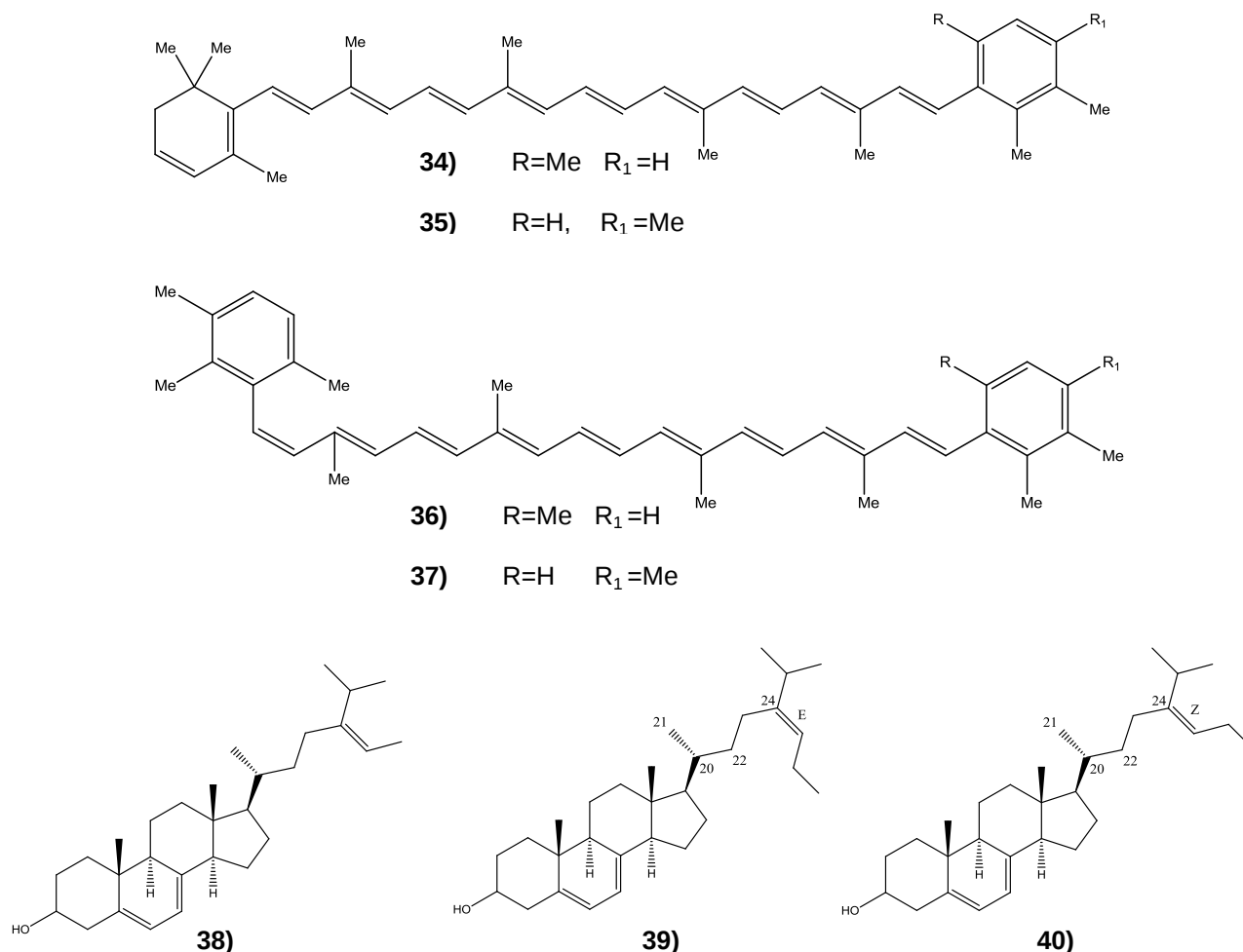


Figura 7) Compuestos aislados de *Tethya amamensis*.

***Tethya californiana*.**

Se ha reportado un estudio de *Tethya aurantium* var. *californiana*, sin embargo el nombre de esta especie ha sido descartada y actualmente se describe taxonómicamente como *Tethya californiana* [47,55]. Siendo este el único reporte para esta especie, de la cual se identificaron 8 esteroides, (**41-48**) de los cuales el colesterol y

el clionasterol fueron los componentes mayoritarios (**Fig. 8**) y 37 ácidos grasos (**49-88**) (**Tabla 1**) [48].

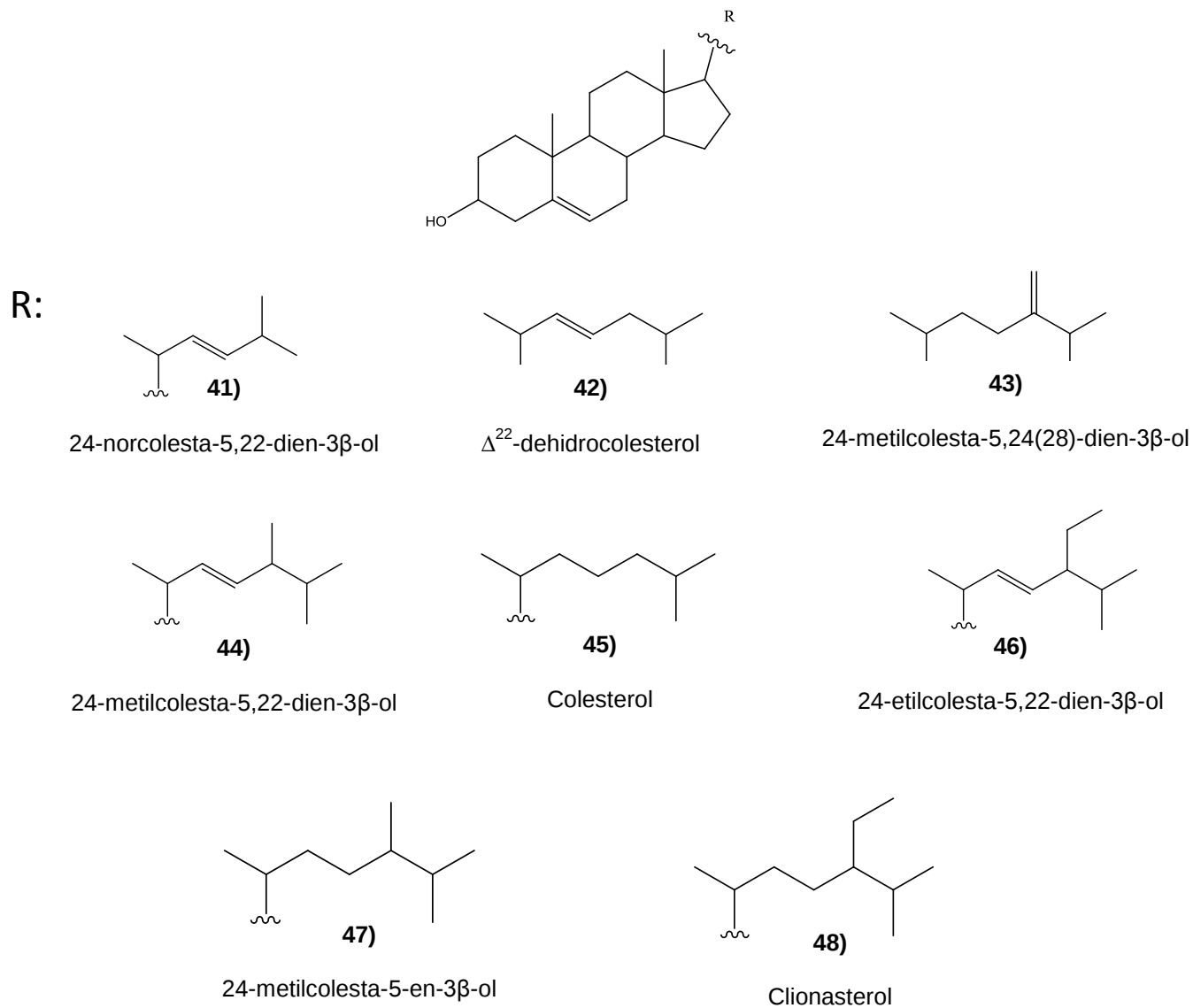
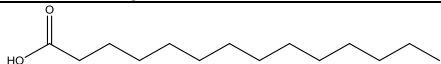
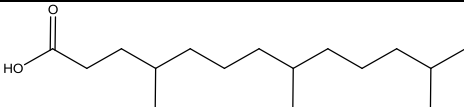
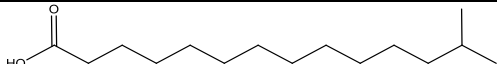
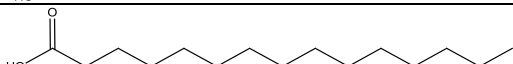
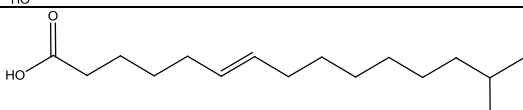
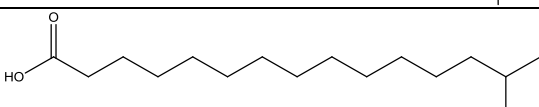
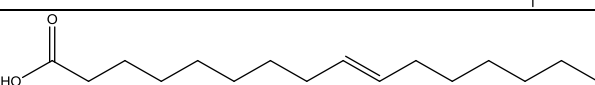
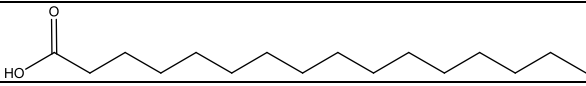
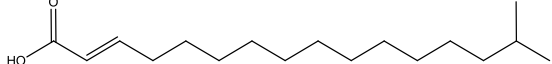
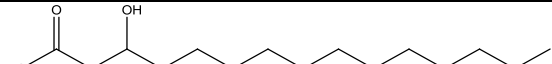
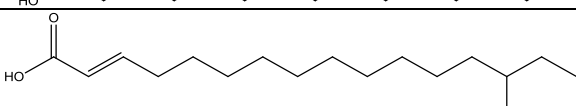
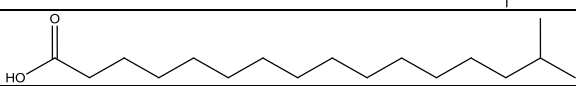
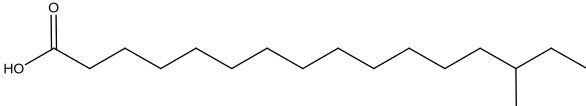
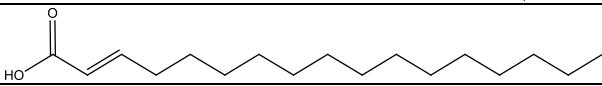
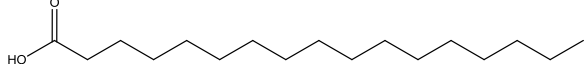
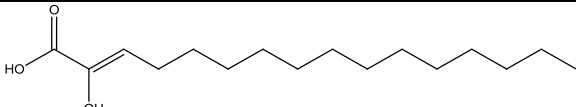
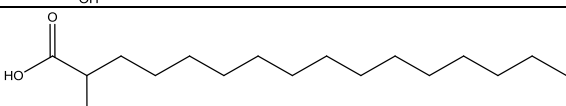
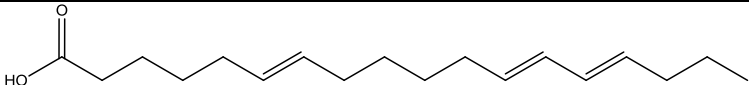
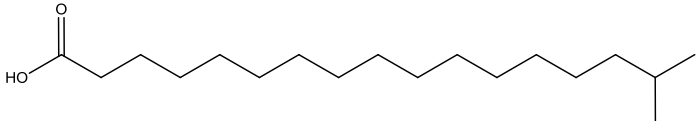
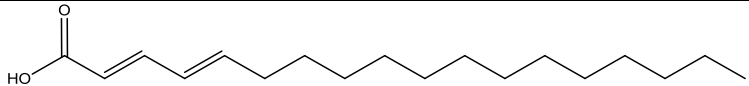
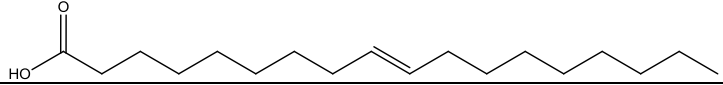
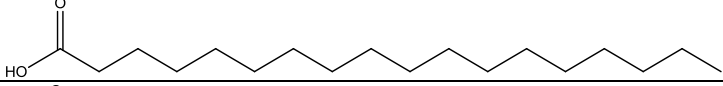
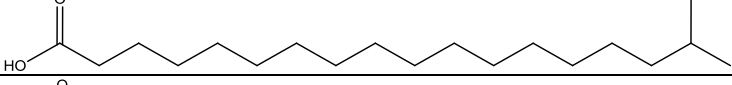
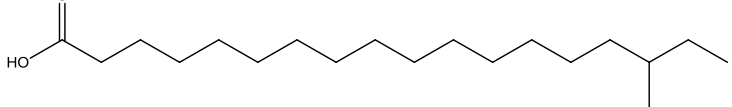
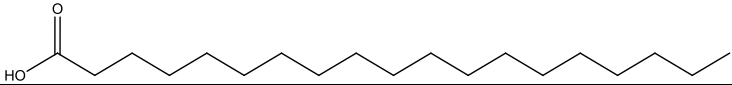
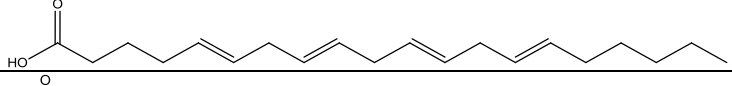
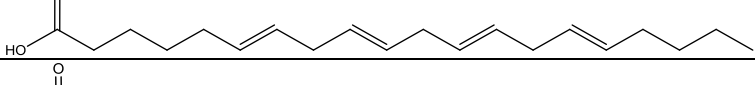
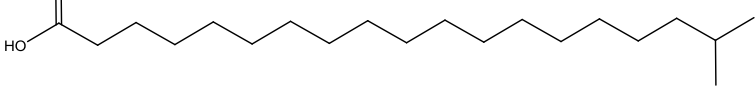
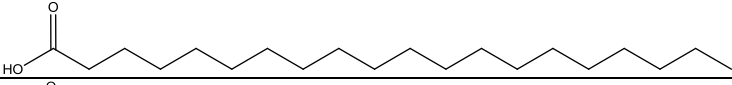
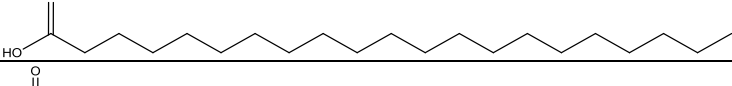
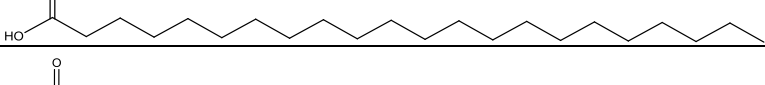
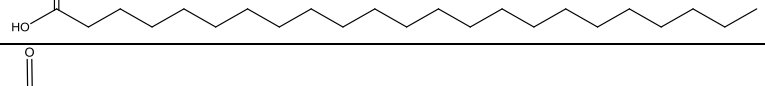
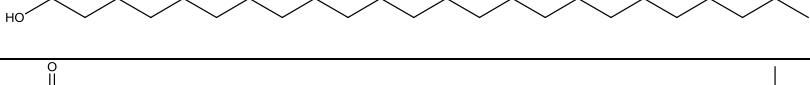
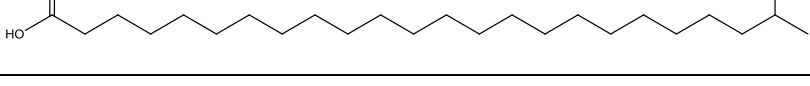
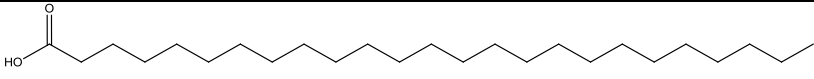
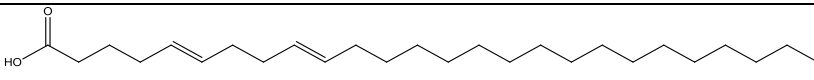
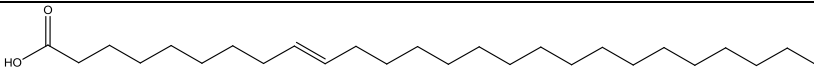
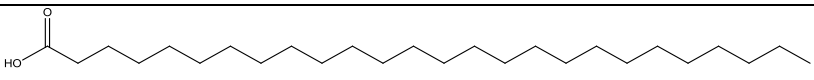
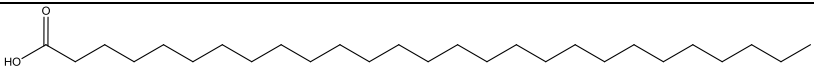
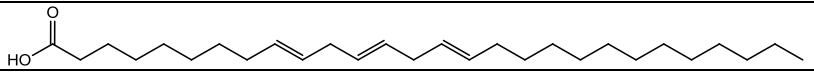


Figura 8) Esteroles identificados en *Tethya californiana*

Tabla 1. Ácidos grasos identificados en *Tethya californiana*.

49) Ácido tetradecanoico	
50) Ácido 4,8,12 trimetil-tridecanoico	
51) Ácido iso pentadecanoico	
52) Ácido pentadecanoico	
53) Ácido iso 6-hexadecenoico	
54) Ácido iso Hexadecanoico	
55) Ácido cis 9-hexadecenoico	
56) Ácido hexadecanoico	
57) Ácido iso heptadecenoico	
58) Ácido 3-hidroxi-pentadecanoico	
59) Ácido anteiso heptadecenoico	
60) Ácido iso heptadecanoico	
61) Ácido anteiso heptadecanoico	
62) Ácido heptadecenoico	
63) Ácido heptadecanoico	
64) Ácido 2-hidroxi-hexadecenoico	
65) Ácido 2-hidroxi hexadecanoico	

66) Ácido 6,12,14-octadecatrienoico	
67) Ácido iso octadecanoico	
68) Ácido octadecadienoico	
69) Ácido 9-octadecenoico	
70) Ácido octadecanoico	
71) Ácido iso nonadecanoico	
72) Ácido anteiso nonadecanoico	
73) Ácido nonadecanoico	
74) 5,8,11,14-eicosatetraenoico	
75) 6,9,12,15- eicosatetraenoico	
76) Ácido iso eicosanoico	
77) Ácido eicosanoico	
78) Ácido heneicosanoico	
79) Ácido docosanoico	
80) Ácido tricosanoico	
81) Ácido tetracosanoico	
82) Ácido iso pentacosanoico	

83) Ácido pentacosanoico	
84) Ácido 5,9-Hexacosadienoico	
85) Ácido 9-Hexacosenoico	
86) Ácido Hexacosanoico	
87) Ácido Heptacosanoico	
88) Ácido Octadecatrienoico	

4. Hipótesis.

Tethya californiana, sintetiza compuestos estructuralmente similares a los aislados de otras especies del mismo género.

5. Objetivo general.

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

Objetivos específicos:

- Separar los componentes poco polares y polares, por extracción con disolventes de diferente polaridad o mediante procesos de reparto (partición) líquido-líquido.
- Separar y purificar los componentes de las fracciones polares y poco polares mediante técnicas cromatográficas convencionales como cromatografía en columna, cromatografía en capa delgada y en caso necesario cromatografía de alta resolución (CLAR, HPLC en inglés).
- Identificar los componentes aislados y determinar las estructuras moleculares de los posibles nuevos componentes, haciendo uso de las técnicas espectroscópicas modernas en el infrarrojo (IR), de resonancia magnética nuclear (RMN) de hidrógeno (RMN-¹H) y carbono-13 (RMN-¹³C), incluidos experimentos homo- y heteronucleares, en una y dos dimensiones (DEPT, COSY, NOESY/ROESY, TOCSY, HSQC, HMBC), espectrometría de masas (EM) y difracción de rayos-X en el caso de compuestos cristalinos que no se encuentren descritos en la literatura química.
- Realizar, en cuanto sea posible, modificaciones químicas de los compuestos aislados para facilitar su separación y purificación.
- Obtener información suficiente para la posible elaboración de un artículo publicable en revistas internacionales, indizadas con arbitraje.

6. PARTE EXPERIMENTAL.

6.1 Material porífero.

6.1.1 Área de recolecta.



Figura 9) Localización de la zona de recolecta (Google Earth 2012).

6.1.2 Recolecta e identificación del material porífero.

La recolecta del material porífero se realizó en la bahía Todos los Santos situado a 31° 47' latitud norte y 116° 46' longitud oeste, en agosto de 2008. Se recolectaron 26 especímenes obteniéndose un peso húmedo de 3 kg.

Tabla 2. Datos de recolecta del material porífero a estudiar.			
Recolecta	Fecha	Peso húmedo total (Kg)	Unidades
1	Agosto 2008	3	26

El material fue recolectado mediante buceo autónomo por el M. en C. Daniel Badillo Zapata y el Oceanólogo Cervando Rueda López de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Baja California, a una profundidad de 12-13 metros aproximadamente. Las esponjas de forma lobular se encontraron en forma dispersa formando un tipo de tapete sobre roca, a una temperatura de 16°C. Fuera del agua el material colectado fue lavado con abundante agua de mar y se limpiaron de aquellos organismos adheridos a ella, se colocaron en bolsas de plástico y en hielo para su preservación. El material se empacó en una hielera con hielo seco para su envío vía aérea a la ciudad de México y al instituto de química (IQ) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Una muestra del lote de la esponja de aproximadamente de 3 cm² se fijó en etanol al 90% en un frasco de vidrio, destinado para la identificación taxonómica de la especie y su depósito en el laboratorio 021 del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología (ICMyL), UNAM.

La determinación taxonómica fue realizada por la Bióloga Patricia Gómez, encargada de la Colección Nacional de Phylum Porifera Gerardo Green del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM [47]. De acuerdo con sus características morfológicas externas e internas, la esponja se clasificó de la siguiente manera: como perteneciente al género *Tethya* y a la especie *californiana*.

Reino Animalia

Phylum Porifera

Clase Demospongiae

Orden Hadromerida

Familia Tethyidae

Género *Tethya*

Especie *T. californiana* de Laubenfels, 1932

6.1.3 Distribución y descripción de un espécimen.

El género *Tethya* Lamarck 1814, representa un complejo de especies dentro de la familia Tethyidae (clase: Demospongiae y orden: Hadromerida) que muestra una distribución casi cosmopolita y especialmente rica en especies [49,50]; de un total de

102 especies descritas por lo menos 81 son válidas [51,52,53]. Se puede encontrar de 0-805 m de profundidad, pero la mayoría de las especies se encuentran en aguas poco profundas. A nivel mundial, la mayor diversidad del género *Tethya* se encuentra en aguas tropicales, especialmente en los arrecifes de coral [54].

Tethya californiana de Laubenfels, 1932, se encuentra desde el norte del Estado de California y al sur de la zona económica exclusiva de Estados Unidos de América [55], llegando a costas de la península de Baja California en el territorio Mexicano (**Fig. 10**).

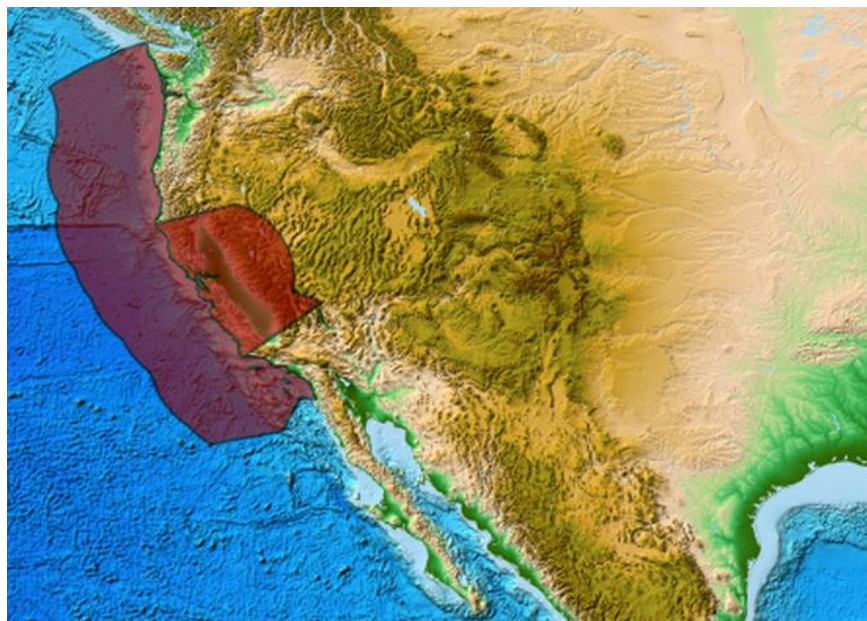
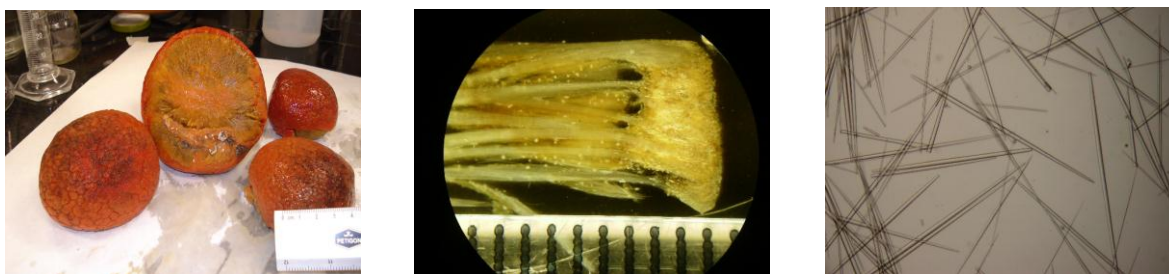


Figura 10) Ubicación de *T. californiana* (fuente: world porífera data base).

La esponja *Tethya californiana* tiene forma semi-esférica y mide de 45-57 mm de diámetro con 30-35 mm de alto. Su color *in vivo* es naranja rojizo intenso, con superficie tuberculada: los tubérculos son achatados, circulares y alargados con diámetro de 2-5 mm. Los ósculos son visibles, agrupados de 4 a 5 y alcanzan un milímetro de abertura. El esqueleto coanosomal tiene un arreglo radial (**Fig. 11.2**) formado por espículas estrongiloxeas (**Fig. 11.3**) empacadas en haces con un grosor de 400-500 μm . Estos haces soportan a los tubérculos en el ectosoma en donde son compactados en dos o tres de ellos y se diferencian del coanosoma por formar una corteza gruesa y densa de 3.5-4.0 mm de grosor [56,57,58].

Las espículas son:

- Megascleras del tipo estrongiloxeas de $782\text{-}2250 \times 15\text{-}41 \mu\text{m}$, estiles delgados de $470\text{-}1345 \times 7.8\text{-}11.4 \mu\text{m}$.
- Microescleras del tipo megaster oxiesferáster de $23.6\text{-}67.6 \mu\text{m}$ de diámetro, estrogilaster y oxiaster de $10.6\text{-}16 \mu\text{m}$ de diámetro.



1

2

3

Figura 11) *Tethya californiana* (1), corte longitudinal (2) y estrongiloxias vistas en microscopio (3).
(Patricia Gómez 2011)

6.1.4 Análisis cromatográficos.

Para cromatografía en capa fina analítica (CCFa), se utilizaron cromatofolios de sílica gel de la marca ALUGRAM SIL G/UV₂₅₄ de 0.20 mm de espesor.

Para cromatografía en capa fina preparativa (CCFp) se utilizaron placas MACHEREY-NAGEL SIL G-100/UV₂₅₄ Y G-50/UV₂₅₄, de 20 x 20 cm y 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 mm de espesor según el caso.

La visualización de las placas se llevó a cabo mediante exposición a la luz UV con una lámpara Spectroline CX-20 a dos longitudes de onda (254 nm y 336 nm) y/o utilizando como revelador una solución de sulfato cérico al 3% en ácido sulfúrico 2N y/o revelador de óleum [solución de ácido acético (80%), ácido sulfúrico (16%) y agua (4%)] seguido de calentamiento en parrilla durante 1 minuto a 100°C aproximadamente.

Las cromatografías en columna abierta (CC) se realizaron en columnas de vidrio empacadas con gel de sílice para cromatografía en capa fina (malla 230 - 400).

La cromatografía en columna de intercambio iónico, se realizó en una columna de vidrio empacada con resina amberlita XAD-4.

La cromatografía de fase reversa, se realizó en una columna abierta empacada con octadecilsilano (ODC o C18).

Los disolventes (hexano, diclorometano, acetato de etilo, acetona, y metanol) se destilaron en el laboratorio previo a su uso.

6.1.5 Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas, espectrométricas y equipo utilizado.

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

Las rotaciones ópticas se determinaron en un polarímetro Perkin-Elmer modelo 343.

Los espectros de masas se determinaron en un espectrómetro de masas, Jeol, SX 102A y las determinaciones por CG/EM en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas, Jeol GCMate II.

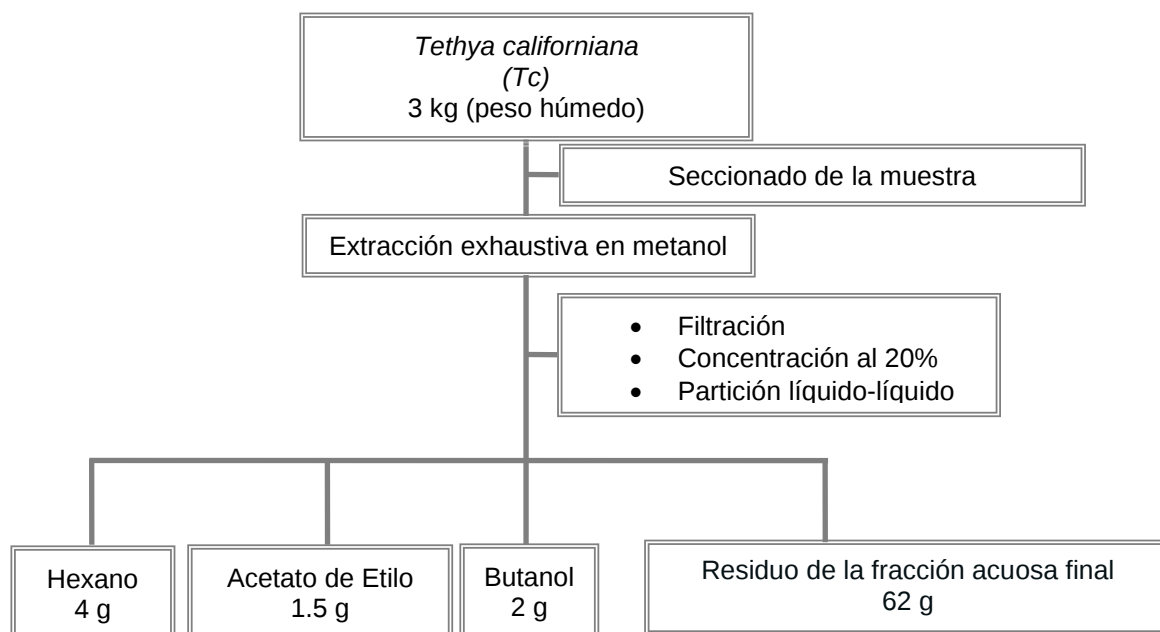
Los espectros en el infrarrojo se realizaron en un espectrofotómetro IR Brucker Tensor 27.

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

Los espectros de RMN se determinaron en espectrómetros Varian (Gemini 200), Jeol (Eclipse 300) y Bruker (Avance III 400), utilizando disolventes deuterados.

6.1.6 Obtención de los extractos.

El total del lote recolectado de *T. californiana* se cortó en pequeños trozos y se extrajo por maceración con metanol, por una semana aproximadamente; posteriormente se filtró y se concentró a presión reducida en un evaporador rotatorio a un 20% del volumen aproximadamente. El extracto metanólico-acuoso se sometió a un proceso de reparto (partición) líquido-líquido con hexano, acetato de etilo y butanol, sucesivamente (**Esq. 1**). Una vez preparados los extractos de diferentes polaridades, se procedió a la separación y purificación de sus componentes mediante métodos cromatográficos.



Esquema. 1 Diagrama de flujo de la obtención de los diferentes extractos de *T. californiana*

6.1.7 Extracto Hexánico.

El extracto hexánico de la partición líquido-líquido (4 g) se fraccionó mediante cromatografía en columna (CC) utilizando 80 g de sílice, y como eluyentes se utilizaron disolventes de polaridad creciente: hexano, diclorometano, acetato de etilo y acetona (**Tabla 3**); de las fracciones obtenidas se analizó la más abundante, (MHTcB 1.2 g).

Tabla 3. Fraccionamiento del extracto Hexánico de la partición.		
Fracción	Eluyente-proporción	Clave
A	Hexano 100	MHTcA
B	DCM 100	MHTcB
C	AcOEt 100	MHTcC
D	Acetona 100	MHTcD

La fracción MHTcB se recromatografió en una columna con 28 g de gel de sílice, utilizando como eluyentes hexano, diclorometano y acetona y mezclas de polaridad creciente de los mismos. Se obtuvieron 12 eluatos, de los cuales se reunieron, con base en la semejanza de sus componentes, en 4 fracciones primarias (**Tabla 4**), de las cuales se analizó la más abundante (MHTcBA):

Tabla 4. Recromatografía de la fracción **MHTcB**.

Fracción	Eluyente-proporción	Fracciones reunidas	Clave
1-6	H-DCM 50:50	1-4	MHTcBA
		5-6	MHTcBB
7-12	DCM-A 95:5	7	MHTcBC
		8-12	MHTcBD

La fracción más abundante **MHTcHBB** se analizó por resonancia magnética nuclear protónica (RMN ^1H) y por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) lo cual indicó la presencia de una mezcla de ácidos grasos y de ésteres de ácidos grasos.

6.1.8 Reunión y separación de los extractos de baja polaridad.

Los extractos de hexano y acetato de etilo, obtenidos del reparto líquido-líquido mostraron perfiles espectroscópicos de RMN ^1H y CCF muy similares, con respecto a la fracción de esteroides, por lo que se decidió reunirlos para obtener la mayor cantidad de muestra a estudiar. Los extractos reunidos (3.49 gr), se cromatografiaron sobre sílica-gel (60 g), utilizando mezcla de hexano-DCM 1:1, DCM y mezclas de DCM-acetona, como eluyentes (**Tabla 5**).

Tabla 5. Cromatografía en columna de gel de sílice de las fracciones reunidas de baja polaridad.

Fracción	Eluyente-proporción	Clave
1	H – DCM 50:50	TcFMP1
2	H – DCM 50:50	TcFMP2
3	DCM 100	TcFMP3
4	DCM 100	TcFMP4
5	DCM – A 9:1	TcFMP5
6	DCM – A 9:1	TcFMP6
7	DCM – A 8:2	TcFMP7
8	DCM – A 8:2	TcFMP8
9	DCM – A 6:4	TcFMP9
10	DCM – A 6:4	TcFMP10

El análisis de las fracciones *TcFMP4* y *TcFMP5* por RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) indicó la presencia de esteroides, epidioxi-esteroides y ácidos grasos, los cuales fueron separados por CCFp utilizando DCM/acetona 9:1 como eluyente. De la fracción *TcFMP4* se obtuvieron tres fracciones *TcFMP4* (a, b, c), mientras que de la fracción *TcFMP5* se separaron seis fracciones *TcFMP5* (a, b, c, d, e, f).

Las fracciones *TcFMP4b* y *TcFMP5b* se reunieron ya que tanto el análisis por CCFa como el perfil de RMN ^1H a 300 MHz reveló que se trataba de la misma mezcla de esteroides.

6.1.8.1 Acetilación de la mezcla de esteroides.

Una muestra de 50 mg de la fracción de la mezcla de esteroides (*TcFMP4b5b*), se sometió en condiciones de acetilación, con una gota de piridina y 6 gotas de anhídrido acético, siguiendo el desarrollo de la reacción mediante CCFa por aproximadamente 3 horas, obteniéndose los correspondientes acetatos, los cuales se analizaron por CG-EM.

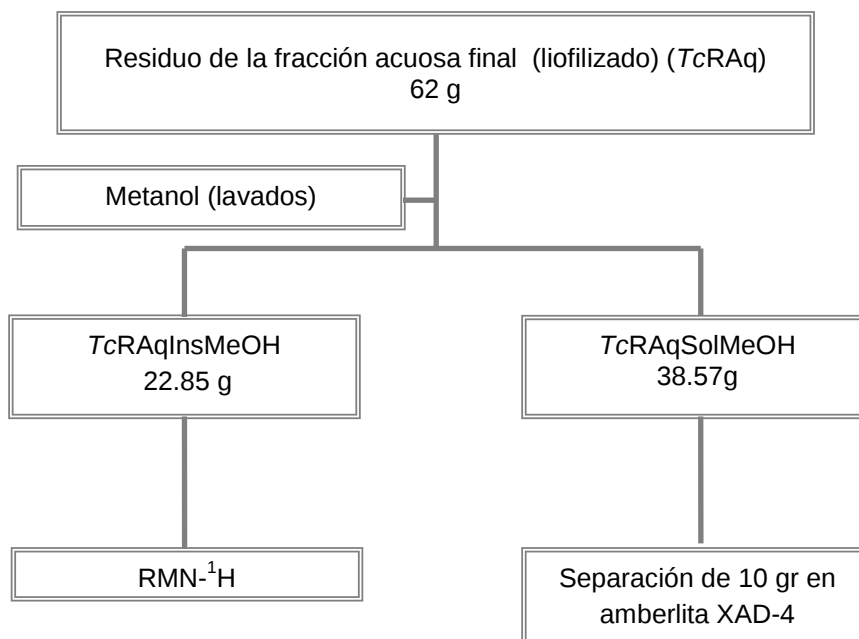
6.1.8.2 Acetilación de la mezcla de epidioxi-esteroides y ácidos grasos.

El análisis por CCFa de la fracción *TcFMP5c* y su perfil de RMN ^1H a 300 MHz evidenció la presencia de señales correspondientes a epidioxi-esteroides y ácidos grasos. Esta fracción se separó por CCFp y se obtuvieron tres fracciones (a, b, c); en el análisis por CCFa se determinó que la fracción "b" presentaba la fracción de epidioxi-esteroides en menor medida en mezcla con ácidos grasos por lo que se acetiló de la manera descrita anteriormente, para separar los epidioxi-esteroides de los ácidos grasos. El producto de la reacción se separó por CCFp, obteniéndose 5 fracciones (a, a', a'', b y c), la fracción a' se analizó por RMN ^1H .

