

OBTENCIÓN DE SUSTANCIAS ANTIMICROBIANAS A PARTIR DE ESPONJAS DE LA BAHÍA DE CISPATÁ

RESUMEN

De las esponjas marinas *Amphimedon viridis* y *Suberites aurantiaca*, se aislaron las fracciones de ácidos grasos y de compuestos esteroidales. Los ácidos grasos se identificaron mediante CGAR-EM obteniéndose 22 compuestos, que incluyen ácidos con diferentes funcionalidades químicas. En la fracción esterólica de *A. viridis* se identificaron 6 esteroides con núcleo Δ^5 y diferentes cadenas laterales. Por su parte, en la misma fracción de *S. aurantiaca* se encontraron núcleos $\Delta^{5,7}$, los cuales fueron oxidados fotoquímicamente obteniéndose compuestos tipo epidioxisteroidales, cuya identificación química incluyó experimentos de MS y RMN. Los extractos de diclorometano y metanólico de *A. viridis* y la fracción epidioxisteroidal obtenida de *S. aurantiaca*, presentaron buena actividad antibacteriana.

PALABRAS CLAVES: Esponjas marinas, *Amphimedon viridis*, *Suberites aurantiaca*, ácidos grasos, esteroides, epidioxisteroides, actividad antibacteriana.

ABSTRACT

From the marine sponges *Amphimedon viridis* and *Suberites aurantiaca* the fractions of fatty acids and steroids were isolated. The fatty acids were identified by HPLC-MS obtaining 22 compounds including acids with different chemical functionalities. In the sterolic fraction of *A. viridis* 6 sterols with nucleus Δ^5 and different side chains were identified. On the other hand, in the same fraction of *S. aurantiaca* nucleus $\Delta^{5,7}$ were found. These were photo-oxidationed obtaining epidioxysterols. Their structures were determined by NMR y MS spectroscopy. The CH₂Cl₂ and MeOH extracts of *A. viridis* and the epidioxysterol fraction of *S. aurantiaca* showed high bactericide activity..

KEYWORDS: Marine sponges, *Amphimedon viridis*, *Suberites aurantiaca*, fatty acids, sterols, epidioxysterols, bactericide activity.

1. INTRODUCCIÓN

El principal interés en el estudio químico de los productos naturales marinos ha radicado en las muy diversas y novedosas estructuras químicas de los compuestos que de ellos han sido aislados y que además han demostrado poseer una gran variedad de actividades biológicas, lo que permite pensar en su posible aplicación como medicamentos. Los compuestos químicos que más han llamado la atención son aquellos que han sido aislados de organismos que viven en aguas tropicales, situación apenas lógica, ya que es precisamente en estas zonas donde existe un mayor grado de biodiversidad, fenómeno que genera una mayor competencia por espacio y alimento y que necesariamente hace que cada organismo deba producir una serie de estrategias químicas que le aseguren su propio desarrollo [1].

De acuerdo con lo anterior en este trabajo se presenta un estudio químico y de actividad bactericida de compuestos tipo ácidos grasos y esteroidales aislados de las esponjas *Suberites aurantiaca* y *Amphimedon viridis* recolectadas en la Bahía de Cispatá en el Caribe Colombiano.

PAULA GALEANO GARCIA

Químico.

paulagaleano20@yahoo.com.ar

OMAR TORRES

M.Sc Profesor Asistente

Universidad de Córdoba

omartorres@hispanavista.com

JUAN ZULUAGA

M.Sc Profesor Asistente

Universidad de Córdoba

jucazuve@hotmail.com

ALBERTO ANGULO

M.Sc Profesor Asociado

Universidad de Córdoba

aangulo@sinu.unicordoba.edu.co

GILMAR SANTAFÉ

Ph.D Profesor titular

Universidad de Córdoba

gsantafe@sinu.unicordoba.edu.co

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de las esponjas marinas. Los animales estudiados fueron recolectados en la Bahía de Cispatá, Córdoba, en el Caribe Colombiano, encontrándose a profundidades que variaron entre 2 y 10 m. Una vez recolectadas, las esponjas fueron cortadas en trozos pequeños y se colocaron en contacto con metanol durante tres días, posteriormente, el solvente fue eliminado mediante destilación a presión reducida.

Técnicas empleadas.

