

## Las esponjas marinas *Aplysina fulva* y *Aplysina lacunosa* como fuentes de metabolitos secundarios bioactivos

*Marine sponges Aplysina fulva and Aplysina lacunosa as sources of bioactive secondary metabolites*

Haydelba D'Armas, Miguel Lemus, María Amaro, Milagros Fariñas, Gabriel Ordaz

**Palabras clave:** *Aplysina fulva*, *Aplysina lacunosa*, actividad biológica, esponjas marinas, metabolitos secundarios

**Key words:** *Aplysina fulva*, *Aplysina lacunosa*, biological activity, marine sponges, secondary metabolites

### RESUMEN

Los ejemplares de las esponjas marinas fueron recolectados en la Bahía de Mochima, estado Sucre (Venezuela). Para su análisis, se realizó una extracción continua con acetato de etilo a cada una de las especies *Aplysina fulva* y *Aplysina lacunosa*. A cada una de ellas, se le realizaron pruebas químicas y ensayos biológicos como: letalidad con *Artemia salina*, actividad antibacteriana y antifúngica (antibiograma). El análisis fitoquímico reveló la presencia de ciertos metabolitos secundarios comunes para ambas esponjas (alcaloides, taninos, metilencetonas y cumarinas); esteroides insaturados y triterpenos pentacíclicos para *A. fulva*, y polifenoles, saponinas y glucósidos cardiotónicos para *A. lacunosa*. El extracto de *A. fulva* mostró actividad bactericida moderada contra cepas de *Staphylococcus aureus* y leve contra *Escherichia coli*; mientras que el extracto de *A. lacunosa* exhibió una actividad bactericida leve contra cepas de *S. aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus* y *Bacillus subtilis*. Ambas esponjas mostraron una actividad letal significativa (<1000 µg/ml) frente a nauplios de *A. salina* a las 24 h de exposición (279,85 y 268,25 µg/ml para *A. fulva* y *A. lacunosa* respectivamente). Del fraccionamiento

cromatográfico de ambas especies, se obtuvieron diferentes fracciones que presentaron buena actividad en los bioensayos realizados. Varias sub-fracciones mostraron diversos compuestos, lográndose identificar mediante CG/EM algunos constituyentes principales de estas esponjas como los ésteres metílicos de los ácidos: 25-metilheptacosanoico, 9-metiltetradecanoico, 11-metiloctadecanoico, 10-metildodecanoico, hexadecanoico; los ácidos: 9-octadecanoico, n-hexadecanoico, n-octadecanoico; ftalato de dibutilo y hentricontan-16-ona. Además, se aisló y caracterizó el undecanol por RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C. A partir de los resultados obtenidos, se puede inferir que ambas esponjas marinas son una fuente promisoría de metabolitos secundarios bioactivos.

### ABSTRACT

The specimens of the marine sponges were collected in Mochima Bay, Sucre state (Venezuela). A continuous extraction with ethyl acetate was carried out on each of the species *Aplysina fulva* and *Aplysina lacunosa* for its analysis. Chemical and biological tests were performed to each of them, such as: lethality with *Artemia salina*, antibacterial and antifungal activity (antibiogram). The phytochemical

analysis revealed the presence of certain common secondary metabolites for both sponges (alkaloids, tannins, methyl ethyl ketones and coumarins); unsaturated sterols and pentacyclic triterpenes for *A. fulva*, and polyphenols, saponins and cardiotonic glycosides for *A. lacunosa*. *A. fulva* extract showed moderate bactericidal activity against *Staphylococcus aureus* and mild antibacterial activity against *Escherichia coli* strain; while the extract of *A. lacunosa* exhibited a mild bactericidal activity against strains of *S. aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus* and *Bacillus subtilis*. Both sponges showed significant lethal activity (<1000 µg/ml) against *A. salina* nauplii at 24 hours of exposure (279.85 and 268.25 µg/ml for *A. fulva* and *A. lacunosa* respectively). From the chromatographic

fractionation of both species, different sub-fractions were obtained that showed good activity in the bioassays performed. Several sub-fractions showed various compounds, being able to identify some main constituents of these sponges, such as the methyl esters of 25-methylheptacosanoic, 9-methyltetradecanoic, 11-methyloctadecanoic, 10-methyl dodecanoic, hexadecanoic acids; the acids: 9-octadecanoic, n-hexadecenoic, n-octadecanoic; dibutyl phthalate and hentricontan-16-one by GC/MS. In addition, undecanol was isolated and characterized by <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR. From the results obtained, it can be inferred that both sea sponges are a promising source of bioactive secondary metabolites.