6.1.9 Fraccionamiento del residuo butanólico-acuoso.

A la fracción acuosa-butanólica después la separación por reparto en hexano, acetato de etilo y butanol, se le eliminó el butanol a presión reducida y el residuo acuoso se liofilizó. El producto liofilizado se re-suspendió en metanol, obteniéndose dos

fracciones: una fracción insoluble en metanol (**TcRAqInsMeOH**, 22.85 g), y una fracción soluble en metanol (**TcRAqSolMeOH**, 38.57g) (**Esq. 2**).



Esquema 2. Diagrama experimental. Tratamiento preliminar del residuo acuoso final de la esponja

6.1.9.1 Fracción insoluble en metanol (**TcRAqInsMeOH**).

La fracción insoluble en metanol, se analizó por RMN ^1H (200 MHz, D_2O), cuyo perfil mostró principalmente la presencia de las señales correspondientes a la taurina (**1**) (**Esq. 2**).

6.1.9.2 Fracción soluble en metanol (**TcRAqSolMeOH**).

Una muestra de la fracción soluble en metanol (**TcRAqSolMeOH**) (9.7 g) se disolvió en aproximadamente 15 ml de agua y se cromatógrafió sobre una columna empacada con 300 gr de amberlita XAD-4 (5 cm de diámetro x 32 cm de altura), para separar la sal contenida en la muestra. La elución de la columna se inició con agua destilada 100% tomando eluatos de 200 ml, el flujo se mantuvo en 10 ml por minuto y realizando pruebas de cloruros por precipitación con una solución de AgNO_3 después de cada eluato. Posteriormente al observarse la ausencia de precipitación con AgNO_3 se continuó la elución con H_2O -MeOH (50:50), y finalmente con metanol 100%

obteniéndose 16 eluatos, los cuales se analizaron por cromatografía en capa fina (CCFa) visualizándose bajo luz UV (254 nm) (**Fig. 12**), para ser reunidos con base a la semejanza de sus componentes, obteniéndose finalmente 7 fracciones (**Tabla 6**).

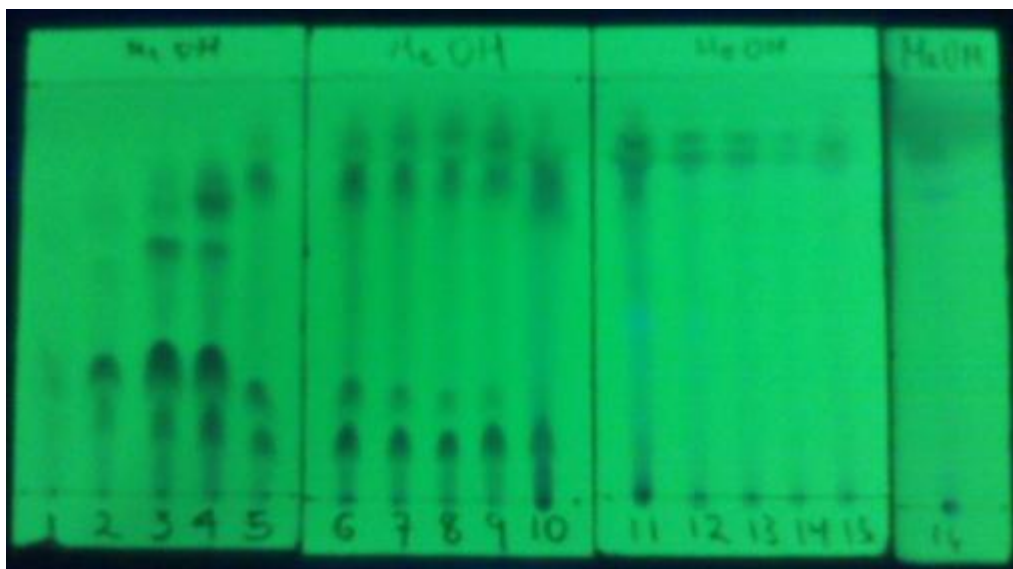


Figura 12) Fraccionamiento de TcRAqSolMeOH en Amberlita XAD-4. Cromatografía en capa fina de las fracciones (eluyente MeOH, visualizadas bajo luz UV, 254 nm).

Tabla 6. Fracciones finales obtenidas dependiendo del estudio por CCF.

Fracción	Eluyente-proporción	Fracciones reunidas	Clave
1-7	H ₂ O 100	1	TcRAqAm1
		2	TcRAqAm2
		3	TcRAqAm3
		4	TcRAqAm4
		5-9	TcRAqAm5
8-12	H ₂ O-MeOH 50:50	10 -11	TcRAqAm6
13-15	MeOH 100	12-15	TcRAqAm7
16	MeOH 100	16	Se desechó

La fracción mayoritaria **TcRAqAm3**, mostró en CCFa, 4 componentes principales, de naturaleza aromática visualizables a la luz ultravioleta de onda corta (254 nm).

6.1.9.3 Separación de la fracción TcRAqAm3 en columna de octadecilsilano (C-18).

La fracción TcRAqAm3 (1.05 g), se recromatografió sobre una columna de fase reversa C-18 (octadecilsilano), utilizando como eluyentes H₂O 100% y mezclas de H₂O:MeOH 90:10, 80:20, 50:50, metanol 100%, y finalmente acetona 100%, obteniéndose 27 fracciones. Sin embargo, la mayor parte del material, se obtuvo en las primeras dos fracciones: la fracción 1 (**TcRAqAm3C18-1**) con un peso de 0.386 mg, y la fracción 2 (**TcRAqAm3C18-2**) de 0.663 mg; el resto de las fracciones se reunieron obteniéndose aproximadamente 5 mg, con un perfil en CCFa muy similar a las primeras dos fracciones visualizada a la luz ultravioleta (**Fig. 12**), mientras que el revelado con óleum [solución de ácido acético (80%), ácido sulfúrico (16%) y agua (4%)], de estas fracciones mostró solamente uno de los 4 componentes; el menos polar que reveló como una mancha oscura.

La fracción (**TcRAqAm3C18-1**) se purificó por CCFp en una placa de gel de sílice de 20 x 20 cm y 2 mm de espesor; utilizando metanol 100%, como eluyente, obteniéndose cuatro fracciones TcRAqAm3C18-1(**a**, **b**, **c** y **d**), las cuales se extrajeron con MeOH:acetona 50:50.

6.1.9.4 Acetilación del componente TcRAqAm3C18-1a.

Una muestra de 10 mg del componente TcRAqAm3C18-1**a** (**2**) se puso en condiciones de acetilación, obteniéndose el correspondiente derivado acetilado (**3**).

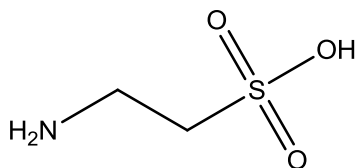
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

De los diferentes extractos orgánicos obtenidos de la esponja marina *Tethya californiana* De Laubenfels, 1932, se identificaron ácidos grasos y esteroides, mientras que del extracto acuoso-butanólico se obtuvieron un ácido sulfónico y un carbohidrato que se identificaron como la taurina (**1**), el α -metil-D-glucopiranosido (**2**), respectivamente; así como tres compuestos muy polares pertenecientes al grupo de las betaínas (compuestos en forma de sales internas o "zwitterions"), los cuales se identificaron como homarina (**4**), trigonelina (**5**) y sulcatina (**6**), así como un nucleósido identificado como uridina (**7**).

De los extractos de baja polaridad de la esponja, se obtuvo como componente mayoritario una mezcla de 5 esteroides: colesterol (**8**), ostreasterol (**9**), Δ^{22} -dehidrocolesterol (**10**), brassicasterol (**11**), clionasterol (**12**) y sus respectivos derivados 5,8-Epidioxi (**13-17**), los cuales fueron identificados mediante CG/EM como sus correspondientes acetatos obtenidos por acetilación de la mezcla.

De igual manera mediante CG/EM se identificaron los ésteres metílicos de 16 ácidos grasos (**18-33**).

7.1 Taurina (1).



De la fracción 3 obtenida de la separación en amberlita del residuo acuoso (**TcRAqAm3**) se obtuvo por cristalización espontánea de agua-metanol, un sólido cristalino con punto de fusión de 65-75°C. El espectro de RMN ^1H determinado a 400 MHz en D_2O (**Fig. 14**), resultó ser muy similar al de la fracción *TcAqInsMeOH*, en el que se observaron dos señales triples correspondientes a dos metilenos contiguos: δ 3.15 (t, $J = 6.8$ Hz) y 3.31 (t, $J = 6.4$ Hz) (**Fig. 14**) similares a la beta-alanina (**Fig. 13**). Sin embargo, el espectro de RMN ^{13}C , presentó únicamente dos señales, con desplazamientos de 36.8 y 48.9 ppm (**Fig. 14**), lo que difiere en el caso de la estructura de la beta-alanina, ya que ésta debe presentar 3 señales para 3 carbonos, uno de ellos correspondiente al carbonilo del ácido carboxílico en la región de 170 ppm, el cual no se observa.

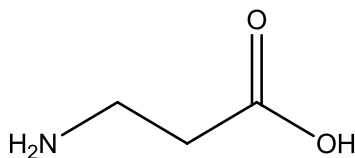


Figura 13). Estructura de la β -alanina

La comparación de las constantes de celda cristalina, obtenidas por difracción de rayos-X, de la muestra con las de la base de datos CSD versión 5.32, indicó que el compuesto corresponde muy probablemente al ácido sulfónico denominado taurina (**1**).

Lo anterior fue confirmado por comparación de los datos de RMN ^1H con los reportados para taurina (**1**) aislada de la esponja *Agelas oroides* [59], los cuales están de acuerdo para el compuesto obtenido de *T. californiana* (**Tabla 7**). El peso molecular de la taurina es de 124 uma; sin embargo en el espectro de masas obtenido por impacto electrónico (EI-MS) se obtuvo un ion molecular de m/z 249 correspondiente al dímero protonado $[2\text{M}+\text{H}]^+$, lo cual coincide con los datos reportados para el compuesto aislado de la esponja *Agelas oroides* [59].

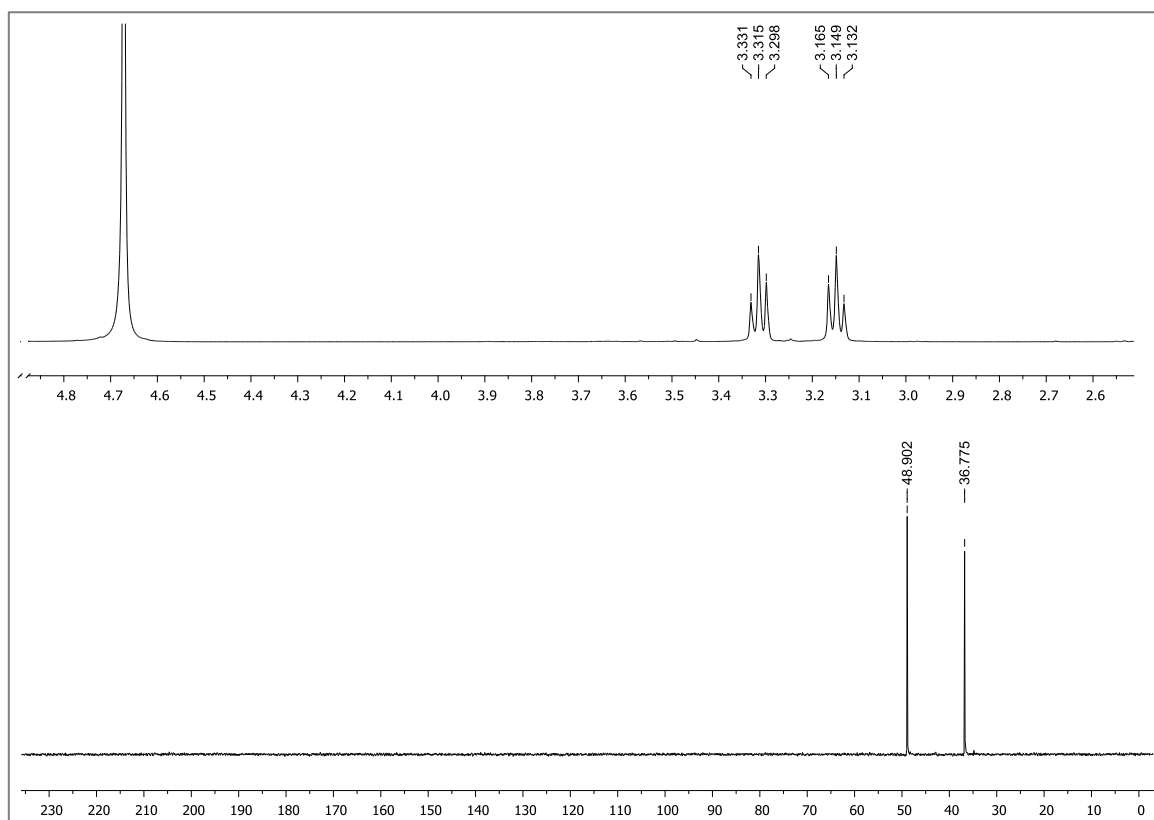


Figura 14) Espectros de RMN ^1H (400 MHz) y ^{13}C (100 MHz) en CD_3OD de la taurina (**1**) obtenida de *T. californiana*.

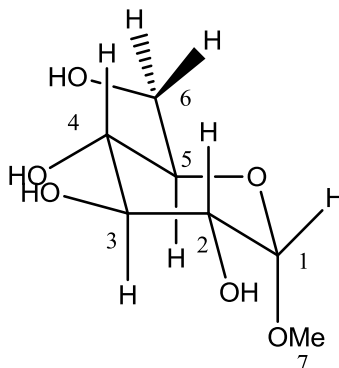
Tabla 7. Datos de RMN ^1H (400 MHz) y ^{13}C (100 MHz) del compuesto **1**. Determinados en CD_3OD (7.1), comparados con los reportados en la literatura (7.2).

1. Datos obtenidos en CD_3OD			2. Datos reportados en CD_3OD		
Posición	δ RMN ^1H	δ RMN ^{13}C	Posición	δ RMN ^1H	δ RMN ^{13}C
1	3.15 (t, 6.8)	48.8	1	3.15 (t, 6.8)	48.8
2	3.31 (t, 6.8)	36.8	2	3.31 (t, 6.8)	36.8

La taurina (ácido 2-aminoetano sulfónico, **1**), es un compuesto presente en la mayoría de los animales; en los tejidos de los mamíferos existe en pequeñas cantidades, hasta los 38 mmol/kg en tejidos húmedos, pero en algunos invertebrados marinos este compuesto es bastante abundante, a veces excediendo los 100 mmol/kg en tejidos húmedos [60]. Este compuesto se describe como un importante neurotransmisor en los vertebrados, y en repetidas ocasiones se ha encontrado en muchos invertebrados marinos, por ejemplo, hidrozooos, estrellas de mar y esponjas [59]. Es un compuesto que al parecer tiene muchas funciones en vertebrados e

invertebrados, como neurotransmisor inhibitorio o modulador en el sistema nervioso central de los mamíferos. En invertebrados marinos la taurina se ha relacionado con los cambios osmóticos y en los vertebrados marinos las funciones más importantes que se proponen para la taurina son la protección de la membrana, la desintoxicación y anti-oxidación. En la retina de los vertebrados, la taurina puede actuar como un transmisor inhibitorio, que puede estar implicado en la homeostasis del Ca^{2+} y en la regulación de la presión osmótica [61]. En medicina, la taurina se ha aplicado para tratar múltiples enfermedades neurológicas incluyendo la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, la isquemia del cerebro y del corazón. Este compuesto se sabe que puede proporcionar protección contra múltiples enfermedades neurológicas y contra daños a tejidos en múltiples enfermedades [62].

7.2 Alfa-metil-D-Glucopiranosido (2).



El componente menos polar (a) de la CCFp de la fracción **TcRAqAm3**, (**TcRAqAm3C18-1a**) revelable con óleum, se identificó mediante RMN de ^1H , y ^{13}C (**Fig. 15**), incluidos experimentos DEPT, COSY, HMBC y HSQC, como el α -metil-D-glucopiranosido (**2**).

El espectro de RMN ^1H determinado a 400 MHz, mostró la señal para el protón anomérico H-1 como una señal doble δ 4.67 (d, $J = 3.6$ Hz), la cual mostró acoplamiento con la señal doble de doble a δ 3.41 (dd, $J = 9.2, 4$ Hz, H-2) en el espectro de correlación homonuclear ^1H - ^1H (COSY) (**Fig. 16**); ésta a su vez muestra acoplamiento con la señal a δ 3.61 (t, $J = 9.2$ Hz, H-3), acoplada a su vez con la señal a δ 3.29 (dd, $J = 10, 9.2$ Hz, H-4). Esta última mostró acoplamiento con una señal múltiple a δ 3.53, que a su vez muestra acoplamientos con dos señales doble de dobles a δ 3.68 (dd, $J = 5.6, 11.6$ Hz) y δ 3.81 (dd, $J = 2.8, 11.6$ Hz), las cuales deben corresponder a H-5, H-6a y H-6b, respectivamente. Finalmente, la presencia de una señal simple aguda δ 3.40, indicó la presencia del metilo de un grupo metoxilo.

En el experimento bidimensional de correlación heteronuclear ^{13}C - ^1H (HSQC) (**Fig. 17**), las señales correspondientes a los carbonos de los 5 metinos mostraron acoplamientos con las señales a δ 99.8, 73.7, 72.1, 70.3 y 63.0, mientras que las señales del metilo y el metileno mostraron acoplamientos con las señales a δ 54.1 y 61.2, respectivamente. De esta manera quedaron asignadas inequívocamente las señales de los 7 carbonos en el espectro (**Tabla 8**). En el experimento de HSQC se pueden apreciar, además de las señales del compuesto, otras señales producidas por

el disolvente deuterado (δ 3.30) e impurezas presentes en la fracción (δ_H 3.56, 3.67 y δ_C 69.8 y 63.0).

Tanto los datos de RMN, principalmente la constante de acoplamiento del protón anomérico, como la rotación óptica positiva ($[\alpha]_D$: +84.03), están de acuerdo para el **α -metil-D-glucopiranosido (2)**.

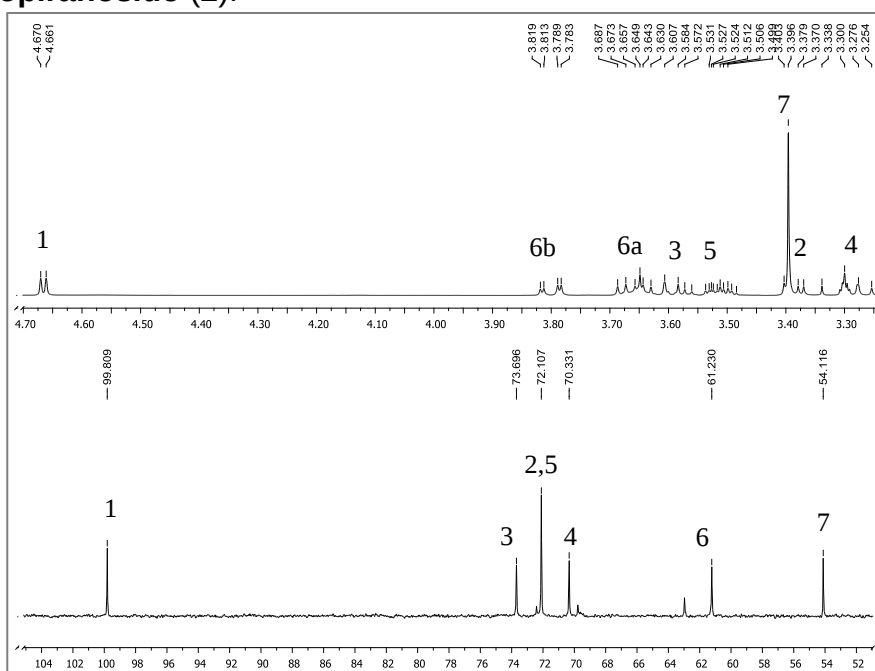


Figura 15) Espectros de RMN 1H y ^{13}C del α -metilglucopiranosido (2).

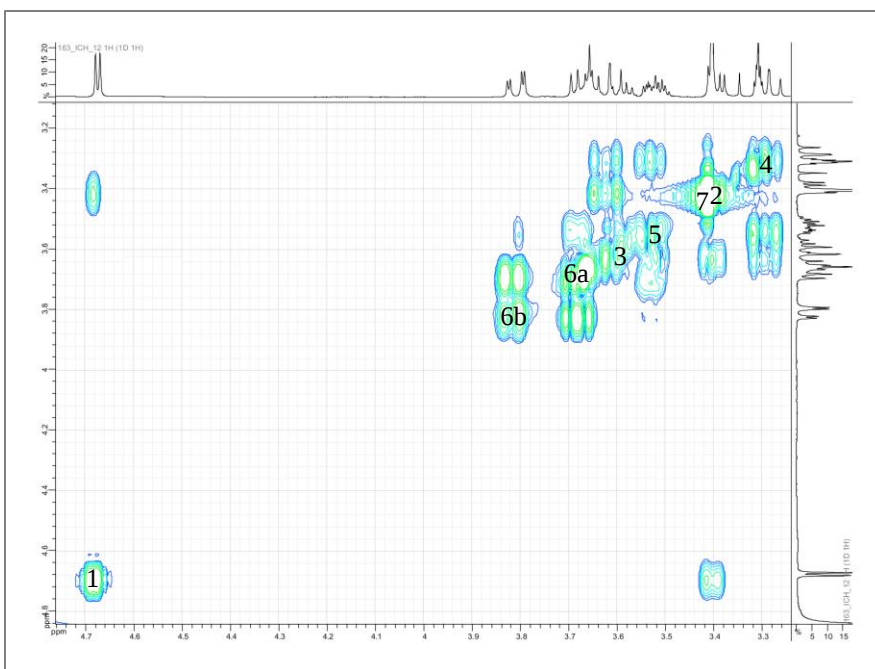


Figura 16) Correlaciones observadas en el experimento COSY del α -metil-D-glucopiranosido (2).

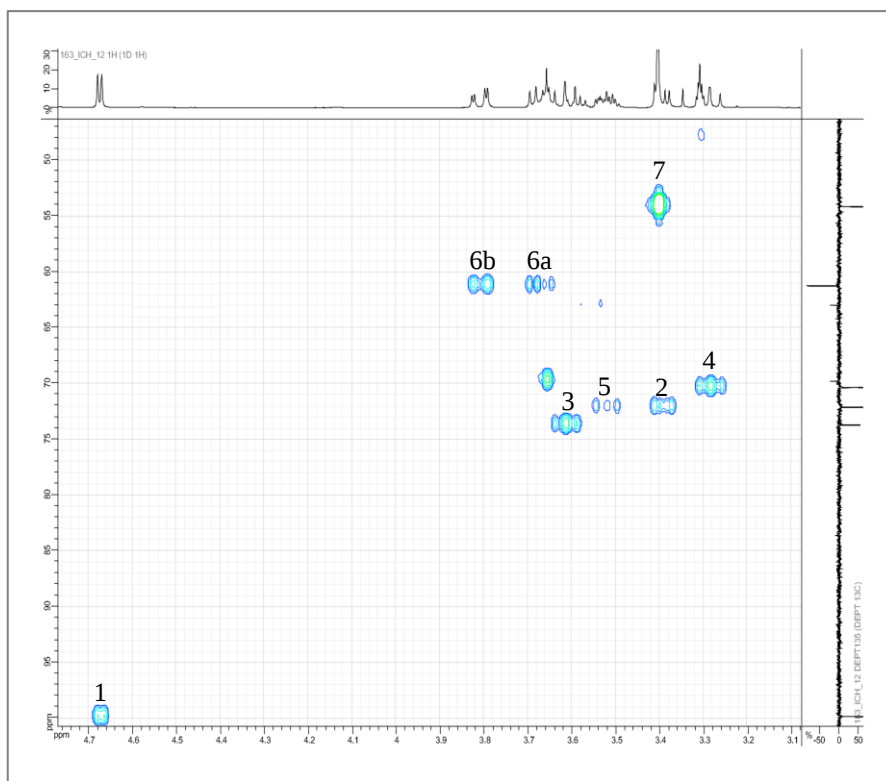
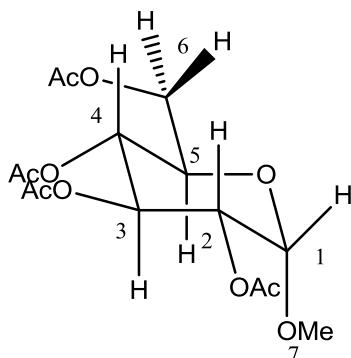


Figura 17) Correlaciones observadas en el experimento HSQC del α -metil-D-glucopiranosido (**2**).

Tabla 8. Datos de RMN ^1H (400 MHz) y ^{13}C (100 MHz) del compuesto **2** determinados en CD_3OD .

Posición	δ RMN ^1H	δ RMN ^{13}C
1	4.67 (d, 3.7)	99.8
2	3.41 (dd, 9.2, 4)	72.1
3	3.61 (t, 9.2)	73.7
4	3.29 (dd, 10, 9.2)	70.3
5	3.53 (m)	63.0
6a	3.68 (dd 5.6, 11.6)	61.2
6b	3.81 (dd, 2.8, 11.6)	61.2
OMe	3.40 (s)	54.1

7.2.1 Tetra-acetil Alfa-metil-D-Glucopiranosido (3).



La acetilación del compuesto (2), produjo el tetra-acetato correspondiente (3), comprobando la existencia de cuatro hidroxilos acetilables, de acuerdo con la estructura de la molécula. En el espectro de RMN ^1H del compuesto (3), se observaron 4 señales simples agudas para los protones de los grupos metilo de los acetatos con desplazamientos químicos δ_{H} 2.10, 2.08, 2.03, 2.01, además de las señales de los protones de los metinos (H-2, H-3, H-4 y H-5) y los protones del metileno (H-6a y H-6b), bases de los grupos OH, las cuales se encuentran desplazadas a frecuencias mayores (Tabla 9) (Fig. 19). Así mismo en el espectro de RMN ^{13}C se observaron señales de 7 carbonos correspondientes a 5 metinos (δ 96.8, 70.8, 70.1, 68.5 y 67.1), 1 metoxilo (δ 55.5) y 1 metileno (δ 61.9), de acuerdo a los experimentos DEPT (Fig. 18), además de las correspondientes a los carbonilos (δ 170.6, 170.1, 170.0, 169.6) y los grupos metilo (δ 20.7, 20.7, 20.67, 20.61) de los acetatos. La asignación de los desplazamientos químicos de los protones y sus respectivos carbonos en la estructura se estableció mediante el experimento HSQC (Fig. 20). El peso molecular del compuesto fue determinado por espectrometría de masas mediante la técnica FAB+ revelando un ion pseudomolecular de m/z 363 $[\text{M}+\text{H}]^+$, así como el correspondiente aducto con sodio de m/z 385 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, congruentes con el tetracetato del metilglucopiranosido.

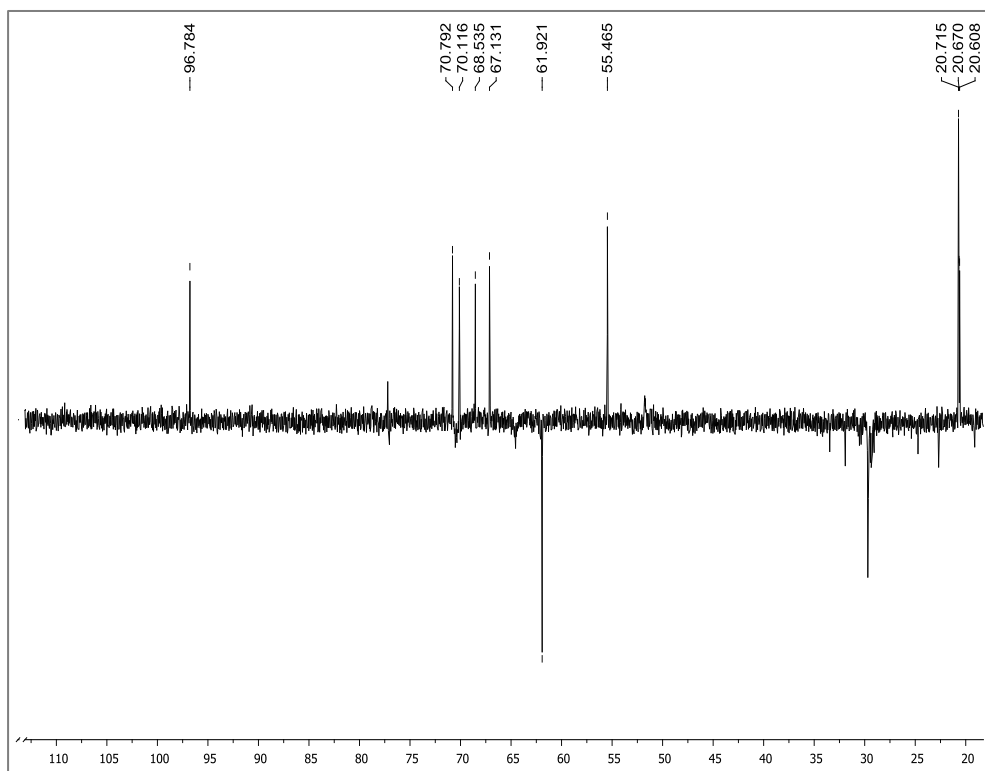


Figura 18) Experimento DEPT del tetracetato del α -metilglucopiranosido (3).

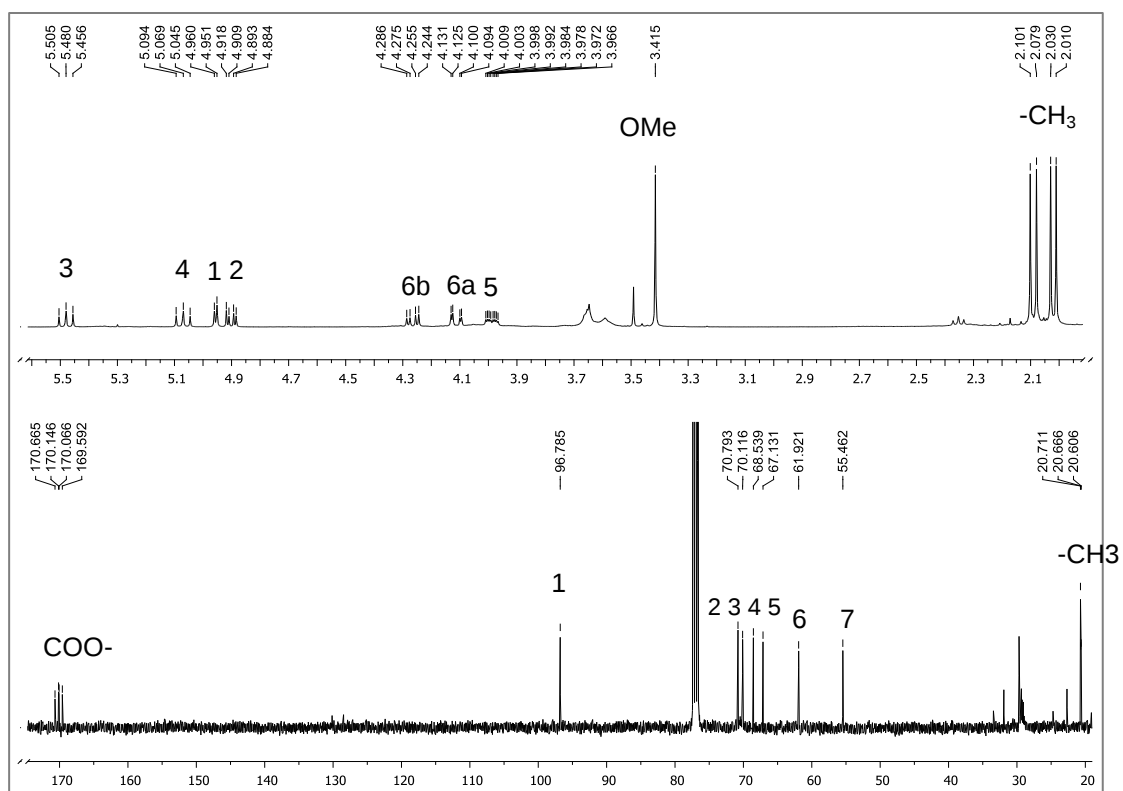


Figura 19) Espectros de RMN ^1H y ^{13}C del tetracetato del α -metilglucopiranosido (3).

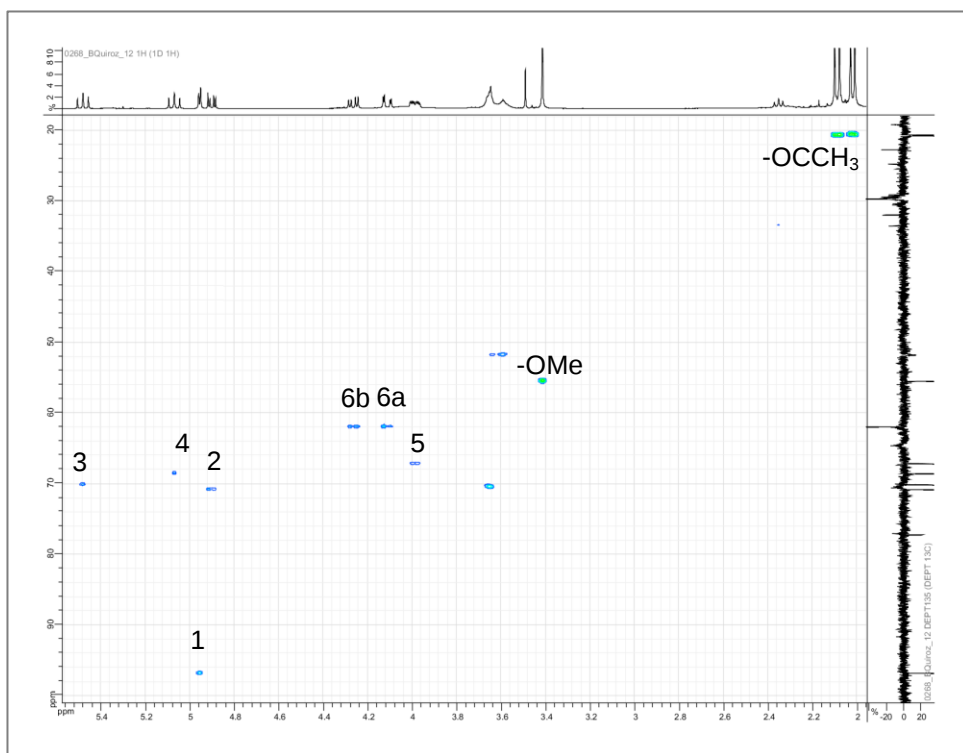


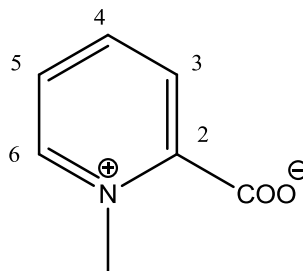
Figura 20) Correlaciones observadas en el experimento HSQC del tetracetato del α -metilglucopiranosido (**3**).

Tabla 9. Datos de RMN ^1H (400 MHz) y ^{13}C (100 MHz) del compuesto 3 determinados en CDCl_3 .		
Posición	δ RMN ^1H	δ RMN ^{13}C
1	4.96 (d, 4)	96.8
2	4.90 (dd, 4, 10.4)	70.8
3	5.47 (t, 10)	70.1
4	5.06 (t, 10)	68.5
5	3.99 (m, 2.4, 4.6, 10.3)	67.1
6a	4.11 (dd, 2.4, 12.4)	61.9
6b	4.1 (dd, 4.8, 12.5)	61.9
OMe	3.4 (s)	55.5
COO-	-----	170.6
		170.1
		170.0
		169.6
CH ₃ -	2.1 (s)	20.7
	2.07 (s)	20.7
	2.02 (s)	20.67
	2.01 (s)	20.61

CARBOHIDRATOS.

Los carbohidratos son metabolitos primarios ubicuos en la naturaleza, sirviendo como fuentes de energía (como la glucosa), como miembros estructurales y como componentes de ácidos nucleicos en sistemas biológicos. La glucosa es uno de los monosacáridos más abundantes en la naturaleza.

7.3 Homarina (4).



La fracción (c) de la separación por CCFp, de la fracción **TcRAqAm3** (**TcRAqAm3C18-1c**), se analizó por RMN en metanol deuterado (CD_3OD). En el espectro de RMN ^1H determinado a 400 MHz se observaron 4 señales en la región de los aromáticos: δ 7.93 (dd, $J \sim 8$, H-5), δ 8.07 (d, $J \sim 8$, H-3), δ 8.52 (t, $J \sim 8$, H - 4) y δ 8.75 (d, $J \sim 8$, H-6), cuyos desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento están de acuerdo con la presencia de un anillo piridínico 1,2-disustituido. El perfil del espectro de ^1H , es muy similar al del ácido picolínico (**Fig. 21**), del cual difiere en los desplazamientos químicos y la presencia de una señal simple asignable a un $\text{N}^+\text{-Me}$ a δ 4.42 (s, $\text{N}^+\text{-Me}$).

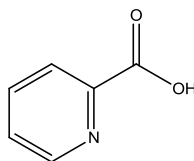


Figura 21) Estructura del ácido picolínico.

Así mismo, en el espectro de RMN ^{13}C determinado a 100 MHz se observaron señales correspondientes a 7 carbonos, 5 de ellos protonados que corresponden a 4 metinos, δ 127.5, 127.5, 147.0 y 146.5 y 1 metilo a δ 47.5 (de acuerdo con los experimentos DEPT) (**Fig. 22**), los cuales muestran acoplamiento con las señales de los protones en δ 8.07, 8.52, 7.93, 8.75 y 4.42, respectivamente, en el experimento de correlación heteronuclear ^1H - ^{13}C (HSQC) (**Fig. 23**). Las dos señales restantes a δ 155.5 y 165.2, corresponden a los 2 carbonos cuaternarios (**Fig. 24**). Estos resultados están de acuerdo a datos obtenidos de la literatura para la homarina (4), presente en moluscos del mediterráneo [63] (**Tabla 10**). El espectro de masas mediante la técnica FAB+ mostró los fragmentos correspondientes a la homarina a $m/z = 94, 138$ y 160 , datos que están de acuerdo con los obtenidos para la homarina aislada de moluscos del mediterráneo [63].