Cromatografía en capa fina y cromatografía en columna. Los procesos de fraccionamiento y purificación de los extractos y fracciones de interés se llevaron a cabo mediante cromatografía en columna (CC) empleando como fase estacionaria sílica gel (0.063 - 0.2 mm, Merck®) teniendo en cuenta la relación fase estacionaria: muestra (50:1) y como fase móvil se utilizaron soluciones con gradiente de polaridad de los solventes Hexano, Acetato de etilo y Metanol. El monitoreo por Cromatografía en capa delgada (CCD) se realizó en cromatoplas de aluminio 20 x 20 cm de

sílica gel 60F 254 y un espesor de 0.2 mm utilizando como fase móvil mezclas de los solventes anteriormente mencionados. Como medios de detección se utilizaron una lámpara Ultravioleta marca CAMAG (con longitudes de onda de 254 y 366 nm), solución de ácido fosfomolibdico al 5% en etanol y reactivo Liebermann-Burchard, con aspersiones sobre las placas y posterior calentamiento.

Para los derivados metil ésteres y pirrolidídicos de los ácidos grasos se empleó como fase estacionaria sílica gel para CCD tipo 60HF₂₅₄ (relación, muestra: fase estacionaria 1:50) y gradientes discontinuos de solventes Hexano: Benceno y Benceno: Acetato de etilo respectivamente. [2]

Cromatografía de gases de alta resolución acoplada a espectrometría de masas. El análisis por cromatografía de gases de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (CGAR-EM) para los derivados de ácidos grasos, se realizó en un equipo Shimadzu GC-17 A utilizando una columna capilar de sílica fundida Columna HP-5 (0,25 mm, 30,0 m, 0.25 μ m) nominal y Helio como gas de arrastre a 1.0 mL / min. El detector utilizado fue un espectrómetro de masas Shimadzu modelo QP-5050 A, con una fuente de ionización de 70 eV y un filamento de 60 μ A mantenido a 300 °C. La temperatura del inyector y detector para cada uno se mantuvo a 300°C. Para el análisis de los ésteres metílicos se utilizó un programa de temperatura en la columna desde 135°C por 4 minutos hasta 280°C por 15 minutos a una velocidad de 2°C/min y para las pirrolididas se utilizó en la columna un programa de temperatura desde 200°C por 4 minutos hasta 295°C por 30 minutos a una velocidad de 2°C/min. El split fue de 1: 10 y el volumen de inyección fue de 1 μ L.

Cromatografía líquida de alta eficiencia. El fraccionamiento y análisis por Cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) se realizó en un cromatógrafo Merck-Hitachi L-6000 A, equipado con una bomba binaria (Beckman 118) y un detector de índice de refracción (Waters R-401), para el caso se utilizó una columna Lichocart RP-18 (125 x 4 mm d.i., μ m). Flujo: 1 mL/min. Todas las muestras se filtraron antes de su análisis a través de filtros desechables Millipore y el solvente se desgasificó al vacío luego de filtrarlo a través de membranas Millipore (Durapore 0.45 μ m HV).

Espectrometría de masas. Los espectros de masas de impacto electrónico por entrada directa de los compuestos epidioxisterólicos se tomaron en un equipo Shimadzu modelo QP-5050 A utilizando una fuente de ionización de 70 eV.

Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear. Los espectros de ¹H y ¹³C fueron realizados en CDCl₃ y se utilizó TMS como referencia interna empleando un espectrómetro Bruker AC-200 de 200 MHz.

Esteres metílicos de ácidos grasos. Se colocaron 100 mg de la mezcla de ácidos grasos y 2 mL de trifluoruro de boro metanólico (14%) en un baño de arena a 90° C durante dos horas. La reacción fue monitoreada por CCD, posteriormente se agregaron 5 mL de hexano y se lavó con solución saturada de cloruro de sodio. Luego la fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se filtró obteniéndose los respectivos ésteres.

Pirrolididas de ácidos grasos. 5 mg de esterres metílicos de ácidos grasos se trataron con una mezcla de pirrolidina:ácido acético (10:1) en una baño de arena a 100°C por 90 min. La reacción se monitoreo por CCD. Posteriormente, se extrajo la mezcla de reacción con cloroformo y la fase orgánica fue tratada con una solución 2N de ácido clorhídrico, posteriormente se seco con sulfato de sodio anhidro y se filtro obteniéndose las pirrolididas.

Obtención de epidioxisteroles. Partiendo de la fracción esterólica pura se procedió a realizar una reacción de oxidación la cual se llevó a cabo disolviendo 400 mg de está en 150 ml de Cloroformo grado reactivo, sometiendo la mezcla a reflujo con agitación constante y luz directa de una lámpara de 100 W por 72 horas (Fig. 1), monitoreando el progreso de la reacción por CCD, empleando como fase móvil Hexano: Acetato de etilo (2:1) y comparando con un patrón de 5a,8a-epidioxiergosta-6,22-dien-3 β -ol; la aparición de una mancha de Rf: 0.23 indicó la obtención de los epidioxisteroles como producto final de la oxidación de los esterres con núcleo esteroidal^{5,7}.

