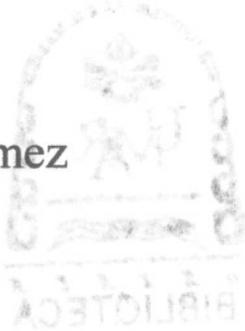




Universidad del Mar

10201

Aislamiento de Sustancias Bioactivas del Extracto de
Diclorometano de la Esponja *Aplysina gerardogreeni* Gómez
y Bakus, 1992 (Porifera: Demospongiae).



TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA MARINA

PRESENTA
RIVERA IBARRA FABRICIO SARO

Pto. Ángel, Oaxaca

Enero 2005

**A Linda y a Max
por haberme hecho adicto
al mejor vicio de todos: el conocimiento**

AGRADECIMIENTOS.

Un sincero agradecimiento a mis padres por su infinito apoyo y cariño y a todas las personas que con sus críticas ayudaron al mejoramiento de este trabajo, entre ellas, a mi directora la Dra. Rosalba Encarnación Dimayuga y a mis asesores la M. en C. Alejandra Torres Ariño, la Dra Nelda Xanath Martínez, Beatríz Hernández Carlos y al Dr. Rolando Bastida Zavala por sus múltiples sugerencias formativas. Quisiera agradecer de forma muy especial a Belinda por su gran apoyo espiritual y ubicua compañía, y al Pollo por tu simple presencia y por permitirme compartir contigo aventuras, alegrías, tristezas y pensamientos que no podría haberlo hecho con nadie más. Gracias también por tu apoyo en cuanto a recursos logísticos y fuentes de información, este trabajo no hubiera sido el mismo sin tu apoyo. Finalmente agradezco al B.M. Carlos Sánchez Ortíz por su trabajo de identificación y al CONACyT por haber financiado este trabajo al formar parte del proyecto: “Búsqueda de compuestos con actividad antimicrobiana en organismos marinos *A. gerardogreeni* (Demospongiae) y Gorgónidos (Anthozoa) No. de ref. 433100-5-34984-E.

RESUMEN

La presencia de moléculas novedosas y bioactivas en invertebrados marinos, especialmente en organismos sésiles, ha estimulado durante los últimos 50 años la búsqueda y el aislamiento de sustancias con finalidad farmacéutica y ecológica-química que por un lado, permitan solventar el problema clínico de la resistencia microbiana hacia los antibióticos y por el otro, promuevan el entendimiento de las interacciones químicas intra- e interespecíficas entre la biota marina y su medio. Sin duda, de entre todos los grupos de organismos marinos, las esponjas continúan siendo el foco de atención, dado que hasta la fecha no existe otro Phylum de metazoos del que se hayan aislado más sustancias bioactivas. Con base en lo anterior, se procedió a realizar el aislamiento y la purificación biodirigida, mediante cromatografía, de uno de los compuestos bioactivos que conformaron la fracción MCC3F10 derivada del extracto de diclorometano de la esponja *Aplysina gerardogreeni*. Se utilizó como prueba de susceptibilidad microbiana, el método de difusión en agar en disco contra cepas de *Bacillus subtilis*, *Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* y una cepa resistente a antibióticos de *Staphylococcus aureus*. La mayoría de las subfracciones resultantes mostraron consistente actividad antimicrobiana contra bacterias Gram(+), esto contrastado con lo observado para *Escherichia coli* y *Candida albicans*. El compuesto semipuro contenido en la subfracción HF4 mostró, mediante espectroscopía de infrarrojo, bandas de absorción correspondientes a enlaces N-H y/o O-H, C=N, C=O y/o C-N y C=C, (3327, 1705 1662 y 1660 cm^{-1} respectivamente). La comparación de espectros de infrarrojo de la fracción HF4 y el estándar de aerotionina, muestran cierto grado de similitud entre las sustancias, así como la posible presencia del grupo funcional α -iminoamida (1705, 1662, 1600 y 1535 cm^{-1}) parte formadora del sistema cíclico de espirociclohexadienilisoaxazol, comúnmente encontrado en compuestos brominados derivados de la 3,5-dibromotirosina aislados de esponjas pertenecientes al Orden Verongida.

Palabras clave: *Aplysina gerardogreeni*, Porifera, metabolitos secundarios, actividad antimicrobiana, 3,5-dibromotirosina.

LISTA DE FIGURAS.