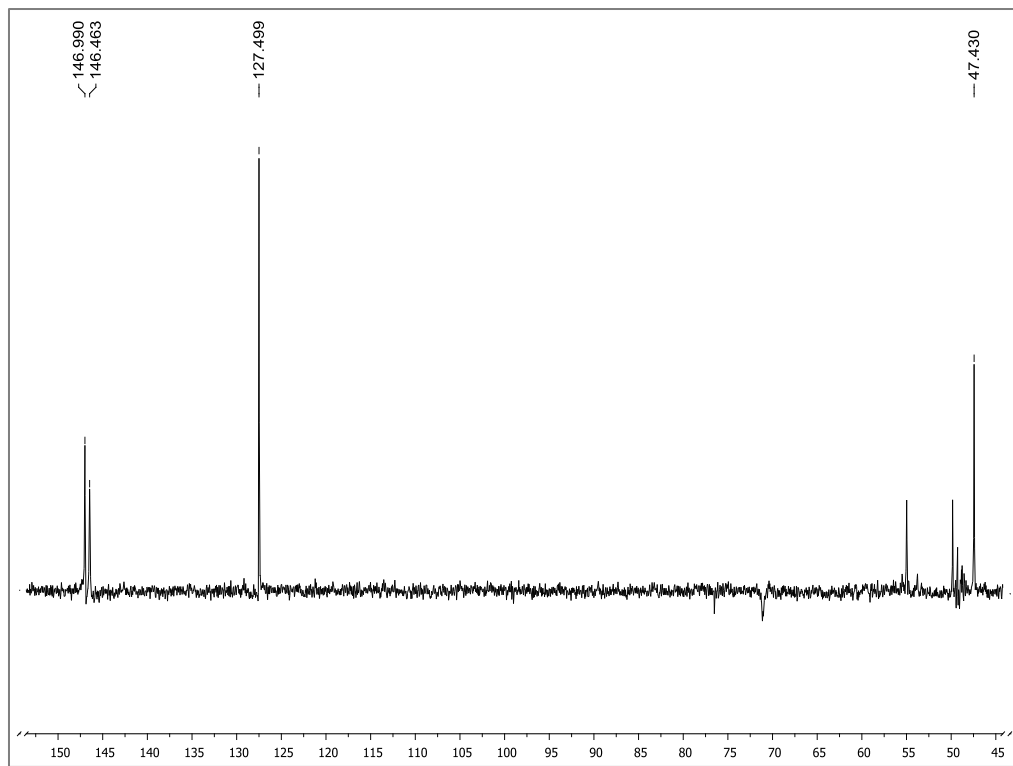


Figura 22) Experimentos DEPT de Homarina (4).

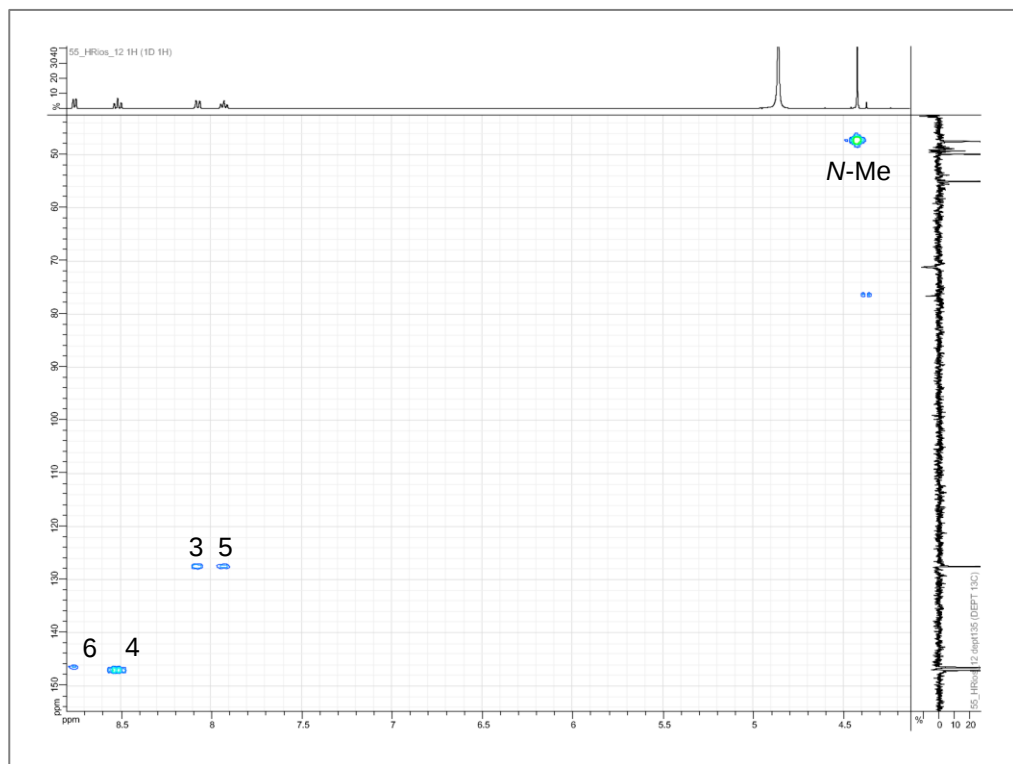


Figura 23) Correlaciones observadas en el experimento HSQC de Homarina (4).

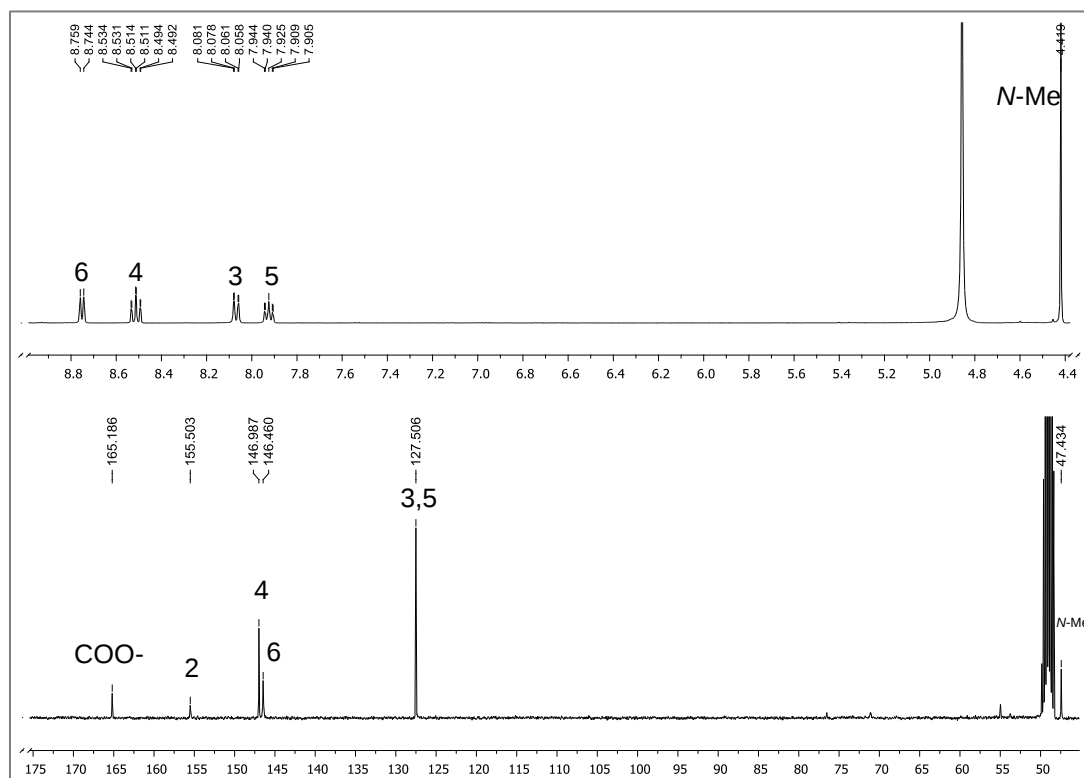
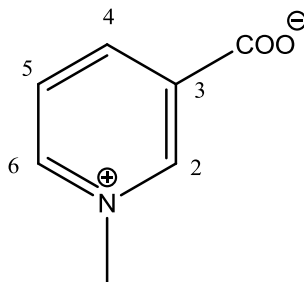


Figura 24) Experimentos de RMN ^1H y ^{13}C de Homarina (**4**).

Tabla 10. Datos de RMN ^1H (400 MHz) y ^{13}C (100 MHz) del compuesto **4** determinados en CD_3OD (10.1) comparados con los reportados en la literatura (10.2).

1. Datos obtenidos en CD_3OD			2. Datos reportados en CD_3OD		
Posición	δ RMN ^1H	δ RMN ^{13}C	Posición	δ RMN ^1H	δ RMN ^{13}C
2	-----	155.5	2	-----	155.2
3	8.07 (dd, 7.8, 1.2)	127.5	3	8.07 (d, 8)	127.6
4	8.52 (ddd, 8.4, 8.2, 1.4)	147	4	8.52 (t, 8)	147
5	7.93 (dd, 7.2, 6.8)	127.5	5	7.93 (dd, 8, 6.5)	127.6
6	8.75 (d, 8)	146.5	6	8.76 (d, 6.5)	146.6
NMe	4.42 s	47.5	NMe	4.42 s	47.5
COO-	-----	165.2	COO-	-----	165.2

7.4 Trigonelina (5).



El componente más polar (**d**) de la separación de la fracción **TcRAqAm3** por CCFp (**TcRAqAm3C18-2d**), se identificó de acuerdo con sus datos de RMN de ^1H y ^{13}C como el isómero de la homarina (**4**) conocido como trigonelina (**5**). El espectro de RMN ^1H mostró señales para 4 protones en la región de los aromáticos con diferentes desplazamientos químicos y multiplicidad comparados con la homarina (**4**), a δ 8.05 (dd, $J=6$ Hz), 8.86 (d, $J=8$ Hz), 8.90 (d, $J=8$ Hz) y 9.20 (s). La multiplicidad y constantes de acoplamiento son característicos de un anillo piridínico 1,3-disustituido muy similares al ácido nicotínico. Como en el caso de la homarina (**4**), se observó también una señal assignable a un $\text{N}^+\text{-Me}$ a 4.43 ppm. Así mismo, en el espectro de RMN ^{13}C determinado a 100 MHz se observaron señales correspondientes 7 carbonos, que corresponden a 4 metinos (δ 147.6, 146.8, 146.0, 128.5), 1 metilo (δ 46.4) (**Fig. 25**) y 2 carbonos cuaternarios (δ 139.9, 177.2) (**Fig. 26**). La comparación de los datos obtenidos con los datos de RMN ^1H reportados en la literatura para la trigonelina (**5**) obtenida de la esponja *Astrosclera willeyana* [64] (**Tabla 11**), confirmaron la identificación del compuesto aislado de *T. californiana* como trigonelina (**5**). El análisis de espectrometría de masas por FAB+ dio como resultado un pseudo ion molecular de m/z 138 $[\text{M}+\text{H}]^+$; estos datos están de acuerdo con los obtenidos para la trigonelina aislada de la esponja marina *Astrosclera willeyana* [64].

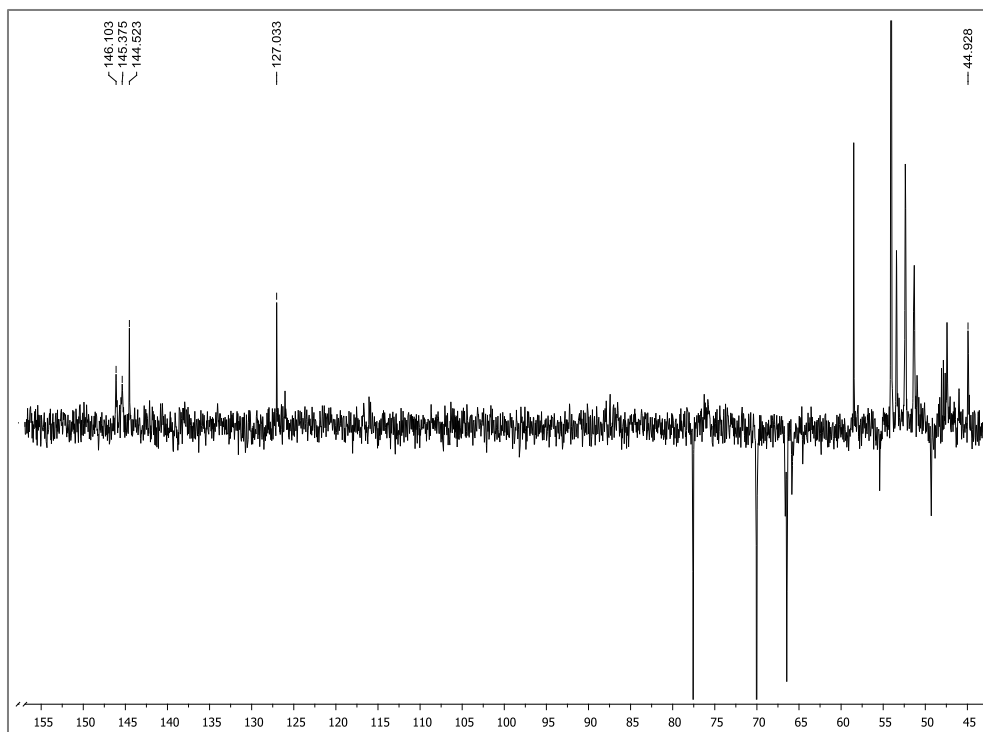


Figura 25) Experimentos DEPT de Trigonelina (5).

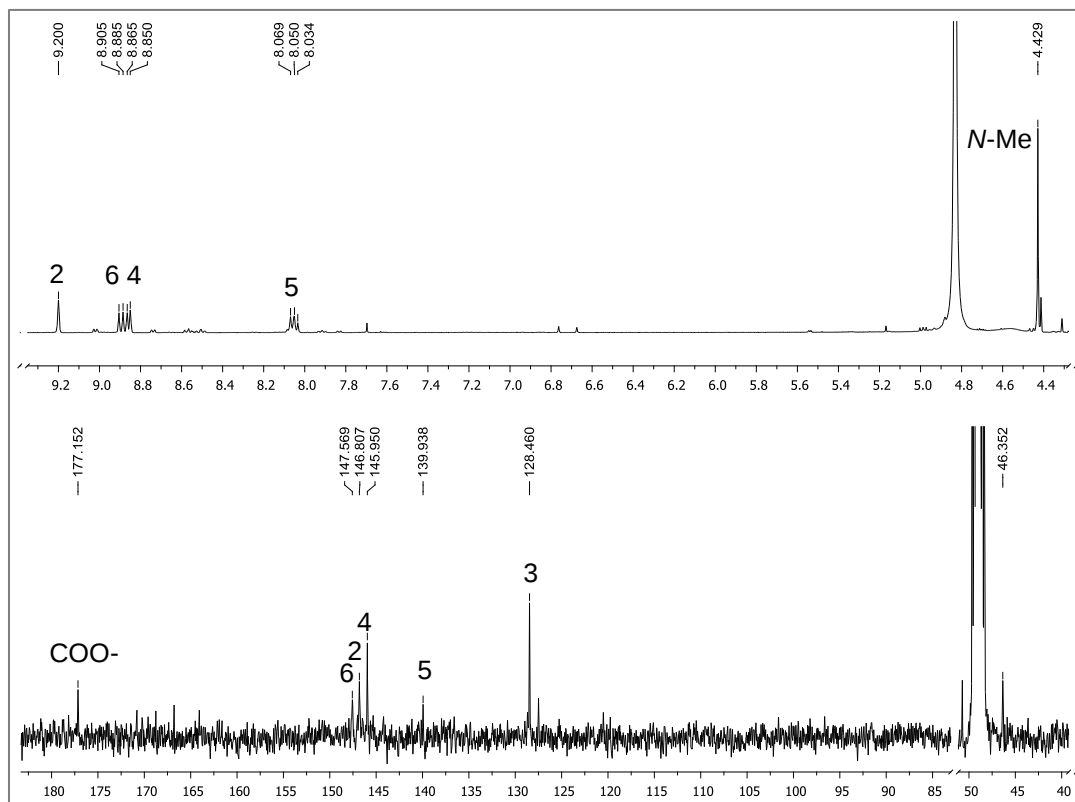
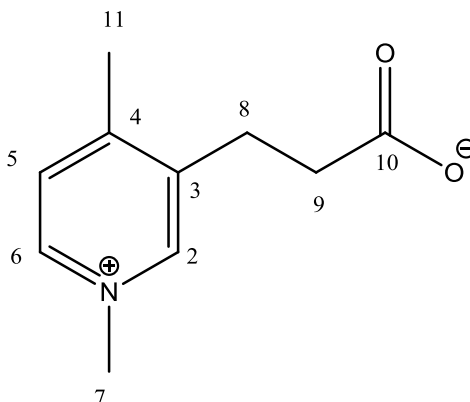


Figura 26) Espectros de RMN ^1H y ^{13}C de Trigonelina (5).

Tabla 11. Datos de RMN ^1H (400 MHz) y ^{13}C (100 MHz) del compuesto **5** determinados en CD₃OD (11.1), comparados con los datos de RMN ^1H (300 MHz, CD₃OD) reportados en la literatura (11.2).

1. Datos obtenidos en CD ₃ OD			2. Datos reportados en CD ₃ OD	
Posición	δ RMN ^1H	δ RMN ^{13}C	Posición	δ RMN ^1H
2	9.20 s	146.8	2	9.24 s
3	-----	139.9	3	-----
4	8.86 d, 8	146.0	4	8.89 d
5	8.05 dd, 6	128.5	5	8.10 dd
6	8.90 d, 8	147.6	6	8.95 d
NMe	4.43 s	46.4	NMe	4.47 s
COO-	-----	177.2	COO-	-----

7.5 Sulcatina (6).



De la fracción **TcRAqAm6**, después de sucesivas separaciones por CCFp, utilizando metanol 100% (3x), se obtuvo la fracción **TcRAqAm6bb**, más polar que la homarina (**4**) y la trigonelina (**5**). Su espectro de RMN ^1H , mostró la presencia de señales en la región de los aromáticos, δ 7.81 (d, $J=6$ Hz), 8.52 (d, $J=6$ Hz) y 8.60 (s) cuyos desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento como en el caso de los compuestos **4** y **5**, pueden atribuirse a un anillo piridínico (en forma de ion piridinio) 1,3,4-trisustituido, en este caso. Como en los casos anteriores, se observa también una señal asignable a un $N^+-\text{Me}$ a 4.30 ppm, además de 2 señales triples acopladas a 2.53 y 3.10 ppm, correspondientes a dos grupos metileno contiguos y una señal simple en 2.69 ppm, asignable a un metilo aromático. Así mismo, en el espectro de RMN ^{13}C determinado a 100 MHz se observaron señales correspondientes a 10 carbonos, que corresponden a 2 metilos, 2 metilenos, 3 metinos y 3 carbonos cuaternarios, de acuerdo con los experimentos DEPT (**Fig. 27 y 28**). Los datos anteriores están de acuerdo con los datos descritos en la literatura para el compuesto denominado sulcatina (**6**) (**Tabla 12**), aislado anteriormente del tunicado *Microcosmus vulgaris* [65] y recientemente de la esponja *Cliona californiana* [66]. El espectro de masas determinado en la modalidad FAB+ revelaron un pseudo ion molecular $[\text{M}+\text{H}]^+$ de m/z 180 así como el correspondiente aducto con sodio $[\text{M}+\text{Na}]^+$ de m/z 202; los que están de acuerdo con los datos reportados para la sulcatina (**6**) aislada de la ascidia *Microcosmus vulgaris* [65].

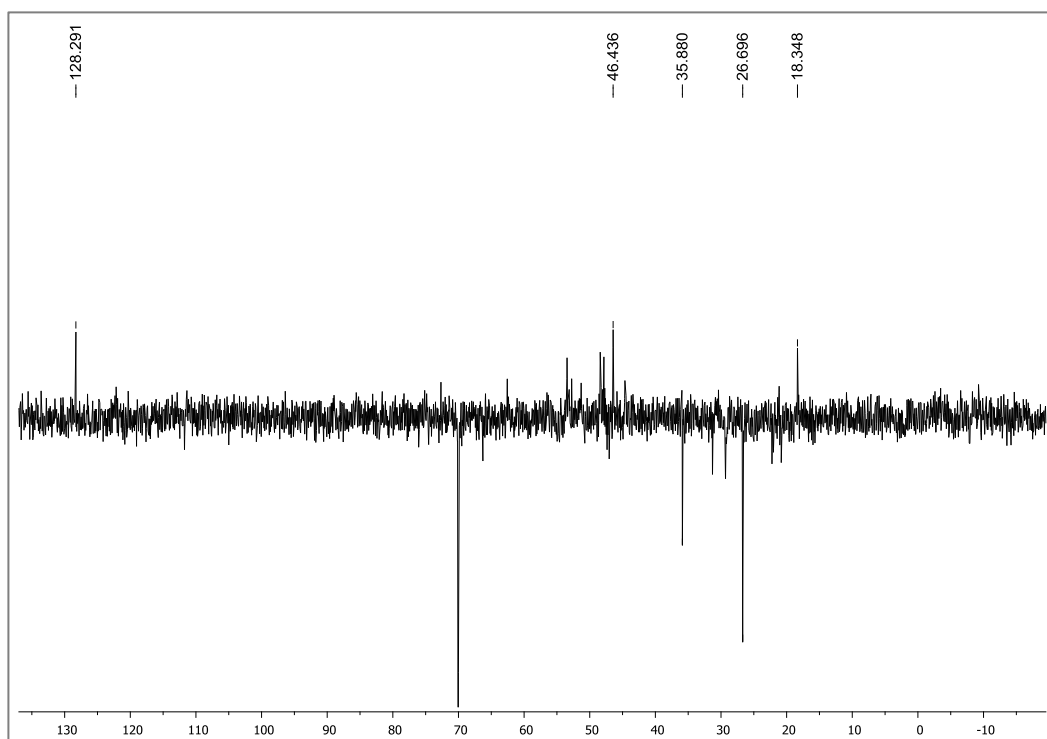


Figura 27) Experimentos DEPT de Sulcatina (6).

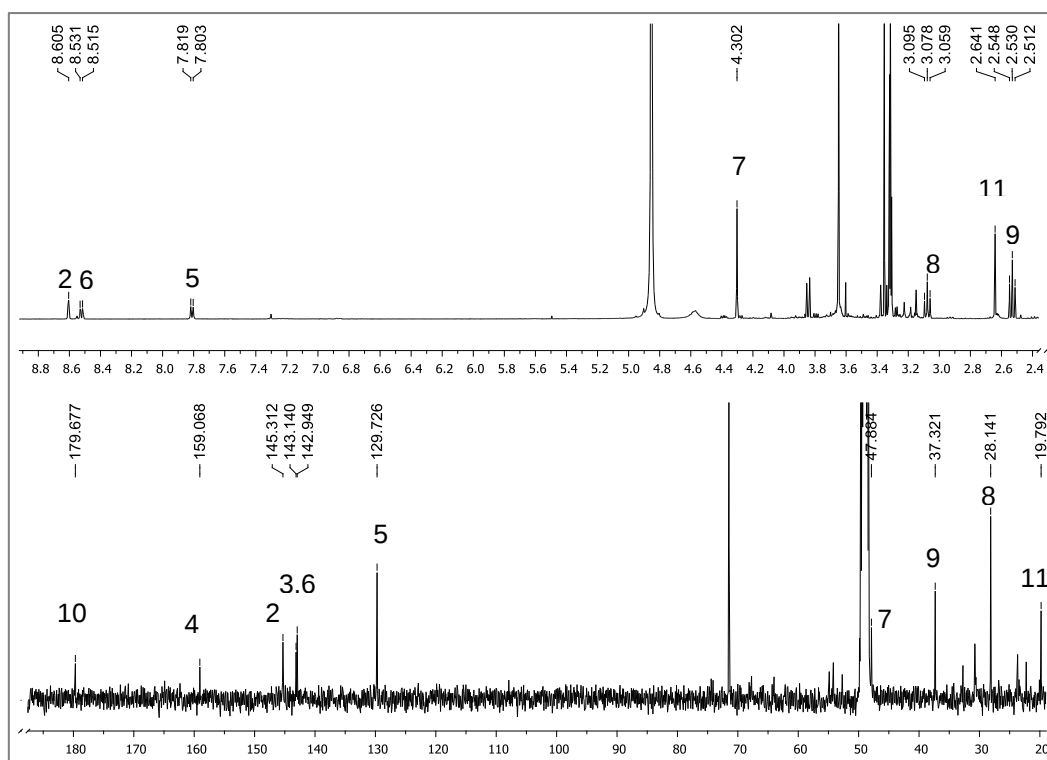


Figura 28) Espectros de los experimentos de RMN ^1H y ^{13}C de Sulcatina (6).

Tabla 12. Datos de RMN ^1H (400 MHz) y ^{13}C (100 MHz) del compuesto **6** determinados en CD_3OD (12.1) comparados con los reportados en la literatura (12.2).

1. Datos obtenidos en CD_3OD			2. Datos reportados en CD_3OD		
Posición	δ RMN ^1H	δ RMN ^{13}C	Posición	δ RMN ^1H	δ RMN ^{13}C
2	8.60 (s)	145.3	2	8.62 (sas)	145.1
3	-----	143.1	3	-----	143.1
4	-----	159.1	4	-----	160.0
5	7.81 (d, 6)	129.7	5	7,84 (sa d, 6)	129.8
6	8.52 (d, 6)	143.0	6	8.55 (sa d, 6)	143.1
7	4.30 (s)	47.9	7	4.32 (sa s)	47.9
8	3.10 (t, 6.5)	28.2	8	3.10 (t, 6.5)	27.9
9	2.53 (t, 6.5)	37.3	9	2.57 (t, 6.5)	37.1
10	-----	179.7	10	-----	180.0
11	2.69 (Sa s)	19.8	11	2.68 (Sa s)	19.8

Las betaínas son compuestos con un amonio cuaternario alquilado o una fracción piridínica y un grupo carboxilato, separados por grupos CH_2 ($\text{N}^+(\text{CH}_2)_n\text{COO}^-$) denominadas “zwitteriones”. Las aplicaciones actuales más importantes de las betaínas incluyen los artículos de tocador y productos de cuidado personal, que representan una gran área de consumo. Las propiedades únicas de betaínas como tensoactivos anfóteros determinan su uso en la industria textil. Además, las betaínas se han utilizado para la preparación de emulsiones fotográficas, en la recuperación de petróleo, para obtener aleaciones brillantes de cobre, estaño y zinc en galvanoplastia, sustancias agroquímicas, materiales de embalaje de alimentos, etc. Además se han encontrado aplicaciones en la medicina, farmacia, biología y otros campos científicos. Los representantes más importantes de las betaínas son la homarina (N-metil-2-carboxi-piridina) (**4**) y la trigonelina (N-metil-3-carboxi-piridina) (**5**), en los que los grupos cargados (N^+ y COO_2^-) están acoplados a través de los electrones- π al anillo de piridina. Ambas betaínas han sido aisladas de diversas plantas, semillas y tejidos de animales [67]. Varios autores han propuesto que estos compuestos zwitteriónicos pueden jugar un papel importante en la actividad osmótica de las células de invertebrados marinos [68].

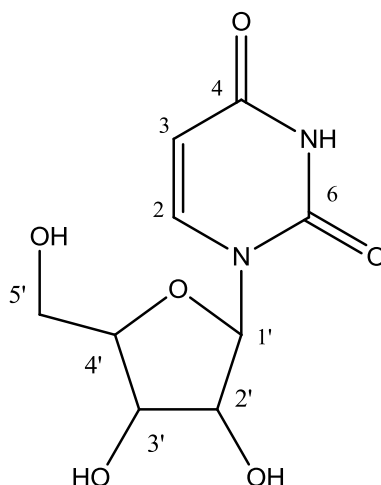
La **homarina** (betaína ácido N-metil picolínico) es un compuesto muy común en numerosos organismos marinos; está presente en crustáceos marinos, moluscos y también en algunos anélidos, equinodermos, urocordados, celenterados, corales, medusas, anémonas de mar, cangrejos, gusanos, erizos de mar y esponjas, pero parece que no se ha encontrado en vertebrados e invertebrados de agua dulce [60]. La homarina es una base de amonio cuaternario animal con algunas características interesantes que sugieren algunos posibles roles en la función nerviosa [69]. Se ha sugerido que las bases nitrogenadas como lo son la homarina y otros compuestos de la misma naturaleza pueden intervenir en funciones osmoreguladoras, además de presentar propiedades antiadherentes y antidepredatorias. El ácido picolínico es el probable precursor biogénico de la homarina en analogía con la nicotinamida y N-metilnicotinamida [70]. Además la homarina junto con la trigonelina, parecen estar involucrados como morfógenos en el desarrollo del hidroide marino *Hydractinia echinata* [71]. La homarina fue aislada por primera vez por Hoppe-Seyler del músculo de una langosta del género *Homarus* [72].

Es ampliamente aceptado que la homarina sirve como un osmolito en las algas marinas. Los estudios iniciales fueron llevados a cabo en el alga verde *Platymonas subcordiformis*. Estudios con el coral blando *Gersemia antarctica* demostraron que este libera una potente mezcla antimicrobiana de compuestos orgánicos en el agua circundante, y la homarina es el compuesto responsable de la mayor parte de esta actividad biológica [73]. Otros estudios evidenciaron que la homarina también puede funcionar como un agente transmetilante en el camarón marino. También se ha sugerido que la homarina actúa como un donador de grupos metilo a los receptores apropiados en tejidos de crustáceos [74].

La **trigonelina** (***N*-metil-3-carboxi-piridina**) es una betaína aislada de varias plantas, semillas y de la langosta *Panulirus cygnus* [75]. Este compuesto difiere estructuralmente de la homarina, únicamente en la posición del grupo carboxilo y al parecer se encuentra en menor cantidad que la homarina. Está presente en algunos crustáceos marinos, anélidos y celenterados [60]. Además junto con la homarina parece estar involucrada en el desarrollo del hidroide marino *Hydractinia echinata* [71]. Se ha demostrado que posee una amplia gama de actividades como agente hipoglucémico, hipolipidémico, hipocolesterolémico, insulinoatrófico y antioxidante. Esas propiedades son relacionadas al control del síndrome metabólico, un trastorno del metabolismo de carbohidratos y grasas, que aumenta el riesgo de diabetes y enfermedades cardiovasculares. Por lo tanto, la trigonelina es un potente agente natural antidiabético, así como un agente anti microbiano y anti demencial [76]. Se ha sugerido que este compuesto de amonio-cuaternario juega un importante rol en las actividades osmóticas en los invertebrados marinos [77].

Los compuestos de amonio cuaternario de bajo peso molecular están ampliamente distribuidos en las plantas terrestres, así como en los invertebrados y algas marinas. La mayoría de estos compuestos son derivados del ion piridinio con carácter anfótero, llamados colectivamente betaínas; ejemplos de estos son la homarina y la trigonelina. El núcleo de la piridina y el ion piridinio se han encontrado en varios metabolitos bioactivos aislados de esponjas marinas; todos estos compuestos son piridinas sustituidas con cadenas laterales alifáticas que frecuentemente llevan al final un grupo amino, *N*-metil amino, metoxiamino, o metoxiimino éter, que muestran diversas propiedades farmacológicas, como son las actividades ictiotóxica, citotóxica y antimicrobiana. La **sulcatina** es un compuesto con características muy similares a las anteriores, se describe como un alcaloide de bajo peso molecular con propiedades antiproliferativas y es el primer alcaloide piridínico aislado de un tunicado [78] y una esponja [66].

7.6 Uridina (7).



La fracción menos polar (**a**) de la CCFp de la fracción **TcRAqAm6**, se separó nuevamente por CCFp, obteniéndose 5 fracciones (a, b, c, d, e), las cuales se analizaron por RMN ^1H . El espectro de la fracción b (**TcRAqAm6ab**), mostró el perfil del nucleósido, denominado **Uridina (7)**. En él se observaron las 2 señales dobles del sistema AB correspondiente a los protones del doble enlace del grupo uracilo a δ 8.0 y 5.7 (d, $J = 8.2$ Hz), así como, la señal doble a 5.9 ($J = 4.6$ Hz), correspondiente al protón anomérico (H-1') de la arabinosa (**Fig. 29**). Así mismo en el espectro de RMN ^{13}C determinado a 100 MHz se observaron señales correspondientes a 9 átomos de carbono que corresponden a 6 metinos dos de ellos carbonos sp^2 (δ 142.7, 102.8) y las restantes corresponden a bases oxigenadas (δ 90.6, 75.7, 71.4 y 86.5 ppm), además de 1 metileno (δ 62.3 ppm), y 2 carbonos cuaternarios (δ 166.1 y 152.5) (**Fig. 29**), de acuerdo con los experimentos DEPT (**Fig. 30**) (**Tabla 13**). La comparación con los datos reportados en la literatura para el compuesto citotóxico aislado de una cepa de *Streptomyces* de origen marino [79], así como en un estudio reciente de la esponja *Cliona californiana* [66] y con una muestra auténtica de uridina, confirmaron la identificación del compuesto aislado como tal (**7**).

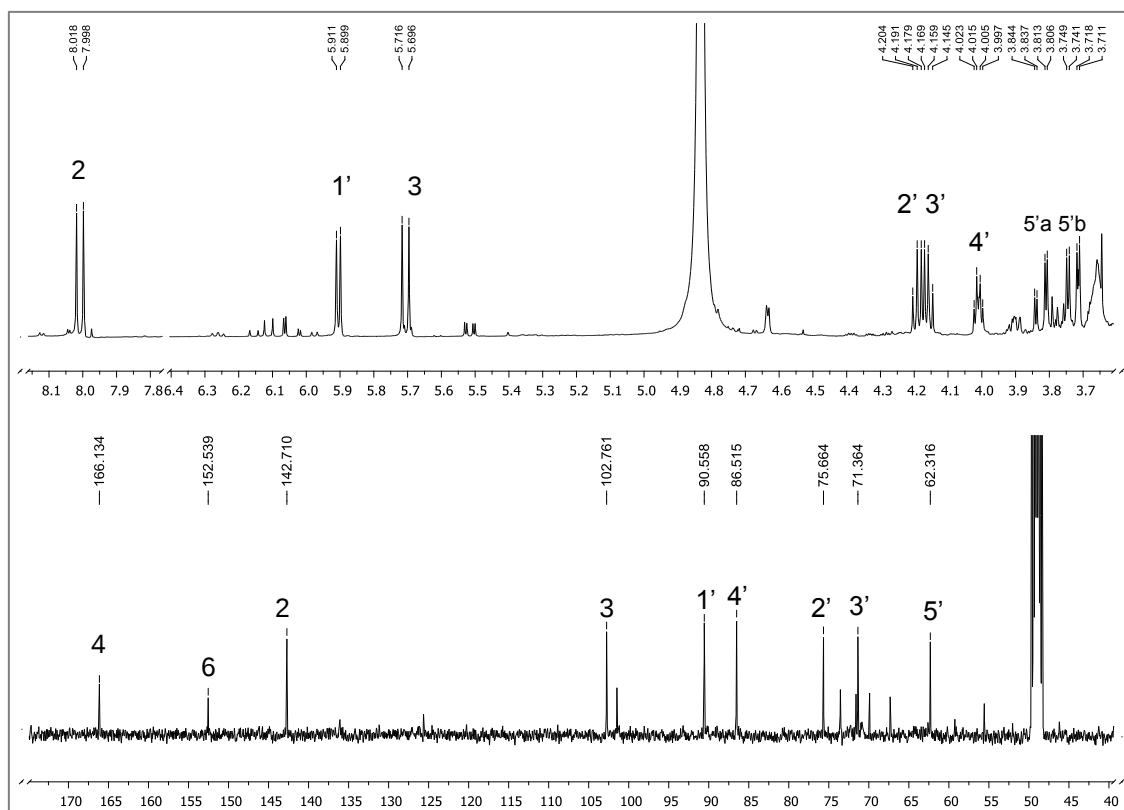


Figura 29) Experimentos de RMN ¹H y ¹³C de Uridina (7).

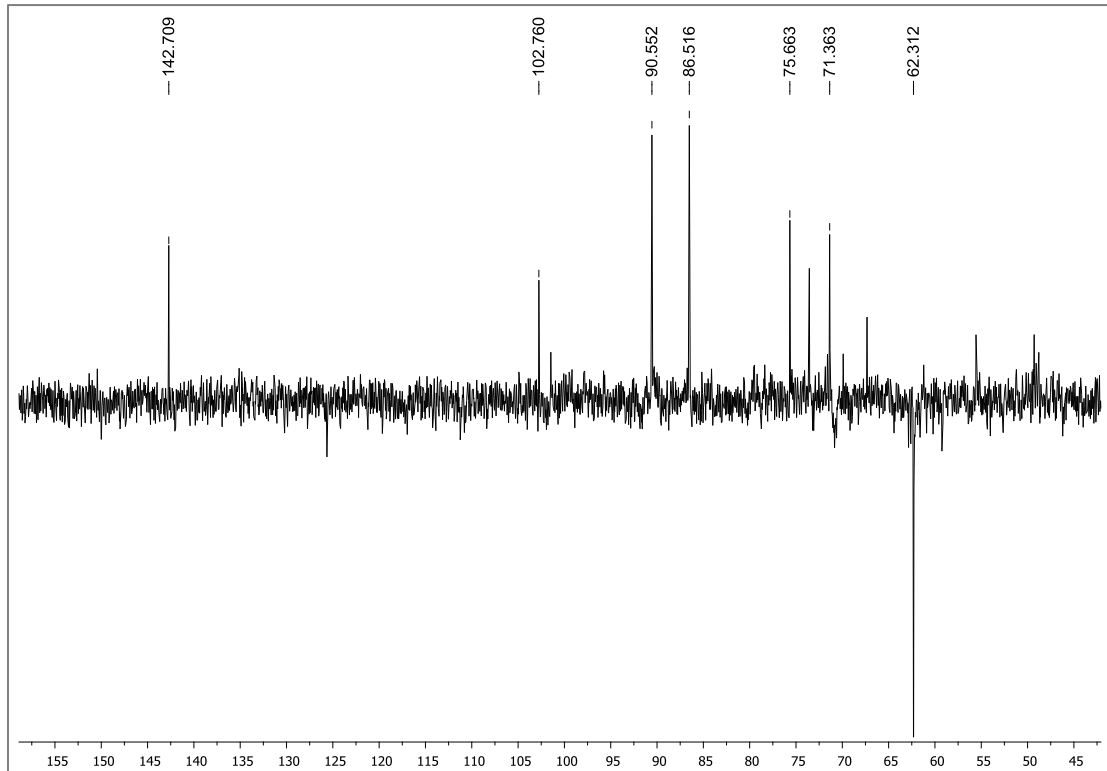


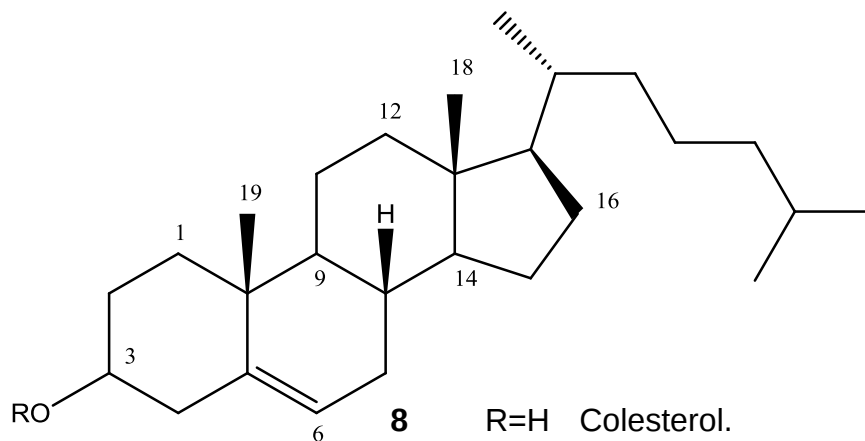
Figura 30) Experimentos DEPT de Uridina (7).

