



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



VARIACIÓN TEMPORAL DE LOS PRODUCTOS  
NATURALES MAYORITARIOS DE LA ESPONJA  
*Aplysina gerardogreeni* DEL GOLFO DE  
CALIFORNIA.

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS  
EN  
MANEJO DE RECURSOS MARINOS

PRESENTA

**SONIA SCHEHERAZAD VALENCIA AGAMI**

LA PAZ, B.C.S., JUNIO DE 2013



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO  
ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 12:00 horas del día 09 del mes de Mayo del 2013 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis titulada:

"VARIACIÓN TEMPORAL DE LOS PRODUCTOS NATURALES MAYORITARIOS DE LA ESPONJA *Aplysina gerardogreeni* DEL GOLFO DE CALIFORNIA"

Presentada por el alumno:

VALENCIA

Apellido paterno

AGAMI

materno

SONIA SCHEHERAZAD

nombre(s)

Con registro: 

A	1	1	0	4	7	7
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA DEFENSA DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

Director(a) de Tesis

DRA. CLAUDIA JUDITH HERNÁNDEZ GUERRERO

DRA. CHRISTINE JOHANNA BAND SCHMIDT

DR. JESÚS IVÁN MURILLO ÁLVAREZ

DR. SERGIO FRANCISCO MARTÍNEZ DÍAZ

DRA. BÁRBARA GONZÁLEZ ACOSTA

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

DRA. MARÍA MARGARITA CASAS VALDEZ



IPN  
CICIMAR  
DIRECCION



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

## SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

### CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 5 del mes Junio del año 2013  
el (la) que suscribe BM. SONIA SCHEHERAZAD VALENCIA AGAMI alumno(a) del  
Programa de MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS  
con número de registro A110477 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS  
manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de:

DRA. CLAUDIA JUDITH HERNÁNDEZ GUERRERO

y cede los derechos del trabajo titulado:

"VARIACIÓN TEMPORAL DE LOS PRODUCTOS NATURALES MAYORITARIOS

DE LA ESPONJA *Aplysina gerardogreeni* DEL GOLFO DE CALIFORNIA"

al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Éste, puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: soniasvagami@gmail.com - sdiaz@ipn.mx

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

BM. SONIA SCHEHERAZAD VALENCIA AGAMI

*nombre y firma*

Este trabajo esta dedicado a todas las personas que ayudaron a que se lograra realizar, pero en especial a mi familia la cual siempre me ha apoyado.

A mis padres: Raquel Agami y David Valencia

A mis tios: Sandra Agami y Sanson Minquiz

A mis hermanos: Ari Minquiz, Angelica Valencia, Jorge Valencia Israel Mendoza

A mi sobrino Angel Mendoza

A mi mamá Aurora y a mi tia Mari por rezar por mi todos los dias

A mis compañeros de laboratorio que sin ellos no hubiera sido tan divertido este trabajo (Ismael, Noemi, Francisco, Cynthia, Roman, Lalo, Diana, Lina y Conchita)

A mis amigas de la vida que a pesar que no son lo que yo pensaba ni lo que yo quería siempre están ahí cuando las necesito (Abigail, Mariana, Tony y Bea)

A Claudia Hernandez quien mas que mi directora es una guía

A la Dra.Barbara por toda la ayuda que me ha brindado

A la Familia Fita-Andrade por tantos años de apoyo

A la Familia Díaz Santana- Iturríos por adoptarme como de su familia

A mi roomie (Cynthia) por no matarme con un cuchillo accidentalmente

A la Conchita por que la amo y por ultimo A Facebook por permitirme tener una vida social.

## AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Politécnico Nacional y al Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, por prestar las instalaciones para la realización de este trabajo.

Al CONACYT, por el apoyo económico otorgado durante mis estudios (389671) y mi estancia en el extranjero (Beca mixta) y al Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI) del IPN por las becas otorgadas.

A mi directora de tesis Dra. Claudia Judith Hernández Guerrero por ayudarme a tener éxito en lo que me llena de pasión.

A los miembros de mi comité revisor Dra. Christine Band, Dra Barbara González, Dr. Ivan Murillo, Dr. Sergio Martínez, por las sugerencias y comentarios que enriquecieron este trabajo.

Al laboratorio de productos naturales marinos de la Universidad de Cadíz en donde se llevó a cabo parte de importante de la metodología. En especial a la Dra. Eva Zubia y a los compañeros del laboratorio por todo el apoyo brindado durante mi estancia.

A la Dra. Eva Zubia por su ayuda en la realización de la espectroscopia de RMN.

A Jose Borges y Alejandra Chávez que realizaron las recolectas de los organismos, y los buenos momentos en las salidas de campo donde la mayor parte del trabajo la realizan ustedes.

Al Centro de Investigaciones Biomedicas en la Cd. de Monterrey y en especial al Dr. Victor Torres por su participación en este proyecto.

A mis compañeros de equipo Ismael, Noemi, Cynthia, Francisco, Karla, Yessi y Erika por todas las veces que me ayudaron a solucionar las complicaciones que se llegaron a presentar y también por compartir sus alegrías conmigo.

A Cynthia Montes por el mantenimiento a mi computadora.

ESTE TRABAJO SE DESARROLLO GRACIAS A LOS APOYOS ECONÓMICOS DE  
LOS PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN DEL INSTITUTO POLITECNICO  
NACIONAL SIP 20111046, 20121262, 20131532.