## INTRODUCCIÓN

Las esponjas constituyen un recurso rico en productos naturales bioactivos y pueden sintetizar algunos compuestos químicos con propiedades farmacológicas de aplicación en la medicina, como sustancias antitumorales, antibacterianas o antifúngicas, entre otras. Las esponjas *Aplysina lacunosa* y *Aplysina fulva* pertenecen a la familia *Aplysinidae* (orden Verongida) y poseen un tipo de sustrato sobre coral y praderas de *Thalassia testudinum*. Dichas especies provenientes de aguas venezolanas, no han sido estudiadas, y como su composición

química depende de las condiciones ambientales, las mismas fueron recolectadas en la Bahía Mochima, estado Sucre con el fin de investigar sus metabolitos secundarios y conocer su bioactividad, para tener un conocimiento más profundo de la química de estas esponjas y del potencial que puedan tener sus constituyentes en el campo de la biomedicina. Este es un reporte importante para la literatura, sobre los constituyentes de dichas esponjas marinas, que confirma la potencialidad de estos organismos para biosintetizar varias familias fitoquímicas.

## METODOLOGÍA

### Recolección de las muestras

Se recolectaron ejemplares de las esponjas marinas *Aplysina lacunosa* y *Aplysina fulva*, en la localidad de Mangle Quemao (10° 22' 28" Lat. N y 64° 20' 53" Long. W), Bahía de Mochima, ubicada en la costa norte de Venezuela, estado Sucre, donde se tomaron las esponjas a poca profundidad y fueron trasladadas en una cava con hielo a la Universidad de Oriente. La identificación se realizó en el Laboratorio de Bioactivos Marinos del Departamento de Biología Marina, Instituto Oceanográfico de Venezuela.

### Extracción

Las esponjas frescas se cortaron en trozos pequeños para limpiarla de cualquier organismo que pudiese estar en ella, se dejaron suspendidas en agua de mar bifiltrada cambiando el agua en intervalos de una hora en dos ocasiones, luego, se escurrieron para eliminar la mayor cantidad de agua. Posteriormente, se colocaron en un envase con metanol durante 48 horas, se filtraron y el residuo se re-extrajo sucesivamente. Los filtrados combinados fueron evaporados y concentrados a presión reducida en un rotaevaporador Hildolph a 40 °C para la obtención del extracto metanol/agua. Seguidamente, este extracto se particionó con agua y se extrajo con acetato de etilo para la fase orgánica que fue separada y secada con sulfato de sodio anhidro y concentrada a presión reducida. Las fracciones solubles en acetato de etilo se

pesaron y guardaron para posteriores análisis.

### Análisis Fitoquímico

La determinación de las diferentes familias químicas se realizó siguiendo la metodología descrita por Marcano & Hasegawa (2002) y Murillo & Méndez (2007).

### Bioensayo de actividad antimicrobiana

Se empleó la técnica de difusión en agar, empapando discos estériles de papel de filtro Whatman N° 3 de 5 mm con 10 µl de una solución (preparada con 40 mg del extracto a probar en 1 ml de un solvente) y se colocaron en una placa Müller-Hinton, previamente inoculada con cepas bacterianas certificadas (*Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter calcoaceticus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* sp.). Para la actividad antifúngica se utilizaron placas con PDA (Agar Papa Dextrosa) con cepas de los hongos *Curularia* sp., *Aspergillus niger*, *Candida albicans* y *Penicillium crustobum*. Posteriormente, se pre incubaron a 5°C durante 12 h, y luego a 37°C por 24 h. Las propiedades antimicrobianas se evaluaron por la formación del halo de inhibición alrededor del disco, el cual se midió utilizando un vernier (Bauer *et al.*, 1966). Para la interpretación de los resultados se utilizó la metodología de cruces, donde se establece las categorías interpretativas para

los diámetros de la zona de inhibición (Monks *et al.*, 2002).

#### Toxicidad en contra de *Artemia salina*

La actividad tóxica o letal contra larvas del crustáceo *A. salina*, del extracto y/o fracciones de las esponjas fue evaluada mediante la realización de un bioensayo en el cual se preparó una solución de 10 000 µg/ml del extracto o fracción, en una mezcla H<sub>2</sub>O/DMSO según la solubilidad de éstos y, a partir de ésta, se prepararon soluciones de 1 000; 100; 10; 1; 0,1; 0,01 µg/ml mediante diluciones sucesivas con agua de mar bifiltrada en viales que contenían entre 10 y 15 nauplios de *A. salina* eclosionados con 24 horas de anticipación. Por cada concentración, se realizaron cuatro réplicas y un control con igual número de réplicas. La cuantificación de la mortalidad de los nauplios se realizó a las 24 h de exposición de éstos a las diferentes muestras y la CL<sub>50</sub> se calculó mediante el software estadístico Finney Two V2.5 (métodos Probit, Logit y Media móvil con un límite de confianza del 95%) diseñado por Stephan (1977) para determinar la concentración letal media (LC<sub>50</sub>) (Meyer *et al.*, 1982).