Tabla 13. Datos de RMN ^1H (400 MHz) y ^{13}C (100 MHz) del compuesto **7** determinados en CD_3OD (13.1) comparados con los reportados en la literatura determinados en CD_3OD (13.2).

1. Datos obtenidos en CD_3OD			2. Datos reportados en CD_3OD		
Posición	δ RMN ^1H	δ RMN ^{13}C	Posición	δ RMN ^1H	δ RMN ^{13}C
2	8.01 (d, 8)	142.7	2	8.00 (d, 8.2)	142.7
3	5.71 (d, 8)	102.8	3	5.68 (d, 8.2)	102.6
4	-----	166.1	4	-----	166.2
6	-----	152.5	6	-----	152.5
1'	5.90 (d, 4.8)	90.6	1'	5.89 (d, 4.6)	90.7
2'	4.19 (t, 5.0)	75.7	2'	4.17 (t, 5.0)	75.7
3'	4.16 (t, 5.0)	71.4	3'	4.13 (t, 5.0)	71.3
4'	4.01 (dd, 3.0, 7.5)	86.5	4'	3.99 (dd, 3.0, 7.5)	86.4
5'	3.82 (dd, 2.8, 12)	62.3	5'	3.81 (d, 5.0, 11.5)	62.3
	3.73 (dd, 3.2, 12.4)			3.72 (d, 3.0, 11.5)	

Los nucleósidos constan de una purina o pirimidina y un azúcar cíclico, con mayor frecuencia D-ribosa o 2-desoxi-D-ribosa, ligada a través de un enlace covalente beta *N*-glicosídico, ya sea con el N-9 de una purina o al N-1 de una pirimidina. Los nucleósidos se denominan ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos dependiendo si el azúcar es una ribosa o una 2-desoxirribosa [80]. Los nucleósidos, son componentes vitales de todas las células vivientes y están relacionadas con varios procesos biológicos. Gran parte de la enorme cantidad de trabajos realizados en la química de nucleósidos proviene de la posibilidad de que los análogos de nucleósidos naturales podrían tener utilidad como antibióticos, antiparasitarios, antivirales y antitumorales. Bergmann (1950) aisló por primera vez tres nucleósidos poco usuales: espongotimidina (Ara-T), espongouridina (Ara-U) y espongossina de la esponja marina *Cryptotethya crypta* [81]. El nucleósido uridina es un derivado importante de la pirimidina denominada uracilo; este tipo de compuesto es biológicamente fundamental para la vida en general, ya que son parte de los ácidos nucleicos [82]. La uridina consta de D-ribosa ligada, por medio de un enlace beta *N*-glicosídico, al N-1 de una pirimidina [80]. La espongouridina fue aislada por primera vez de una esponja marina y posteriormente obtenida de la gorgonia *Eunicella cavollini*. Algunos análogos de la espongouridina se han evaluado contra el virus de *Eunicella cavollini* *Herpes simplex* [81].

7.7 Colesterol (8).



8.1 R=Ac Acetato del colesterol.

De las fracciones *TcFMP4b* y *TcFMP5b* reunidas y después de acetilar, se obtuvo un sólido cristalino de color blanco. Su espectro de RMN ^1H , mostró además de la señal simple aguda correspondiente al metilo del acetato; las señales correspondientes a los protones de los metilos C_{18} y C_{19} se observaron como señales simples agudas a δ 0.67 y 1.01, respectivamente. La señal correspondiente al protón del metino base del acetato (H_3) en el anillo A, se observó como una señal ancha a 4.60 ppm; así también, la presencia de una señal doble ancha a 5.37 ppm correspondiente al protón vinílico en C_6 ; y 4 señales en 5.22 (m), 5.15 (m) y 4.71 (s) y 4.66 (d) debidas a protones vinílicos (**Fig. 31**). Los datos anteriores son indicativos de una mezcla de acetatos de esteroides, la cual fue analizada por CG/EM.

Rubinstein *et al.* (1979) [83], Pouchert y Behnke (1993) [84] y Sánchez-Nava (2006 y 2010) [66,85] reportan para el acetato de colesterol (**8.1**) tres señales dobles a campo alto en 0.91, 0.87 y 0.86 ppm con constates de acoplamiento (J) de 6.8 Hz, que se deben a los metilos secundarios C_{21} , C_{26} y C_{27} , respectivamente. En el presente trabajo se observaron señales para los metilos secundarios C_{21} , C_{26} y C_{27} , en δ 0.90, 0.87 y 0.85 ppm; así como, las señales correspondientes a los protones H_3 , H_6 , H_{18} y H_{19} antes mencionados, por consiguiente, uno de los compuestos presentes en esta fracción es el colesterol **8**, el cual fue caracterizado como su correspondiente derivado

acetilado **8.1**. En el espectro de masas se observó un ion de m/z 368 que está de acuerdo a la formula molecular $C_{27}H_{44}$, es decir 60 unidades de masa menos comparados con el compuesto acetilado, debido a la pérdida del grupo acetato como ácido acético $[M - CH_3COOH]^+$.

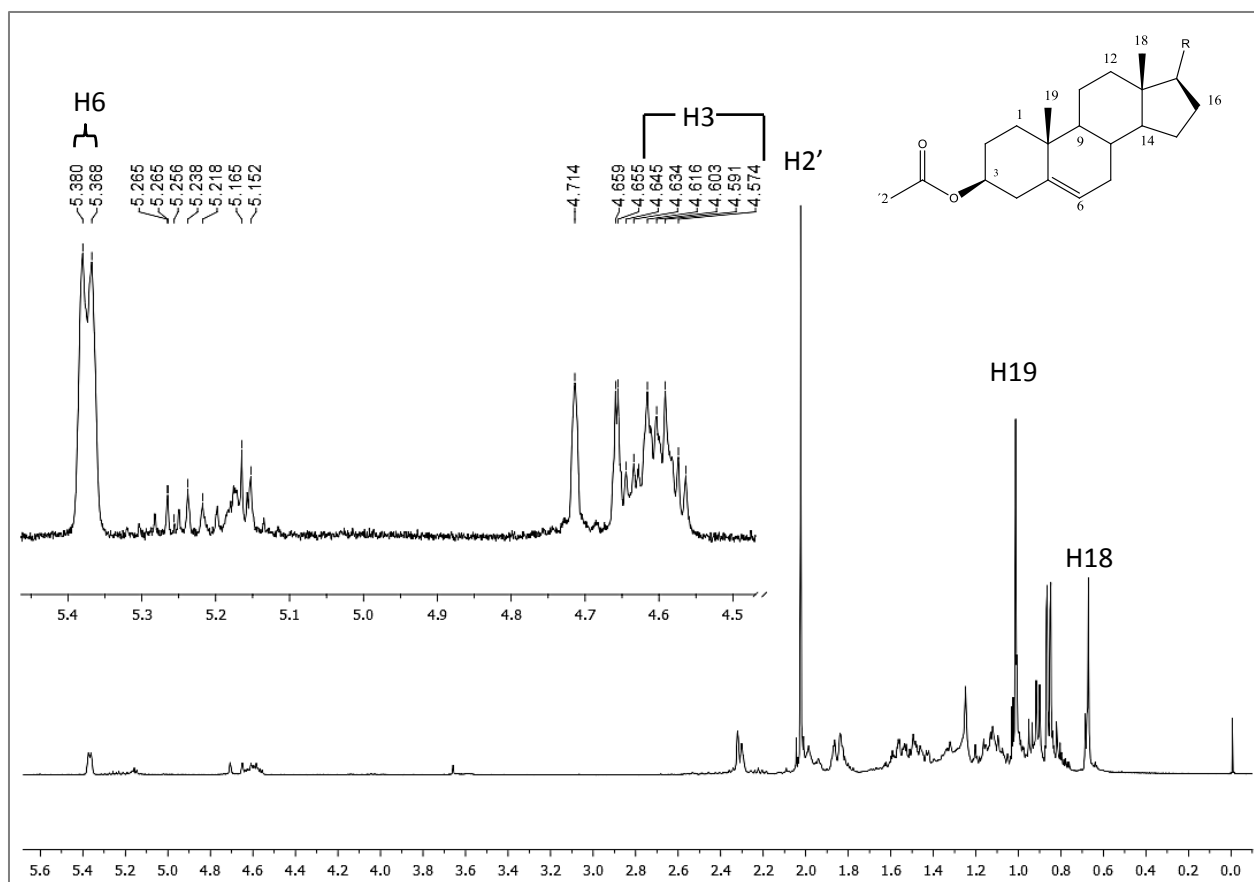
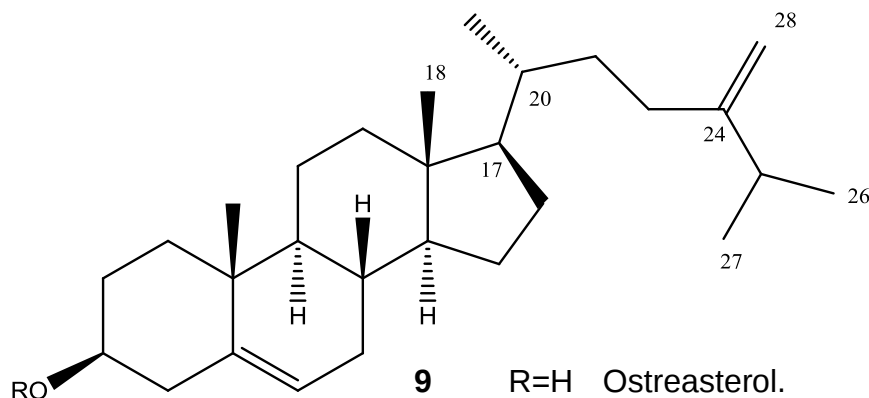


Figura 31). Espectro de RMN^1H de la fracción de esteroides obtenidos y acetilados de los diferentes extractos poco polares.

7.8 Ostreasterol (9).



9.1 R=Ac Acetato de ostreasterol.

Massey y Djerassi (1979) [86], Lo *et al* (2001) [87], Giner *et al* (2002) [88], Lu *et al* (2004) [90] y Sánchez-Nava (2006 y 2010) [66,85] reportan para el 24-metilen-colesterol u ostreasterol (**9**) desplazamientos químicos a 1.03 y 1.02 ppm para los metilos 26 y 27, además de dos señales simples anchas en 4.7 y 4.6 ppm debidas al doble enlace $\Delta^{24(28)}$. En la figura **32** se pueden observar dos señales en 4.72 y 4.66 ppm que pueden deberse a la presencia de un doble enlace terminal; también se observan dos señales dobles en 1.03 y 1.02 ppm, las cuales pueden atribuirse a los protones de C₂₆ y C₂₇. De esta manera se estableció que otro de los compuestos presentes en la mezcla de esteroides, es el ostreasterol o 24-metilen-colesta-5,24(28)-dien-3 β -ol **9**, caracterizado como su correspondiente derivado acetilado **9.1**. El espectro de masas también está de acuerdo, aunque no presentó el ión molecular, este presentó un pico de $m/z = 380$, que corresponde a $M^+ - 60$ unidades de masa debido a la pérdida del ácido acético, así como los picos en m/z 365 (18%), 296 (40%), 281(16%), 253 (20%) y 213 (22%).

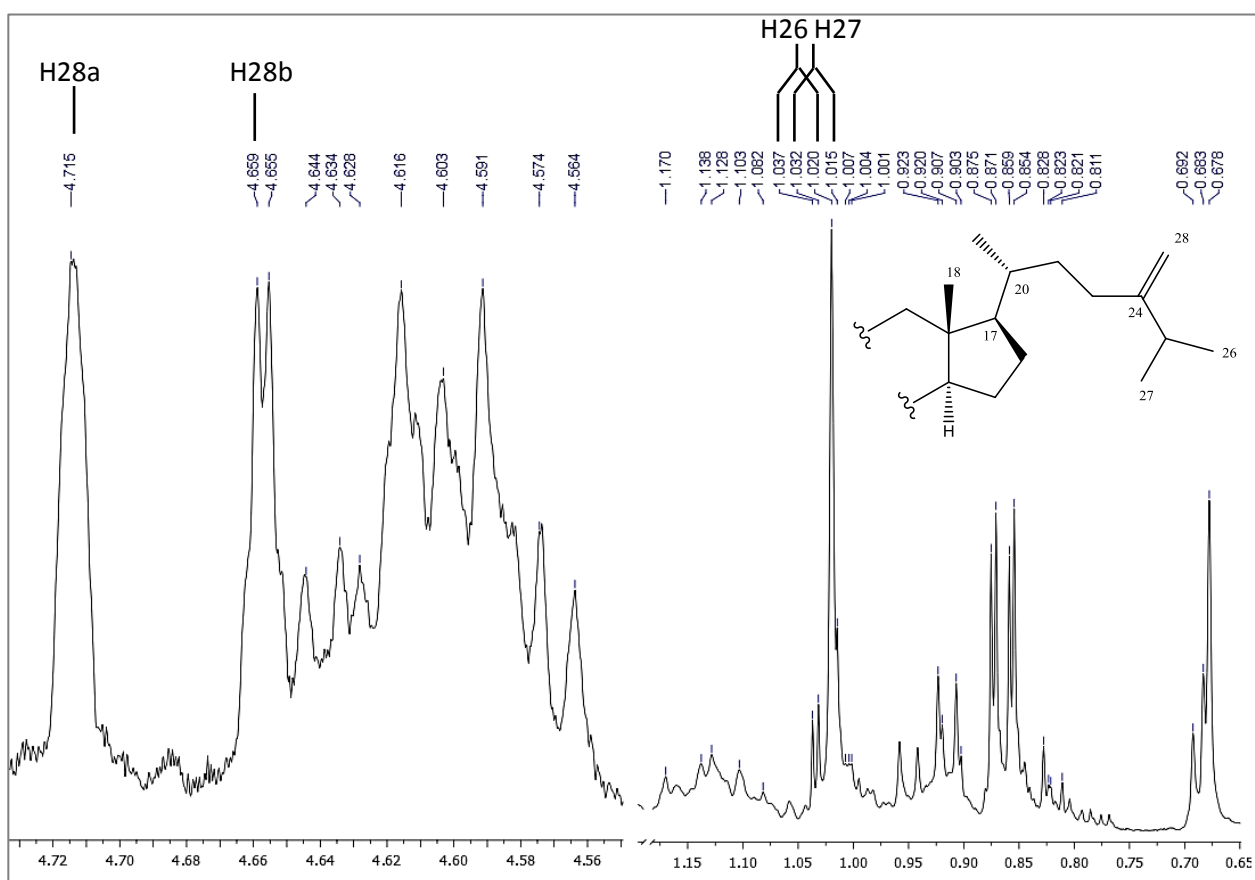
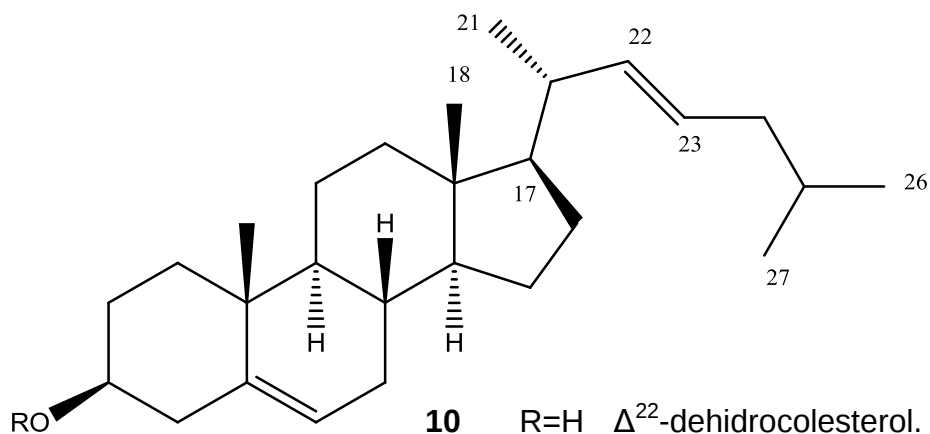


Figura 32) Expansión de las señales de ostreasterol, del espectro de RMN^1H de la fracción de esteroides.

7.9 Δ^{22} -dehidrocolesterol (10).



10.1 R=Ac Acetato de Δ^{22} -dehidrocolesterol.

Las señales adicionales múltiples en 5.23 (m), 5.16 (m) pueden ser asignadas a protones vinílicos los cuales se localizan en las posiciones 22, 23 de la cadena lateral; además de las señales adicionales a campo alto entre 0.82 y 1.01 ppm, las cuales se pueden asignar a protones de metilos secundarios. Sánchez-Nava (2006) [85] reporta para el acetato del Δ^{22} -dehidrocolesterol (**10.1**) desplazamientos químicos para los protones C₁₈, C₁₉, C₂₁, C₂₆ y C₂₇ (**Fig. 33**), los cuales coinciden con los observados en el espectro de esta fracción, además de la señal δ 5.23 que corresponden a los protones vinílicos H₂₃ y H₂₂. Como en los casos anteriores el espectro de masas no presentó el ión molecular, y solo se observa el ion de $m/z = 366$, que corresponde a M⁺ -60 unidades de masa debido a la pérdida de ácido acético. Por lo que otro de los componentes de esta fracción fue identificado como el Δ^{22} -dehidrocolesterol (**10**) identificado como su correspondiente derivado acetilado **10.1**.

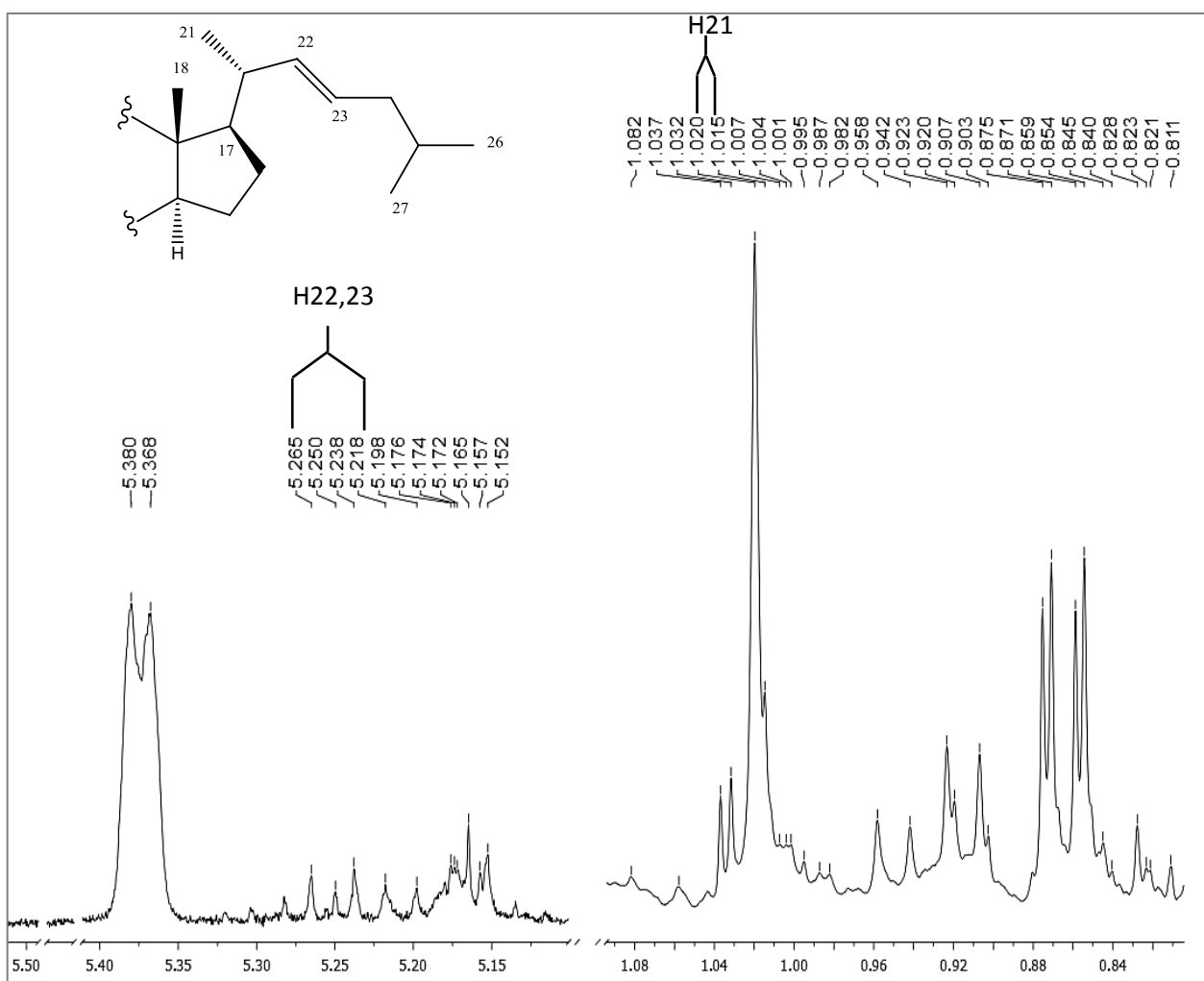
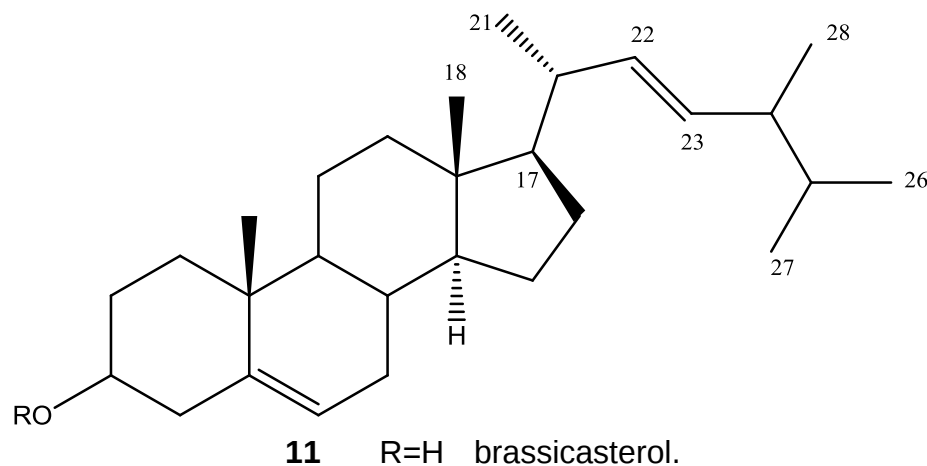


Figura 33) Expansión de las señales de Δ^{22} -dehidrocolesterol, del espectro de RMN^1H de la fracción de esteroides.

7.10 Brassicasterol (11).



11.1 R=Ac Acetato de brassicasterol.

Rubinstein *et al.* (1979) [83], Akihisa *et al.* (1987) [90], Giner *et al.* (2002) [88], Suckla *et al.* (2004) [91] y Sánchez-Nava (2010) [66] reportan para el brassicasterol o 24-metilcolesta-5,22-dien-3 β -ol (**11**) una señal doble en 0.92 ppm que es asignada a los protones del metilo 28 (H₂₈) en la posición 24 de la cadena lateral y otra señal en 5.16 ppm para los protones vinílicos H₂₂ y H₂₃; además de un desplazamiento a campo alto de los protones de metilos secundarios H₂₆ y H₂₇ (**Fig. 34**). Como en los casos anteriores se observó el ion M⁺ -60 unidades de masa, debido a la pérdida de ácido acético a partir del ion molecular; así mismo se observan picos en *m/z* 365, 352, 282, 255 y 213, similarmente a los reportados por Santalova *et al.* (92) para los compuestos **10** y **11**.

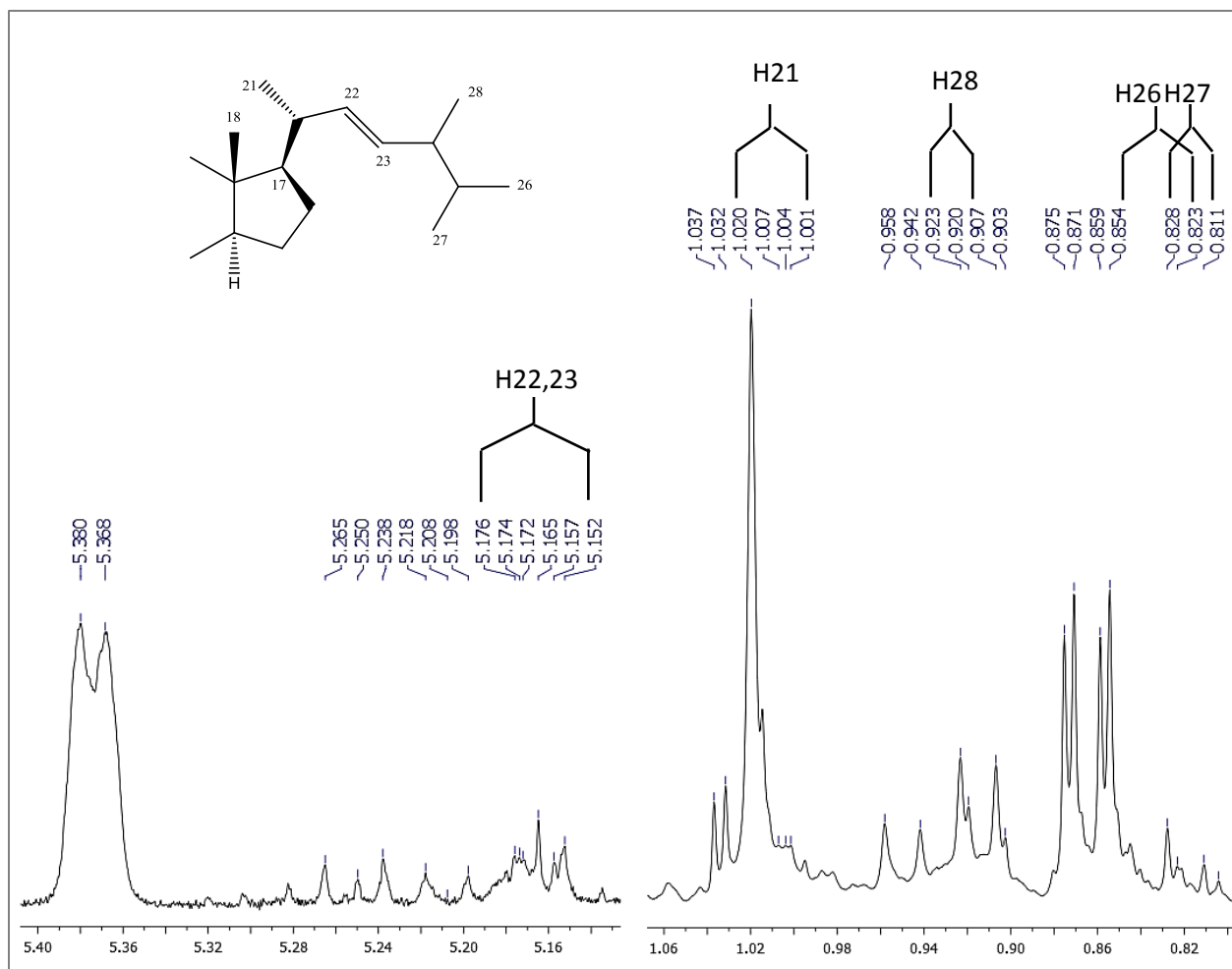
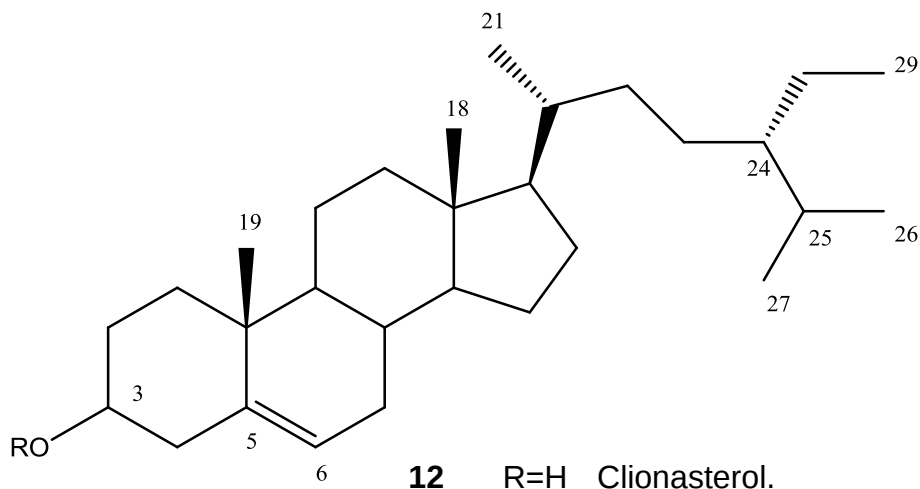


Figura 34) Expansión de las señales de brassicasterol, del espectro de RMN¹H de la fracción de esteroides.

7.11 Clionasterol (12).



12.1 R=Ac Acetato de clionasterol.

En los espectros de RMN¹H de 500 MHz de la mezcla de esteroides acetilados se observa claramente la presencia del grupo acetoxi (AcO-) en C₃ en 2.02 ppm, además de señales sobresalientes de los protones H₁₈ y H₁₉ en 0.69 y 1.01 respectivamente, así como la señal correspondiente al protón H₃, que se encuentra a campo más bajo como una señal ancha a 4.62 ppm; así también se observa la presencia de la señal de los protones vinílicos en la posición 5,6 que corresponde a una señal múltiple en la región de 5.24 ppm. Se pudo observar la señal triple con constante de acoplamiento (J) de 6.8 Hz en 0.86 ppm correspondiente a C₂₉, además de las señales dobles en 0.92 (J = 6.7 Hz), 0.85 (J = 6.7 Hz) y 0.86 (J = 6.7) que se deben a los metilos secundarios C₂₁, C₂₆ y C₂₇ (**Fig. 35**).

En la **figura 36** se pueden observar que en el espectro de RMN¹³C las señales para C₂₀, C₂₁, C₂₃ y C₂₄ se encuentran en 36.19, 18.72, 26.31 y 46.07, respectivamente, en tanto que las señales de los carbonos C₂₅, C₂₆, C₂₇ y C₂₈ se encuentran en 28.82, 18.89, 19.31 y 22.82, muy similares con los reportados por Vázquez-Maldonado 1998, para la esponja *Xestospongia subtriangularis* [9]

El espectro de masas está de acuerdo, ya que se observa el pico de $m/z = 396$, que corresponde a M⁺ -60 unidades de masa para el compuesto acetilado.

Lo anterior indica la presencia de clionasterol **12** como un componente más de la mezcla de esteroides.

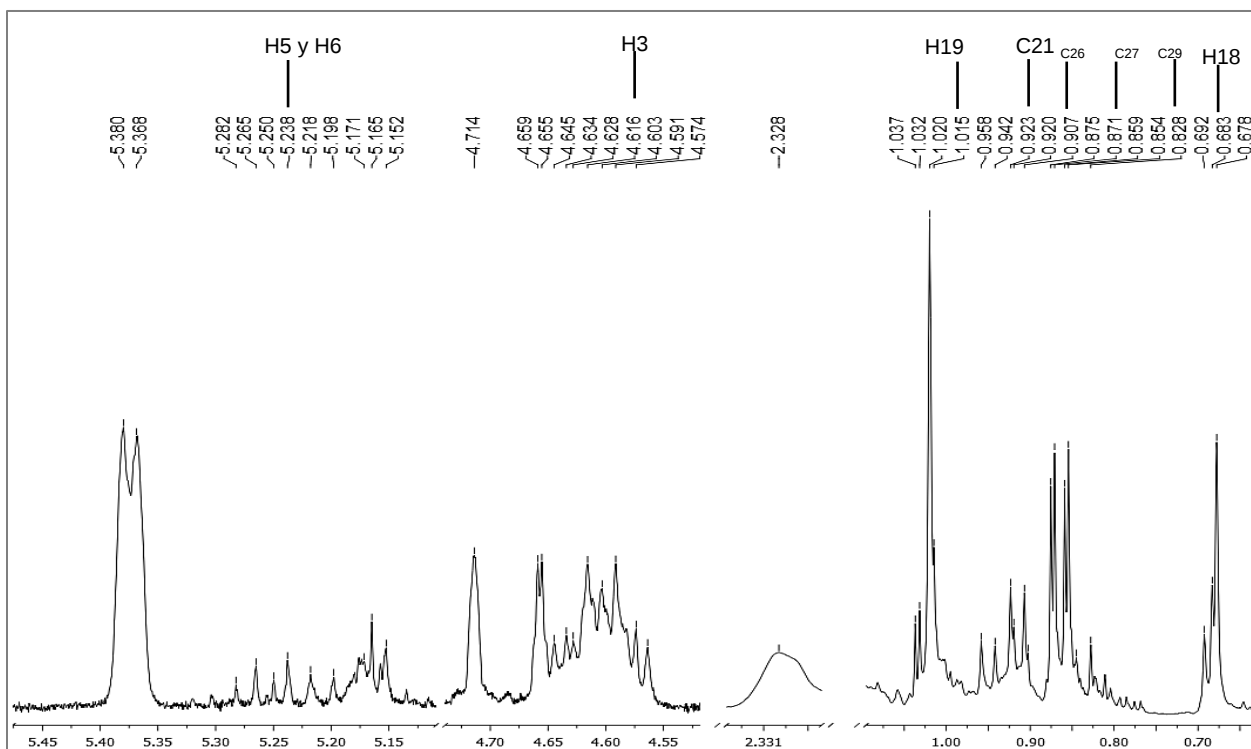


Figura 35. Expansión de las señales de clionasterol, del espectro de RMN^1H de la fracción de esteroides.

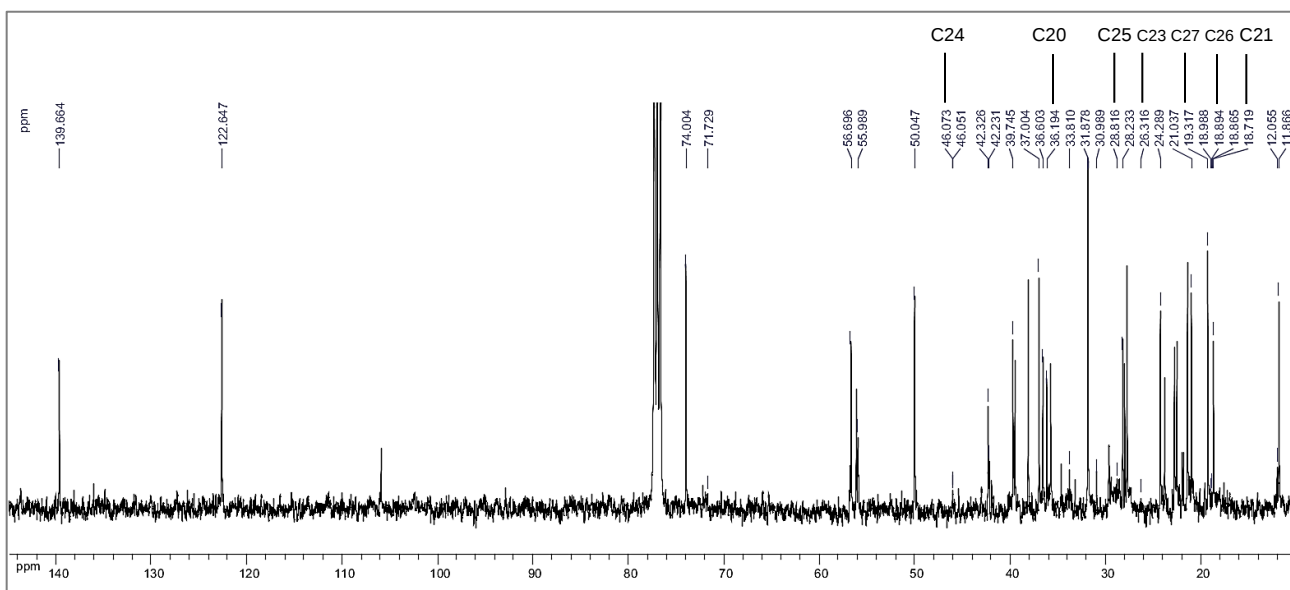


Figura 36. Espectro de RMN^{13}C de la fracción de esteroides.

7.12 Derivados 5,8-Epidioxi de los esteroides (13-17)

El espectro de RMN¹H de la fracción TcFMP5cba' de los compuestos **13-17** (Fig. 37), presenta cierta similitud con los compuestos **8-12**, pero como diferencia significativa se observan 2 señales dobles en la región de protones vinílicos correspondientes a un sistema AB, centradas en δ 6.21 y 6.51 con una constante de acoplamiento de 8.5 Hz, originadas por los protones vinílicos sobre C₆ y C₇, las cuales son características de 5,8-epidioxi-esteroides.