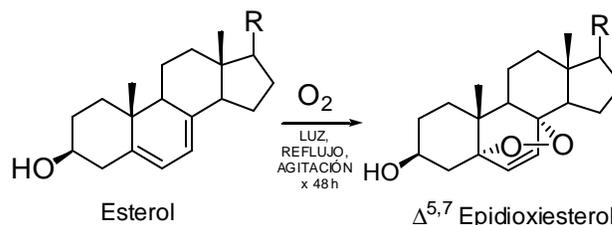


Figura 1. Obtención de epidioxisteroles.

Actividad bactericida. Método de difusión en agar.

Diámetro de los discos: 5 mm, medio de cultivo: Agar de Mueller-Hinton, espesor del agar: 4 mm, tiempo de incubación: 24 h, temperatura de incubación: 37 °C. Las fracciones y los extractos fueron evaluados por triplicado en experimentos *in Vitro* contra cepas de microorganismos Gram-positivos (*Staphylococcus aureus*) y Gram-negativos (*Escherichia coli*). Se emplearon sensidiscos S&S® (Sigma-aldrich, 6 mm) esterilizados por exposición a la luz ultravioleta durante 1 hora, posteriormente cada sensidisco fue impregnado con soluciones de las muestras a concentraciones de 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62 y 7.81 μ g/mL. De cada una de las muestras se aplicaron 500 μ L por cada sensidisco,

15 minutos después, las cajas Petri fueron incubadas y posteriormente se midieron los halos de inhibición.

3. RESULTADOS

Los extractos metanólicos fueron sometidos a diferentes sistemas de partición siguiendo una adaptación del método de Kupchan [3] obteniendo subextractos de menor complejidad química agrupados de acuerdo a su polaridad, los cuales fueron fraccionados a través de cromatografía en columna repetitiva. Las fracciones así obtenidas se monitorearon por medio de CCF comparándolas con patrones conocidos (colesterol para esteroides y ácido palmítico para los ácidos grasos), de esta forma se aislaron fracciones tanto de ácidos grasos como de esteroides, las cuales fueron posteriormente analizadas por CGAR-MS. Los ácidos fueron evaluados como sus derivados ésteres metílicos y pirrolidídicos. El análisis cromatográfico y el de los espectros de masas permitieron determinar la estructura química de 9 ácidos grasos (tabla 1) y 6 compuestos tipo esteroles en *A. viridis* (colesta-5,22-dien-3 β -ol (1), colest-5-en-3 β -ol (2), 24?-metilcolesta-5,22-dien-3 β -ol (3), 24?-metilcolest-5-en-3 β -ol (4), 24?-etilcolesta-5,22-dien-3 β -ol (5), 24?-etilcolest-5-en-3 β -ol (6), ver figura 2). Por su parte, en *S. aurantiaca* fueron identificados 16 ácidos grasos (tabla 1).

Acido graso	PM	En esponja	
		A. v	S. a
n-tetradecanoico	228	X	x
n-pentadecanoico	242	X	
12-metiltetradecanoico	242	X	
13-metiltetradecanoico	242	X	
5,8,11,14,17- eicosapentaenoico	302		x
9-hexadecenoico	254	X	
11-hexadecenoico	254		x
n-hexadecanoico	256	X	
4,8,12-trimetiltridecanoico	256	X	x
14-metil- pentadecanoico	256		x
7-metil-6-hexadecenoico	268		x
9, 12, 13-trimetiltetradecanoico	270	X	
heptadecanoico	270		x
15-metil-hexadecanoico	270		x
5,8,11,14,17-eicosapentaenoico	302		x
n-octadecanoico	284	X	x
9,10-ciclopropanooctadecanoico	296		x
14- metil-octadecanoico	298		x
5,8,11,14- eicosatetraenoico	304		x
8,11,-eicosadienoico	308		x
11- eicosenoico	310		x
25-oxo-hexacosenoico	410		x

Tabla 1. Ácidos grasos identificados en *A. viridis* y *S. aurantiaca*.