## ÍNDICE

GLOSARIO.....	IV
ABREVIATURAS.....	VIII
INDICE DE TABLAS .....	X
INDICE DE FIGURAS.....	XI
RESUMEN.....	XIII
ABSTRACT.....	XIV
I.INTRODUCCIÓN.....	1
II.ANTECEDENTES.....	3
III.JUSTIFICACIÓN.....	18
VI.HIPÓTESIS.....	19
V.OBJETIVOS.....	19
General.....	19
Particulares.....	19
VI.ÁREA DE ESTUDIO.....	20
VII.MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
VII.1 Perfil cromatográfico de los compuestos derivados de la dibromotirosina de la esponja <i>Aplysina gerardogreeni</i> .....	21
VII. 2 Aislamiento y caracterización estructural de los compuestos.....	25
VII.3 Variación temporal de los compuestos mayoritarios de <i>A. gerardogreeni</i> .....	26
VII.4 Ensayo de actividad antibacteriana de los compuestos puros.....	27
VIII. RESULTADOS.....	28
VIII.1 Perfil cromatográfico de los compuestos derivados de la dibromotirosina de la esponja <i>A. gerardogreeni</i> .....	28

VIII.2 Aislamiento y caracterización estructural de los compuestos.....	30
Caracterización de la aerothionina (2).....	30
Caracterización de la homoaerothionina (1).....	31
Caracterización de la 11-oxohomoaerothionina (3).....	32
Caracterización de la Fistularina-1 (5).....	33
Caracterización de la Fistularina-3 (4).....	34
VIII.3 Variación temporal de los compuestos mayoritarios de <i>A. gerardogreeni</i> .....	36
VIII.4 Ensayos de actividad antibacteriana de los compuestos puros.....	41
IX. DISCUSIÓN.....	42
IX.1 Perfil cromatográfico de los compuestos derivados de la dibromotirosina de la esponja <i>A. gerardogreeni</i> .....	42
IX.2 Aislamiento y caracterización estructural de los compuestos.....	43
Aerothionina.....	43
Homoaerothionina.....	44
11-oxohomoaerothionina.....	44
Fistularina-1.....	45
Fistularina-3.....	45
IX.3 Variación temporal de los compuestos mayoritarios de <i>A. gerardogreeni</i> .....	45
IX.4 Ensayos de actividad antibacteriana de los compuestos puros.....	47
X CONCLUSIONES.....	49
XI LITERATURA CITADA.....	51

XII ANEXOS.....	66
XII.1 Biología y Taxonomía de la especie.....	66
XII.2 Desplazamientos químicos de H <sup>1</sup> -RMN de los compuestos establecidos por los autores que realizaron su descripción.....	67
XII.3 Perfiles cromatográficos obtenidos mediante HPLC (eluyente CHCl <sub>3</sub> /MeOH 99:1) con las fracciones de los diferentes meses de muestreo.	68

## GLOSARIO

**Actividad Antimicrobiana:** capacidad de una sustancia que es efectiva contra microorganismos, ya sea porque suprime su crecimiento o eventualmente puede destruirlos.

**Alelopatia:** fenómeno que implica la inhibición directa de una especie por otra ya sea vegetal o animal usando sustancias tóxicas o disuasivas.

**Antibiótico:** sustancia química producida por microorganismos o sintetizada por métodos químicos que a determinada concentración mata o impide el crecimiento de otros microorganismos sensibles.

**Bioensayo:** Proceso experimental mediante el cual se determinan las características y la fuerza de una sustancia potencialmente tóxica o de un desecho metabólico, a través del estudio de sus efectos sobre organismos cuidadosamente escogidos y bajo condiciones específicas de laboratorio.

**Biotoxina:** Sustancia tóxica producida por animales y derivados de plantas.

**Cepa:** variante genotípica de una especie o, incluso, de un taxón inferior, usualmente propagada clonalmente, debido al interés en la conservación de sus cualidades definitorias.

**Concentración:** proporciones entre las cantidades de soluto y disolvente que se están utilizando en una disolución.

**Cromatogramas:** diagrama de picos que da como resultado de la separación de cada uno de los componentes químicos de la muestra analizada estos picos son el resultado de los tiempos de retención de cada compuesto esto es como la huella dactilar cada compuesto tiene un único tiempo de retención.

**Cromatografía de alta eficacia:** Es un tipo de cromatografía en columna utilizada frecuentemente en bioquímica y química analítica. El HPLC es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica.

**Cromatografía en capa fina:** Es una técnica cromatográfica, en la que la fase estacionaria es una capa uniforme de un absorbente mantenido sobre una placa, la cual puede ser de vidrio, aluminio u otro soporte.

**Cromatografía en columna:** Se emplea para la separación de mezclas o purificación de sustancias a escala preparativa. Como fase estacionaria se usa, generalmente, gel de sílice o alúmina dentro de una columna.

**Desapantallamiento y Apantallamiento:** el campo magnético sentido por un núcleo en un átomo o en una molécula difiere de una pequeña cantidad del campo magnético externo aplicado  $B_0$  como consecuencia del fenómeno conocido con el término genérico de apantallamiento nuclear. El origen de este fenómeno recae principalmente en la creación de corrientes electrónicas diamagnéticas y paramagnéticas en átomos y moléculas inducidas por el campo magnético externo aplicado, por los campos locales generados por grupos moleculares vecinos y las moléculas del disolvente. Estas corrientes generan campos magnéticos que se oponen (apantallamiento) o refuerzan a  $B_0$  (desapantallamiento).

**Desplazamientos:** describe la dependencia de los niveles de energía magnética del núcleo con el ambiente electrónico de la molécula. El núcleo de un átomo puede poseer un momento magnético (espín nuclear), el que entrega diferentes niveles de energía

**Deuterado:** compuesto orgánico en el que los hidrógenos fueron reemplazados por deuterio.

**Eluyente:** palabra utilizada en métodos cromatográficos de separación para referirse a la sustancia (puede ser puro, mezcla de varias o disolución) que se añade en una columna cromatográfica para desplazar el producto de interés.