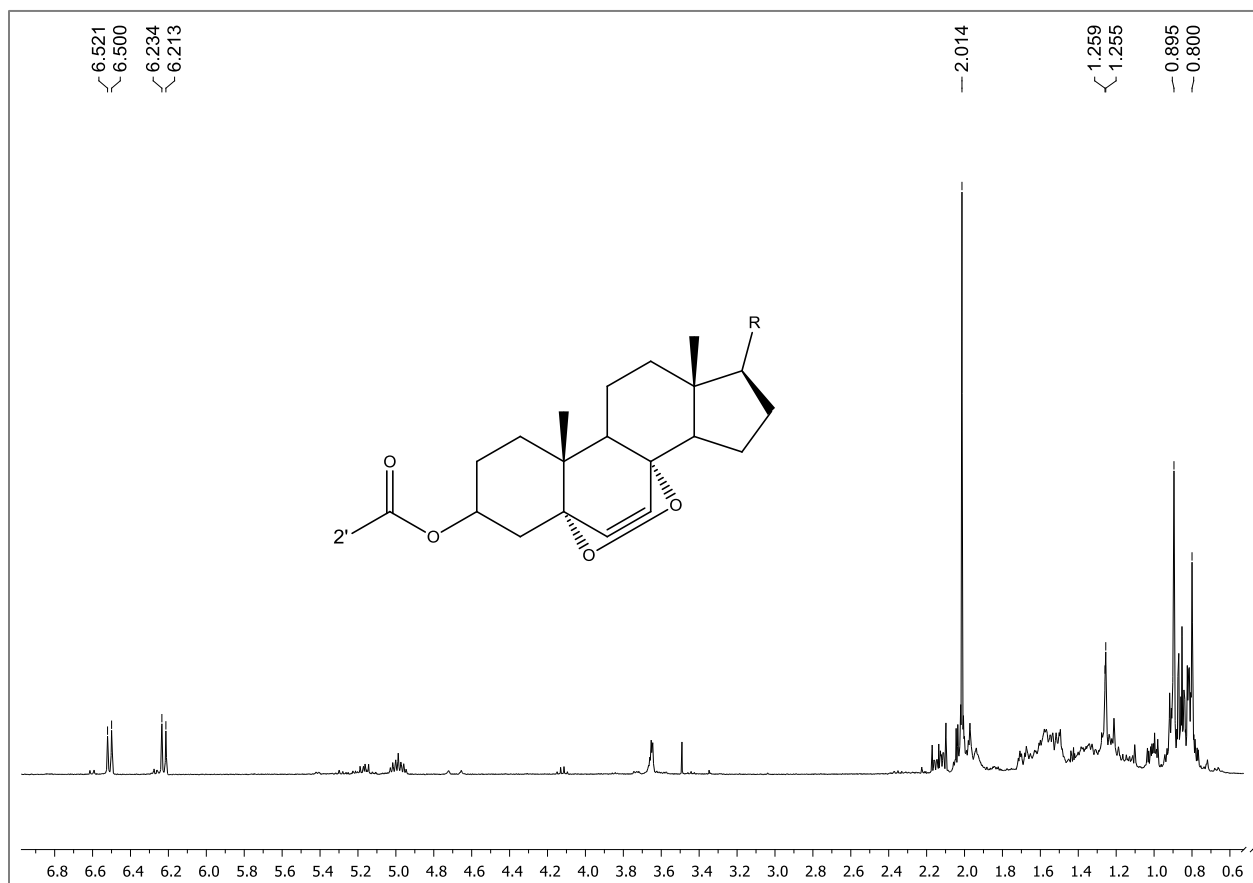
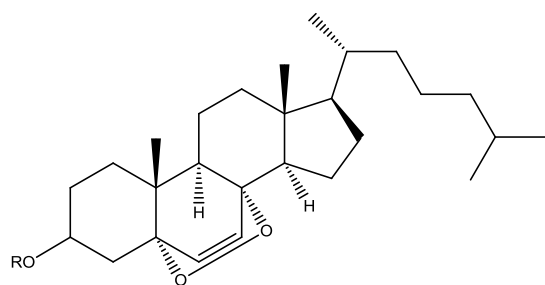
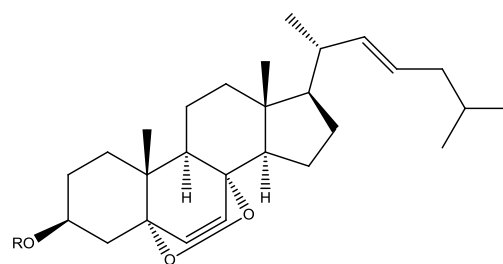


Figura 37. Expansión del espectro de RMN¹H de la fracción de epidioxi



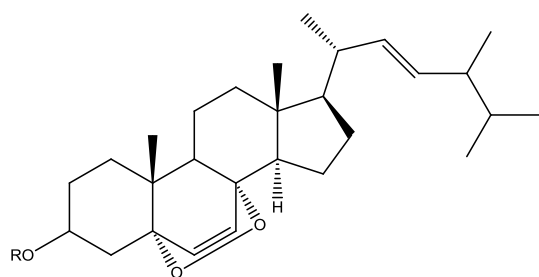
5α,8α-epidioxi-colesta-6-en-3β-ol

13



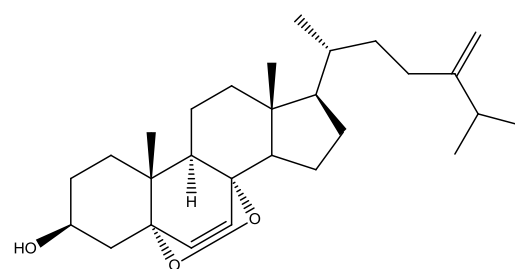
5α,8α-epidioxi-colesta-6,22-dien-3β-ol

14



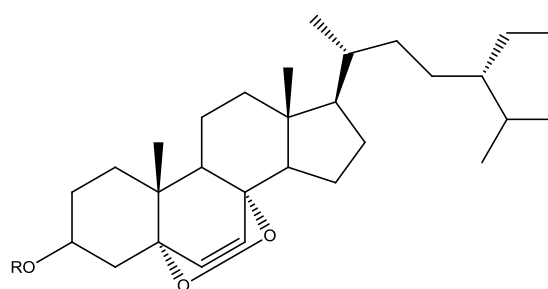
5α,8α-epidioxi-24-metilcolesta-6-en-3β-ol

15



5α,8α-epidioxi-ergosta-6,24(28)-dien-3β-ol

16



5α,8α-epidioxi-24α-etilcolesta-6-en-3-ol

17

Los esteroides se encuentran ampliamente distribuidos en los reinos animal y vegetal y se les encuentra en forma libre, como ésteres o como glicósidos. Todos contienen un núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno y presentan un grupo hidroxilo en el carbono 3. La mayoría de esteroides naturales poseen una cadena lateral de 8 a 10 átomos de carbono y un enlace doble en el C-5 (**Fig. 38**).

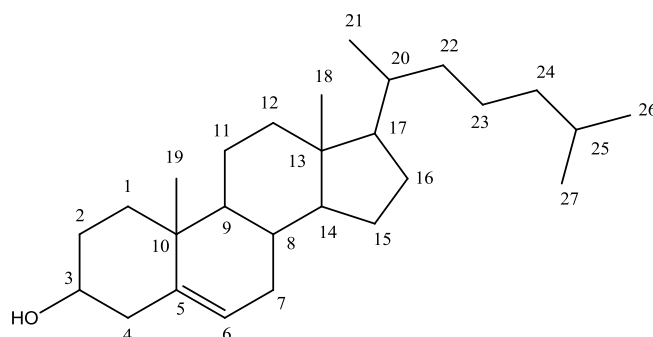


Figura 38) Numeración de la estructura fundamental de los esteroides.

En los animales superiores (incluido el hombre) se encuentra principalmente el colesterol, el cual es un constituyente importante de membranas y precursor de sustancias fisiológicamente importantes (como hormonas, ácidos biliares, vitamina D, etc.).

En las plantas superiores se encuentran principalmente los denominados fitosteroides: β -sitosterol, campesterol y estigmasterol (**Fig. 39**). Un esteroide menos común es el fucosterol, el cual es el esteroide principal de muchas algas pardas y también se le ha detectado en el coco (*Cocos nucifera* L.). En los hongos y levaduras se encuentra principalmente el ergosterol.

En cambio, los animales inferiores (principalmente invertebrados marinos tales como esponjas, estrellas, corales, etc.) y ciertas plantas filogenéticamente poco evolucionadas (P.ej. algunas Orchidaceae) contienen mezclas complejas de esteroides con modificaciones estructurales variadas tales como núcleos sin el carbono 4 (A-nor-esteroides), sin el carbono 19 (19-nor-esteroides), con varias insaturaciones, con cadenas

laterales con más de 10 carbonos, con anillos ciclopropano, con enlaces alénicos, etc.; en la figura 39 se presentan algunos ejemplos.

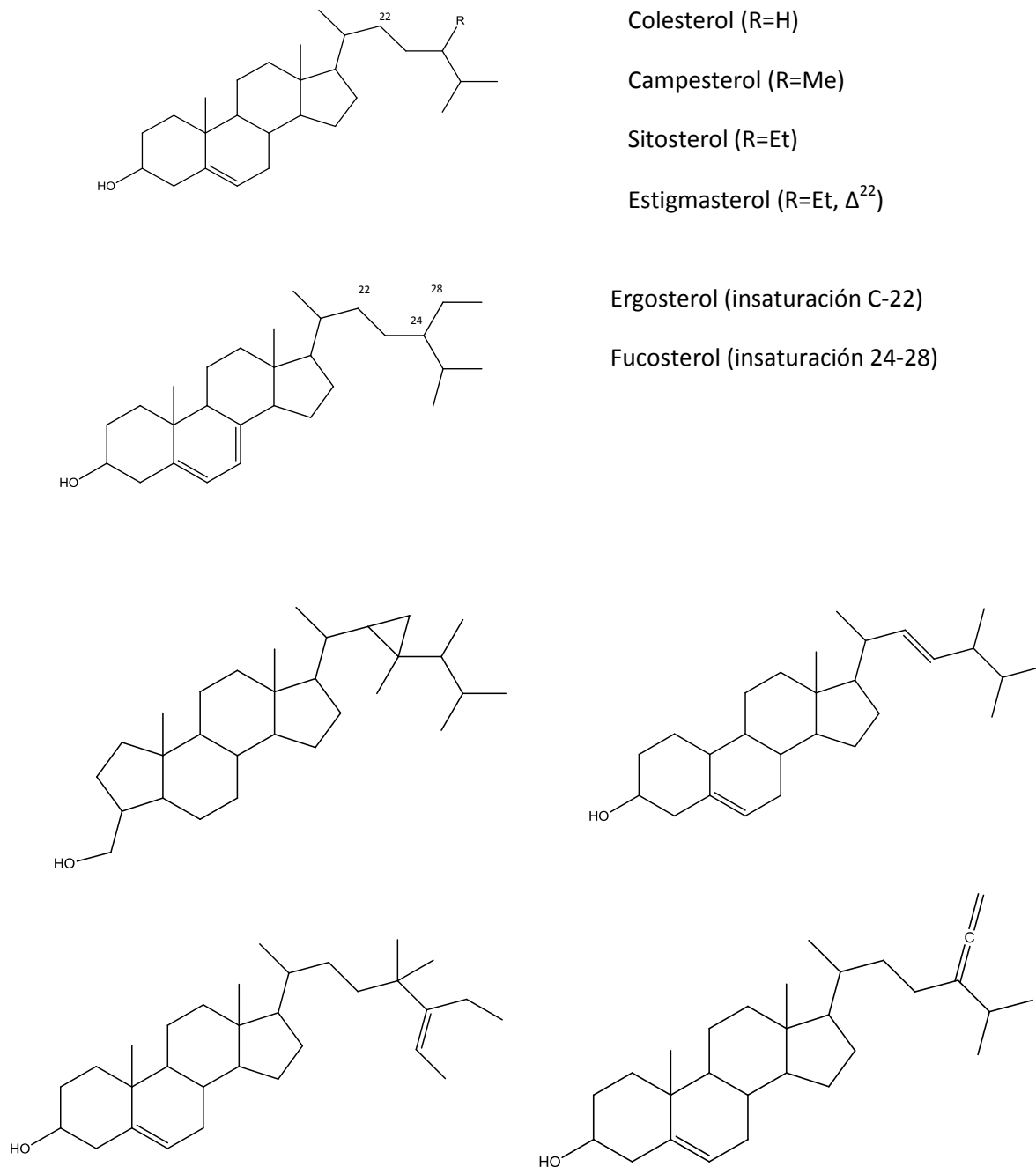
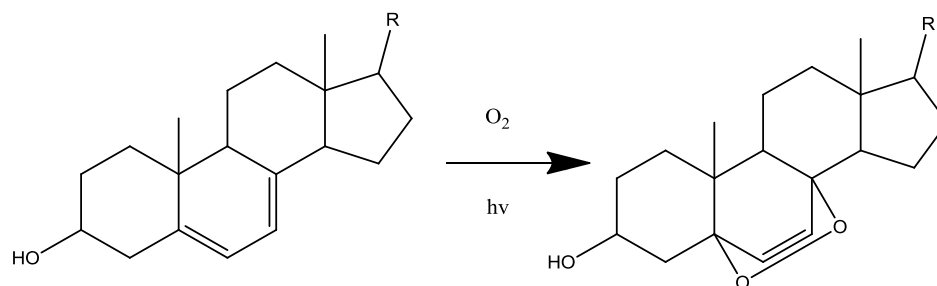


Figura 39) Algunos ejemplos de esteroides naturales. Las últimas cuatro estructuras corresponden a esteroides de origen marino.

La gran mayoría de esteroides conocidos son sólidos cristalinos incoloros, solubles en disolventes orgánicos poco polares (cloroformo, benceno, etc.), menos solubles en alcoholes de bajo peso molecular, y que se funden sin descomponerse (en forma libre o esterificada). Presentan además actividad óptica debido a los carbonos asimétricos que poseen. Los esteroides se pueden recrystalizar en metanol caliente o en la mezcla metanol-tetrahidrofurano 10:1, formando cristales en forma de agujas brillantes incoloras. Los que presentan dobles enlaces conjugados son de color amarillento y tienden a descomponerse por acción de la luz como por ejemplo los esteroides con insaturaciones en C-5 y C-7, los cuales son susceptibles a la reacción de oxidación fotoquímica para producir los dioxisteroides [93]:



7.13 Ésteres metílicos de ácidos grasos (18-33).

De las fracciones menos polares (Hexano y Acetato de etilo) obtenidas mediante partición líquido/líquido de los extractos crudos de esponja, se obtuvieron mezclas de ácidos y ésteres metílicos de ácidos grasos las cuales fueron analizadas por CG-EM y RMN¹H (**Fig 40 y 41**). Las fracciones fueron caracterizadas como una mezcla de ésteres metílicos saturados e insaturados, por medio de su espectro de RMN¹H (400 MHz). En el espectro se observó una señal múltiple a 5.3 ppm, debido a la presencia de protones vinílicos (-CH=CH-), además de una señal simple aguda a 3.66 ppm que corresponde a los protones del metilo del grupo éster (O=C-OCH₃) (**Fig. 41**). La presencia de la cadena alifática -(CH₂)_n- y el metilo terminal -CH₃, dan lugar a una señal simple y otra señal triple distorsionada en 1.25 y 0.88 ppm, respectivamente. El análisis de la mezcla de ésteres metílicos por CG-EM condujo a la identificación de 16 ácidos grasos. Los resultados de los análisis por CG-EM de estas mezclas permitieron identificar ácidos grasos lineales y ramificados de 14 a 21 átomos de carbono (C₁₄ a C₂₁), tanto saturados como insaturados.

Los ésteres metílicos de los ácidos saturados son: etradecanoico (**18**), 4,8,12-trimetil-tridecanoico (**19**), hexadecanoico (**21**), heptadecanoico (**24**), 14-metil-hexadecanoico (**26**), octadecanoico (**28**), nonadecanoico (**30**), eicosanoico (**31**), heneicosanoico (**33**), así como el ácido n-hexadecanoico (**23**).

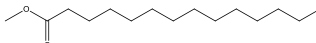
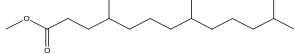
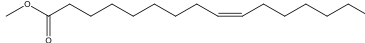
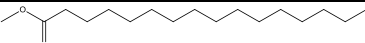
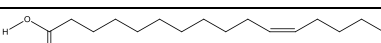
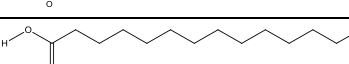
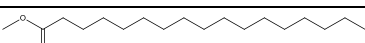
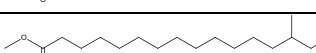
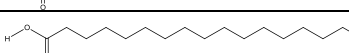
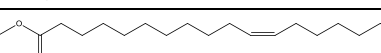
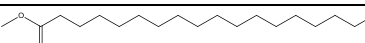
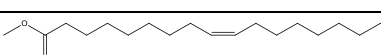
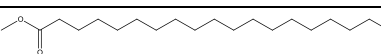
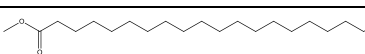
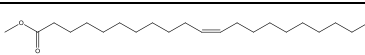
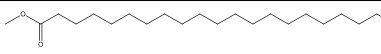
Los ésteres metílicos de los ácidos insaturados: Δ^9 -hexadecenoico (**20**), Δ^{11} -octadecenoico (**27**), Δ^{11} -eicosenoico (**32**) y los ácidos libres Δ^{11} -hexadecenoico (**22**) y Δ^9 -octadecenoico (**29**).

Los ésteres metílicos de ácidos grasos presentan un patrón de fragmentación característico en espectrometría de masas en el que se observan iones correspondientes a fragmentos hidrocarbonados de tipo alquilo C_nH_{2n+1} (*m/z*: 29, 43, 57, 71, ...), acompañados de fragmentos olefínicos C_nH_{2n-1} (*m/z* 27, 41, 55, 69, ...) y otra serie de fragmentos con oxígeno, de los cuales el más característico es el pico de *m/z* 74 y que corresponde al pico base (100%) en el espectro, seguido del pico de *m/z* 87 que corresponde al ión [CH₂-CH₂-COOMe]⁺.

The image displays the ^1H NMR spectrum of 1-octene, with the chemical structure CCCCCCCC=C shown above the spectrum. The x-axis represents the chemical shift in ppm, ranging from 0 to 8. The spectrum features several distinct signals: a sharp peak at approximately 7.2 ppm (labeled 7.259 ppm), a multiplet between 5.0 and 6.5 ppm (labeled 5.363, 5.352, 5.347 ppm), a sharp peak at 3.655 ppm, a complex multiplet between 1.5 and 2.5 ppm (labeled 2.365, 2.371, 2.379, 2.385, 2.391, 2.397, 2.403, 2.409, 2.415, 2.421, 2.427, 2.433, 2.439, 2.445, 2.451, 2.457, 2.463, 2.469, 2.475, 2.481, 2.487, 2.493, 2.499, 2.505, 2.511, 2.517, 2.523, 2.529, 2.535, 2.541, 2.547, 2.553, 2.559, 2.565, 2.571, 2.577, 2.583, 2.589, 2.595, 2.601, 2.607, 2.613, 2.619, 2.625, 2.631, 2.637, 2.643, 2.649, 2.655, 2.661, 2.667, 2.673, 2.679, 2.685, 2.691, 2.697, 2.703, 2.709, 2.715, 2.721, 2.727, 2.733, 2.739, 2.745, 2.751, 2.757, 2.763, 2.769, 2.775, 2.781, 2.787, 2.793, 2.799, 2.805, 2.811, 2.817, 2.823, 2.829, 2.835, 2.841, 2.847, 2.853, 2.859, 2.865, 2.871, 2.877, 2.883, 2.889, 2.895, 2.901, 2.907, 2.913, 2.919, 2.925, 2.931, 2.937, 2.943, 2.949, 2.955, 2.961, 2.967, 2.973, 2.979, 2.985, 2.991, 2.997, 3.003, 3.009, 3.015, 3.021, 3.027, 3.033, 3.039, 3.045, 3.051, 3.057, 3.063, 3.069, 3.075, 3.081, 3.087, 3.093, 3.099, 3.105, 3.111, 3.117, 3.123, 3.129, 3.135, 3.141, 3.147, 3.153, 3.159, 3.165, 3.171, 3.177, 3.183, 3.189, 3.195, 3.201, 3.207, 3.213, 3.219, 3.225, 3.231, 3.237, 3.243, 3.249, 3.255, 3.261, 3.267, 3.273, 3.279, 3.285, 3.291, 3.297, 3.303, 3.309, 3.315, 3.321, 3.327, 3.333, 3.339, 3.345, 3.351, 3.357, 3.363, 3.369, 3.375, 3.381, 3.387, 3.393, 3.399, 3.405, 3.411, 3.417, 3.423, 3.429, 3.435, 3.441, 3.447, 3.453, 3.459, 3.465, 3.471, 3.477, 3.483, 3.489, 3.495, 3.501, 3.507, 3.513, 3.519, 3.525, 3.531, 3.537, 3.543, 3.549, 3.555, 3.561, 3.567, 3.573, 3.579, 3.585, 3.591, 3.597, 3.603, 3.609, 3.615, 3.621, 3.627, 3.633, 3.639, 3.645, 3.651, 3.657, 3.663, 3.669, 3.675, 3.681, 3.687, 3.693, 3.699, 3.705, 3.711, 3.717, 3.723, 3.729, 3.735, 3.741, 3.747, 3.753, 3.759, 3.765, 3.771, 3.777, 3.783, 3.789, 3.795, 3.801, 3.807, 3.813, 3.819, 3.825, 3.831, 3.837, 3.843, 3.849, 3.855, 3.861, 3.867, 3.873, 3.879, 3.885, 3.891, 3.897, 3.903, 3.909, 3.915, 3.921, 3.927, 3.933, 3.939, 3.945, 3.951, 3.957, 3.963, 3.969, 3.975, 3.981, 3.987, 3.993, 3.999, 4.005, 4.011, 4.017, 4.023, 4.029, 4.035, 4.041, 4.047, 4.053, 4.059, 4.065, 4.071, 4.077, 4.083, 4.089, 4.095, 4.101, 4.107, 4.113, 4.119, 4.125, 4.131, 4.137, 4.143, 4.149, 4.155, 4.161, 4.167, 4.173, 4.179, 4.185, 4.191, 4.197, 4.203, 4.209, 4.215, 4.221, 4.227, 4.233, 4.239, 4.245, 4.251, 4.257, 4.263, 4.269, 4.275, 4.281, 4.287, 4.293, 4.299, 4.305, 4.311, 4.317, 4.323, 4.329, 4.335, 4.341, 4.347, 4.353, 4.359, 4.365, 4.371, 4.377, 4.383, 4.389, 4.395, 4.401, 4.407, 4.413, 4.419, 4.425, 4.431, 4.437, 4.443, 4.449, 4.455, 4.461, 4.467, 4.473, 4.479, 4.485, 4.491, 4.497, 4.503, 4.509, 4.515, 4.521, 4.527, 4.533, 4.539, 4.545, 4.551, 4.557, 4.563, 4.569, 4.575, 4.581, 4.587, 4.593, 4.599, 4.605, 4.611, 4.617, 4.623, 4.629, 4.635, 4.641, 4.647, 4.653, 4.659, 4.665, 4.671, 4.677, 4.683, 4.689, 4.695, 4.701, 4.707, 4.713, 4.719, 4.725, 4.731, 4.737, 4.743, 4.749, 4.755, 4.761, 4.767, 4.773, 4.779, 4.785, 4.791, 4.797, 4.803, 4.809, 4.815, 4.821, 4.827, 4.833, 4.839, 4.845, 4.851, 4.857, 4.863, 4.869, 4.875, 4.881, 4.887, 4.893, 4.899, 4.905, 4.911, 4.917, 4.923, 4.929, 4.935, 4.941, 4.947, 4.953, 4.959, 4.965, 4.971, 4.977, 4.983, 4.989, 4.995, 5.001, 5.007, 5.013, 5.019, 5.025, 5.031, 5.037, 5.043, 5.049, 5.055, 5.061, 5.067, 5.073, 5.079, 5.085, 5.091, 5.097, 5.103, 5.109, 5.115, 5.121, 5.127, 5.133, 5.139, 5.145, 5.151, 5.157, 5.163, 5.169, 5.175, 5.181, 5.187, 5.193, 5.199, 5.205, 5.211, 5.217, 5.223, 5.229, 5.235, 5.241, 5.247, 5.253, 5.259, 5.265, 5.271, 5.277, 5.283, 5.289, 5.295, 5.301, 5.307, 5.313, 5.319, 5.325, 5.331, 5.337, 5.343, 5.349, 5.355, 5.361, 5.367, 5.373, 5.379, 5.385, 5.391, 5.397, 5.403, 5.409, 5.415, 5.421, 5.427, 5.433, 5.439, 5.445, 5.451, 5.457, 5.463, 5.469, 5.475, 5.481, 5.487, 5.493, 5.499, 5.505, 5.511, 5.517, 5.523, 5.529, 5.535, 5.541, 5.547, 5.553, 5.559, 5.565, 5.571, 5.577, 5.583, 5.589, 5.595, 5.601, 5.607, 5.613, 5.619, 5.625, 5.631, 5.637, 5.643, 5.649, 5.655, 5.661, 5.667, 5.673, 5.679, 5.685, 5.691, 5.697, 5.703, 5.709, 5.715,

72

Tabla 14. Ácidos y ésteres metílicos de los ácidos grasos de *T. californiana* de la fracción de Hexano identificadas por CG/EM.

No. de estructura	Nombre	m/z	[M] ⁺	Estructura	HTcBB
18	Tetradecanoico	72	242		TR = 23.23
19	4,8,12-Trimetil-tridecanoico	87	270		TR = 24
20	Δ^9 -Hexadecenoico	55	268		TR = 25.93
21	Hexadecanoico	74	270		TR = 26.2
22	Ácido Δ^{11} -hexadecenoico	55	236		TR = 26.57
23	Ácido n-hexadecanoico	43	256		TR = 26.86 TR = 26.91
24	Heptadecanoico	74	284		TR = 27.08
25	14-metil-hexadecanoico	74	284		TR = 27.21
26	Ácido heptadecanoico	73	270		TR = 27.7 TR = 27.82
27	Δ^{11} -octadecenoico	55	296		TR = 28.7
28	Octadecanoico	74	298		TR = 28.94
29	Ácido Δ^9 -octadecenoico	55	264		TR = 29.31
30	Nonadecanoico	74	312		TR = 29.73 TR = 30.18
31	Eicosanoico	74	326		TR = 30.89
32	Δ^{11} -Eicosenoico	55	324		TR = 31.11
33	Heneicosanoico	74	340		TR = 32.12

Los ácidos grasos son los lípidos más simples y se caracterizan por tener una región hidrofílica (cabeza) y una región hidrofóbica (cola). Son utilizados como reserva energética y para la formación de las membranas lipoproteicas.

Los lípidos son las principales fuentes de energía metabólica y materiales esenciales para la formación de membranas celulares y de tejidos. Son muy importantes en los procesos fisiológicos y reproductivos de los animales marinos y reflejan las condiciones especiales bioquímicas y ecológicas del medio marino. La proporción relativa y la composición de los ácidos grasos en los organismos marinos son característicos de cada especie y del género, y también dependen de las

condiciones ambientales. El papel principal de los lípidos neutros, que en los organismos marinos se componen fundamentalmente de triglicéridos y ceras, es como reserva energética de ácidos grasos, destinados a la generación de energía (ATP) o para su incorporación en los fosfolípidos.

Los fosfolípidos son los componentes básicos para la bicapa lipídica de la membrana. Los ácidos grasos proporcionan el interior hidrofóbico de todas las membranas celulares, formando una barrera impermeable al agua y las moléculas polares y separando el contenido celular del medio extracelular. Los invertebrados marinos, especialmente esponjas, han demostrado ser una rica fuente de ácidos grasos poco comunes. Las esponjas son animales muy antiguos, con características estructurales especiales en las membranas de sus células, en particular, ácidos grasos, fosfolípidos y esteroides, ya que las interacciones fosfolípidos-esteroides, juegan un papel importante en las membranas celulares que han permitido su adaptación a entornos a menudo precarios [94].

8. CONCLUSIONES.

- El estudio de las fracciones más polares del extracto metanólico de *Tethya californiana* condujo al aislamiento de ácido sulfónico, taurina, además de tres betaínas que fueron identificadas como homarina, trigonelina y sulcatina, así como, el nucleósido uridina y un monosacárido, el alfa-metil-D-glucopiranosido. La identificación de los componentes aislados se llevó a cabo con base en sus datos espectroscópicos principalmente de RMN de ^1H y ^{13}C , y de las constantes de celda cristalina por cristalografía de rayos X en el caso de la taurina, así como, por comparación con datos reportados en la literatura.
- Hasta donde tenemos conocimiento, este es el primer reporte acerca del aislamiento de estos 6 compuestos para el género *Tethya*.
- El residuo insoluble del extracto metanólico de la esponja, se encuentra constituido principalmente por taurina, sílice y cloruro de sodio.
- De los extractos orgánicos poco polares, se obtuvieron mezclas de ácidos grasos, esteroides y epidioxi-esteroides, que se analizaron por CG-EM los cuales se identificaron como colesterol, ostreasterol, Δ^{22} -dehidrocolesterol, brassicasterol y clionasterol. Se identificaron mezclas de ácidos grasos C_{13} a C_{21} saturados e insaturados y sus correspondientes ésteres metílicos, los cuales fueron identificados por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.
- Algunos de los componentes aislados de los extractos menos polares de *Tethya californiana* están de acuerdo con estudios anteriores de la misma especie de esponja, mientras que aquellos aislados de los extractos polares no han sido reportados.

9. BIBLIOGRAFÍA.

1. Jiménez JC, Marfil M, Francesca AM, Cuevas C, Álvarez M, Albericio F. Productos naturales de origen marino. Investigación y Ciencia, 2007; 367:75-83.
2. [Http://www.itescam.edu.mx/principal/sylabus/fpdb/recursos/r48882.PDF](http://www.itescam.edu.mx/principal/sylabus/fpdb/recursos/r48882.PDF) fecha de consulta: 17-07-2012.
3. Harper MK, Bugni TS, Copp BR, Janes RD, Lindsay BS, Richardson AD, Schnabel PC, Tasdemir D, vanwagoner RM, Verbitski SM, Ireland CM. 2001. Introduction to the chemical ecology of marine natural products. En: Marine Chemical Ecology. Mcclintock JB, Baker BJ. (Ed.) United States of America: CRC Press. P 10-47.
4. De la Calle F. Fármacos de origen marino. Treballs de la SCB. 2007. 58: 141-155.
5. Proksch P. Detection of pharmacologically active natural products using ecology. Selected examples from indopacific marine invertebrates and sponge-derived fungi. Pure Appl. Chem. 2003, 75: 343–352.
6. Bhakuni DS. Rawat. Bioactive Marine Natural Products. Preface.
7. Pujol Martinez E. Esponjas, lejanos antepasados. Reportaje. "El faro" la luz de la ciencia. 6 Nov, 2008. VIII. No. 92.
8. Bergquist PR. Sponges. Hutchinson University library: Londres, 1978; 268 pages. En: Regalado EL., Laguna A. Las esponjas marinas como fuente de nuevas sustancias bioactivas. Cuba: Medio Ambiente y Desarrollo; Revista electrónica de la Agencia de Medio Ambiente. Año 10, No. 19. 2010.
9. Vázquez-Maldonado LE. Estudio químico-biológico de la esponja marina *Xestospongia subtriangularis* (Duchassaing 1850). Tesis. Instituto de Química, UNAM, D. F., México. 1998.
10. Fernández-Alamo MA. Rivas G. Niveles de organización en animales. 1ra edición, pp 44-47. 2007.
11. Bergquist PR. "Sponges". University of California Press. U.S.A. 1978.pp 268.
12. Barnes DR. "Invertebrate zoology". Saunders College Publishing. U.S.A. 1987. pp. 893.

13. Green KD. y Bakus G. "Taxonomic atlas of the benthic fauna of the Santa Maria Basin and Western Santa Barbara Channel" Vol. 2. "The Porifera". Santa Barbara Museum of Natural History. California, U.S.A. 1994, pp 1-13.
14. Rützler K. Feller C. Mangrove swamp communities. *Oceanus* 30. 1987. 4: 16-24. En: Regalado EL. Laguna A. Las esponjas marinas como fuente de nuevas sustancias bioactivas. Cuba: Medio Ambiente y Desarrollo; Revista electrónica de la Agencia de Medio Ambiente. Año 10, No. 19. 2010.
15. Wilkinson CR. Net primary productivity in coral reef sponges. *Science*. 1983. 219: 410-412. En: Regalado E. L. Laguna A. Las esponjas marinas como fuente de nuevas sustancias bioactivas. Cuba: Medio Ambiente y Desarrollo; Revista electrónica de la Agencia de Medio Ambiente. Año 10, No. 19. 2010.
16. Corredor JE. Wilkinson CR. Vicente V. P. Morrel J. M. Otero E. Nitrate release by Caribbean reef sponges. *Limnology and Oceanography*. 1988. 33 (1): 114-120. En: Regalado EL. Laguna A. Las esponjas marinas como fuente de nuevas sustancias bioactivas. Cuba: Medio Ambiente y Desarrollo; Revista electrónica de la Agencia de Medio Ambiente. Año 10, No. 19. 2010.
17. Thakur NL. Müller WEG. Biotechnological potential of marine sponges. *Current Science*. 2004. 86 (11): 1506-1512. En: Regalado E L. Laguna A. Las esponjas marinas como fuente de nuevas sustancias bioactivas. Cuba: Medio Ambiente y Desarrollo; Revista electrónica de la Agencia de Medio Ambiente. Año 10, No. 19. 2010.
18. Munro MHG. Blunt JW. Marine Literatura database (marinlit). University de Canterbury, New Zealand, 2009. En: Regalado EL. Laguna A. Las esponjas marinas como fuente de nuevas sustancias bioactivas. Cuba: Medio Ambiente y Desarrollo; Revista electrónica de la Agencia de Medio Ambiente. Año 10, No. 19. 2010.
19. Mayer AM. Rodriguez AD. Berlinck RG. Hamann MT. 2009. Marine pharmacology in 2005–6: Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune, and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica Acta* 1790:

- 283-308. En: Regalado EL., Laguna A. Las esponjas marinas como fuente de nuevas sustancias bioactivas. Cuba: Medio Ambiente y Desarrollo; Revista electrónica de la Agencia de Medio Ambiente. Año 10, No. 19. 2010.
20. Mayer AM. Rodriguez AD. Berlinck RG. Hamann MT. 2007. Marine pharmacology in 2003–4: Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune, and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action. *Comparative Biochemistry and Physiology, C: Comparative Pharmacology and Toxicology* 145: 553-581.
21. Jain R. Tiwari A. Sponges: An invertebrate of bioactive potential. *Current Science*. 2007. 93: 444-445. En: Regalado EL., Laguna A. Las esponjas marinas como fuente de nuevas sustancias bioactivas. Cuba: Medio Ambiente y Desarrollo; Revista electrónica de la Agencia de Medio Ambiente. Año 10, No. 19. 2010.
22. Mayer AMS. Hamann MT. Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune, and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action. *Comparative Biochemistry and Physiology, C: Comparative Pharmacology and Toxicology*. 2002. 140: 265-286. En: Regalado EL., Laguna A. Las esponjas marinas como fuente de nuevas sustancias bioactivas. Cuba: Medio Ambiente y Desarrollo; Revista electrónica de la Agencia de Medio Ambiente. Año 10, No. 19. 2010.
23. Duque C. Martínez A. y Peñuela G. Esteroles en esponja. *Revista Colombiana de Química*. 1983. Vol. 12 no. 1.
24. Henze M. Hoppe-Seyler's *Z. Physiol. Chem.* 1904. 41, 109. En: Duque C. Martínez A. y Peñuela G. Esteroles en esponja. *Revista Colombiana de Química*. 1983. Vol. 12 no. 1.
25. Henze M. Hoppe-Seyler's *Z. Physiol. Chem.* 1908. 55, 427. En: Duque C. Martínez A. y Peñuela G. Esteroles en esponja. *Revista Colombiana de Química*. 1983. Vol. 12 no. 1.

26. Dorée C. Biochem. J. 1909. 4, 72. En: Duque C. Martínez A. y Peñuela G. Esteroles en esponja. Revista Colombiana de Química. 1983. Vol. 12 no. 1.
27. Bergmann W. J. Mar. 1949. Res. 8, 137. En: Duque C. Martínez A. y Peñuela G. Esteroles en esponja. Revista Colombiana de Química. 1983. Vol. 12 no. 1.
28. Bergmann W. Sterols: Their structure and distribution in comparative biochemistry. Ed. By Florkin, M. and Masón, S. 1962. Vol. 3. New York. Academic Press. En: Duque C. Martínez A. y Peñuela G. Esteroles en esponja. Revista Colombiana de Química. 1983. Vol. 12 no. 1.
29. Brooks CJW. Steroids: Sterols and Bile Acids in Rodd's Chemistry of carbon compounds. Ed. By S. Coffey, Vol. IID. Elsevier Publishing Company 1970. En: Duque C. Martínez A. y Peñuela G. Esteroles en esponja. Revista Colombiana de Química. 1983. Vol. 12 no. 1.
30. Bergmann W. Feeney R.J. Contributions to the study of marine products. XXXII. The nucleosides of sponges. I. J. Org. Chem. 1951, 16, 981–987.
31. Privat de Garilhe M. De Rudder J. Effect of 2 arbinose nucleosides on the multiplication of herpes virus and vaccine in cell culture. C. R. Hebd. Seances Acad. Sci. 1964, 259, 2725–2728.
32. Liaaen-jensen S. Renstrom B. Ramdahl T. y Hallenstvet M. Carotenoids of Marine Sponges*, Biochemical Systematics and Ecology. 1962. Vol. 10, No. 2, pp. 167-174.
33. Weber J. Fuhrman F. Fuhrman G. and Harry S. Mosher. Isolation of Allantoin and adenosine from the marine sponge *Tethya aurantia*. Comp. Biochem. Physiol. 1981. Vol. 70B, pp. 799 to 801.
34. Sheikh Y. Djerassi C. Steroids from sponge. Volume 30, Issues 23-24. 1974. Pag 4095-4103.
35. Dasgupta A. Ayanogly E. High performance liquid chromatography and fast atom bombardment mass spectrometry of unusual branched and unsaturated phospholipid molecular species. Chemistry and Physics of lipids. Elsevier Scientific Publishers Ireland Ltd. 1987. 43. 101-111.
36. Smith G. Djerassi C. Phospholipids Studies of Marine Organisms: 14. Ether Lipids of the Sponge *Tethya aurantia*. LIPIDS. 1987. Vol 22. No. 4.