En un trabajo previo [4], encontramos que la fracción esteróica de *S. aurantiaca* contenía compuestos esteroidales con núcleo $\Delta^{5,7}$, los cuales son susceptibles de ser oxidados produciendo compuestos

epidioxisteroidales que se caracterizan por presentar gran actividad biológica [5]. De acuerdo con lo anterior, se desarrolló la oxidación de dichos esteroides obteniéndose los compuestos: 5a,8a-epidioxicolesta-6,22-dien-3 β -ol (7), 5a,8a-epidioxi-24e-metilcolesta-6,22-dien-3 β -ol (8) y 5a,8a-epidioxi-24e-etilcolesta-6,22-dien-3 β -ol (9), los cuales se identificaron por espectrometría de masas y RMN ^1H y ^{13}C .

Datos espectroscópicos.

5a,8a-epidioxicolesta-6,22-dien-3 β -ol (7). RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz). d 6.51 ppm (d, $J = 8.3$ Hz, H-6), d 6.24 ppm (d, $J = 8.3$ Hz, H-7), d 5.1 ppm (2H, m, H-22 y H-23), d 3.99 ppm (1H, m, H-3), d 0.81 ppm (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H-27), d 0.79 ppm (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H-26), 0.85 ppm (3H, s, H-18), 0.83 ppm (3 H, t, $J = 7.0$ Hz, H-29), 0.90 ppm (3H, s, H-19) y 1.12 ppm (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-21), RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) d 135.2 (d, C-22), d 132.2 (d, C-23), d 82.1 (s, C-5), d 79.4 (s, C-8), d 66.4 (d, C-3), d 20.5 (c, C-21), d 17.5 (c, C-27), d 18.5 (c, C-26) d 18.1 (c, C-19) d 12.5 (c, C-18). EMIE 70 eV: m/z 414 $[\text{M}]^+$, 382, $[\text{M} - \text{O}_2]^+$, 364 $[\text{M} - \text{O}_2 - \text{H}_2\text{O}]^+$, 349 $[\text{M} - \text{O}_2 - \text{H}_2\text{O} - \text{CH}_3]^+$. Fórmula molecular $\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{O}_3$. HPLC, tr: 20.5 min.

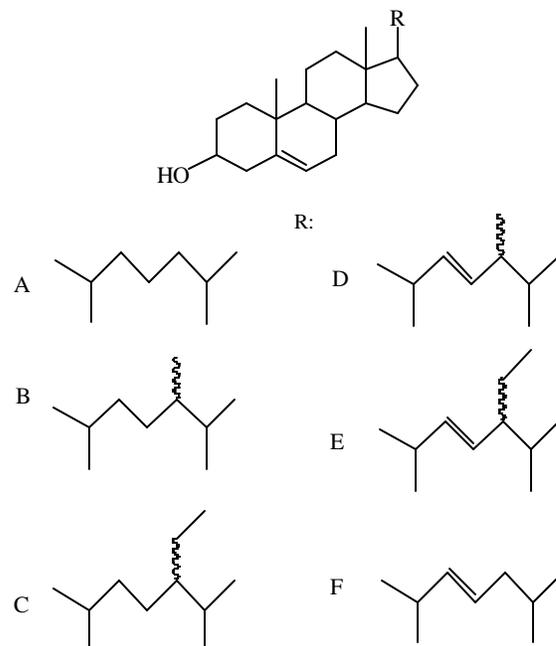


Figura 2. Esteroides identificados en *A. viridis*. Núcleo Δ^5 y cadena lateral (R): R=F, compuesto 1; R=A, compuesto 2; R=D, compuesto 3; R=B, compuesto 4; R=E, compuesto 5; R=C, compuesto 6.

5a,8a-epidioxi-24e-metilcolesta-6,22-dien-3 β -ol (8). EMIE 70 eV. m/z 428 $[\text{M}]^+$, 410 $[\text{M} - \text{H}_2\text{O}]^+$, 396 $[\text{M} - \text{O}_2]^+$, 363 $[\text{M} - \text{O}_2 - \text{H}_2\text{O} - \text{CH}_3]^+$, 337 $[\text{M} - \text{O}_2 - \text{C}_3\text{H}_7\text{O}]^+$, m/z 271 $[\text{M} - \text{O}_2 - \text{Cad Lat}]^+$, 253 $[\text{C}_{19}\text{H}_{25}]^+$ y m/z 251 $[\text{C}_{19}\text{H}_{23}]^+$. $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}_3$ HPLC, tr: 25.0 min