## RESULTADOS y DISCUSIÓN

El análisis fitoquímico reveló la presencia de ciertos metabolitos secundarios comunes para ambas esponjas (alcaloides, taninos, metilencetonas y cumarinas); esteroides insaturados y triterpenos pentacíclicos para *A. fulva*, y polifenoles, saponinas y glucósidos cardiotónicos para

#### Fraccionamiento y caracterización

La aplicación de diferentes técnicas cromatográficas (cromatografía en columna, cromatografía analítica y preparativa en capa fina) permitió la separación de los principales constituyentes químicos de los extractos en acetato de etilo, y fracciones bioactivas de ambas especies del género *Aplysina*. Las Cromatografías de Columna (CC) se realizaron sobre sílica gel 35-70 mesh (0,2 – 0,5 mm) como fase estacionaria, utilizándose mezclas de solventes de distintas polaridades. Para la Cromatografía de Capa Fina preparativa (CCFP) se utilizó una placa de vidrio de 20x20 cm<sup>2</sup> recubierta de sílica gel 10 - 40 µm de 1 ml de espesor y como revelador la luz UV y una reacción en molibdato de amonio. Los metabolitos secundarios de las esponjas marinas se identificaron mediante la combinación de resonancia magnética nuclear (RMN, marca Bruker AVANCE de 300 MHz) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM, cromatógrafo de gases marca HEWLETT-PACKARD modelo 5890 y detector de masas HP modelo 5971 A).

*A. lacunosa*. Se puede observar que en ambas esponjas se presentan la misma cantidad familia de metabolitos secundarios (seis), observándose que los alcaloides, taninos y metilcetonas están presentes en ambas esponjas y obtuvieron el 100% en estas especies. Ambas esponjas

presentaron taninos y metilencetonas, esto se puede deber a que estas especies se han caracterizado por poseer actividades biológicas significativas como actividad antitumoral, antimicrobiana, fototóxica,

entre otras, siendo posible que estos dos tipos de metabolitos estén relacionados con algún mecanismo de defensa de las mismas (ver tabla 1).

Tabla 1. Análisis fitoquímico de las fracciones solubles en acetato de etilo de las esponjas *A. fulva* y *A. lacunosa*, respectivamente

Familia de Metabolitos	<i>A. fulva</i>	<i>A. lacunosa</i>	%EMF
Alcaloides	+	+	100
Taninos	+	+	100
Metilencetonas	+	+	100
Esteroles insaturados	+	-	50
Triterpenos pentacíclicos	+	-	50
Antraquinonas	-	-	0
Polifenoles	-	+	50
Saponinas	-	+	50
Glucósidos cianogénicos	-	-	0
Glucósidos cardiotónicos	-	+	50
Cumarinas	+	-	50
%MPE	54,54	54,54	

(+): Detectados; (-): No detectados; %EMF: porcentaje de fracciones con metabolitos pertenecientes a la misma familia química; %MPE: porcentajes de metabolitos presentes para cada una de las especies

En ambas especies se hicieron presente los alcaloides, lo que concuerda con trabajos realizados anteriormente en donde se reportaron alcaloides en estas especies, como el aislamiento e identificación a partir de *Aplysina* spp, colectada en las costas de Puerto Rico, de un alcaloide tipo bromotirosina 11-oxoaerotionina, el cual exhibe citotoxicidad *in vitro* contra líneas celulares de cáncer de colon humano (Kirk & Othmer, 1998; Puyana *et al*, 2015), y con la caracterización de otros metabolitos quimiotipos bromotirosinas a partir de esponjas *Aplysinas* de las costas brasileñas (Silva *et al*, 2010). La presencia de alcaloides en esponjas marinas se puede deber a las

altas concentraciones de nitritos y nitratos disueltos en los océanos, incorporándolos a su metabolismo mediante la filtración del agua de mar.

Cabe destacar que muchos de estos resultados concuerdan con los reportados para diversos trabajos realizados sobre esponjas marinas de este género (*Aplysina*), principalmente en la presencia de alcaloides (Gutterres *et al*, 2008; Cedeño, 2010; Lanza, 2012). A pesar de encontrarse algunas diferencias en los otros metabolitos reportados en los trabajos citados, principalmente con lo presentado por *A. fulva* que mostró la presencia de esteroles insaturados y triterpenos pentacíclicos y

dio negativo para polifenoles, saponinas y glucósidos (cianogénicos y cardiotónicos), contrario a lo observado para *A. lacunosa* que exhibió la ausencia de esteroides y triterpenos, y la presencia de glucósidos cardiotónicos, conllevando a la obtención de metabolitos totalmente diferentes en polaridad y estructura. Estos resultados difieren un poco de los hallados por Cedeño-Ramos *et al* (2015) donde las esponjas del género *Aplysina* fueron las que presentaron mayor cantidad de metabolitos, y los ensayos resultaron negativos para la detección de

antraquinonas, polifenoles, saponinas, glicósidos cianogénicos y glicósidos cardiotónicos.

El extracto de *A. fulva* mostró actividad bactericida moderada contra cepas de *Staphylococcus aureus* y leve contra *Escherichia coli*; mientras que el extracto de *A. lacunosa* exhibió una actividad bactericida leve contra cepas de *S. aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus* y *Bacillus subtilis*, con lo que se puede decir que estas especies poseen compuestos activos contra el crecimiento de estas cepas bacterianas (ver Tabla 2).