37. Yu Z. Lang G. Kajahn I. Schmaljohann R. and Imhoff JF. Scopilarides A y B, Cyclodepsipeptides from a Marine Sponge-Derived Fungus, *Scopulariopsis brevicalis*. Journal Natural Products. 2008. 7. 1052-1054.
38. Wiese J. Ohlendorf B. Blümel M. Schmaljohann R. and Imhoff JF. Phylogenetic Identification of Fungi Isolated from the Marine Sponge *Tethya aurantium* and Identification of Their Secondary Metabolites. Mar. Drugs 2011, 9, 561-585; doi: 10.3390/md9040561.
39. Bringmann G. Lang G. Bruhn T. Schäffler K. Steffens S. Schmaljohann R. Wiese J. Imhoff JF. Sorbifuranones aec, sorbicillinoid metabolites from *Penicillium* strains isolated from Mediterranean sponges. Tetrahedron 66 (2010) 9894-9901.
40. Zhou Y. Mándi A. New Australides from the Sponge-Associated Fungus *Aspergillus* sp. Eur. J. Org. Chem. 2011, 6009-6019.
41. Seo Y. Rho J. Cho K. Sim CJ. Shin J. Isolation of epidioxysteroids from a sponge of the genus *Tethya*. Bull Korean Chem. Soc. 1997; 18:631–5. En: Anna Aiello, Ernesto Fattorusso*, Marialuisa Menna. Steroids from sponges: Recent reports. Journal ELSEVIER Steroids 64 (1999) 687–714.
42. Minale L. Natural Product Chemistry of the Marine Sponges. Pure & appl Chem., Vol. 48, pp. 7—23. Pergamon Press, 1976. Printed in Great Britain.
43. Tanaka Y. Yamamoto A. Kagoshima Univ., Kagoshima, Japan. Nippon Suisan Gakkaishi. The structure of a new carotenoid tethyanine in sea sponge *Tethya amamensis*. 1984. 50(10), 1787. CODEN: NSUGAF ISSN: 0021-5392. Journal written in English. CAN 102:76015 AN 1985:76015 CAPLUS.
44. Tanaka Y. Katayama T. Fac. Fish., Univ. Kagoshima, Shimoarata, Japan. Biochemical studies on the carotenoids in Porifera. The structure of a new carotenoid, tethyatene in sea sponge, *Tethya amamensis*. Nippon Suisan Gakkaishi. 1977. 43(10), 1229-32. CODEN: NSUGAF ISSN: 0021-5392. Journal written in English. CAN 88:19017 AN 1978:19017 CAPLUS.
45. Tanaka Y. Yamamoto A. Katayama T. Fac. Fish., Univ. Kagoshima, Kagoshima, Japan. Biochemical studies on the carotenoids in Porifera. Two natural 7-cis aromatic carotenoids from sea sponge *Tethya amamensis*. Nippon Suisan

- Gakkaishi. 1982. 48(11), 1651-5. CODEN: NSUGAF ISSN: 0021-5392. Journal written in English. CAN 98:86548 AN 1983:86548 CAPLUS.
46. Shin-Ichi T. Kanazawa A. Sterols of the Sponge *Tethya amamensis*: Occurrence of (24E)-24-Ethylidenecholesta-5,7-dienol, (24E)-24-Propylidenecholesta-5,7-dienol, and (24Z)-24-Propylidenecholesta-5,7-dienol. LIPIDS.1983. Vol 18, No. 3.
47. Gómez P. Catálogo de la Colección Nacional del Phylum Porifera Gerardo Green. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM. Base de datos SNIB-CONABIO proyecto V005. México, D.F. 2003.
48. Zimmernan MP. Hoberg M. Cell Separation of *Tethya Aurantia*, an Analytical Study of Embryonic and Differentiated Sponge Cells. LIPIDS. 1990. Vol. 25. No. 7.
49. Sarà M. 1998. A biogeographic and evolutionary survey of the genus *Tethya* (Porifera, Demospongiae). In *Sponge sciences. multidisciplinary perspectives* (ed. Y. Watanabe and N. Fusetani), pp. 83–94. Tokyo: Springer-Verlag. En: Heim I. Nickel M. and Brümmer F. Phylogeny of the genus *Tethya* (Tethyidae: Hadromerida: Porifera): molecular and morphological aspects. J. Mar. Biol. Ass. U.K. 2007. 87, 1615–1627.
50. Sarà M. Family Tethyidae Gray 1848. In: *Systema Porifera: a guide to the classification of sponges* (ed. J.N.A. Hooper and R.W.M. van Soest). 2002. pp. 245–265. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers. En: Heim I. Nickel M. and Brümmer F. Phylogeny of the genus *Tethya* (Tethyidae: Hadromerida: Porifera): molecular and morphological aspects. J. Mar. Biol. Ass. U.K. 2007. 87, 1615–1627.
51. Van Soest RWM. Boury-Esnault N., Janussen D. & Hooper JNA. World Porifera database. 2005. Available online at <http://www.vliz.be/vmdcdata/porifera>. Consulted on 27-02-2007. En: Heim I. Nickel M. and Brümmer F. Phylogeny of the genus *Tethya* (Tethyidae: Hadromerida: Porifera): molecular and morphological aspects. J. Mar. Biol. Ass. U.K. 2007. 87, 1615–1627.
52. Nickel M. Bullinger E. & Beckmann F. Functional morphology of *Tethya* species (Porifera): 2. Three-dimensional morphometrics on spicules and skeleton superstructures of *T. Minuta*. Zoomorphology. 2006a.125, 225–239. En: Heim I. Nickel M. and Brümmer F. Phylogeny of the genus *Tethya* (Tethyidae: Hadromerida:

- Porifera): molecular and morphological aspects. J. Mar. Biol. Ass. U.K. 2007. 87, 1615–1627.
53. Heim I. Nickel M. Picton B. & Brümmer F. 2007c. Description and molecular phylogeny of *Tethya hibernica* sp. Nov. (Porifera, Demospongiae) from Northern Ireland with remarks on the European species of the genus *Tethya*. Zootaxa, 1595, 1–15. En: Heim I. Nickel M. and Brümmer F. Phylogeny of the genus *Tethya* (Tethyidae: Hadromerida: Porifera): molecular and morphological aspects. J. Mar. Biol. Ass. U.K. 2007. 87, 1615–1627.
54. Sarà M. 1997. Species diversity and ecology of the genus *Tethya* (Porifera, Demospongiae) in coral reefs. Proceedings of the 8th International Coral Reef Symposium, 2, 1383–1386. En: Heim I. Nickel M. and Brümmer F. Phylogeny of the genus *Tethya* (Tethyidae: Hadromerida: Porifera): molecular and morphological aspects. J. Mar. Biol. Ass. U.K. (2007), 87, 1615–1627.
55. [Http://www.marinespecies.org/porifera/porifera.php?P=taxdetails&id=170942](http://www.marinespecies.org/porifera/porifera.php?P=taxdetails&id=170942), consultado el 13-12-2011.
56. Sarà M. Gómez P. Sarà A. 2001. East Pacific Mexican *Tethya* (Porifera: Demospongiae) with descriptions of five new species. Proceedings of the Biological Society of Washington 114 (3): 794-821.
57. Laubenfels M.W. de 1932. The marine and fresh water sponges of California. Proceedings of the United States national Museum 81, art. 4:1-140.
58. Sara M. Corriero G. Redescription of *Tethya californiana* de Laubenfels as a valid species for *Tethya aurantia* var. *Californiana* (Porifera, Demospongiae). Ophelia. 1993. 37(3):203-211.
59. Tasdemir D. Topaloglu B. Marine natural products from the Turkish sponge *Agelas oroides* that inhibit the enoyl reductases from *Plasmodium falciparum*, *Mycobacterium tuberculosis* and *Escherichia coli*. Bioorganic & Medicinal Chemistry 15 (2007) 6834–6845.
60. R. F. BURTON. The composition of animal cells: solutes contributing to osmotic pressure and charge balance. Comp. Biochem. Physiol. 1983. Vol. 76B, No. 4, pp. 663-671.

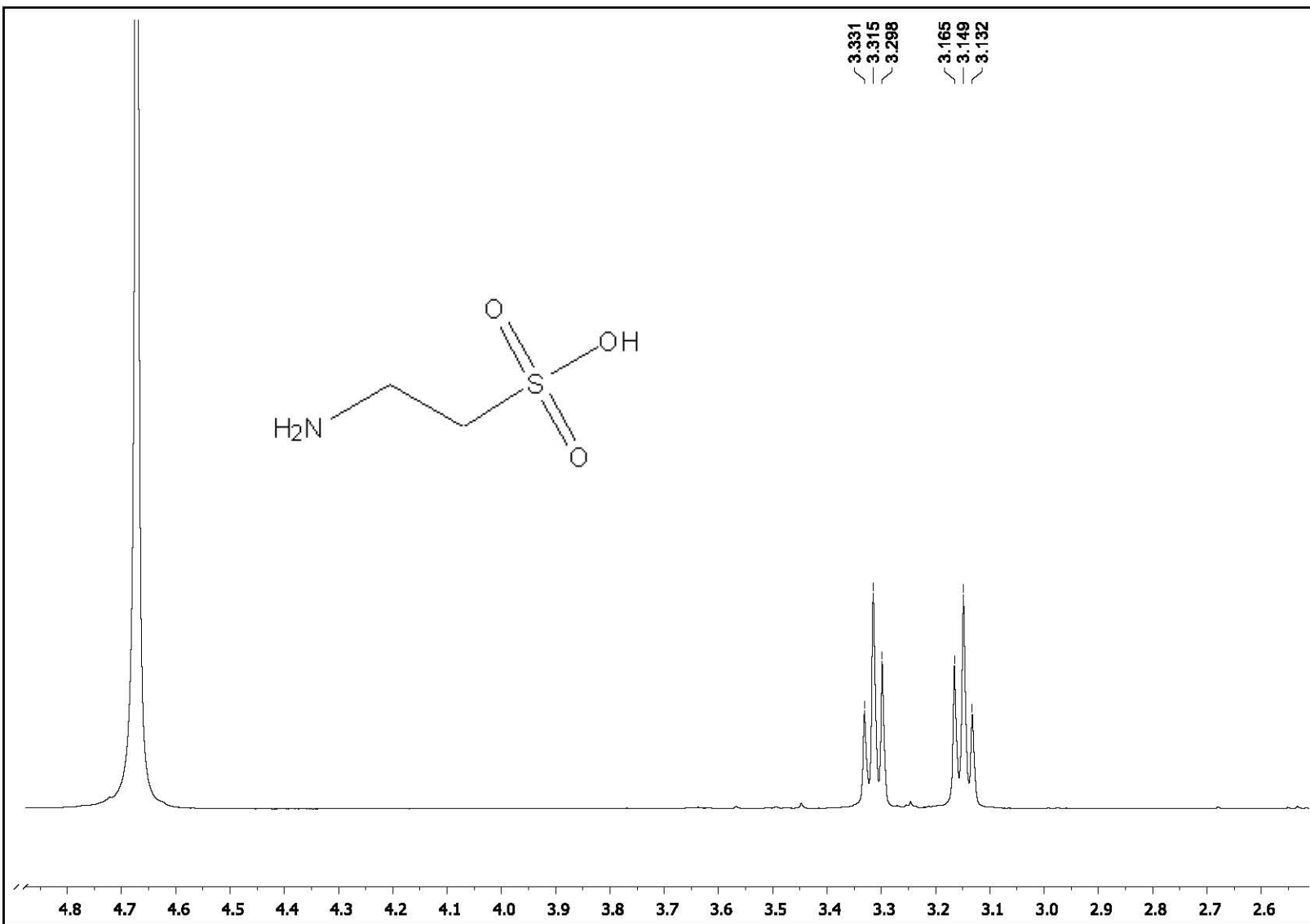
61. Berking S. Taurine found to stabilize the larval state. Roux's Arch Dev Biol (1988) 197:321-327.
62. Pan C. Prentice H. Beneficial effect of taurine on hypoxia- and glutamate-induced endoplasmic reticulum stress pathways in primary neuronal culture. Amino Acids. 2012. 43:845–855.
63. Francois T. Evi V. Anthony T. Homarine, a common metabolite in edible Mediterranean molluscs: occurrence, spectral data and revision of a related structure. Laboratory of pharmacognosy, University of Athens. Natural Product Letters. 2001. Vol. 15(6), pp. 411-418.
64. Thorsten J. Gabriele M. Anthony D. Manzacidin D. An unprecedented secondary metabolite from the "Living Fossil" Sponge *Astrosclera willeyana*. Tetrahedron Letters, Vol. 38, No. 22, pp. 3883-3884, 1997.
65. Ann A. Ernesto F. Marialuisa M. And Teresa I. Sulcatin, a novel antiproliferative N-methylpyridinium alkaloid from the ascidian *Microcosmus vulgaris*. J. Nat. Prod. 2000, 63, 517 – 519.
66. Sánchez-Nava, A. T. "Aislamiento, Elucidación Estructural y Evaluación de la actividad Biológica de los Compuestos Provenientes de la Esponja Clona californiana (De Laubenfels, 1932)". Tesis, 2010, Instituto de Química, UNAM, DF, México.
67. Szafran M., Koput J. Dega-Szafran Z. Katruziak A. X-ray, mp2 and dft studies of the structure and vibrational spectra of homarinium chloride. Journal of Molecular Structure 700 (2004) 109–125.
68. Cafieri F. Fattorusso E. Taglialatela-Scafati O. Novel betaines from the marine sponge *Agelas dispar*. J. Nat. Prod. 1998. 61, 1171-1173
69. Gasteiger EL. Haake PC. Gergen JA. An investigation of the distribution and function of homarine (n-methyl picolinic acid). Annals of the New York Academy of Sciences. 1960.vol. 90, issue 3 Biochemistry, pp. 622-636.
70. Targett N.M. BISHOP SS. McConnell O.J. Antifouling agents against the benthic marine diatom, *Navicula salinicola* Homarine from the Gorgonians *Leptogorgia*

- virgulata* and L. Setacea and Analogs. Journal of Chemical Ecology Vol. 9, No. 7, 1983.
71. Anthoni U. Larsen C. Nielsen P. H. Hydrophilic organic nitrogenous metabolites from marine bryozoans. Comp. Biochem. Physiol. 1989. Vol. 92B, No. 4, pp. 711-713.
72. Hirano T. On the distribution and seasonal variation of homarine in some marine invertebrates. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries. 41 (10) 1047-1051(1975).
73. Affeld S., Wägele H. AVILA C. Distribution of homarine in some Opisthobranchia (Gastropoda: Mollusca). Bonner zoologische Beiträge. Band 55 (2006). Heft ¾. Seiten 181–190. Bonn, November 2007.
74. Shapo J. L. Moeller PD. Galloway S. B. Antimicrobial activity in the common seawhip, *leptogorgia virgulata* (cnidaria: gorgonaceae). Comparative Biochemistry and Physiology, Part B 148 (2007) 65–73.
75. Szafran M. Koput J. Dega-Szafran Z. Katrusiak A. X-ray, MP2 and DFT studies of the structure and vibrational spectra of trigonellinium chloride. Chemical Physics 289 (2003) 201–219.
76. Marchesini AM. Prado GG. Messiano GB. Chemical constituents of *Aristolochia giberti*. J. Braz. Chem. Soc., Vol. 20, No. 9, 1598-1608, 2009.
77. Jahn TGM. K6NLG*, Wright AD. Manzacidin D: An Unprecedented Secondary Metabolite from the "Living Fossil" Sponge *Astrosclera willeyana*. Tetrahedron.1997. Letters, Vol. 38, No. 22, pp. 3883-3884.
78. Aiello A. Fattorusso E. Menna M. Sulcatin, a novel antiproliferative n-methylpyridinium alkaloid from the ascidian *Microcosmus vulgaris*. J. Nat. Prod. 2000, 63, 517-519.
79. Hong REN, Qianqun GU, Chengbin CUI, and Weiming ZHU. The Cytotoxic Constituents from Marine-derived Streptomyces 3320[#]. Journal of Ocean University of China (oceanic and Coastal Sea Research). ISSN 1672-5182, January 30, 2006, Vol. 5, No1, pp 75-81.
80. Murray RK. Mayers PA. Harper bioquímica ilustrada. 14a edición. Capítulo 35 pp 419-426.

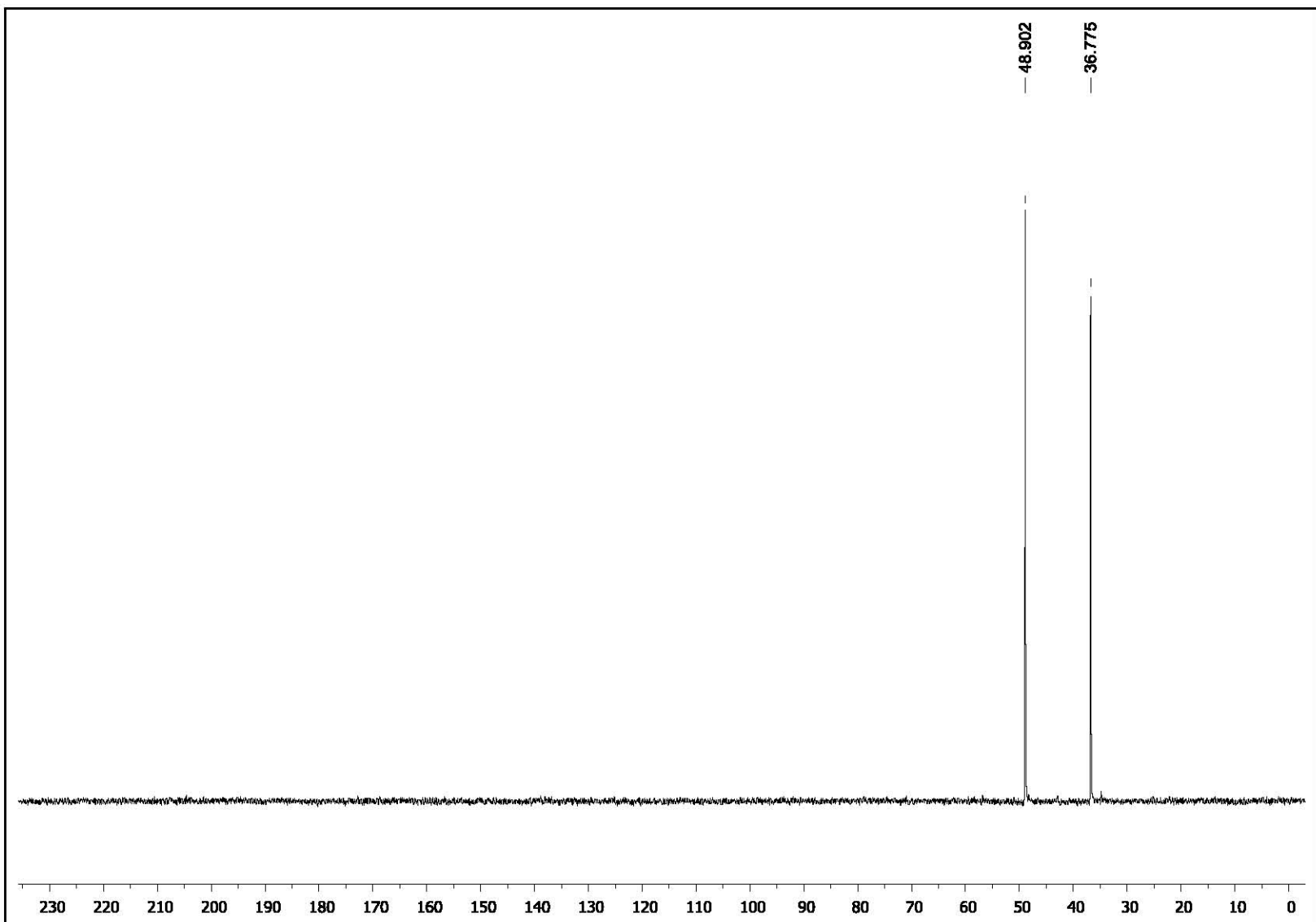
81. Bhakuni D.S. Rawat D.S. Bioactive marine natural products. Bioactive Marine Nucleosides. PP 209- 228.
82. Espinoza-Vazquez A. Negrón-Silva G. E. Electrochemical impedance evaluation of uracil and thymine pyrimidine derivatives and its nucleosides compounds as a non-toxic corrosion inhibitors of steels in 1M HCl. ECS Trans. 2011, Volume 36, Issue 1, Pages 217-228.
83. Rubinstein I. Goad LJ. Clage ADH. Mulheirn LJ. The 220 MHz NMR spectra of phytosterols. Phytochemistry. 1976. 15: 195-200.
84. Pouchert CJ. Behnke J. The Aldrich Library of C^{13} and 1H FT NMR Spectra. Aldrich Chemical Company, Inc. USA. 1993. Vol. 3: 563-617.
85. Sánchez –Nava AT. 2006. Aislamiento y determinación estructural de los compuestos provenientes de la esponja marina *Spherospongia confederata*. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Marinas: Universidad Autónoma de Baja California. 52 p.
86. Massey IJ. Djerassi C. 1979. Structural and stereochemical application of mass spectrometry in the marine sterol field. Synthesis and electron impact induced mass spectral fragmentation of Δ^{24} - and $\Delta^{24(28)}$ - 3β -Hidroxy- Δ^5 -sterols. J Org Chem 44(14): 2448-2456.
87. Lo JM. Wang WL. Chiang YM. Chen CM. Ceramides from Taiwan red alga *Ceratodictyon spongiosum* and symbiotic sponge *Sigmadocia symbiotica*. J Chin Chem Soc. 2001.48: 821-826.
88. Giner JL. Zhao H. Beach DH. Parish EJ. Jayasimhulu K Kaneshiro ES. Comprehensive and definitive structural identities of *Pneumocystis carinii* sterols. J Lipid Res. 2002.43: 1114-1124.
89. Lu W. Zhang C. Zeng L Su J. Synthesis of polyhydroxysterols (V): efficient and stereospecific synthesis of 24-methylene-cholesterol-5-ene- 3β ,7 α -diol and its C-7 epimer. Steroids. 2004. 69: 803-808.
90. Akihisa T. Shimizu N. Ghosh P. Thakur S. Rosenstein FU. Tamura T. Matsumoto T. Sterols of the Cucurbitaceae. Phytochemistry. 1987. 26(6): 1693-1700.

91. Shukla V. Negis S. Rawat MSM. Pant G. Nagatsu A. Chemical study of *Ramalina africana* (Ramalinaceae) from the Garhwal Himalayas. *Biochem Syst Ecol.* 2004. 32: 449-453.
92. Santalova EA., Makaireva TN, Gorshkova IA, Dmitrenok AS, Krasokhin VB, Stonik VA. 2004, Sterol from six marine sponges. *Biochem Sys Ecol* 36(5-6), 493-496.
93. Martínez M. A. Esteroles. Universidad de Antioquia. 2002.
94. Jean-Pascal B. and Gilles B. Fatty acids from lipids of marine organisms: molecular biodiversity, roles as biomarkers, biologically active compounds, and economical aspects. *Adv Biochem Engin/Biotechnol.* 2005. 96: 49-125.

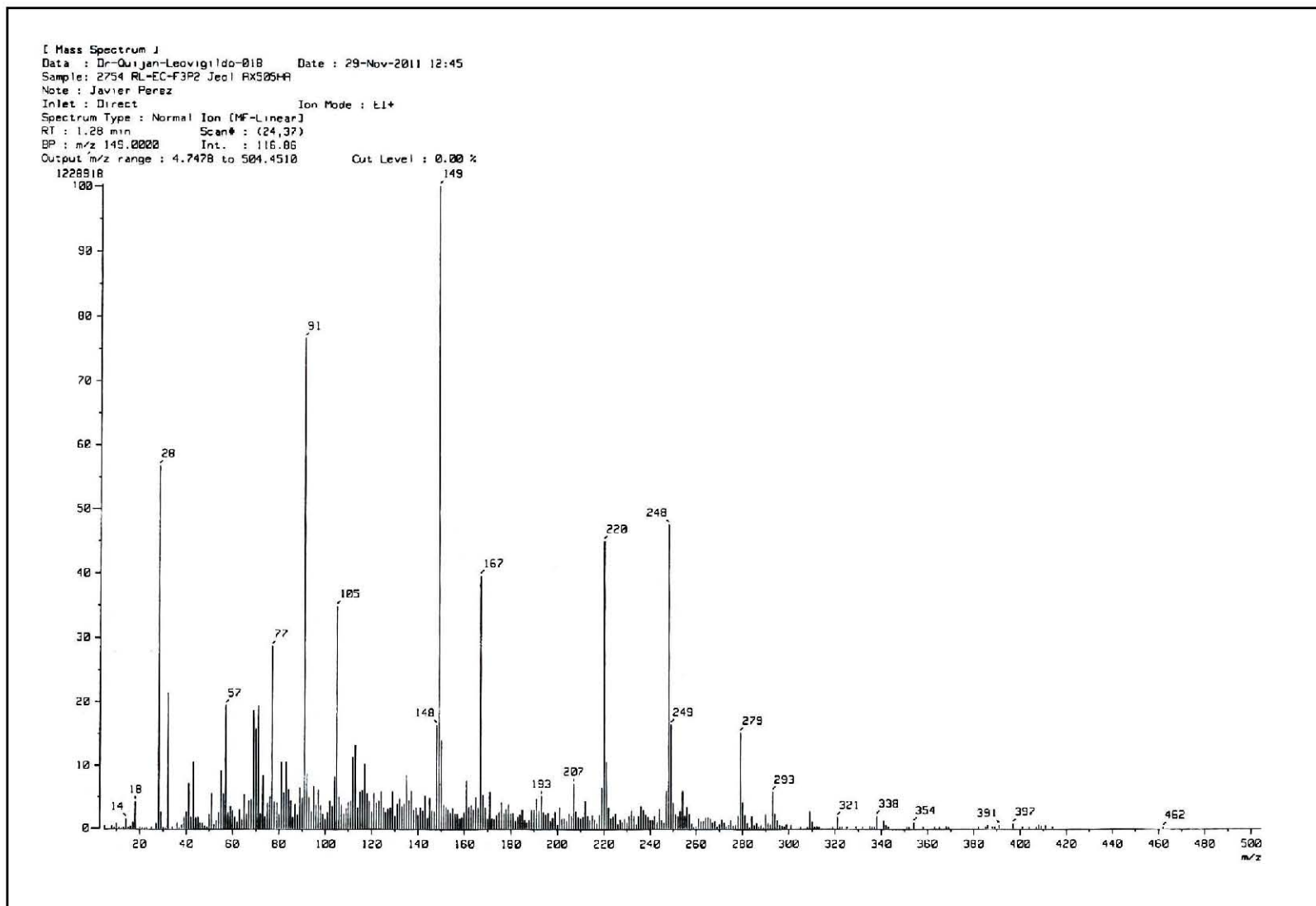
ANEXO



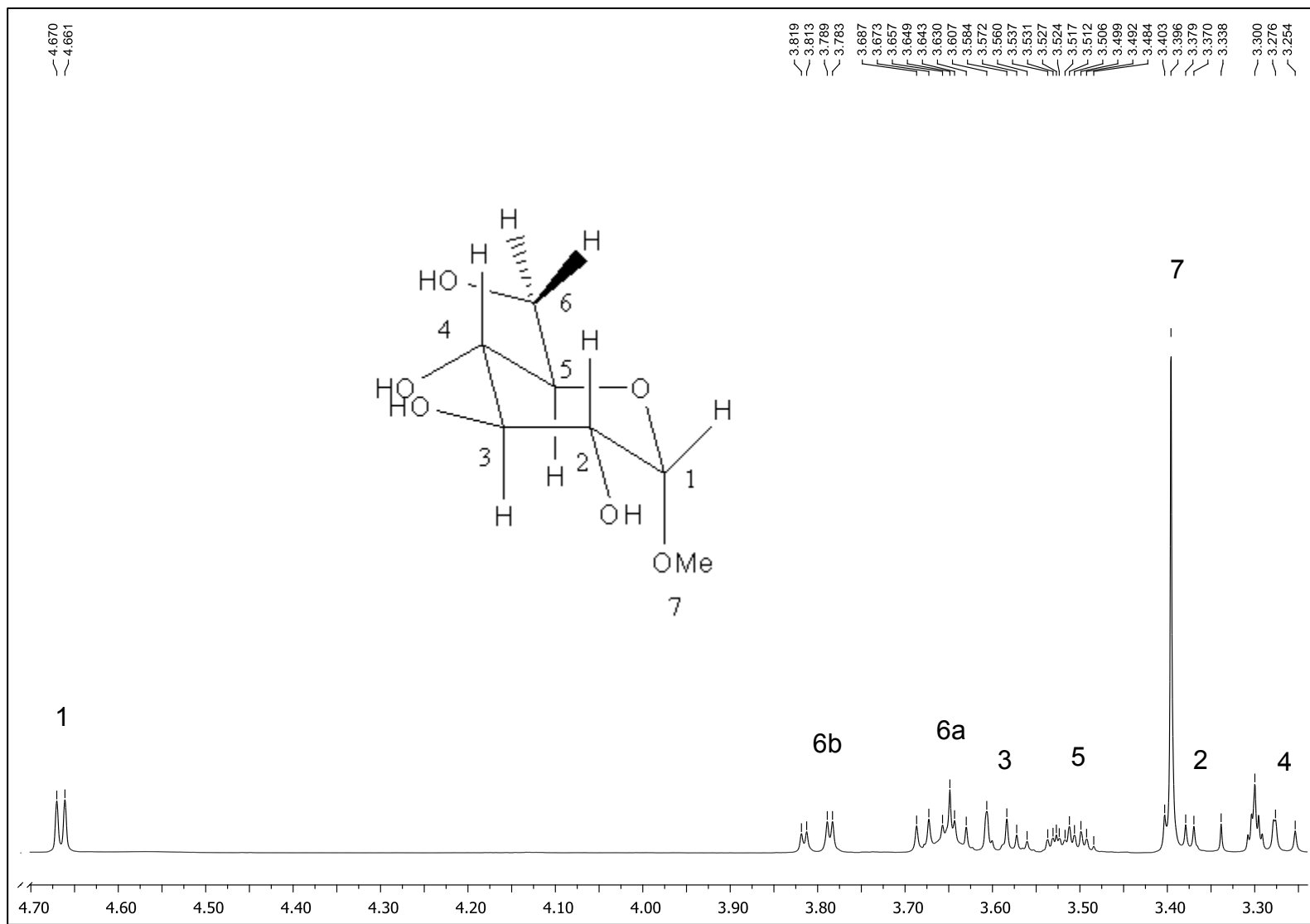
Espectro de ^1H 400 MHz de taurina (1)



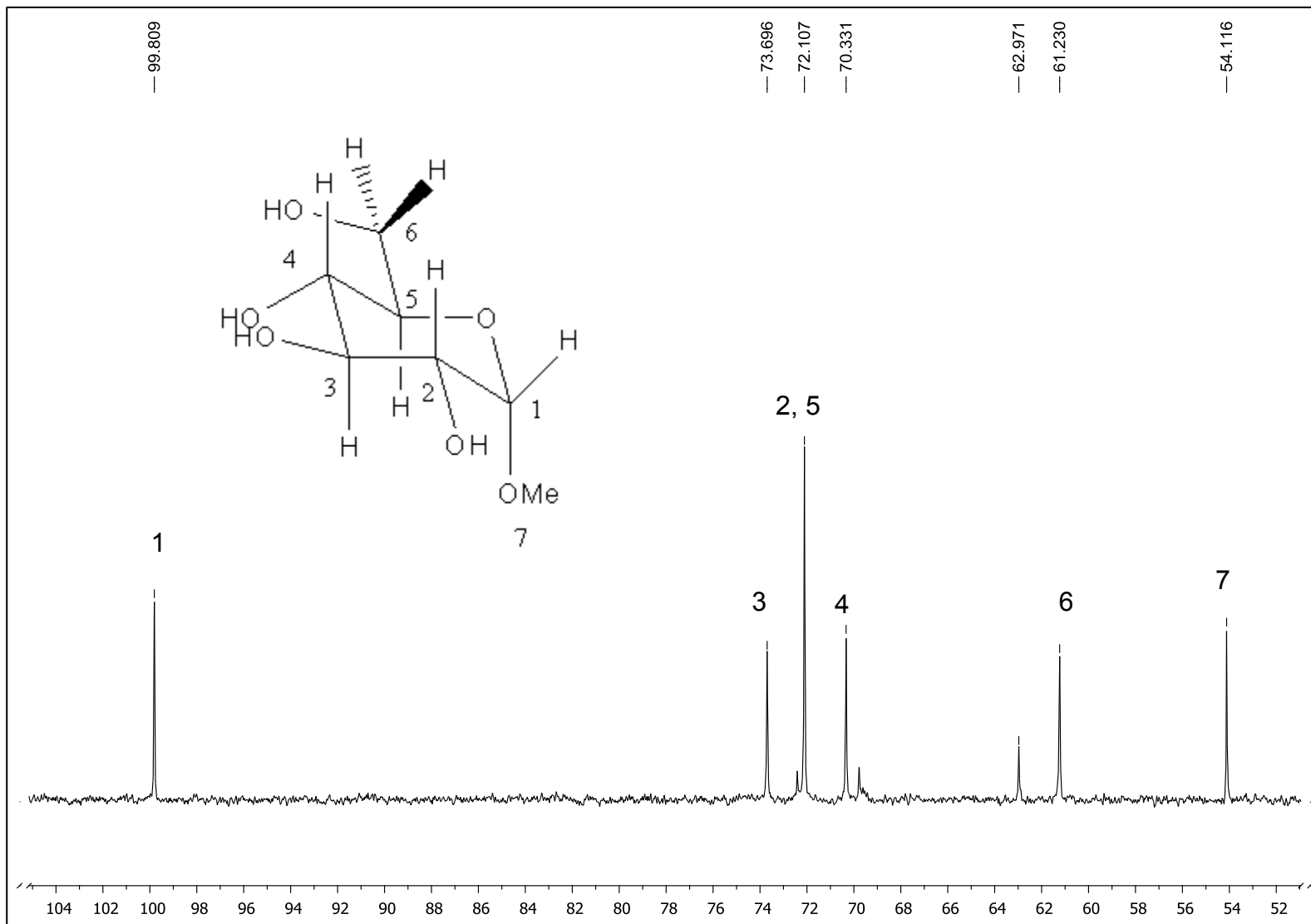
Espectro de ^{13}C 100 MHz de Taurina (1).



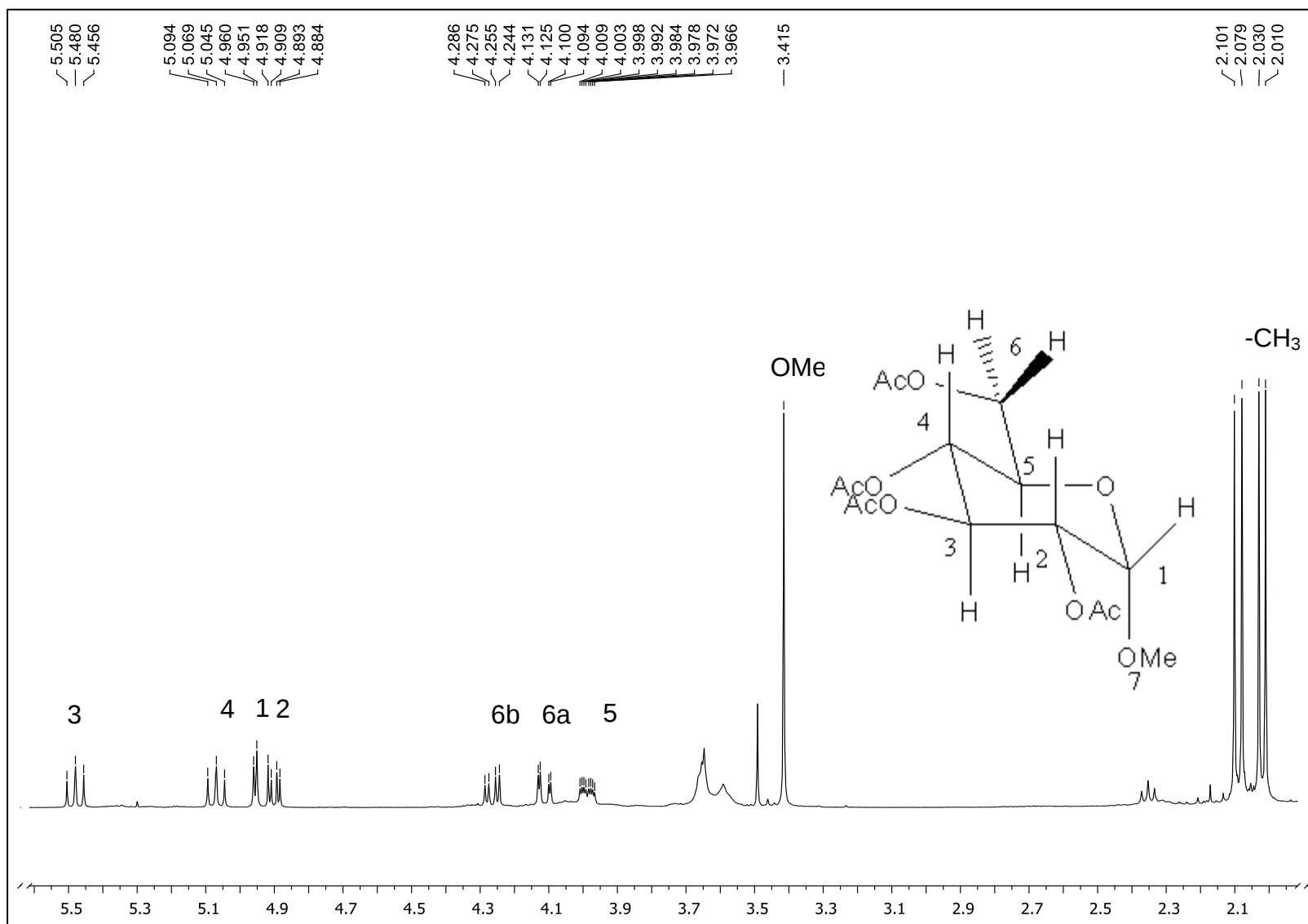
Espectro de Masas (IE) de Taurina (1).