**Extracto:** Es una sustancia obtenida por extracción de una parte de una materia prima, a menudo usando un solvente como etanol o agua. Los extractos pueden comercializarse como tinturas o en forma de polvo.

**Fármaco:** sustancia química purificada utilizada en la prevención, diagnóstico, tratamiento, mitigación y cura de una enfermedad; para evitar la aparición de un proceso fisiológico no deseado; o para modificar condiciones fisiológicas con fines específicos.

**Fraccionamiento:** métodos que tienen como objetivo recuperar las diferentes fracciones o componentes de una solución: el solvente y los solutos.

**Gram Negativa:** bacterias que no se tiñen de azul oscuro o violeta por la tinción de Gram, y lo hacen de un color rosado tenue. Esta característica está íntimamente ligada a la estructura de la envoltura celular.

**Gram Positiva:** bacterias que se tiñen de azul oscuro o violeta por la tinción de Gram. Esta característica está íntimamente ligada a la estructura de la envoltura celular.

**Halo de inhibición:** muerte de células causadas por un bactericida o antibiótico realizado por un antibiograma (prueba de resistencia bacteriana a fármaco)

donde al si se produce lisis o destrucción de bacterias se observa un espacio en blanco donde anteriormente estaba la bacteria

**Halogenado:** compuestos orgánicos sintéticos, y algunos naturales que contienen algún elemento halógeno

**Lecounoide:** Organización de mayor complejidad que presentan la mayoría de las esponjas de la clase Demoespongia.

**Metabolito Secundario:** compuestos orgánicos sintetizados por el organismo que no tienen un rol directo en el crecimiento o reproducción del mismo.

**Olefínico:** compuestos con doble enlaces.

**Porifero (porífera):** filo de animales invertebrados acuáticos que se encuentran dentro del subreino Parazoa. Son mayoritariamente marinos, sésiles y carecen de auténticos tejidos.

**Sensidisco:** Disco de papel filtro de poro grueso y de diámetro variable, impregnado con el antibiótico de prueba.

**Tiempo de retención:** tiempo transcurrido al momento de eluir el máximo de concentración del soluto

**Tirosina:** uno de los 20 aminoácidos que forman las proteínas. Se clasifica como un aminoácido no esencial en los mamíferos ya que su síntesis se produce a partir de la hidroxilación de otro aminoácido: la fenilalanina.

## ABREVIATURAS

**Acetona- $d_6$** : Acetona deuterada

**AcOEt**: Acetato de etilo

**bs**: singlete ancho

**bt**: triplete ancho

**CC**: Cromatografía en columna

**CD<sub>3</sub>OD**: Metanol deuterado

**(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO**: Acetona

**CHCl<sub>3</sub>**: Cloroformo

**d** : Doblete (tipo de desdoblamiento de una señal de RMN)

**dd**: Doble doblete

**<sup>1</sup>H-RMN**: RMN de protón

**HEX**: Hexano

**HPLC**: Cromatografía de alta eficacia

**J**: Constante de acoplamiento (ayuda a explicar los espectros de los compuestos)

**MeOH**: Metanol

**MIC**: Concentración inhibitoria Mínima

**NO<sub>2</sub>**: Nitritos

**NO<sub>3</sub>**: Nitratos

**Piridina- $d_5$** : piridina deuterada.

**PO<sub>4</sub>**: Fosfatos

**Rf:** Factor de retención

**RMN:** Resonancia magnética Nuclear

**s :** singlete (tipo de desdoblamiento de una señal de RMN)

**t:** Triplete

**TSA:** Agar soya Trypticase

**UV:** Ultra violeta

**$\delta$  :** Desplazamiento químico

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla I.</b> Compuestos más comúnmente aislados en esponjas del género <i>Aplysina</i> .....	6
<b>Tabla II.</b> Actividad antibacteriana de diversos compuestos aislados de esponjas del género <i>Aplysina</i> .....	9
<b>Tabla III.</b> Desplazamientos químicos de <sup>1</sup> H-RMN de los compuestos mayoritarios aislados de la esponja <i>A. gerardogreeni</i> (multiplicidad, <i>J</i> en Hz).....	35
<b>Tabla IV.</b> Coeficiente de correlación entre la concentración relativa de los compuestos Aerothionina (Aero), Homoaerothionina (Homo), 11-oxohomoaerothionina (11-oxo), Fistularina-3 (Fist-3), Fistularina-1 (Fist-1), la profundidad y los parámetros ambientales temperatura (T°C), Nitritos (NO <sub>2</sub> ) Nitratos (NO <sub>3</sub> ) y fosfatos (PO <sub>4</sub> ).....	41
<b>Tabla V.</b> Resultados de los halos de inhibición (expresados en mm) presentados por los diferentes compuestos a una concentración de 200 µg frente a las cepas de referencia. El control positivo fue ampicilina 25 µg.....	41

## INDICE DE FIGURAS

PÁG.