	Páginas
1. Estructura química del terpeno furospongina-1	67
2. Estructura química del compuesto bromopirrolico oroidina	67
3. Estructura química de la aeroplysinina-1	68
4. Estructura química general de una benzoquinona fenilada	68
5. Estructura química de la jaspamida	68
6. Estructura química de la aerotionina	69
7. Estructura química de la homoaerotionina	69
8. Estructura química de la 11-oxo-aerotionina	69
9. Estructura química de la 11-oxo-(r)-12-hidroxiaerotionina	70
10. Estructura química de la 11-oxo-(s)-12-hidroxiaerotionina	70
11. Estructura química de la imidazol-[1,5-c]-tetrahidropirimidina-5-ona	70
12. Estructura química de la aplysinolida	71
13. Estructura química de la aplysinimina	71
14. Estructura química de la aplysinamisina I.	71
15. Estructura química de la aplysinopsina	72
16. Estructura química de la aplysellina A	72
17. Estructura química de la caissarina A	72
18. Estructura química de la caissarina B	73
19. Estructura química del ácido 3,5-dibromo-2-hidroxy-4-metoxifenil acético	73
20. Estructura química de la calafianina	74
21. Sitio de recolecta	16
22. Obtención de la fracción MCC3F10	18
23. Método de difusión en agar en disco	21
24. Fraccionamiento de MCC3F10AM y obtención de la fracción CC23F3	27
25. Fraccionamiento de CC23F3 y CC34F2	30
26. Purificación de la fracción CC67F2	31
27. Halos de inhibición de crecimiento microbiano y recuperación de muestra para el fraccionamiento: CC23 <MCC3F10AM> (a); CC34 <CC23F3> (b); CC40 <CC34F2> (c)	32
28. Espectro de infrarrojo del compuesto HF4	34
29. Comparación de espectros de infrarrojo del compuesto HF4 y la aerotionina estándar	34

LISTA DE CUADROS.

	Páginas
1. Actividad antimicrobiana y peso de las fracciones obtenidas del fraccionamiento CC23 <MCC3F10AM>	75
2. Actividad antimicrobiana y peso de las fracciones obtenidas del fraccionamiento CC34 <CC23F3>	75
3. Actividad antimicrobiana y peso de las fracciones obtenidas del fraccionamiento CC40 <CC34F2>	76
4. Peso de las fracciones obtenidas del fraccionamiento CC67 <CC40F5>	76
5. Peso de las fracciones obtenidas del fraccionamiento mediante HPLC <CC67F2>	76

ABREVIATURAS

AU	Unidades de absorbancia (<i>Absorbancy units</i>)
CH ₂ Cl ₂	Cloruro de metileno (diclorometano)
CHCl ₃	Cloroformo
cm ⁻¹	Centímetros inversos o número de ondas (<i>Wavenumber</i>)
def	Vibración de tipo deformante (<i>Deformation</i>)
DSB	Caldo dextrosa Saboraud (<i>Dextrose Saboraud Broth</i>)
EtOAc	Acetato de etilo
EtOH	Etanol
Hex	Hexano
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HPTLC	Cromatografía de capa fina de alta resolución (<i>High Performance Thin Layer Chromatography</i>)
IR	Espectroscopía de infrarrojo
MDA	Método de difusión en agar en disco
Me ₂ CO	Acetona
MeOH	Metanol
Psi	Libras por pulgada cuadrada (<i>Pound per square inch</i>)
Rf	Coefficiente de reparto
SiO ₂	Sílica gel
str	Vibración de tipo alargamiento-estrechamiento (<i>Stretching</i>)
TLC	Cromatografía de capa fina (<i>Thin Layer Chromatography</i>)
TSB	Caldo de tripticaseína de soya (<i>Trypticasein Soy Broth</i>)
Tol	Tolueno
t _r	Tiempo de retención
%T	Porcentaje de transmitancia

1. INTRODUCCIÓN.

A principios de los 40's se consideró que con el descubrimiento de la penicilina, catalogada por algunos como el "antibiótico milagroso", y el de algunas otras sustancias, sería suficiente para terminar con muchas de las enfermedades infecciosas que preocupaban a los médicos (Travis, 1994; Levy, 2001). Incluso, todavía hasta 1969 algunos personajes del ámbito clínico podían darse el lujo de decir en público que "por fin, se podría cerrar el libro de muchas enfermedades infecciosas" (Barret, 2001). Con la misma tendencia, hacia la década de los 80's, algunas compañías farmacéuticas suspendían trabajos sobre la búsqueda de nuevos antibióticos, argumentando que los mercados se encontraban saturados (Culotta, 1994; Travis, 1994).