Tabla 2. Actividad antibacteriana de las fracciones solubles en acetato de etilo de las esponjas marinas *A. fulva* y *A. lacunosa*

Bacterias	<i>A. lacunosa</i>	<i>A. fulva</i>	%EAM
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	NE	0
<i>Escherichia coli</i>	-	+	50
<i>Pseudomonas sp.</i>	-	NE	0
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	-	NE	0
<i>Bacillus subtilis</i>	+	NE	50
<i>Micrococcus luteus</i>	+	NE	50
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	++	100
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	NE	50
<i>Listeria monocytogenes</i>	NE	-	0
<i>Salmonella sp.</i>	NE	-	0

+++ : Actividad fuerte (diámetro superior a 18 mm), ++ : Actividad moderada (diámetro entre 15 – 18 mm), + : Actividad leve (diámetro entre 11 – 14 mm), - : no hay actividad, NE: No ensayada, %EAM: porcentaje de extractos activos contra un mismo microorganismo. Estudio realizado con una concentración de 40 mg/ml (Monks *et al.*, 2002).

En este caso las dos esponjas del mismo género presentaron actividad antibacteriana del 100% contra cepas de *Staphylococcus aureus*, resultado que concuerda con trabajos realizados anteriormente con estas especies y con

*Aplysina fistularis* por otros autores (Morales *et al.*, 2000; Cedeño-Ramos, 2015).

La esponja *A. fulva* mostró actividad leve contra *Escherichia coli* y una actividad moderada contra *Staphylococcus aureus*, en este caso las dos especies resultaron activas

solo para bacterias Gram (+). En esta investigación las dos esponjas del mismo género presentaron actividad antibacteriana del 100% contra cepas de *Staphylococcus aureus*, resultado que concuerda con reportes sobre estas especies realizados previamente en la literatura (Galeano & Martínez, 2007; Lanza, 2012).

Se debe destacar que, aunque las esponjas no tuvieron actividad contra algunas cepas, no quiere decir que la especie o alguna otra esponja del mismo género, pero de diferente hábitat, pueda llegar a tener actividad, ya que los metabolitos secundarios pueden ser diferentes en cada esponja, dependiendo de los factores ambientales en donde se desarrollen. Tanto *A. fulva* como *A. lacunosa* no presentaron actividad antifúngica contra ninguna de las cepas utilizadas, se podría decir que estas especies no poseen compuestos activos contra las especies de hongos ensayadas.

*Artemia salina* es considerada de gran utilidad en el área de productos naturales, debido a que se puede predecir actividades antitumorales, ya que este estudio tiene una correlación positiva entre la mortalidad de los nauplios de *A. salina* con la citotoxicidad frente a las células 9 KB (carcinoma nasofaríngeo humano) y la línea celular 3PS (leucemia *in vivo*). También son empleados para detectar

compuestos antitumorales y medir actividades plaguicidas, ya que estos crustáceos son muy sensibles a un amplio rango de compuestos químicos y diversos fármacos (McLaughlin & Lingling, 1998; Pino & Lazo, 2010). De acuerdo con este método, se refleja qué tan tóxicos pueden ser los respectivos extractos o fracciones. Para esto, se utilizó la metodología propuesta por los autores citados y en la cual, valores de  $CL_{50} \leq 30 \mu\text{g/ml}$  se consideran soluciones muy tóxicas; sin embargo, todas las que poseen  $CL_{50} < 1000 \mu\text{g/ml}$  son considerados buenos resultados y se estiman que podrían ser letales también.

En la Tabla 3, se puede observar que los extractos de ambas especies son muy similares, a medida que transcurrieron las horas la letalidad aumentó, este incremento de la letalidad se puede deber a una alteración del proceso de desarrollo de los nauplios de *A. salina*, por efecto de los principios activos presentes en los diferentes extractos orgánicos; debido a que a las 48 horas del bioensayo, la membrana celular que protege a estos organismos se ha debilitado por la exposición a los extractos; permitiendo de esta manera que los compuestos activos actúen con mayor efectividad (Carballo *et al.*, 2002).