<b>Figura 1.</b> Compuestos derivados de la dibromotirosina aislados a partir de esponjas del genero <i>Aplysina</i> . .....	4
<b>Figura 2.</b> Tipos de cromoforos de los compuestos derivados de la bromotirosina. (a) cromoforo ciclohexanona $\alpha$ -bromo- $\alpha,\beta$ -insaturado presente en compuestos tipo cavernicolinas, (b) el dieno tri-sustituido presente en esterres del ácido verongidoico y (c) el 1-alkil-4-alkuioxi-3,5-dibromobenceno, como el de compuestos de tipo bis-oxazolidinona (tomado de Silva <i>et al.</i> , 2010).....	5
<b>Figura 3.</b> Compuestos aislados a partir de la esponja <i>Aplysina gerardogreeni</i> .....	13
<b>Figura 4.</b> Punta Arena de La Ventana entre los 24°03'31.50" N y los 109°49'46.02" W.....	20
<b>Figura 5.</b> Esquema de fraccionamiento mediante cromatografía en columna de los extractos de MeOH obtenidos de ejemplares de la esponja <i>Aplysina gerardogreeni</i> . .....	24
<b>Figura 6.</b> Placa cromatografica de los compuestos de la esponja <i>Aplysina gerardogreeni</i> en las diferentes profundidades (2, 4 y 6 m) y meses de muestreo. Manchas visibles a la luz UV (254 nm), sistema de elución CHCl <sub>3</sub> /MeOH 92:8, revelada con sulfato de cerio.....	28
<b>Figura 7.</b> Perfil cromatográfico que muestra la presencia de cinco compuestos mayoritarios en la esponja <i>Aplysina gerardogreeni</i> , donde 1) homoaerotionina, 2) aerotionina, 3) 11-oxohomoaerotionina, 4) fistularina-3 y 5) fistularina-1.....	29
<b>Figura 8.</b> Concentración relativa (mg mL <sup>-1</sup> ) de los compuestos mayoritarios obtenidos de la esponja <i>A. gerardogreeni</i> en los diferentes meses muestreados .....	29
<b>Figura 9.</b> Espectro de <sup>1</sup> H-RMN de la aerotionina (2) en acetona- <i>d</i> <sub>6</sub> (*señal del disolvente) .....	30
<b>Figura 10.</b> Espectro de <sup>1</sup> H-RMN de la homoaerotionina (1) en CD <sub>3</sub> OD (*señal del disolvente).....	31
<b>Figura 11.</b> Espectro de <sup>1</sup> H-RMN de la 11-oxohomoaerotionina (3) en CD <sub>3</sub> OD (*señal del disolvente).....	32

<b>Figura 12.</b> Espectro de $^1\text{H}$ -RMN de la fistularina-1 en acetona- $\text{d}_6$ (*señal del disolvente).....	33
<b>Figura 13.</b> Espectro de $^1\text{H}$ -RMN de la fistularina-3 en acetona- $\text{d}_6$ (*señal del disolvente).....	34
<b>Figura 14.</b> Variación temporal y por profundidad de la concentración relativa del compuesto aerothionina aislado a partir de la esponja <i>A. gerardogreeni</i> .....	36
<b>Figura 15.</b> Variación temporal y por profundidad de la concentración relativa de la homoaerothionina aislada de la esponja <i>A. gerardogreeni</i> .....	37
<b>Figura 16.</b> Variación temporal y por profundidad de la concentración relativa de la fistularina-3 aislada de la esponja <i>A. gerardogreeni</i> .....	37
<b>Figura 17.</b> Variación temporal y por profundidad de la concentración relativa de la 11-oxohomoaerothionina aislada de la esponja <i>A. gerardogreeni</i> .....	38
<b>Figura 18.</b> Variación temporal y por profundidad de la concentración relativa de la fistularina-1 aislada de la esponja <i>A. gerardogreeni</i> .....	38
<b>Figura 19.</b> Valores promedio de la temperatura del agua de mar en el área de Punta Arena de la Ventana, B.C.S.....	39
<b>Figura 20.</b> Variación temporal de nutrientes en el área de Punta Arena de la Ventana, B.C.S.....	39
<b>Figura 21.</b> Variación de los nutrientes en el área de Punta Arena de la Ventana con respecto a la profundidad .....	40

## RESUMEN

Se analizó la variación en la composición de los principales metabolitos secundarios de la esponja *Aplysina gerardogreeni* durante el periodo de marzo de 2008 a febrero de 2009 a tres profundidades 2, 4 y 6 metros. Los especímenes fueron recolectados en Punta Arena de la Ventana, B.C.S. (24°02' N; 109° 49' W). Para la obtención de los extractos orgánicos, los organismos fueron macerados en una mezcla de acetona/metanol 1:1 y el residuo fue extraído continuamente con metanol. Los compuestos fueron separados mediante cromatografía en columna y cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC por sus siglas en inglés) e identificados mediante técnicas de resonancia magnética nuclear (RMN). De cada compuesto se calculó su porcentaje y concentración relativa. Los resultados indicaron un patrón químico típico de las esponjas del género *Aplysina*, el cual se caracterizó por presentar cinco compuestos mayoritarios, identificados como aerothionina, homoaerothionina, 11-oxohomoaerothionina, fistularina-1 y fistularina-3, el cual fue muy homogéneo a lo largo del tiempo. La aerothionina fue el compuesto que presentó el mayor porcentaje relativo el cual fue de entre el 20 y 35%, seguido de la homoaerothionina y fistularina-3. Los compuestos 11-oxohomoaerothionina y fistularina-1 fueron menos abundantes, de manera general presentaron una concentración relativa por debajo de 5 mg mL<sup>-1</sup>. Sin embargo, podría considerarse que son representativos de esta esponja, ya que su distribución dentro del género *Aplysina* es muy limitada. La concentración relativa de los cinco compuestos fue variable a lo largo del tiempo y en las diferentes profundidades y aun cuando no presentó diferencias significativas ni un patrón estacional determinado, se observa una mayor concentración relativa en los meses de marzo a septiembre del 2008 cuando la temperatura se incrementa, sin embargo siendo más evidente esta relación con la producción de la fistularina-3. Dada la alta varianza en la concentración de los compuestos a lo largo del tiempo, resulta difícil establecer si las variaciones son debidas a parámetros ambientales o a las variaciones intra-específicas. Con respecto a la actividad antibacteriana, únicamente la aerothionina presentó actividad frente a *Staphylococcus aureus*. Este trabajo representa una primera aproximación que aporta información de la variación de los principales metabolitos secundarios de *A. gerardogreeni* del Golfo de California en el área de Punta Arena de la Ventana B.C.S..