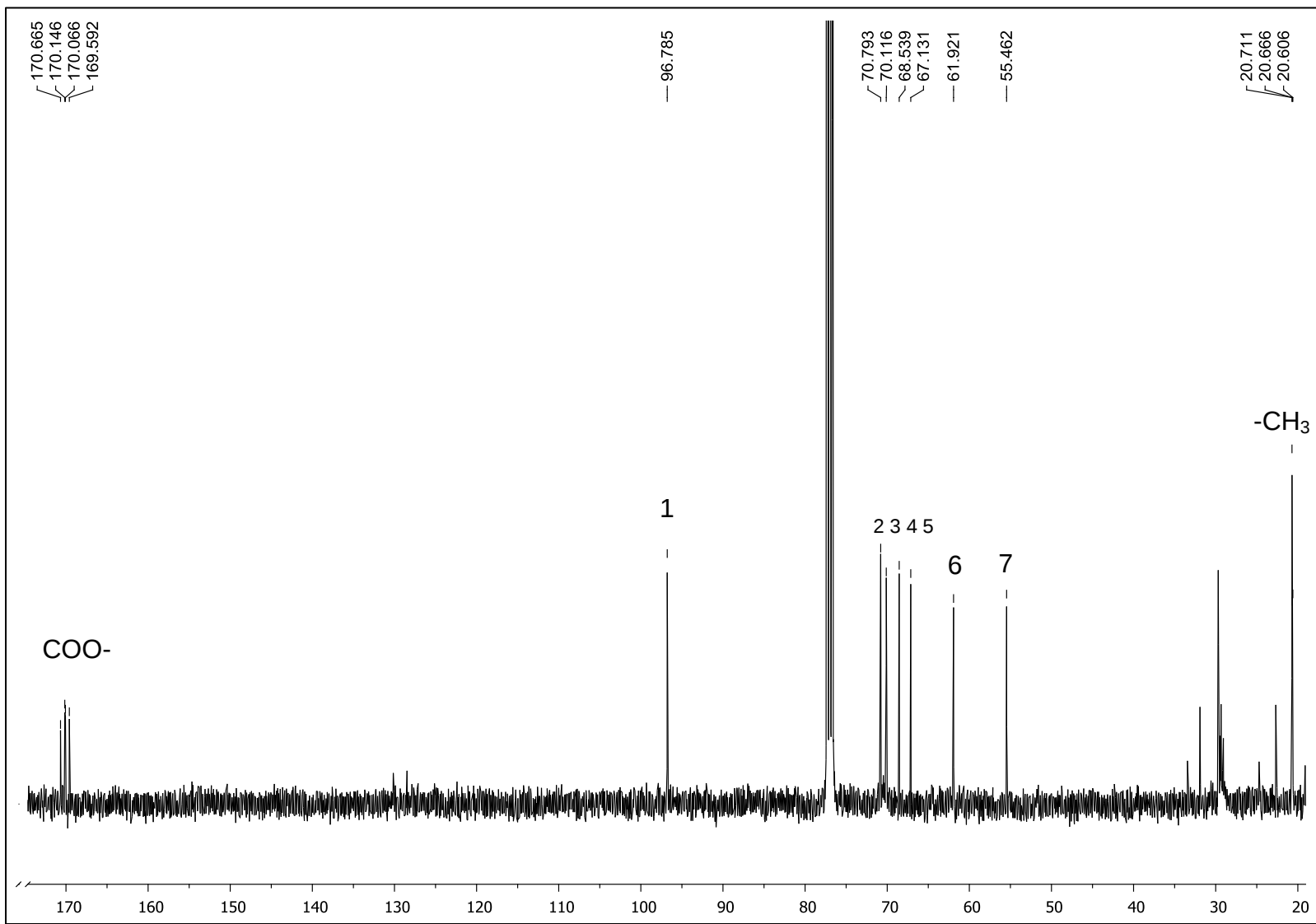
Espectro de ^1H 400 MHz de α -metil-D-glucopiranosido (2).



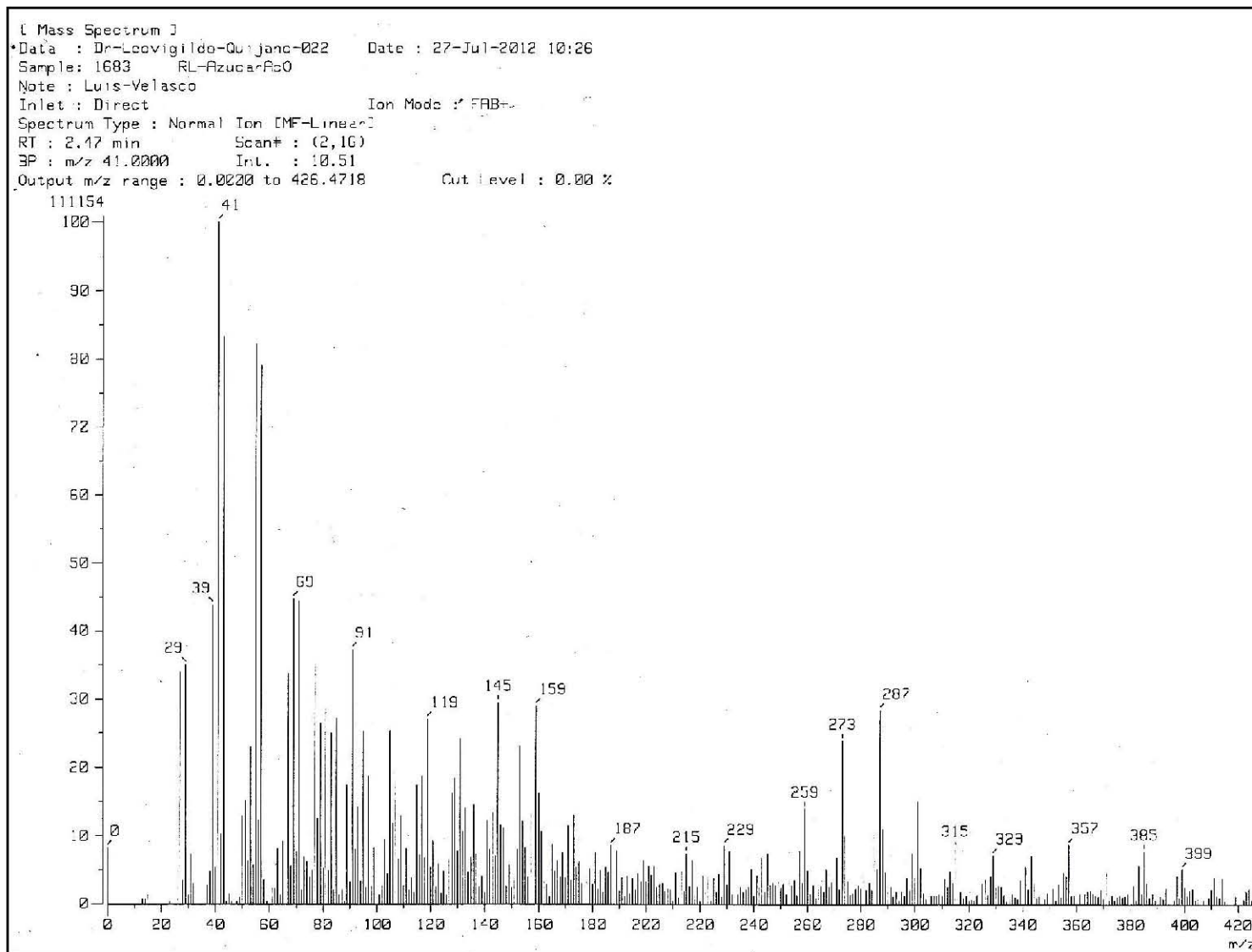
Espectro de ^{13}C 100 MHz de α -metil-D-glucopiranosido (2).



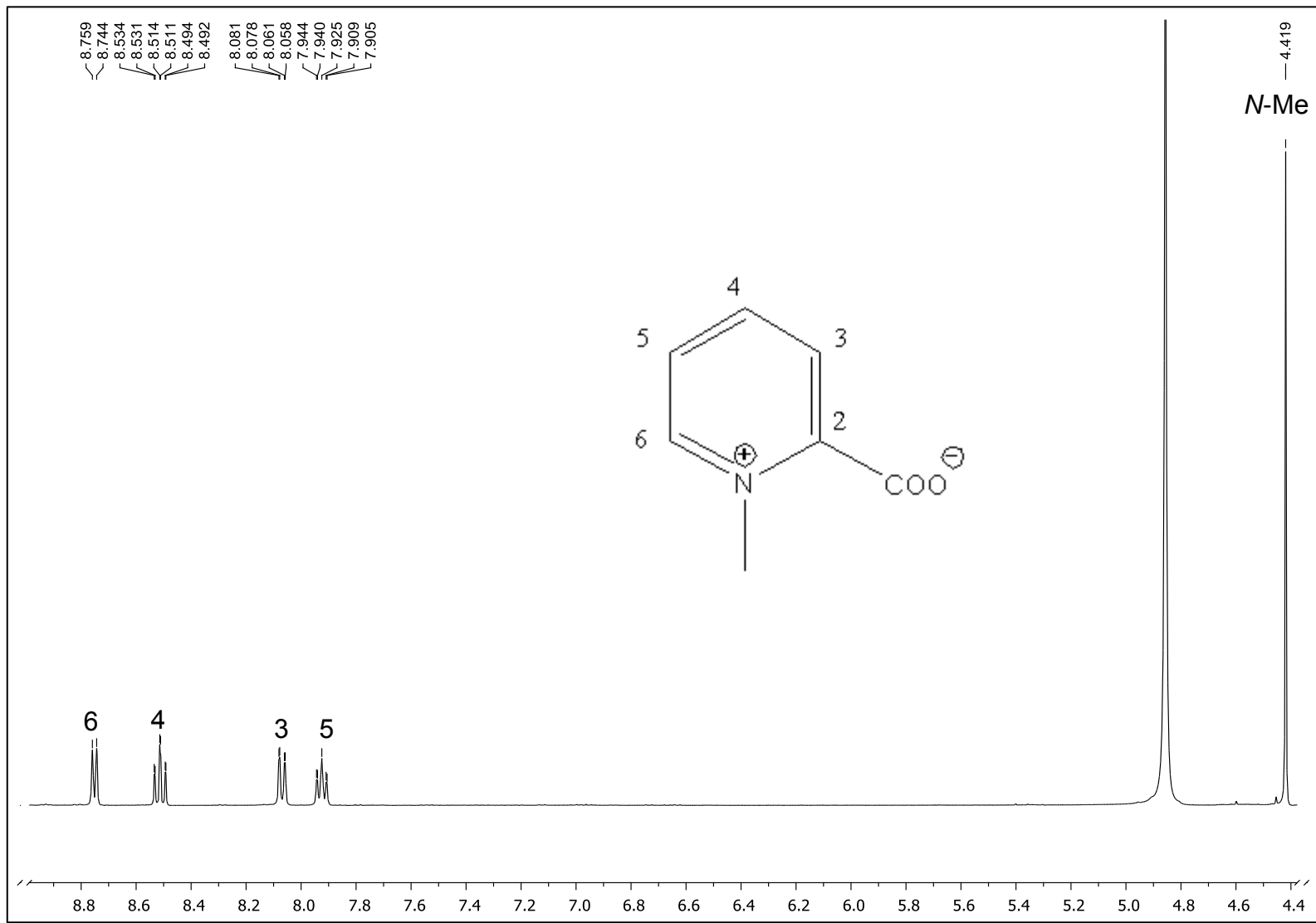
Espectro de ^1H 400 MHz de α -metil-D-glucopiranosido tetracetilado (3).



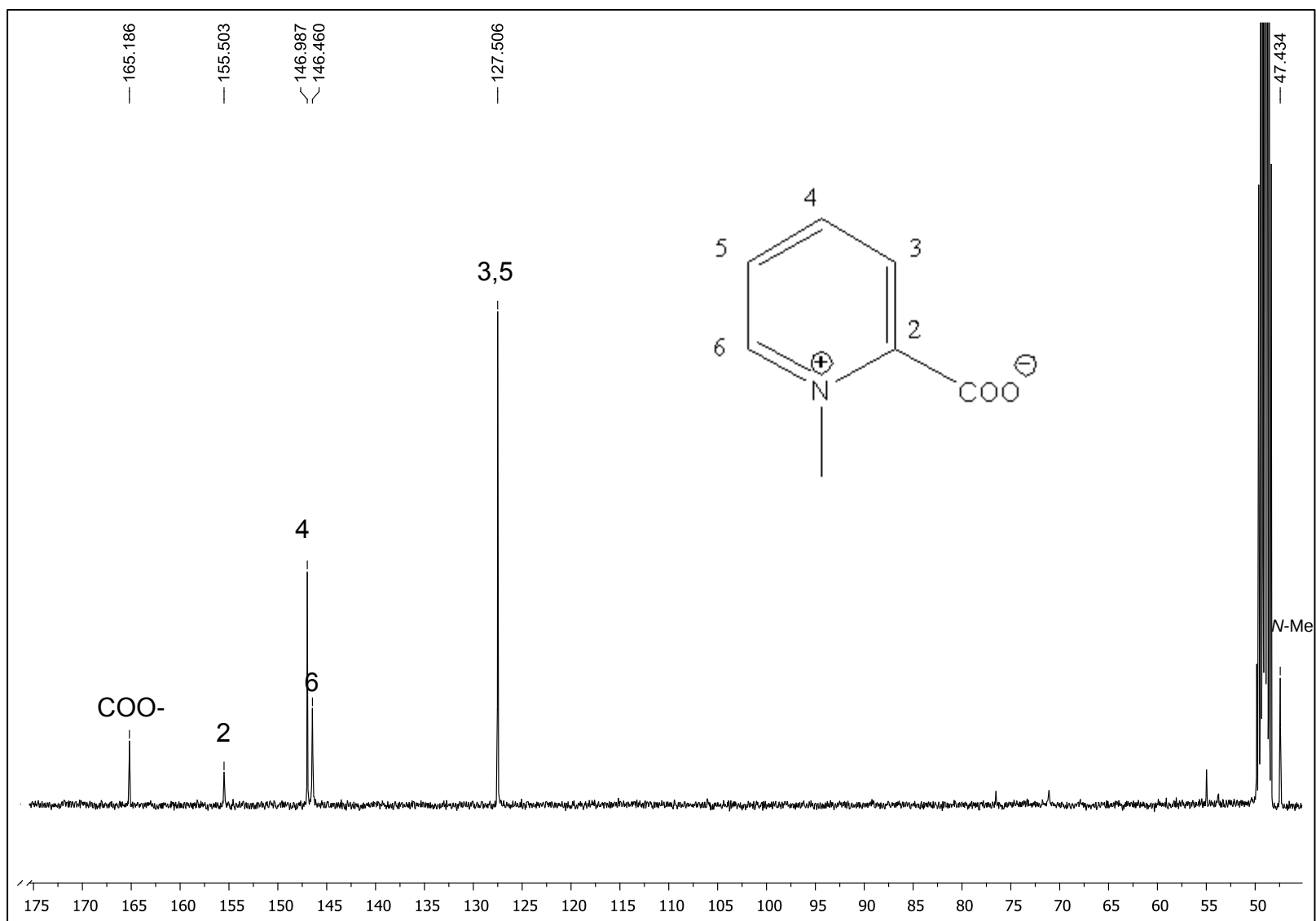
Espectro de ^{13}C 100 MHz de α -metil-D-glucopiranosido tetracetilado (3).



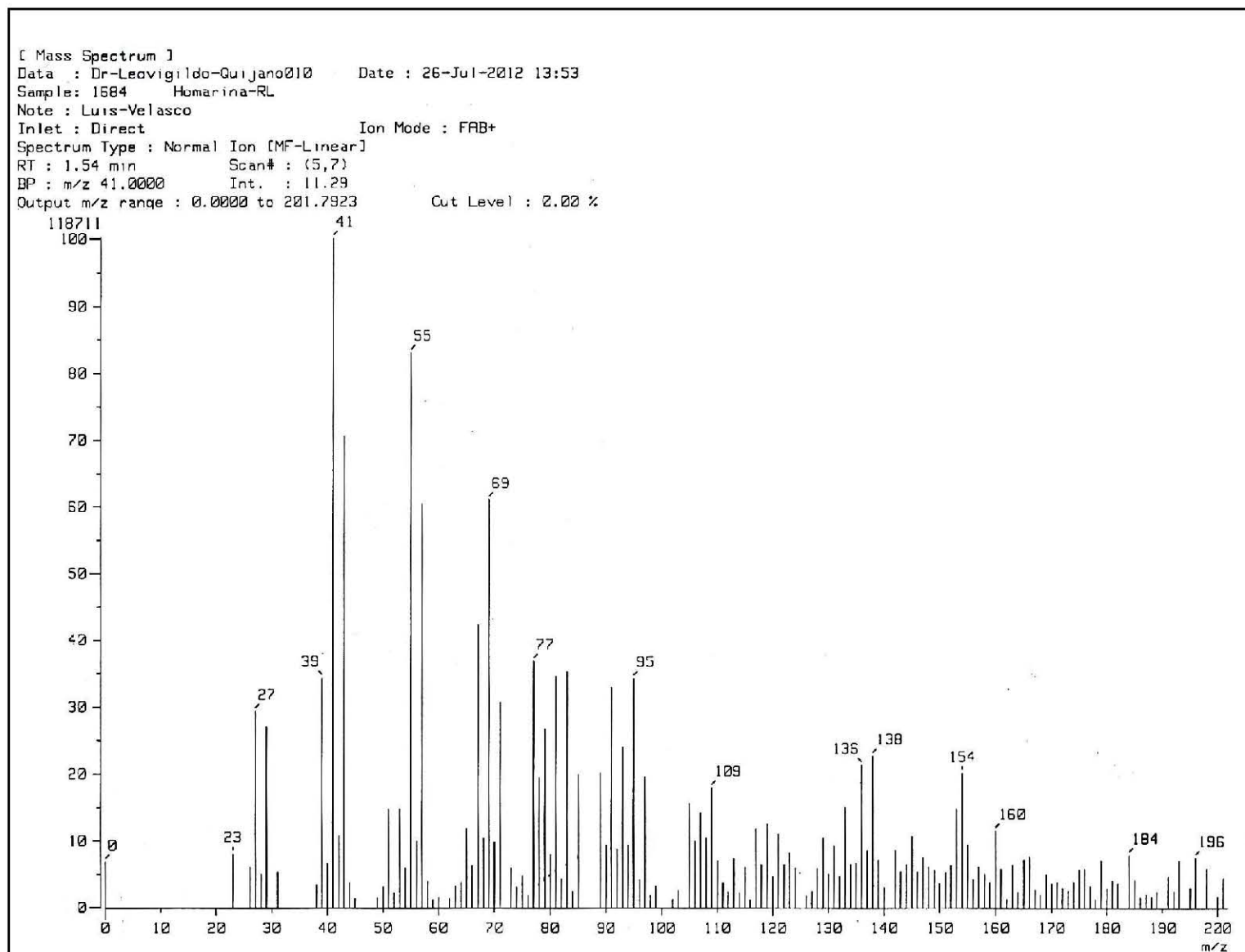
Espectro de Masas (FAB) del de α -metil-D-glucopiranosido tetracetilado (3).



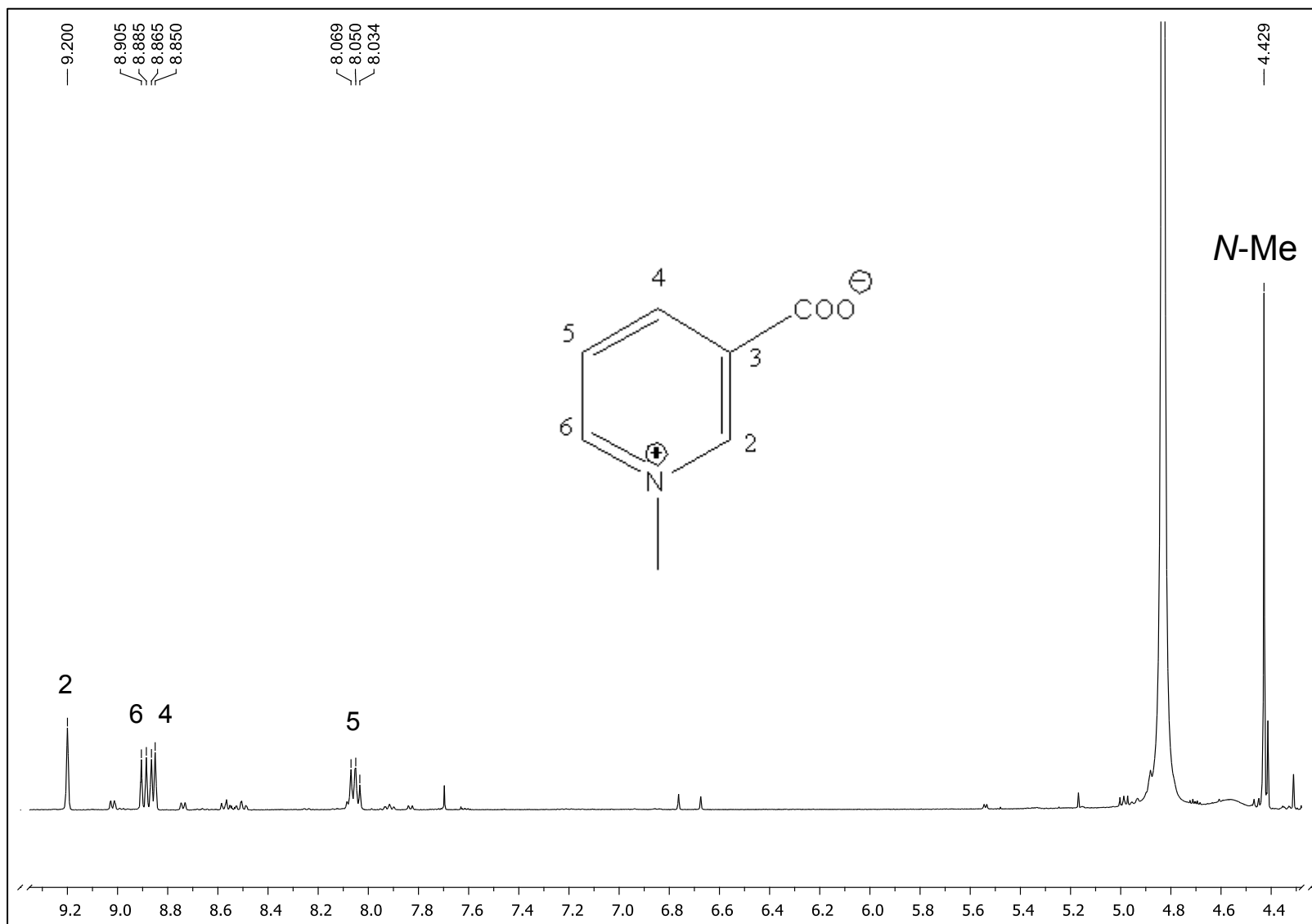
Espectro de ¹H 400 MHz de Homarina (4).



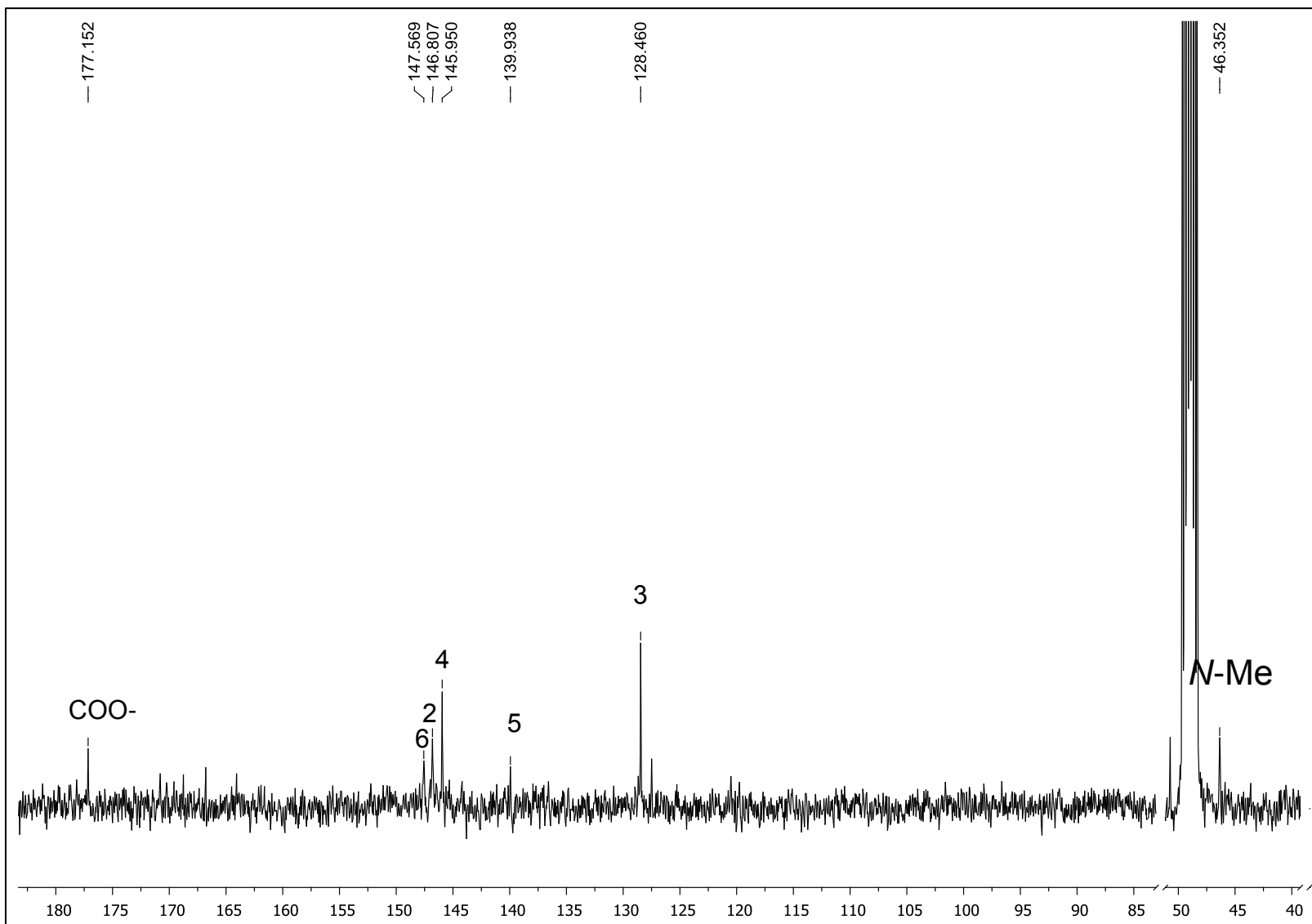
Espectro de ^{13}C 100 MHz de Homarina (4).



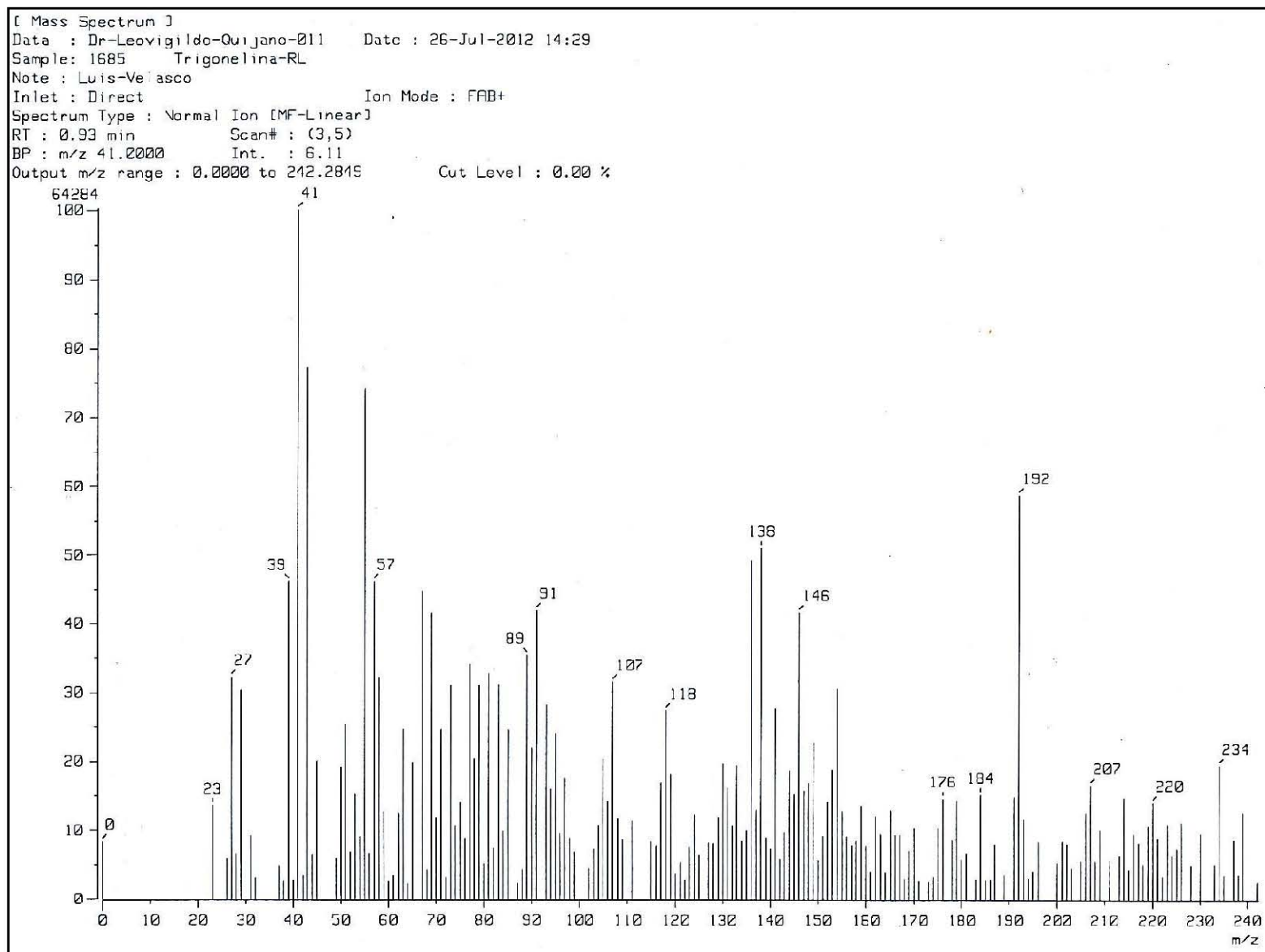
Espectro de Masas (FAB) de Homarina (4).



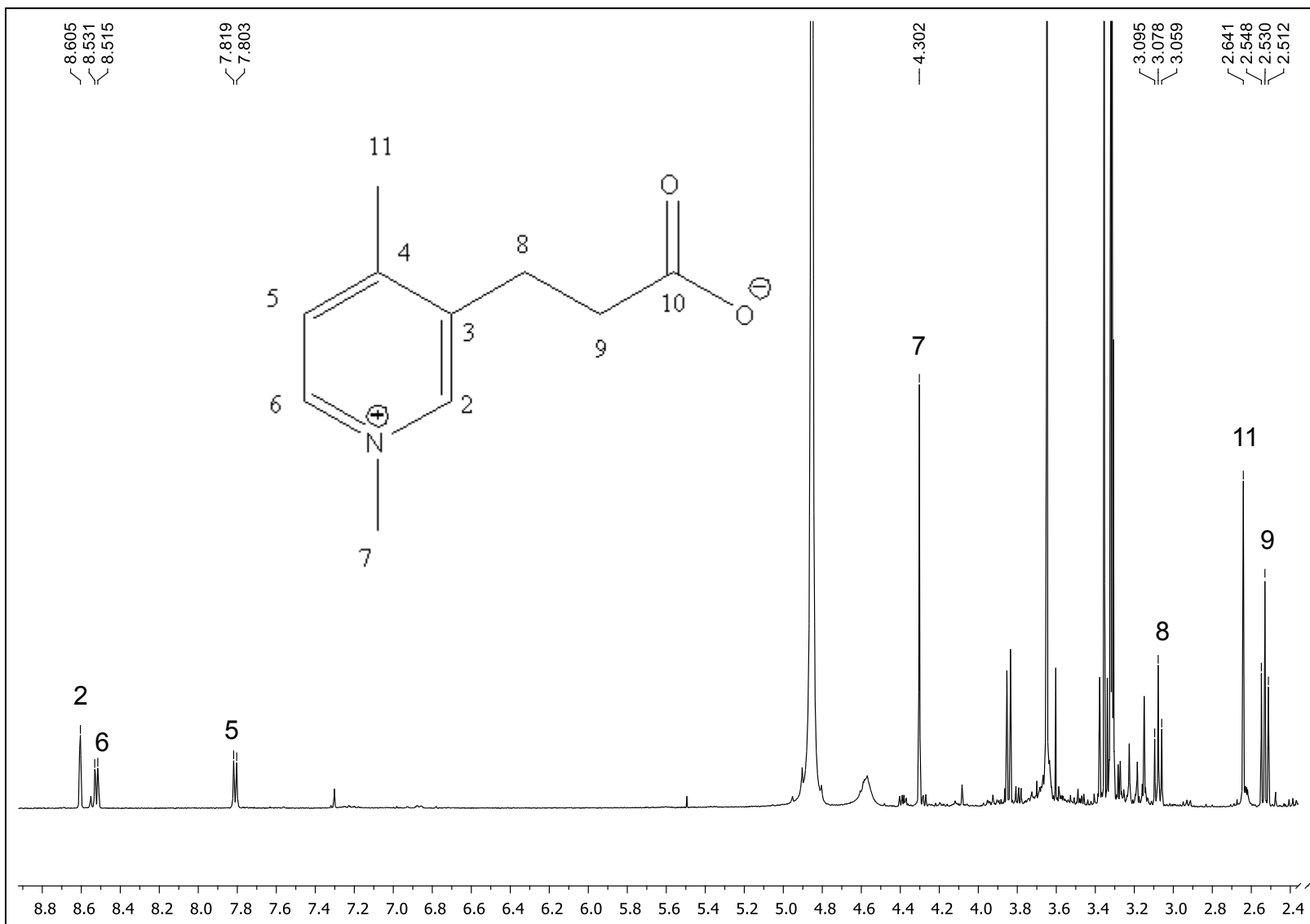
Espectro de ^1H 400 MHz de Trigonelina (5).



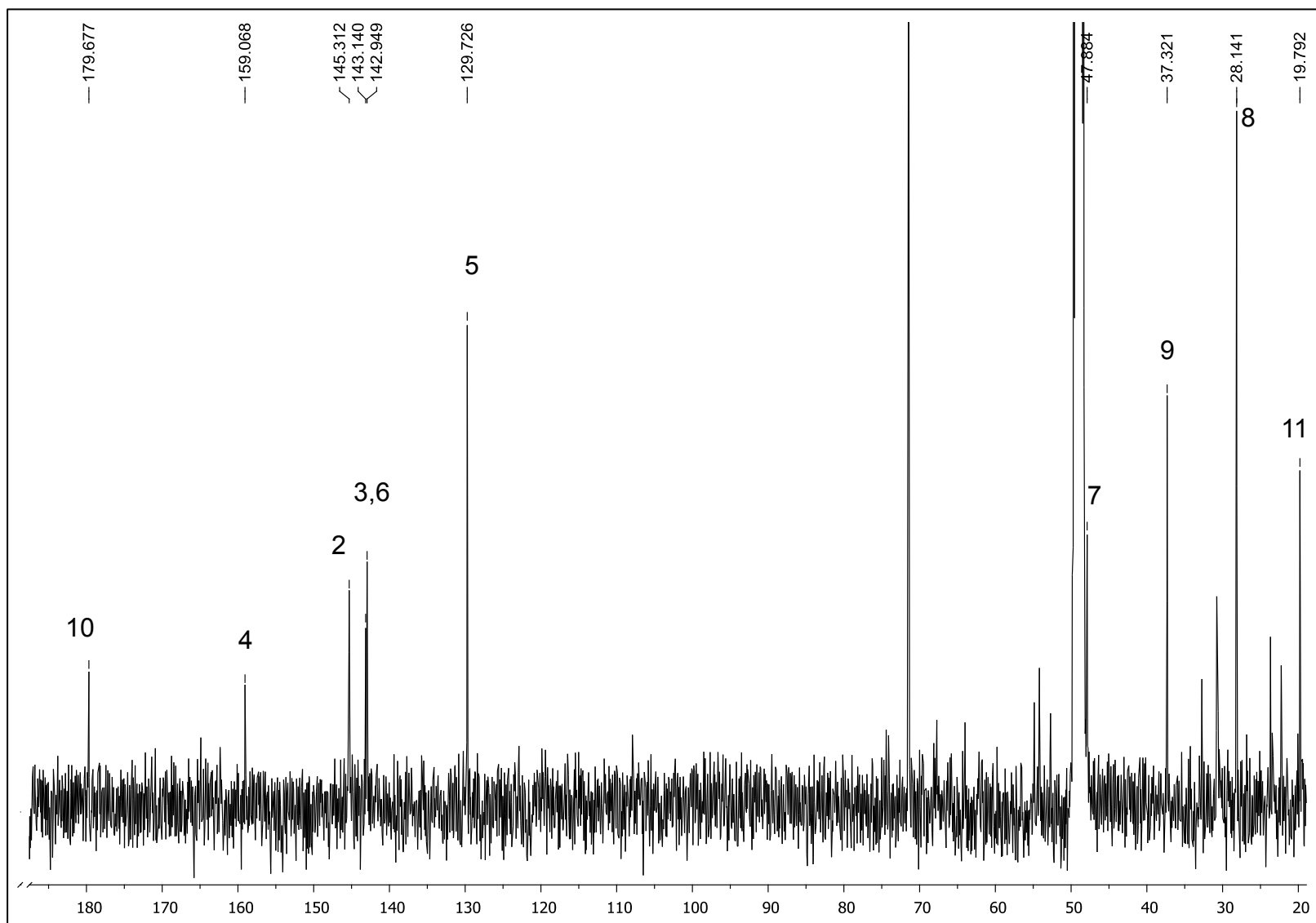
Espectro de ^{13}C 100 MHz de Trigonelina (5).