Sin embargo, lo que pareció alguna vez la panacea de la medicina, se ha ido escapando sutilmente de las manos como si fuera arena (Chin y Marx, 1994; Barret, 2001; WHO, 2001a-b). Se pensaba que la probabilidad de generarse la resistencia a los antibióticos podría ser causada únicamente por la mutación y que ésta, era muy poco probable. Jamás se pensó que las bacterias tuvieran la capacidad de generar e importar y/o exportar, de manera intra y/o interespecífica, genes que promovieran la resistencia a los antibióticos (Davies, 1994). Actualmente, enfermedades que hace 20 años eran fácilmente curables y que ahora son casi incontrolables, la aparición de líneas de microorganismos que han sido expuestos a presiones selectivas extraordinarias en hospitales (enfermedades nosocomiales), la creciente ineficiencia de antibióticos (Chadwick y Goode, 1997; Levy, 2001) y las epidemias a gran escala son algunas

escenas del panorama actual de la medicina. (Travis, 1994; Axley, 2001; WHO, 2001a-b).

Desde un punto de vista biológico, la resistencia a los antibióticos puede ser catalogada simplemente como un proceso de evolución natural ocuriente en todo organismo hacia factores adversos (Travis, 1994; Barret, 2001; WHO, 2001a-b). Sin embargo, éste proceso parece verse acrecentado por causas socioeconómicas (Levy, 1994; Barret, 2001). Modificaciones como el cambio de uso de suelo, las crecientes actividades tecnológicas e industriales y, en general, las tendencias económicas actuales, han llevado no solo a cambios de índole ambiental, sino también en la forma de pensar de las personas en relación con el incremento del consumismo superfluo e irresponsable, tanto con el uso, como en la prescripción de antibióticos (Travis, 1994; King, 2000; Barret, 2001; WHO, 2001a-b). Pero además, el uso inadecuado de antibióticos no solo tiene un componente netamente clínico (Cantor, 1999); se sabe que cerca del 50% de su producción en Europa y América del Norte es destinada para el cultivo de organismos tanto terrestres (WHO, 2001a-b), como acuáticos (McEwen, 2001) para consumo humano.

Ignorando por un momento el hecho de que jamás se perdió por completo el interés en la búsqueda de nuevos compuestos antimicrobianos, se ha intentado competir contra la resistencia microbiana a través de la manipulación química de los fármacos ya existentes. Sin embargo; la experiencia parece indicar que solo es cuestión de tiempo

para que ésta vuelva a presentarse y, por si eso no bastara, algunos expertos mencionan que se ha llegado al máximo grado de manipulación posible (Travis, 1994).

Hoy en día, el problema de la resistencia microbiana emerge como una incesante coevolución entre microorganismos y fármacos (Levy *et al.*, 1987), en donde una de nuestras alternativas de sobrellevarla - por lo menos a corto plazo - es mediante la búsqueda de nuevas sustancias activas que permitan el desarrollo de nuevos antibióticos (Culotta, 1994; DHUK, 1998; Houvinen y Cars, 1998; USAID's, 1998; Barret, 2001; WHO, 2001a). Por otra parte, la naturaleza de manera directa o indirecta siempre ha sido una importante fuente de recursos farmacéuticos, y de los dos grandes ambientes que conforman a nuestro planeta, sin duda, el marino sigue siendo el menos explorado debido en gran parte a las dificultades físicas implícitas en su estudio. No obstante, después de la segunda guerra mundial, se dio un gran avance tecnológico que ha permitido descubrir cosas interesantes de él.

Las investigaciones oceanográficas y biológicas revelan que los océanos son sistemas dotados de una mayor biodiversidad (Hixon *et al.*, 2001) y de una complejidad química distinta a la encontrada en el medio terrestre. Se sabe que de los 33 Phyla Metazoa conocidos hasta ahora, 15 son exclusivamente marinos mientras que sólo un Phylum es exclusivamente terrestre (Norse, 1993; NRC, 1994). La gran riqueza de especies no solo se centra sobre especies multicelulares, sino también, sobre la microbiota, particularmente sobre la diversidad genética de virus (Fuhrman, 1999) y bacterias (Giovannoni *et al.*, 1990). En términos de diversidad química, si bien es