**Palabras clave:** *A. gerardogreeni*, variación temporal, actividad antibacteriana, compuestos mayoritarios.

## ABSTRACT

The variation in the composition of the main metabolites of the sponge *Aplysina gerardogreeni* from the Gulf of California were analyzed during the period from March 2008 to February 2009, at 2, 4, and 6 m. The specimens were collected in Punta Arena de la Ventana, B.C.S. (24°02' N; 109° 49' W). Extraction with acetone/methanol 1:1 was realized in order to obtain the organic extracts; the residue was extracted subsequently with methanol. Compounds were separated by column chromatography and HPLC, and identified by NMR techniques. Relative concentration and percentage of each compound were calculated. Results revealed that there was a typical chemical pattern of sponges from genus *Aplysina*, which was characterized by presenting five main compounds identified as aerothionin, homoaerothionin, 11-oxohomoaerothionin, fistularin-1, and fistularin-3. This compound pattern was very homogeneous through time. Aerothionin was the compound that presented the highest relative percentage between 20 and 35%, followed by homoaerothionin and fistularin-3. The compounds 11-oxohomoaerothionin and fistularin-1 were less abundant; these usually presented a relative concentration below 5 mg mL<sup>-1</sup>. Nevertheless, it could be considered that these compounds are representative of this species; given its distribution in genus *Aplysina* is very limited. The relative concentration of the five compounds were variable a long time and in the different depths, Even did not present significant differences nor a determined stational pattern is observed a higher relative concentration in the months from March to September, when temperature increases, this relationship is more evident with the production of fistularin-3. Given the high variance of the compounds concentration through time, it results difficult to establish whether variations are due to environmental parameters or intra-specific variation. According to antibacterial activity, only aerothionin presented activity against *Staphylococcus aureus*. This survey represents the first approximation that brings information about the variation of the main compounds of *A. gerardogreeni* from the Gulf of California.

**Key words:** *A. gerardogreeni*, temporal variation, antibacterial activity, natural products.

## I. INTRODUCCIÓN

Los organismos marinos producen una gran variedad de metabolitos secundarios como mecanismo de defensa química ante factores bióticos y presiones ambientales, lo cual tiene un importante efecto ecológico (Pawlick, 1993). Sin embargo, el interés en ellos va más allá, debido a que se ha demostrado que estos compuestos o productos naturales pueden presentar actividades interesantes y en algunos casos, mecanismos novedosos de acción antibacteriana, antitumoral, antiinflamatoria, antiviral, entre otros (Blunt *et al.*, 2011), por lo que podrían ser utilizados para el desarrollo de nuevos fármacos (Thompson *et al.*, 1987; Abdo *et al.*, 2007).

Se conoce que la producción de estos compuestos en la naturaleza no es constante, sino que presentan variaciones en función del tiempo, espacio y condiciones ambientales (Turon *et al.*, 1996; Page *et al.*, 2005; López-Legentil *et al.*, 2005, 2007; Turon *et al.*, 2009). Estas fluctuaciones se han tratado de explicar mediante la teoría de la defensa óptima que fue desarrollada a partir de estudios con plantas, la cual supone que la producción de un metabolito secundario conlleva un gasto energético, por lo que la producción no se da de manera constante y su variación depende de factores bióticos (crecimiento, reproducción, competencia, etc.) y abióticos (profundidad, temperatura del agua, disponibilidad de nutrientes, tipo de hábitat, etc.) a los que está sometido el organismo. Sin embargo, aún falta realizar más estudios para entender los procesos que controlan la diversidad química y su variación (Paul *et al.*, 2006).

Los organismos bentónicos marinos son considerados un buen modelo de estudio para investigar patrones en la producción de metabolitos secundarios, debido a que presentan una amplia plasticidad que les permite modificar los niveles de producción de estos compuestos en respuesta a las fuertes presiones ecológicas y ambientales a las que están sujetos (Becerro & Paul, 2004; Turon *et al.*, 2009).

Dentro de los invertebrados marinos, las esponjas presentan la mayor fuente de producción de metabolitos secundarios, por lo que han sido ampliamente estudiadas para el aislamiento de productos naturales con una

finalidad biomédica (Belarbi *et al.*, 2003; Wiffels 2008; Koopmans *et al.*, 2009; Laport *et al.*; 2009). Los estudios de la variación de estos metabolitos son más escasos, pero han dejado ver que las esponjas del género *Aplysina* presentan una amplia variabilidad química dentro de la especie a nivel espacial (a mediana y gran escala) y temporal, entre especímenes y tejidos (Putz *et al.*, 2009; Sacristan-Soriano *et al.*, 2011; 2012).

Las esponjas del género *Aplysina* (Orden Verongida) se caracterizan por presentar una gran variedad de compuestos derivados de la dibromotirosina, siendo los más comunes, los conformados por cuatro átomos de bromo, seguidos de los que contienen tres átomos y en menor cantidad se encuentran los que presentan dos o un átomo bromado (Silva *et al.*, 2010; Silva-Lira, *et al.*, 2011). Los cuales actúan como una defensa frente a depredadores y microorganismos (Teeyapant *et al.*, 1993; Weiss *et al.*, 1996; Kelly *et al.*, 2003; Thoms *et al.*, 2004). Y por otro lado, presentan actividad antibacteriana (Fattorusso *et al.*, 1972; Andersen & Faulkner, 1973; Tymiak & Rinehart., 1981; D'Ambrosio *et al.*, 1984; Encarnación-Dimayuga *et al.*, 2003; León-Deniz, 2003), antiviral (Gunasekera & Cross, 1992), citotóxica (Acosta & Rodríguez, 1992; Compagnone *et al.*, 1999; Hernández-Guerrero *et al.*, 2007), antihistamínica (Ciminiello *et al.*, 2001), antiangiogénica (Rodríguez-Nieto *et al.*, 2002) y antiprotozoaria (Gutiérrez *et al.*, 2005).