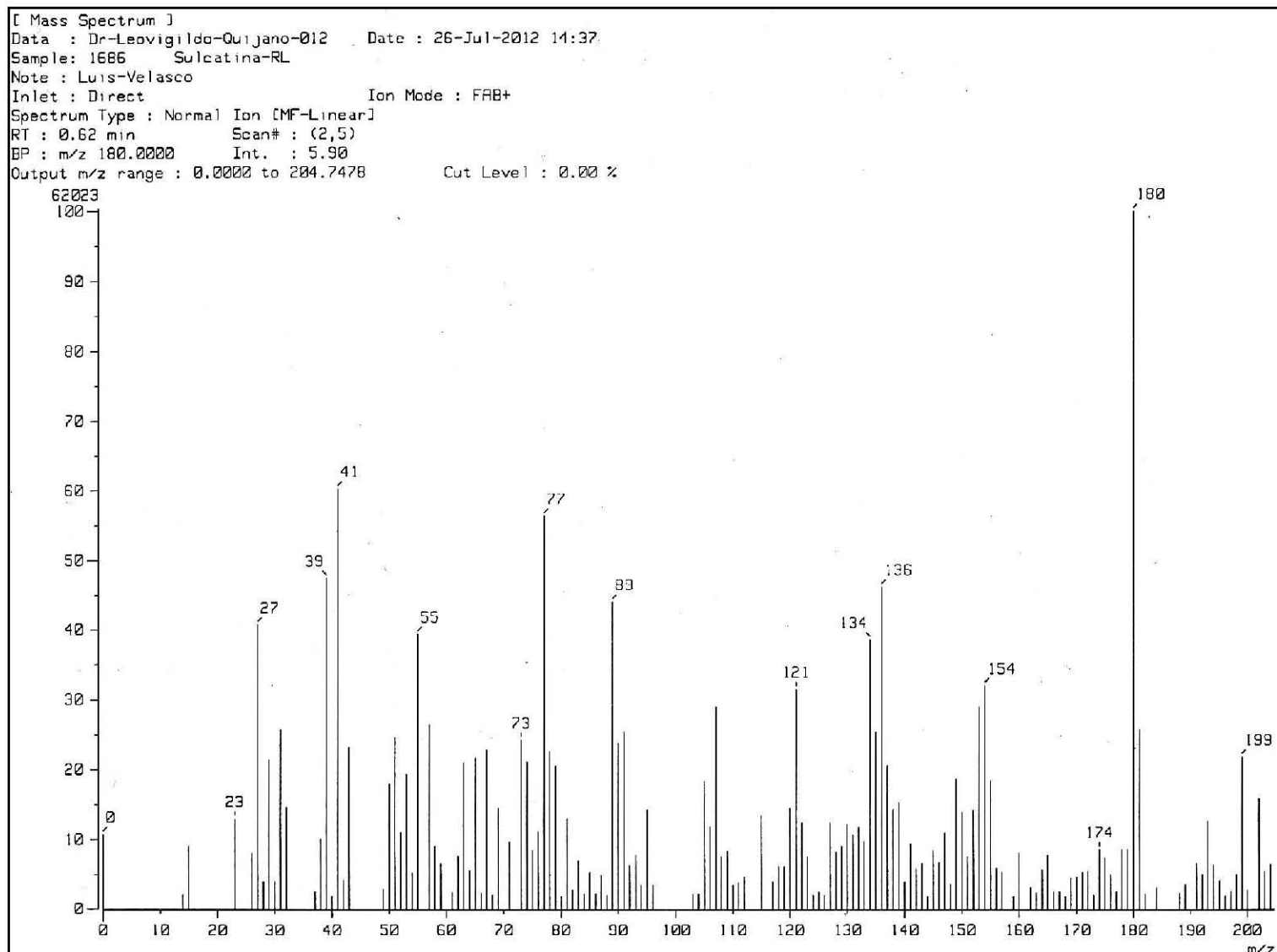
Espectro de Masas (FAB) de Trigonelina (5).



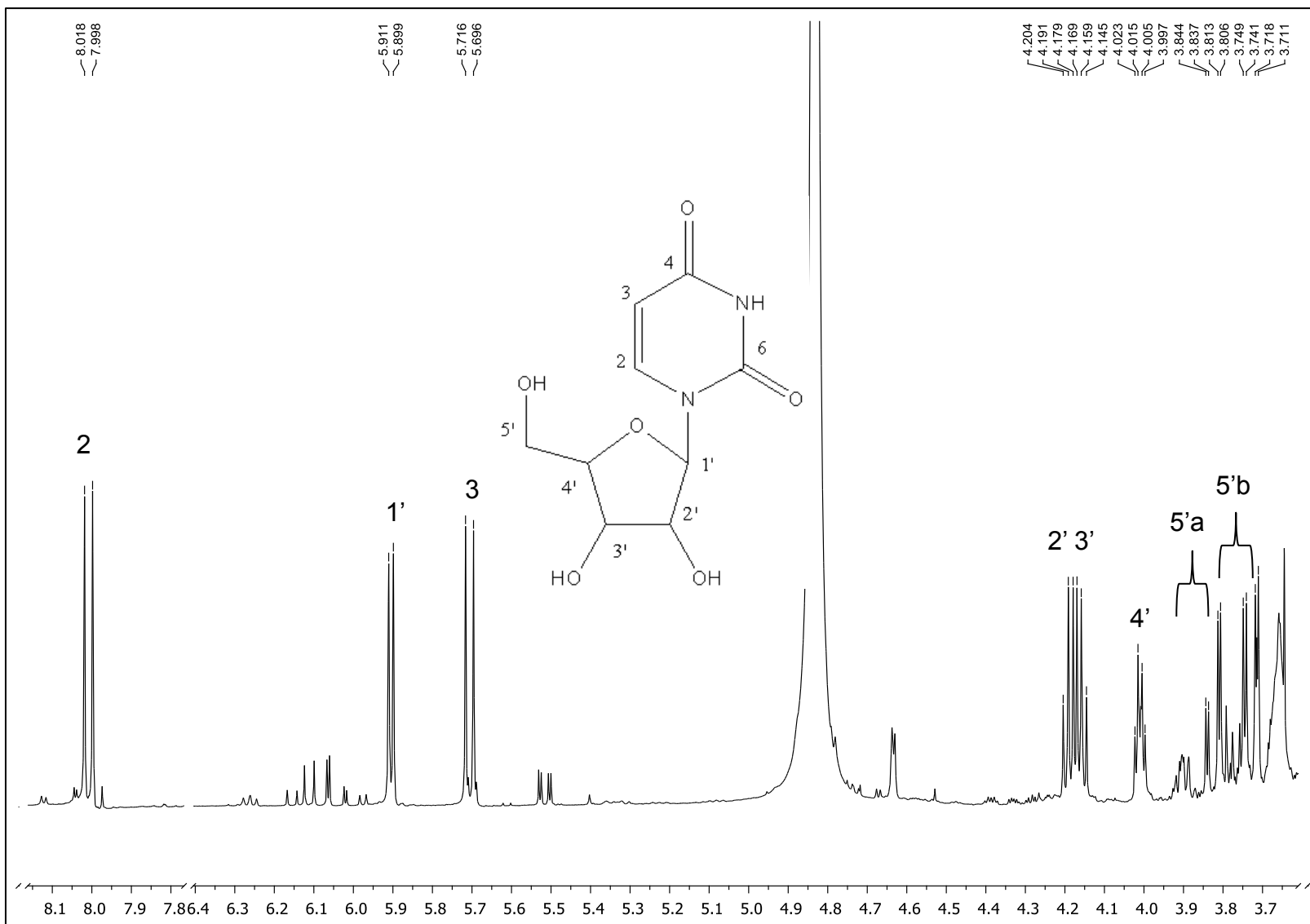
Espectro de ¹H 400 MHz de Sulcatina (6).



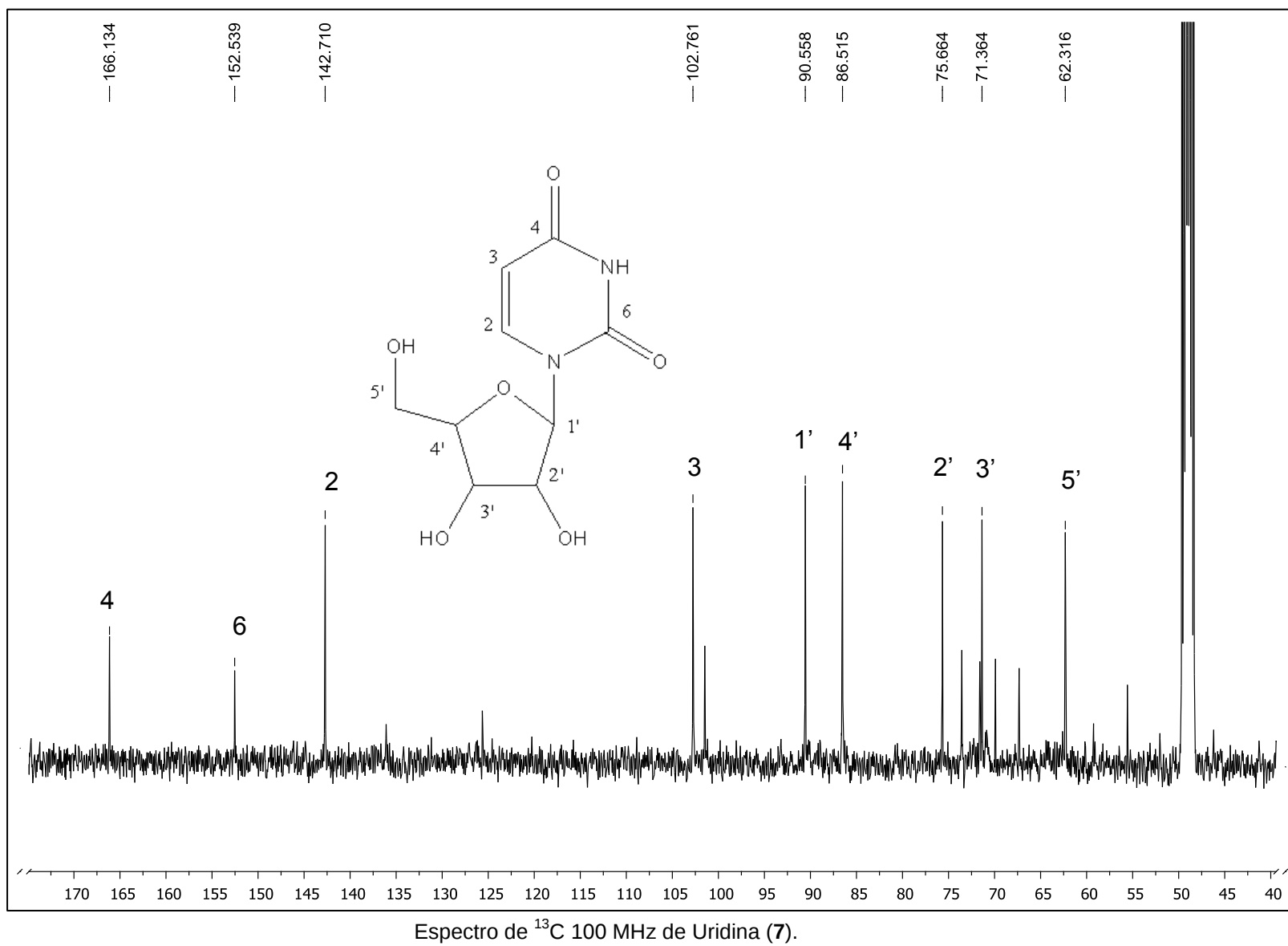
Espectro de ^{13}C 100 MHz de Sulcatina (6).

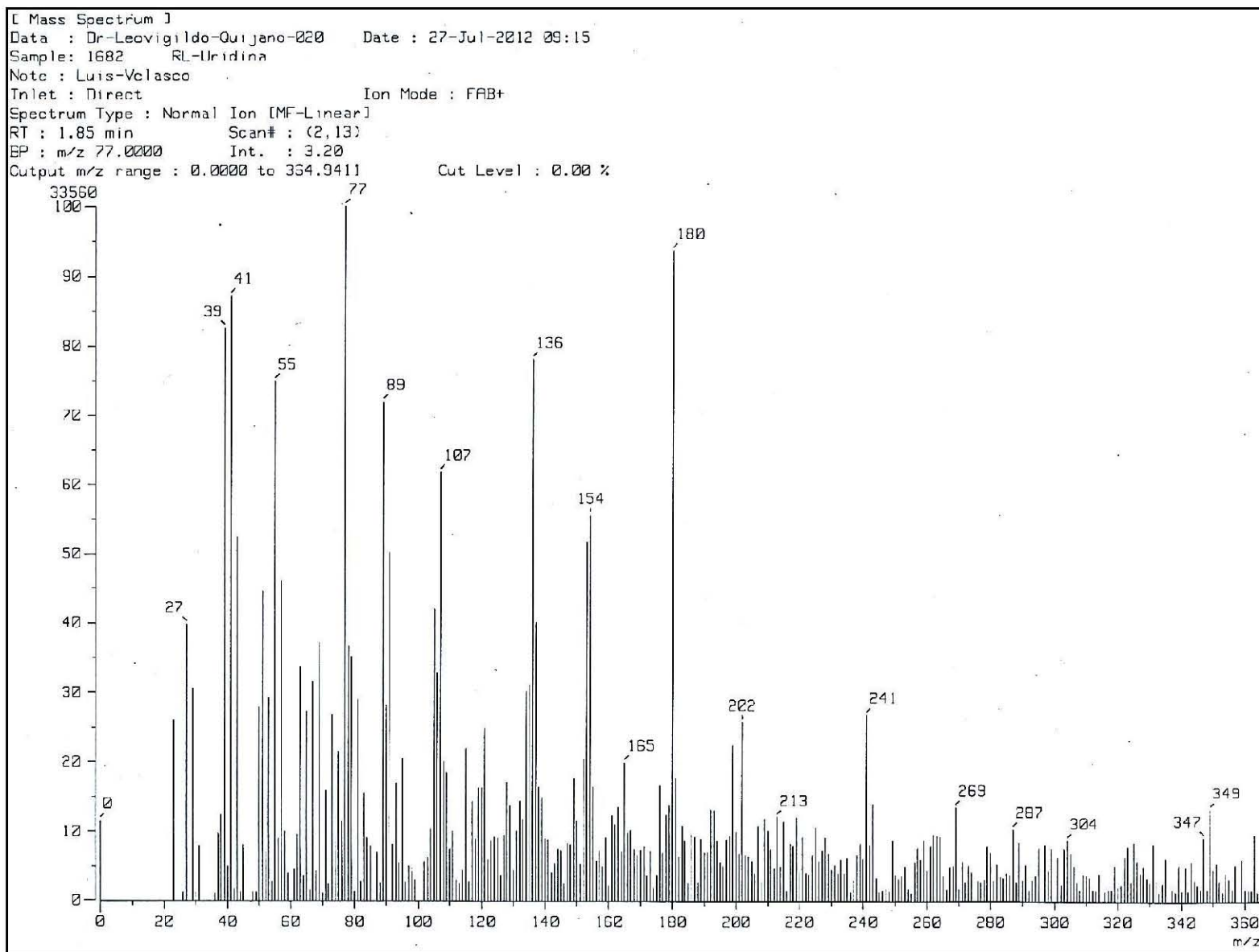


Espectro de Masas (FAB) de Sulcatina (6).



Espectro de ^1H 400 MHz de Uridina (7).



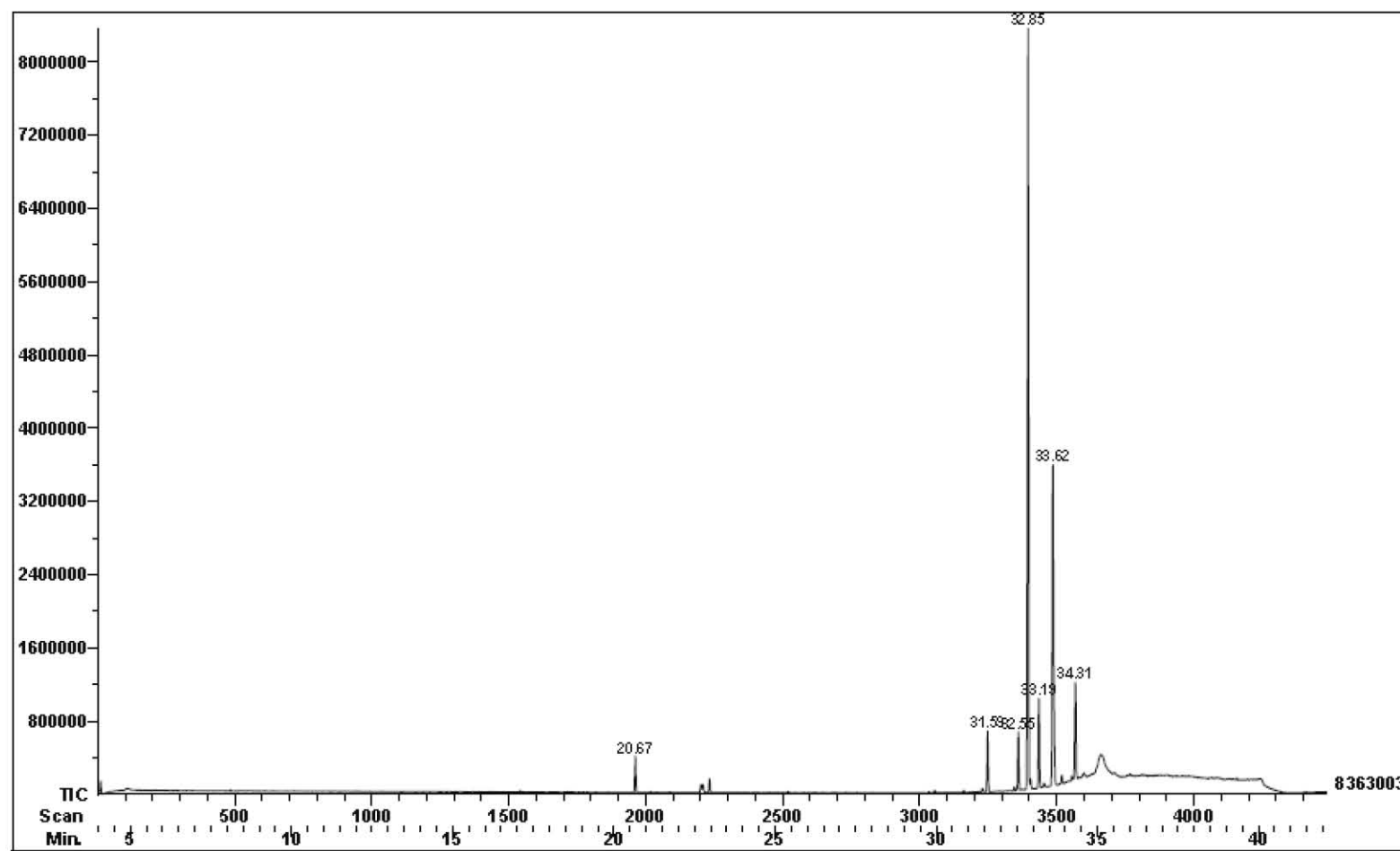


Espectro de Masas (FAB) de Uridina (7).

File: I333-RL-FMP-Est(AcO)
Sample: Dr Quijano-Leovigildo
Instrument: JEOL GCmate
Inlet: GC

Date Run: 12-06-2012 (Time Run: 13:33:27)

Ionization mode: E I+



Cromatograma de CG-GM de la fracción de esteroides.

File: 1333-RL-FMP-Est(AcO)
 Sample: Dr Quijano-Leonigildo
 Instrument: JEOL GCmate
 Inlet: GC

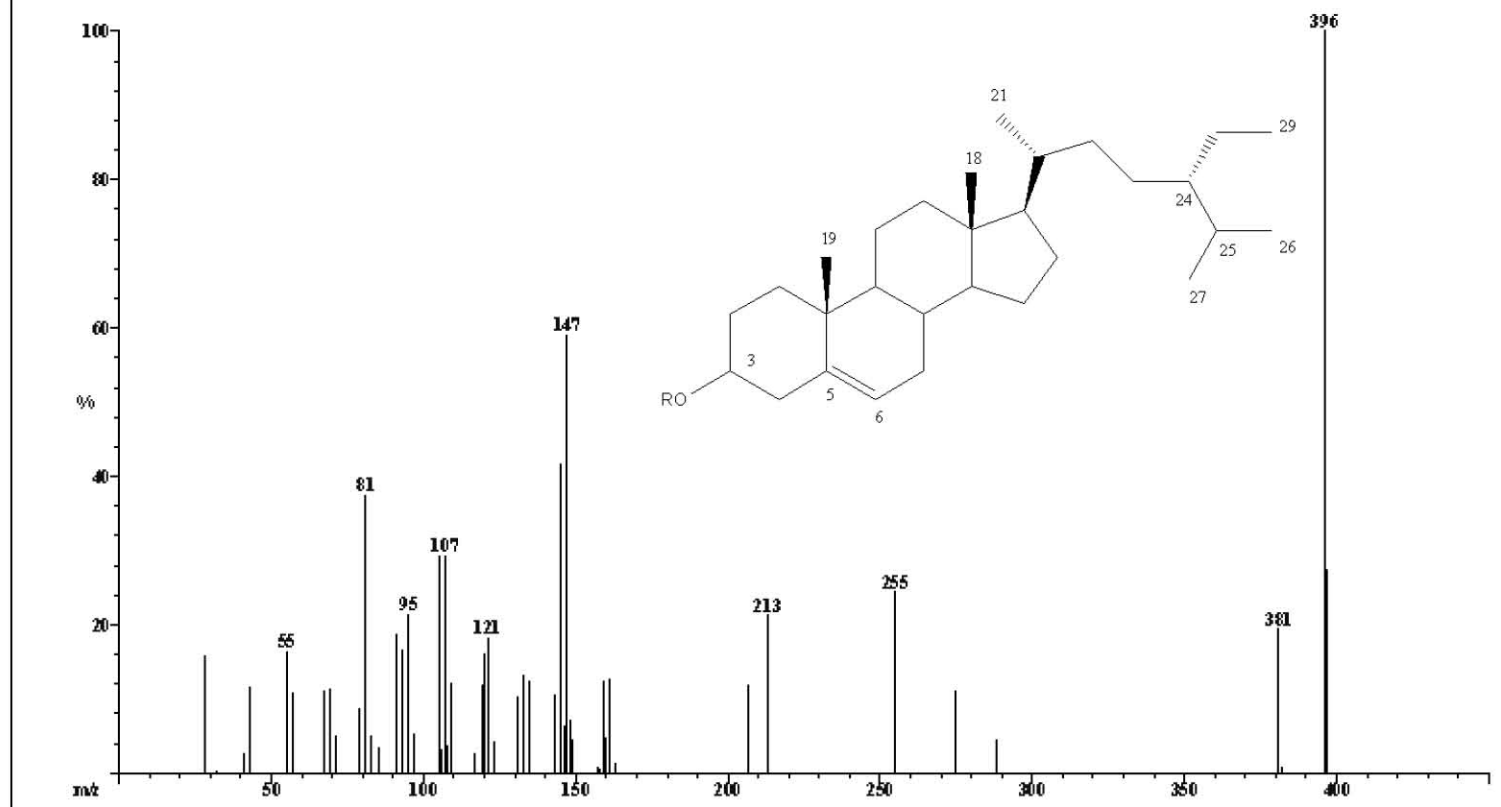
Date Run: 12-06-2012 (Time Run: 13:33:27)

Ionization mode: EI+

Scan: 3248 R.T.: 31.59

Base: m/z 396; 2.5%FS TIC: 782320

#Ions: 51



Espectro de masas de Clionasterol (12).

File: 1333-RL-FMP-Est(AcO)
Sample: Dr Quijano-Leonigillo
Instrument: JEOL GCmate
Inlet: GC

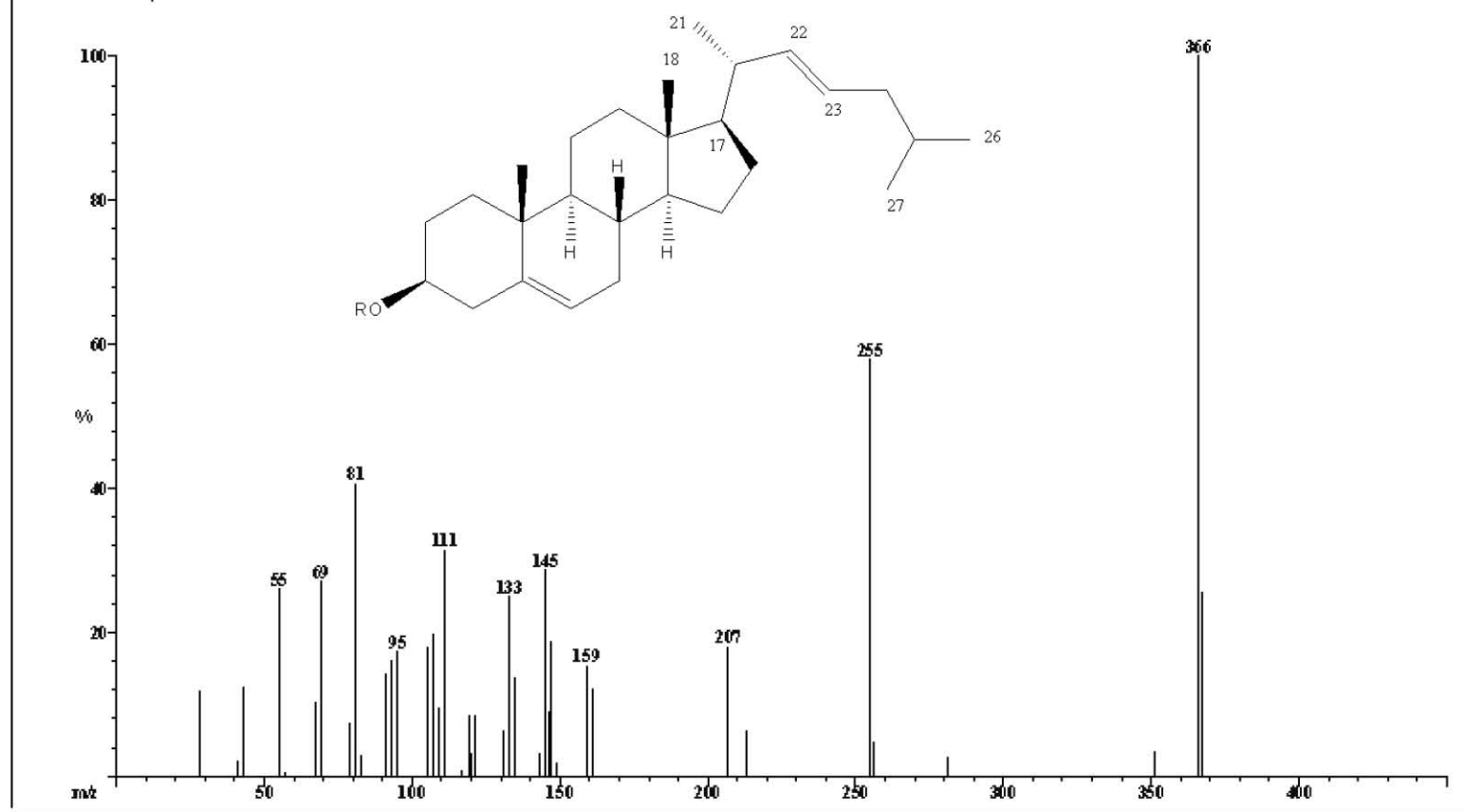
Date Run: 12-06-2012 (Time Run: 13:33:27)

Ionization mode: EI+

Scan: 3360 R.T.: 32.55

Base: m/z 366; 2.7% FS TIC: 720496

#Ions: 39

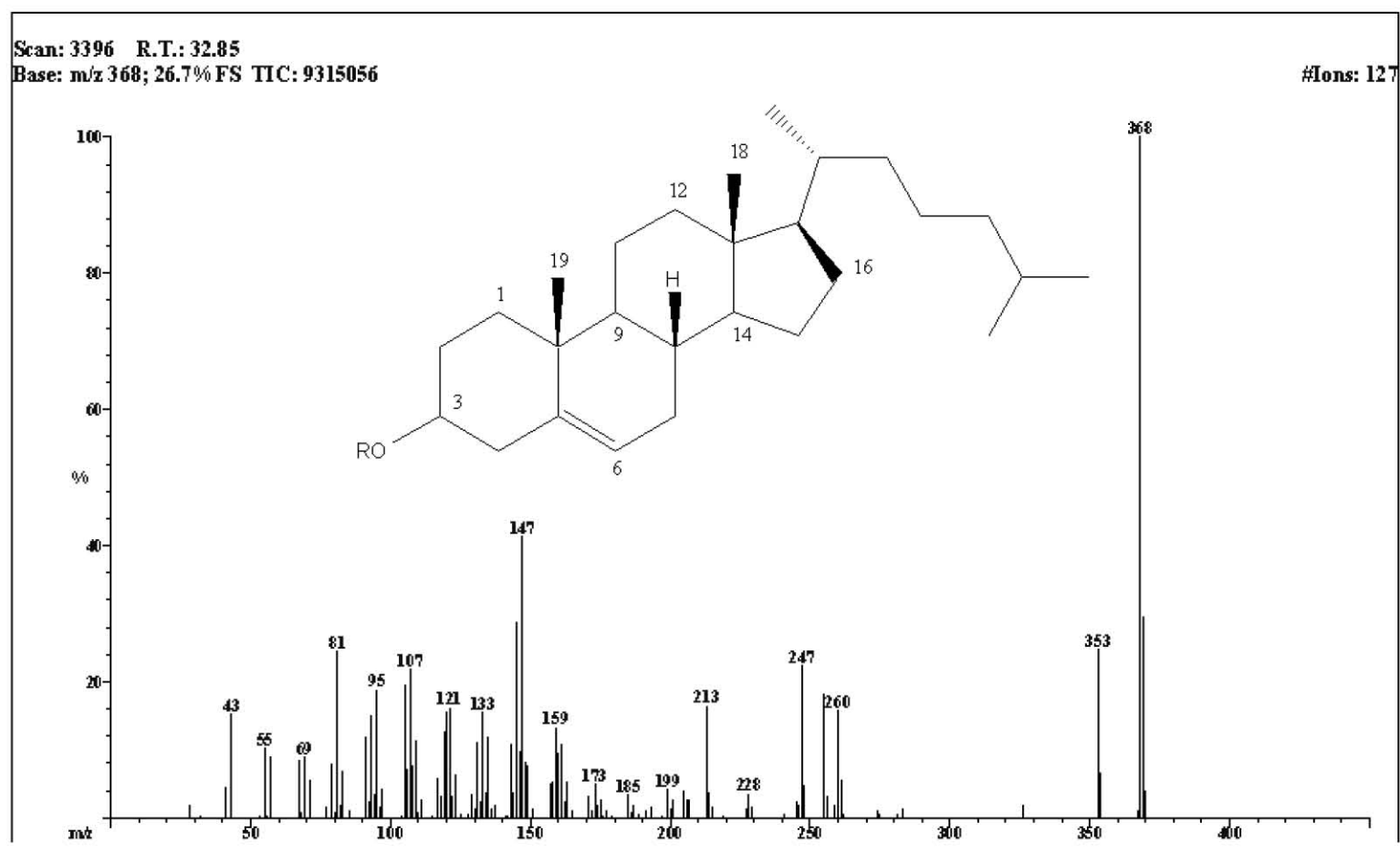


Espectro de masas de Δ^{22} -Deshidrocolesterol (10).

File: 1333-RL-FMP-Est(AcO)
 Sample: Dr Quijano-Leonigildo
 Instrument: JEOL GCmate
 Inlet: GC

Date Run: 12-06-2012 (Time Run: 13:33:27)

Ionization mode: EI+



Espectro de masas de Colesterol (8).

Instituto de Química (UNAM)

File: 1333-RL-FMP-Est(AcO)
Sample: Dr Quijano-Leonigillo
Instrument: JEOL GCmate
Inlet: GC

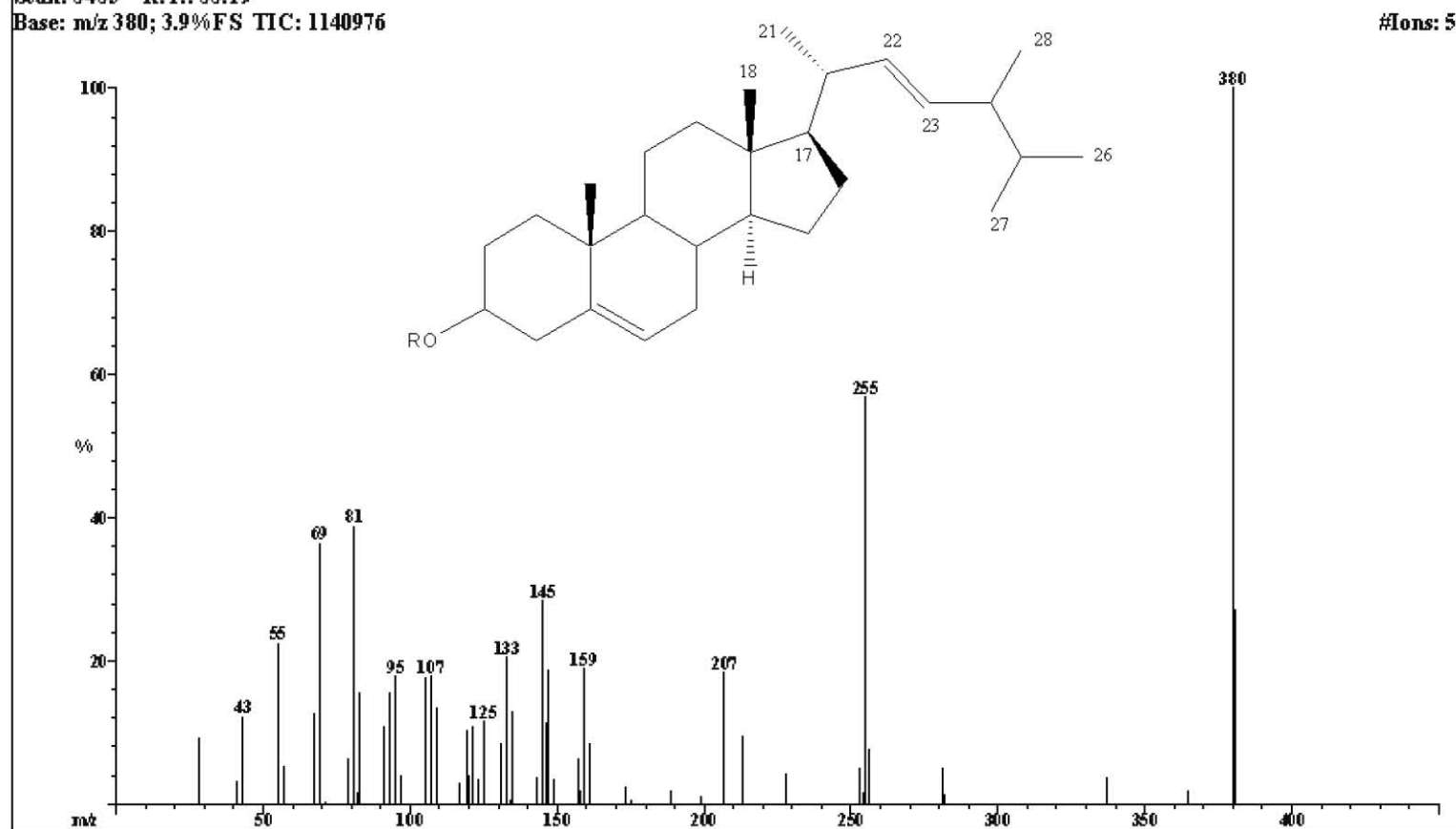
Date Run: 12-06-2012 (Time Run: 13:33:27)

Ionization mode: EI+

Scan: 3435 R.T.: 33.19

Base: m/z 380; 3.9%FS TIC: 1140976

#Ions: 55



Espectro de masas de Brassicasterol (11).

File: 1333-RL-FMP-Est(AcO)
Sample: Dr Quijano-Leonigildo
Instrument: JEOL GCmate
Inlet: GC

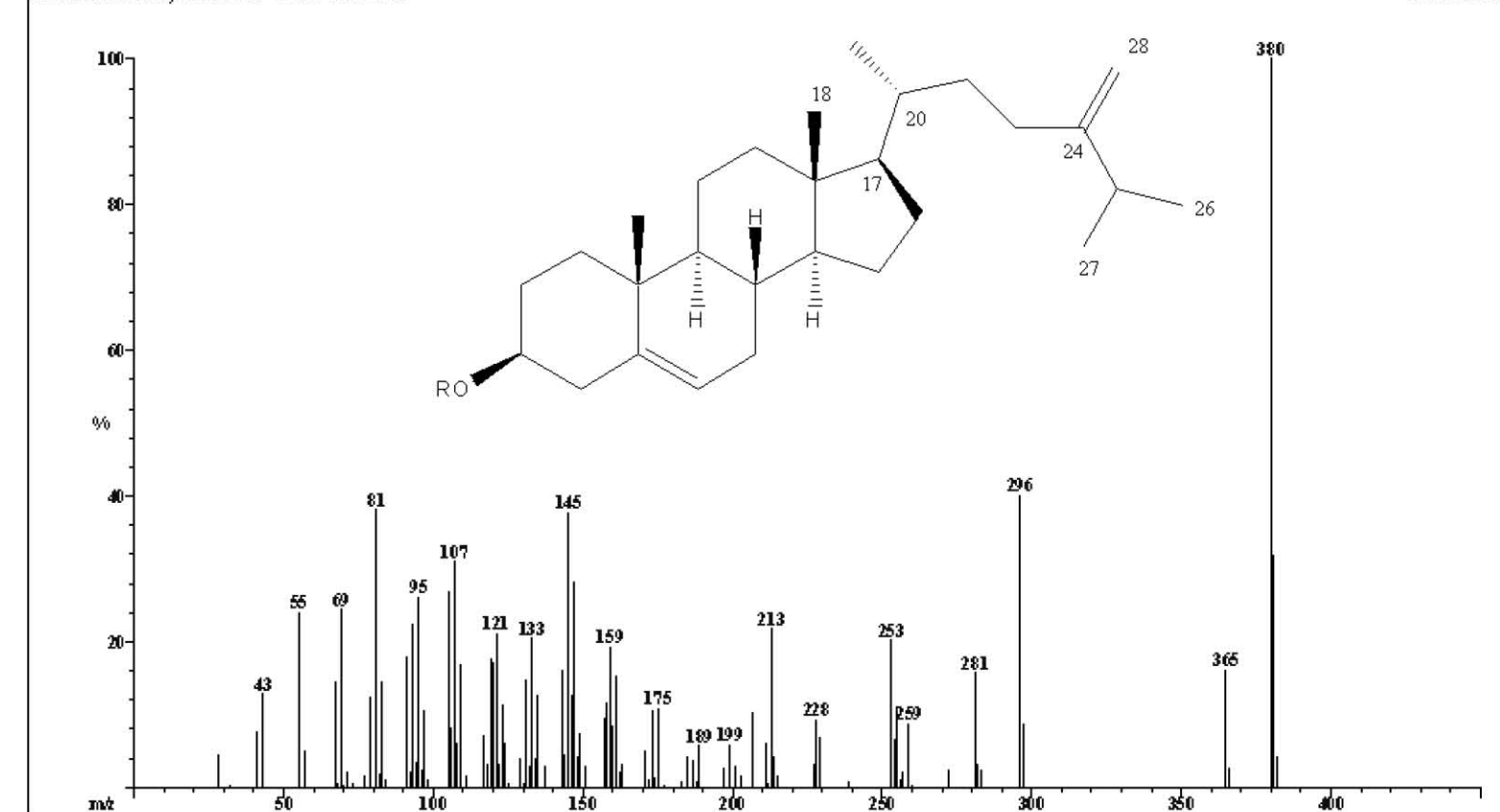
Date Run: 12-06-2012 (Time Run: 13:33:27)

Ionization mode: EI+

Scan: 3486 R.T.: 33.62

Base: m/z 380; 8.7%FS TIC: 3892848

#Ions: 111



Espectro de masas de Ostreasterol (9).