Tabla 3. Actividad letal ( $\mu\text{g/ml}$ ) contra *Artemia salina* de las fracciones solubles en acetato de etilo de las esponjas marinas *A. fulva* y *A. lacunosa*

Esponjas	$CL_{50}$ (24h)	$CL_{50}$ (48h)	Método	CategoríaCYTED
<i>A. fulva</i>	279,85	258,83	Probit	Moderadamente tóxico
<i>A. lacunosa</i>	268,25	242,89	Probit	Moderadamente tóxico

Ambas esponjas mostraron una actividad letal significativa ( $<1000 \mu\text{g/ml}$ ) frente a nauplios de *A. salina* a las 24 h de exposición (279,85 y 268,25  $\mu\text{g/ml}$  para *A. fulva* y *A. lacunosa* respectivamente). De acuerdo con este método, valores de  $\text{CL}_{50} \leq 30 \mu\text{g/ml}$  se consideran soluciones muy tóxicas con posible actividad antitumoral (McLaughlin *et al.*, 1998). Sin embargo, todas las que poseen  $\text{CL}_{50} < 1000 \mu\text{g/ml}$  se estiman que podrían ser letales también, y según las categorías del CYTED (1995), estos resultados indican que probablemente estas especies contienen compuestos bioactivos moderadamente tóxicos, que podrían ayudar al tratamiento de enfermedades cancerígenas o formación de tumores, tal como lo sugieren los resultados obtenidos en este bioensayo de letalidad, lo cual las hace buenas candidatas para ensayar con líneas celulares.

Del fraccionamiento cromatográfico de ambas especies, se obtuvieron diferentes fracciones que presentaron buena actividad en los bioensayos realizados. Varias subfracciones mostraron diversos compuestos, lográndose identificar mediante CG/EM algunos constituyentes principales de estas esponjas como los ésteres metílicos de los ácidos 25-metil heptacosanoico, 9-metiltetradecanoico, 11-metiloctadecanoico, 10-metildodecanoico, hexadecanoico; los ácidos: 9-octadecanoico, n-hexadecanoico, n-octadecanoico; ftalato de dibutilo y hentricontan-16-ona. Además, se aisló y caracterizó el undecanol por RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ .

Con la finalidad de realizar un fraccionamiento biodirigido de la fracción soluble en acetato de etilo de la esponja *A. fulva* se le realizaron pruebas biológicas a algunas de las fracciones cromatográficas, de acuerdo con la cantidad de masa obtenida; las fracciones H y I solo mostraron actividad para las pruebas biológicas ensayadas (actividad letal y actividad antibacteriana).

Se obtuvieron 0,2000 g de la subfracción H, la cual mostró actividad fuerte contra varias cepas de bacterias *E. coli*, *S. aureus*, *B. cereus* y *S. enteritidis* y una actividad letal con un valor de  $\text{CL}_{50}$  de 484,45  $\mu\text{g/ml}$  a las 48 horas). El cromatograma de gases de la subfracción H evidenció la presencia de 5 constituyentes químicos donde principalmente abundan ésteres de ácidos como el heptacosanoico, dodecanoico, octadecanoico, tetradecanoico y también el didodecil ftalato (Tabla 4).

La existencia de ácidos grasos en estas esponjas, se debe posiblemente al sistema defensivo que desarrollan contra depredadores de la zona, tal como ocurre con las plantas e insectos. Los ácidos grasos al igual que sus ésteres metílicos, pudieran ser los responsables de la actividad antibacteriana observada en los extractos y fracciones. Sin embargo, se ha demostrado que la esterificación de los ácidos grasos insaturados causaba la pérdida de la actividad inhibitoria de los ácidos grasos. La baja actividad antibacteriana de los ésteres de ácidos grasos se debe, a que el grupo carbonilo libre es necesario para dicha actividad; además que está

relacionada con el tipo de bacteria (Zheng *et al*, 2005).

Tabla 4. *Compuestos identificados en la subfracción H de la fracción en acetato de etilo de la esponja A. fulva*

Compuesto	Tiempo de retención (min)	Fórmula
Ester metílico del ácido-25-metil heptacosanoico	33,53	C <sub>29</sub> H <sub>58</sub> O <sub>2</sub>
Ester metílico del ácido-9-metil tetradecanoico	34,80	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>
Ácido 9- octadecanoico	34,90	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>
Ácido octadecanoico	35,13	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>
Ester metílico del ácido-25-metil heptacosanoico	37,21	C <sub>29</sub> H <sub>58</sub> O <sub>2</sub>
Ácido n-hexadecenoico	38,44	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>
Didodecil ftalato	48,01	C <sub>32</sub> H <sub>54</sub> O <sub>4</sub>

Se obtuvieron 0,7000 g de la subfracción I, la cual mostró actividad moderada contra cepas de bacterias de *E. coli*, *B. cereus* y *S. enteritidis* y actividad leve contra cepas de *S. aureus*. También se obtuvo una actividad letal con un valor de CL<sub>50</sub> de 0,20 µg/ml a las 48 horas de montado el bioensayo, de la misma tendencia como paso con la fracción H, la fracción I también tuvo un efecto

antagónico, debido a que su actividad antibacteriana y letal aumento de forma considerable. El cromatograma de gases de las subfracción I evidenció la presencia de 3 constituyentes químicos: Éster metílico del ácido hexadecanoico, ácido n-hexadecanoico y hentricontan-16-ona (Tabla 5).