En México los estudios químicos con el género *Aplysina* se han centrado en la especie *A. gerardogreeni*. A partir de esta especie se han aislado nuevos compuestos con actividad citotóxica (Hernández-Guerrero *et al.*, 2007) y antimicobacteriana (Encarnación-Dimayuga, 2003). Además se ha observado que la actividad antibacteriana de los extractos orgánicos presenta una evidente variación estacional (Montes-Plascencia *et al.*, 2010). Sin embargo, se desconoce como varían los compuestos mayoritarios de esta especie a lo largo del tiempo y profundidad. Por lo que este trabajo pretende ser una primera aproximación que aporte información de la variación de los principales compuestos de *A. gerardogreeni* de un arrecife rocoso ubicado dentro del Golfo de California.

## II. ANTECEDENTES

### *Productos naturales marinos.*

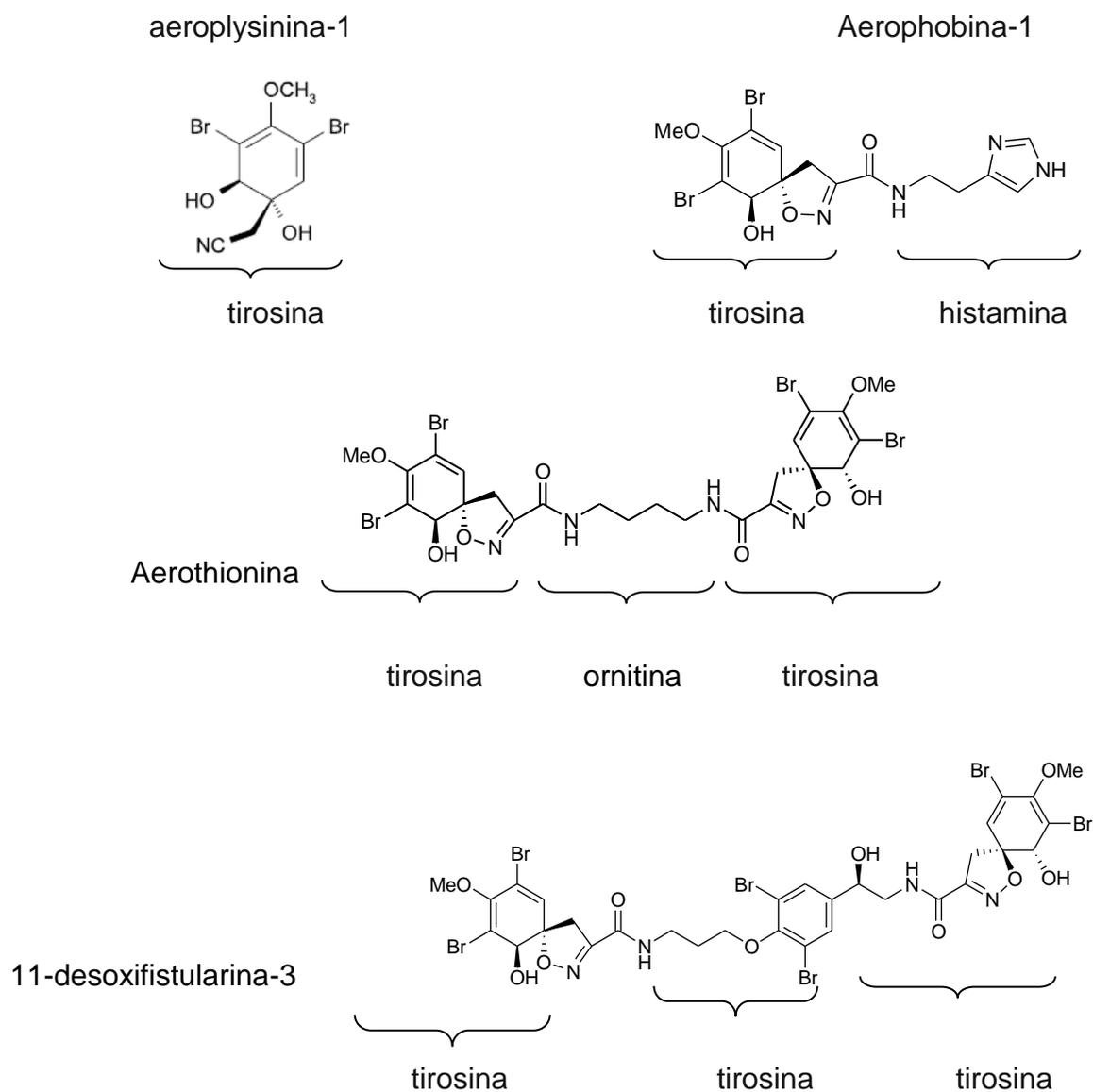
La búsqueda de productos naturales de origen marino es de gran interés debido a varios factores, como son la extraordinaria biodiversidad que existe en los ecosistemas marinos que cubren aproximadamente el 70% de la superficie del planeta, la capacidad de los organismos para sintetizar metabolitos secundarios bioactivos como mecanismos de defensa química (Pawlik, 1993), así como las novedosas y variadas estructuras químicas que presentan estos metabolitos (Faulker, 2002; Bhakuni & Rawat, 2005). Hasta 2007, se tenía un registro de aproximadamente 25,000 productos naturales aislados de organismos marinos, varios de los cuales presentan actividad biológica (Blunt *et al.*, 2007).