5a,8a-epidioxi-24e-etilcolesta-6,22-dien-3β-ol (9). RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz). d 6.51 ppm (d, *J* = 8.3 Hz, H-6), d 6.23 ppm (d, *J* = 8.3 Hz, H-7), d 5.1 ppm (2H, m, H-22 y H-23), d 3.97 ppm (1H, m, H-3), d 0.79 ppm (3H, d, *J* = 6.7 Hz, H-27), d 0.81 ppm (3H, d, *J* = 6.7 Hz, H-26), 0.82 ppm (3H, s, H-18), 0.83 ppm (3 H, t, *J* = 7.0 Hz, H-29), 0.89 ppm (3H, s, H-19) y 1.13 ppm (3H, d, *J* = 6.6 Hz, H-21), RMN ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) d 137.5 (d, C-22), d 129.9 (d, C-23), d 82.1 (s, C-5), d 79.3 (s, C-8), d 66.4 (d, C-3), d 21.0 (c, C-21), d 20.8 (c, C-27), d 18.9 (c, C-26) d 18.1 (c, C-19) d 12.8 (c, C-18). EMIE 70 eV: m/z 442 [M]⁺, 424 [M- H₂O]⁺, 410 [M-O₂]⁺, 392 [M- O₂ + H₂O]⁺, Fórmula molecular C₂₉H₄₆O₃. HPLC, tr: 28.3 min.

4. CONCLUSIONES

Las bacterias *S. aureus* (Gram-positiva) y *E. coli* (Gram-negativa) mostraron sensibilidad frente a los extractos metanólico y de diclorometano de la esponja *A. viridis* a todas las concentraciones ensayadas.

La preparación de derivados de ésteres metílicos y pirrolididas de ácidos grasos y su posterior evaluación por CGAR-EM, permitió identificar en la esponja *A. viridis* 9 ácidos grasos con cadenas hidrocarbonadas de C-14 a C-18, que incluyen cadenas normales saturadas, cadenas ramificadas saturadas y cadenas insaturadas. Por su parte en *S. aurantiaca* se identificaron 16 ácidos grasos con cadenas hidrocarbonadas de C-13 a C-26 que incluyen cadenas: normales saturadas, ramificadas saturadas, insaturadas, insaturadas y ramificadas, con un grupo ciclopropilo y con un grupo carbonilo. En la primera esponja el ácido mas abundante fue el n-octadecanoico con un 70.5% y en la segunda esponja fue el 11- hexadecenoico con un 16,7%. Solo tres compuestos, los ácidos n-tetradecanoico, 4,8,12-trimetiltridecanoico y n-octadecanoico son comunes en los dos organismos estudiados.

Seis monohidroxiesteros fueron identificados en *A. viridis*, todos con núcleo ⁵ encontrándose cadenas laterales diferentes, las cuales varían entre 8 y 10 átomos de carbono con cadena laterales tanto saturadas como insaturadas en el carbono 22.

En *S. aurantiaca* se aisló la fracción de compuestos esteroidales con núcleo ^{5,7}, la cual fue oxidada fotoquímicamente obteniéndose tres epidioxiesteros, compuestos que mostraron alta actividad bactericida contra *S. aureus* y *E. coli*.

5. BIBLIOGRAFÍA

[1] BLUNT J, COPP M, MUNRO M, NORTHCOTE P, AND PRINSEP M. Marine Natural Products. *Natural Products Reports*. 23, 26-78, 2006 y las mas de 15 anteriores revisiones de esta serie.

[2] DUQUE C, CEPEDA N, MARTINEZ A, The steryl ester and phospholipids fatty acids of the sponge *Agelas conifera* from the Colombian Caribbean. *Lipids*, 28, 767-769, 1993.

[3] SANTAFÉ G, ANTA C, JIMENEZ, C. Novel cytotoxic oxygenated C29 sterol from the Colombian marine sponge *Polymastia tenax*. *Journal of Natural Products*, 65, 1161-1164, 2002.

[4] SANTAFE G, MONTAÑO M, SANCHEZ E. Estudio químico y actividad bactericida de las fracciones esterólicas de las esponjas *Suberites aurantiaca* y *Amorphinopsis sp1* recolectadas en la Bahía de Cispatá en Córdoba. *Memorias del XIII Congreso Colombiano de Química*, Cartagena, 2004.

[5] GONZALEZ C, PAREJA A, MARQUEZ D, MARTINEZ A, HIGUITA E. Efecto citotóxico y clastogénico de la fracción de 5a,8a -epidioxiesteros de la esponja marina *Ircinia campana* del Caribe Colombiano. *Acta Farm. Bonaerense*, 24 (1), 75-79, 2005.