Tabla 5. *Compuestos identificados en la subfracción I de la fracción en acetato de etilo de la esponja A. fulva*

Compuesto	Tiempo de retención (min)	Fórmula
Ester metílico del ácido hexadecanoico	18,19	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>
Ácido n-hexadecanoico	18,68	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>
Hentricontan-16-ona	26,86	C <sub>31</sub> H <sub>62</sub> O

En una investigación realizada acerca de los ácidos grasos se comprobó que son tóxicos para varias líneas celulares tumorales humanas, como cáncer de próstata, pecho, vejiga, pulmón y leucemia (Wade, 2004). En otros estudios se señala que los ácidos grasos inhiben de manera efectiva las bacterias Gram positivas, además de que exhiben actividad

antimicótica, reportándose al ácido hexadecanoico como un inhibidor efectivo de bacterias y hongos. Esto concuerda con los resultados obtenidos en el análisis antifúngico de esta subfracción. El ácido hexadecanoico es uno de los ácidos grasos más comunes en los lípidos y ha sido reportado en una amplia variedad de especies terrestres y marinas. Además,

algunos registros señalan que el ácido hexadecanoico, al igual que ácido octadecanoico, posee propiedad apópticas (Ordoñez *et al*, 2003; Benzaria *et al*, 2007).

Es común encontrar en las esponjas marinas, ácidos grasos ligados a distintas clases de lípidos, como por ejemplo fosfolípidos, glicolípidos, glicéridos, esteroides o en forma libre, demostrando la presencia de ácidos demospóngicos (longitudes de cadena superiores a C<sub>24</sub> y generalmente con un patrón de insaturación *cis* C<sub>5</sub> y *cis* C<sub>9</sub>); ácidos grasos con cadena impar y ácidos con un patrón de insaturación C<sub>6</sub> y C<sub>11</sub>, muy poco difundido en la naturaleza, además de la presencia de ácidos poliinsaturados y ramificados (Pandalai *et al.*, 1996).

Cabe destacar que los compuestos (ácido hexadecanoico y éster metílico del ácido hexadecanoico) encontrados en esta subfracción están en concordancia con los encontrados en los diversos trabajos realizados sobre esponjas marinas y otros organismos marinos (Yoo, 2007; Cedeño-Ramos *et al*, 2015). El hentricontan-16-ona fue el metabolito más abundante de esta fracción y es un compuesto que es reportado por primera vez en esta esponja (*A. fulva*).

La fracción soluble en acetato de etilo de *A. lacunosa* fue fraccionada por Cromatografía de Columna. La subfracción 3 obtenida exhibió un efecto antagónico con actividad antibacteriana moderada contra las cepas de las bacterias *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus*

*faecalis*, y una letalidad significativa con un valor de CL<sub>50</sub> de 324,5 µg/ml a las 48 horas del bioensayo.

Además, dicha subfracción mostró una buena separación en el análisis por Cromatografía de Capa Fina Preparativa (CCF), por lo cual se procedió a purificarla por CCFP, colocándose 22,5 mg de la muestra en la placa. Como solventes se empleó CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> – AcOEt 50:50, evidenciándose la presencia de una sola banda aislada a la luz UV; se recuperó de la sílica con acetato de etilo, obteniéndose luego un sólido con una masa de 12,6 mg, representando el 56,0 % del material orgánico cromatografiado. A esta subfracción 3<sub>A</sub> se le realizó espectroscopia RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C, cuyos desplazamientos químicos se expresan en la Tabla 6.

El análisis comparativo de los datos espectroscópicos de <sup>1</sup>H y de <sup>13</sup>C de esta subfracción con aquellos datos teóricos arrojados por el programa Predictor del ChemBioDraw Ultra 2008, mostró concordancia con la estructura del alcohol primario 1-undecanol (Figura 1). Además, pudiéndose inferir que posiblemente este alcohol es uno de los metabolitos causantes de la actividad biológica observada para la subfracción 3 de la fracción soluble en acetato de etilo de *A. lacunosa*. Los alcoholes alifáticos monohídricos de seis o más átomos de carbono se conocen como alcoholes superiores, tradicionalmente derivados de las grasas de los aceites y de las ceras naturales, por lo que se denominan como alcoholes grasos.

Tabla 6. Desplazamientos químicos de  $^1\text{H}$  y de  $^{13}\text{C}$  de la subfracción 3A de la esponja *A. lacunosa* y el undecanol

Posición	Subfracción 3A, $\delta_{\text{H}}$ (ppm) <sup>a</sup>	Undecanol, $\delta_{\text{H}}$ (ppm) <sup>b</sup>	Subfracción 3A, $\delta_{\text{C}}$ (ppm) <sup>a</sup>	Undecanol, $\delta_{\text{C}}$ (ppm) <sup>b</sup>
1	3,62	3,65	63,16	62,8
2	1,55	1,53	32,91	32,2
3	1,24	1,43	25,8	25,6
4	1,24	1,29	29,71	29,6
5	1,24	1,29	29,71	29,6
6	1,24	1,26	29,48	29,6
7	1,24	1,26	29,48	29,6
8	1,24	1,29	29,39	29,3
9	1,24	1,29	31,96	31,9
10	1,24	1,31	22,71	22,7
11	0,86	0,88	14,11	14,1

(<sup>a</sup>): Datos obtenidos a 300 MHz en  $\text{CDCl}_3$ .