De los compuestos procedentes de organismos marinos, una tercera parte tiene su origen a partir de las esponjas (Dembitsky *et al.*, 2005), se ha reportado que del año 1985 al 2008 se aislaron cerca de 3600 a partir de este grupo de organismos (Hu *et al.*, 2011). Estos compuestos pertenecen a muy diversos tipos estructurales, incluyendo terpenos, esteroides, poliacetilenos, alcaloides, nucleósidos y péptidos, muchos de los cuales tienen interés biomédico debido a sus propiedades antivirales, antimicrobianas, antiinflamatorias o antitumorales (Faulker, 2002; Blunt *et al.*, 2006). Por lo que las esponjas han sido consideradas una de las fuentes más prometedoras de nuevas sustancias para el desarrollo de fármacos (Munro *et al.*, 1999).

### *Diversidad de compuestos del genero Aplysina (Orden Verongida)*

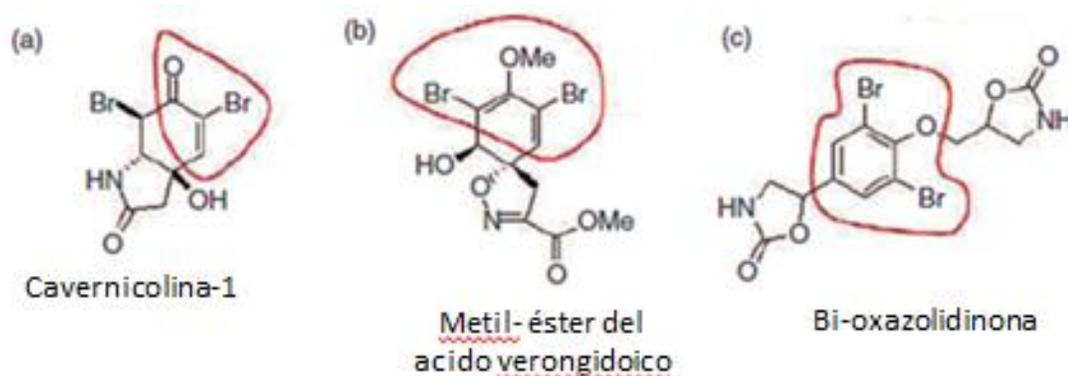
Las esponjas pertenecientes al Orden Verongida contienen una gran cantidad de metabolitos derivados de la dibromotirosina, hasta 2008, la base de datos de literatura y estructuras de productos naturales marinos "MarlinLit" reportó el aislamiento de 300 metabolitos a partir de esponjas pertenecientes a este orden (Silva *et al.*, 2010). Estos compuestos (ampliamente representados en el género *Aplysina*) se derivan del anillo aromático de la tirosina, incluyendo unidades

derivadas de otros aminoácidos; dando lugar a compuestos desde monómeros simples como la aeroplysinina-1, con cadenas laterales como la aerophobina-1, hasta compuestos formados por dos restos derivados de la tirosina enlazados a través de una unidad central de naturaleza y extensión variable, como la aerothionina o la fistularina-3 (Fig. 1).



**Figura 1.** Compuestos derivados de la dibromotirosina aislados a partir de esponjas del género *Aplysina*.

Dentro del orden Verongida, el género *Aplysina* es uno de los más ricos en términos de metabolitos secundarios, los cuales presentan una amplia gama estructural que se ha dividido en diez clases, 1) bromotiraminas, 2) cavernicolinas, 3) hidroverongiaquinoles, 4) bromotirosinacetales, 5) derivados de la dibromotirosina lactona, 6) oxazolidonas, 7) espiroisoxazolininas, 8) verongiabenzenoides, 9) verongiaquinoles y 10) dibromociclohexadienos (Silva-Lira *et al.*, 2011). Dentro de esta gran variedad química, algunos compuestos mayoritarios son aislados constantemente en diferentes especies y localidades (Tabla I). Por lo que para identificar el perfil químico de estos organismos de una forma más rápida, se ha desarrollado un método de dereplicación basado en la detección de tres distintos cromóforos, que se encuentran presentes en los compuestos derivados de la bromotirosina (Fig. 2) (Silva *et al.*, 2010).



**Figura 2.** Tipos de cromóforos de los compuestos derivados de la bromotirosina. (a) cromóforo ciclohexanona  $\alpha$ -bromo- $\alpha,\beta$ -insaturado presente en compuestos tipo cavernicolinas, (b) el dieno tri-sustituido presente en ésteres del ácido verongidoico y (c) el 1-alkil-4-alkuioxi-3,5-dibromobenceno, como el de compuestos de tipo bis-oxazolidinona (tomado de Silva *et al.*, 2010).

Tabla I. Compuestos más comúnmente aislados en esponjas del género *Aplysina*.