(<sup>b</sup>): Datos obtenidos mediante el modelado con el programa Predictor del ChemBioDraw Ultra 2008.

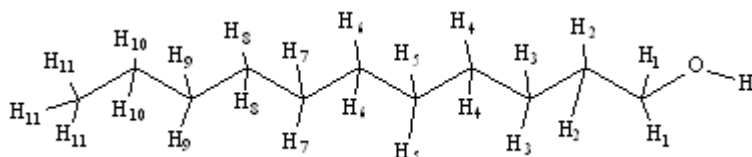


Figura 1. Estructura propuesta a partir del análisis de datos del RMN de la subfracción 3A de la esponja *A. lacunosa*.

## CONCLUSIONES

Ambas esponjas marinas estudiadas mostraron la presencia de alcaloides, taninos y metilcetonas, siendo posible que estas familias de metabolitos

secundarios estén relacionadas con algún mecanismo de defensa de las mismas.

Tanto *A. fulva* como *A. lacunosa* mostraron una actividad letal significativa frente a nauplios de *A. salina*, conteniendo así

compuestos moderadamente tóxicos, y además, exhibieron actividad bactericida, por lo que estas especies poseen constituyentes activos contra el crecimiento de algunas cepas bacterianas.

Los resultados indican que algunos productos naturales identificados podrían

ser la causa de la antibiosis observada, pudiéndose inferir que las especies *A. fulva* y *A. lacunosa* son una fuente prometedora de metabolitos secundarios bioactivos con un gran valor farmacológico.

## REFERENCIAS

- Bauer, A.; Kirby, A.; Sherris, J. y Turk. M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45(4), 493-496. <https://doi.org/10.1093/ajcp/45.4 ts.493>
- Benzaria, A.; Meskini, N.; Dubois, M.; Némoz, G.; Lagarde, M. y Prigent, F. (2007). Phospholipase D as a potential target for the antiproliferative effects of 111 polyunsaturated fatty acids in rat thymocytes. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 18(4), 228-235. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2006.03.009>
- Carballo, J.; Hernández, Z.; Pérez, P. y García, M. (2002). A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. *Biotechnology*, 2(1), 17-21. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-2-17>
- Cedeño, R. (2010). *Estudio químico y bioactividad de las esponjas marinas (Porífera: Demospongiae) más comunes de isla Larga y Mangle Quemao, bahía de Mochima* (Trabajo de pregrado). Departamento de Química, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela.
- Cedeño-Ramos, R.; D'Armas, H.; Amaro, M. y Martínez, R. (2015). Metabolitos secundarios, letalidad y actividad antimicrobiana de seis esponjas marinas de la Bahía de Mochima, Venezuela. *Cuadernos de Investigación UNED*, 7(2), 225-232. <https://doi.org/10.22458/urj.v7i2.1149>
- CYTED (1995). *Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Manual de Técnicas de Investigación*. España: Editor R. Pinzón.
- Galeano, E. y Martínez, A. (2007). Antimicrobial activity of marine sponges from Urabá Gulf, Colombian Caribbean region. *Journal of Medical Mycology*, 17(1), 21-24. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2006.12.002>
- Gutterres, L.; Goulart, G.; Lerner, C.; Soares, A.; Murcia, N. y Muccillo, A. (2008). Investigation of the anti-inflammatory and analgesic effects from an extract of *Aplysina caissara*, a marine sponge. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 22(5), 549-556. <https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.2008.00624.x>
- Kirk y Othmer. (1998). *Enciclopedia temática de Química*. México: Editorial Limusa, S. A.
- Lanza, V. (2012). *Actividad biológica y metabolitos secundarios de esponjas marinas recolectadas en la bahía de Mochima*. Postgrado en Ciencias Marinas. Instituto Océano gráfico de Venezuela.
- Marcano, D. y Hasegawa, M. (2002). *Fitoquímica orgánica*. Caracas, Venezuela: Litopar, Universidad Central de Venezuela.
- McLaughlin, J. y Lingling, L. (1998). The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug Information Journal*, 32, 513-524. <https://doi.org/10.1177/009286159803200223>
- Meyer, N.; Ferrigni, R.; Putnam, E.; Jacobsen, L.; Nichols, J. y McLaughlin, L. (1982). Brine

- shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*, 45(1), 31-34. <https://doi.org/10.1055/s-2007-971236>
- Monks, N.; Lerner, C.; Henriques, A.; Farias, F.; Schapoval, E.; Suyenaga, E.; Da Rocha, A.; Schwartzmann, G. y Mothes, B. (2002). Anticancer, antichemotactic and antimicrobial activities of marine sponges collected off the coast of Santa Catarina, southern Brazil. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 281, 1-12. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(02\)00380-5](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(02)00380-5)
- Morales, T.; Cuberol J.; Lanz Z.; Gómez-Guiñán, Y. y Segnini M. (2000). Actividad antimicrobiana de extractos orgánicos aislados de *Aplysina fistularis* (Demospongiae: Aplysinidae). *Revista de Biología Tropical*, 48 Supl., 1, 199-206. <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/rbt/article/view/29353/29447>
- Murillo, E. y Méndez, J. (2007). *Guía metodológica para la detección rápida de algunos metabolitos secundarios*. Tolima, Colombia: Facultad de Ciencias, Universidad de Tolima.
- Ordoñez, A.; Gómez, J.; Cudmani, N.; Vattunone, M. y Isla, M. (2003). Antimicrobial activity of nine extracts of *Sechium edule* (Jacq) Swartz. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 15(1), 33-39. <https://doi.org/10.1080/0891060010015583>
- Pandalai, K.; Pilat, M.; Yamazaki, K. y Pienta, K. (1996). The effects of omega-3 and omega-6 fatty acids on in vitro prostate cancer growth. *Anticancer Research*, 16, 815-820. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8687134/>
- Pino, O. y Lazo, F. (2010). Ensayo de Artemia: útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. *Revista de Protección Vegetal*, 22(1), 34-43. <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v25n1/rpv08110.pdf>
- Puyanaa, M.; Pawlikb, J.; Blumc, J. y Fenical, W. (2015). Metabolite variability in Caribbean sponges of the genus *Aplysina*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 25, 592-599. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.08.002>
- Silva, M.; Bergamasco, J.; Lira, S.; Lopes, N.; Hajdu, E.; Peixinho, S. y Berlinck, R. (2010). Dereplication of Bromotyrosine-derived Metabolites by LC-PDA-MS and Analysis of the Chemical Profile of 14 *Aplysina* Sponge Specimens from the Brazilian Coastline. *Australian Journal of Chemistry*, 63(6), 886-894. <https://doi.org/10.1071/CH09616>
- Stephan, E. (1977). Methods for calculating in LC50. In: Mayer, F., and Hamelink, J. (Eds.). American society for testing and material (ASTM) aquatic toxicology and hazard evaluation. Philadelphia, Pennsylvania, EEUU: American Society for Testing and Materials (ASTM), pp. 65-84. <https://doi.org/10.1520/STP634-EB>
- Wade, L. 2004. *Química Orgánica. Quinta edición*. Madrid: Pearson Educación, S. A.
- Yoo, Y.; Shin, B.; Hong, J.; Lee, J.; Chee, H.; Song, K. & Lee, K. (2007). Isolation of fatty acids with anticancer activity from *Protaetia brevitarsis* larva. *Archives of Pharmacal Research*, 30(3), 361-365. <https://doi.org/10.1007/BF02977619>
- Zheng, C.; Jung-Sung, Y.; Tae-Gyu, L.; Hee-Young, C.; Young-Ho, K. y Won-Gon, K. (2005). Fatty acid synthesis is a target for antibacterial activity of unsaturated fatty acids. *Federation of European Biochemical Societies*, 579(23), 5157-5162. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.08.028>

**Autores**

**Haydelba D'Armas Regnault.** PhD. en Química. MSc. en Ciencias Marinas. Profesora en la Facultad de Ciencias de la Ingeniería, Universidad Estatal de Milagro, Guayas, Ecuador. Profesora Jubilada de la Universidad de Oriente, Sucre, Venezuela. Investigadora en las áreas de Fitoquímica, Lípidos, Nutraceuticos, Oceanografía Química y otras.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9301-3801>

Email: [hdarmasr@gmail.com](mailto:hdarmasr@gmail.com)

**Miguel Lemus.** Licenciado en Química. Dpto. de Química, Escuela de Ciencias, Universidad de Oriente, Cumaná, Sucre, Venezuela.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6046-7353>

Email: [mijael117@hotmail.com](mailto:mijael117@hotmail.com)

**María Elena Amaro.** MSc. en Biología Marina. Dpto. de Biología Marina, Instituto Oceanográfico de Venezuela-Universidad de Oriente, Cumaná, Sucre, Venezuela.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6882-3631>

Email: [meamaro\\_2000@yahoo.com](mailto:meamaro_2000@yahoo.com)

**Milagros Fariñas.** Dra. en Ciencias. MSc. en Biología Aplicada. Dpto. de Biología Marina, Instituto Oceanográfico de Venezuela-Universidad de Oriente, Cumaná, Sucre, Venezuela.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7456-2733>

Email: [milyfari2006@gmail.com](mailto:milyfari2006@gmail.com)

**Gabriel Ordaz González.** MSc. en Educación en Química. Profesor Asistente adscrito al Departamento de Química, UDO-Sucre, Venezuela. Investigador en las áreas de química de productos naturales, lípidos y pedagogía.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4472-2596>

Email: [gjordazg@gmail.com](mailto:gjordazg@gmail.com)

Recibido: 17-03-2020

Aceptado: 25-06-2020