Compuesto	Especie	Localidad	Referencia
Aerotionina	<i>Aplysina gerardogreeni</i>	Bahía de La Paz, México	Encarnacion-Dimayuga et al., 2003
	<i>Aplysina gerardogreeni</i>	Mazatlán, México	Hernández-Guerrero et al., 2007
	<i>Aplysina aerophoba</i>	Mediterráneo	Ciminiello et al., 1994
	<i>Aplysina cavernicola</i>	Mediterráneo	Ciminiello et al., 1997
	<i>Aplysina fistularis</i>	Brasil	Gandolfi et al., 2010
	<i>Aplysina fistularis</i>	Estados Unidos	Walker et al., 1985
	<i>Aplysina fulva</i>	Mediterráneo	Ciminiello et al., 1994
	<i>Aplysina fulva</i>	Brasil	Pereira et al., 2006
	<i>Aplysina fulva</i>	Brasil	Núñez et al., 2008
	<i>Aplysina insularis</i>	Caribe	Ciminiello et al., 1996
	<i>Aplysina insularis</i>	Caribe	Compagnone et al., 1999
	<i>Aplysina solangeae</i>		Silva et al., 2010
	<i>Aplysina lactuca</i>		Silva et al., 2010
	<i>Aplysina thiona</i>	Pacífico tropical del Este	Cruz et al., 1990
	<i>Aplysina aerophoba</i>	Mediterráneo	Fattorusso et al., 1970
	<i>Aplysina cavernicola</i>	Mediterráneo	Ciminiello et al., 1997
<i>Aplysina fistularis</i>	Brasil	Gandolfi et al., 2010	
Homoaerotionina	<i>Aplysina fulva</i>	Mediterráneo	Ciminiello et al., 1994
	<i>Aplysina gerardogreeni</i>	Mazatlán, México	Hernández-Guerrero et al., 2007
	<i>Aplysina insularis</i>	Caribe	Compagnone et al., 1999
	<i>Aplysina thiona</i>	Pacífico tropical del este	Cruz et al., 1990

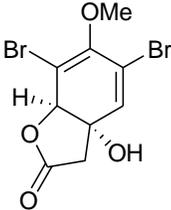
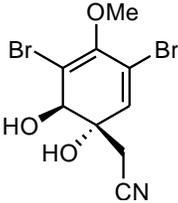
	<i>Aplysina caissara</i>		Silva <i>et al.</i> , 2010
	<i>Aplysina lactuca</i>		Silva <i>et al.</i> , 2010
	<i>Aplysina thiona</i>		Silva <i>et al.</i> , 2010
	<i>Aplysina aerophoba</i>		Silva <i>et al.</i> , 2010
	<i>Aplysina lacunosa</i>	Puerto rico	Acosta & Rodríguez, 1992
	<i>Aplysina cauliformis</i>	Caribe	Rodríguez <i>et al.</i> , 1987
	<i>Aplysina cavernicola</i>	Mediterraneo	Ciminiello <i>et al.</i> , 1997
<b>Fistularina-3</b>	<i>Aplysina lacunosa</i>	Brasil	Silva <i>et al.</i> , 2010
	<i>Aplysina aerophoba</i>	Brasil	Silva <i>et al.</i> , 2010
	<i>Aplysina thiona</i>	Brasil	Silva <i>et al.</i> , 2010
	<i>Aplysina fistularis</i>		Walker <i>et al.</i> , 1985
	<i>Aplysina fistularis</i>		Gopichand & Smith, 1979
	<i>Aplysina fulva</i>	Mediterráneo	Ciminiello <i>et al.</i> , 1994
	<i>Aplysina fulva</i>	Mediterráneo	Ciminiello <i>et al.</i> , 1997
	<i>Aplysina fulva</i>	Brasil	Núñez <i>et al.</i> , 2008
	<i>Aplysina fulva</i>	Brasil	Silva <i>et al.</i> , 2010
	<i>Aplysina insularis</i>	Caribe	Ciminiello <i>et al.</i> , 1996
	<i>Aplysina insularis</i>	Caribe	Fendert <i>et al.</i> , 1999
	<i>Aplysina insularis</i>	Caribe	Compagnone <i>et al.</i> , 1999
	<i>Aplysina archeri</i>		Silva <i>et al.</i> , 2010
	<i>Aplysina.cavernicola</i>		Silva <i>et al.</i> , 2010
	<i>Aplysina.cavernicola</i>		Toms <i>et al.</i> , 2004
	<i>Aplysina caissara</i>		Silva <i>et al.</i> , 2010
	<i>Aplysina cauliformis</i>		Silva <i>et al.</i> , 2010
	<i>Aplysina cavernicola</i>	Mediterráneo	Ciminiello <i>et al.</i> , 1997
	<i>Aplysina aerophoba</i>		Toms <i>et al.</i> , 2004
	<i>Aplysinagerardogreeni</i>	Mazatlán, México	Hernández-Guerrero <i>et al.</i> , 2007
<b>Aplysinamisina-1</b>	<i>Aplysina cauliformis</i>		Rodríguez & Piña, 1993
	<i>Aplysina fulva</i>		Carney <i>et al.</i> ,

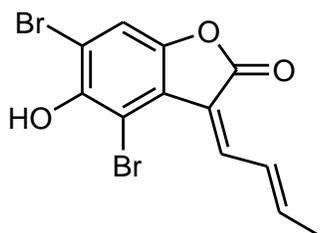
			1995
	<i>Aplysina cavernícola</i>	Mediterráneo	Ciminiello <i>et al.</i> , 1997
<b>Aplysinamisina-2</b>	<i>Aplysina cauliformis</i>		Rodriguez & Piña, 1993
	<i>Aplysina aerophoba</i>	Mediterráneo	Ciminiello <i>et al.</i> , 1997
	<i>Aplysina cavernicola</i>	Mediterráneo	Ciminiello <i>et al.</i> , 1997
<b>Aeroplysinina-1</b>	<i>Aplysina aerophoba</i>	Mediterráneo	Fattorusso <i>et al.</i> , 1970
	<i>Aplysina aerophoba</i>	Mediterráneo	Fattorusso <i>et al.</i> , 1972
	<i>Aplysina archeri</i>		Makarieva <i>et al.</i> , 1981
	<i>Aplysina archeri</i>	Mediterráneo	Ciminiello <i>et al.</i> , 1999
	<i>Aplysina fistularis</i>		Carney <i>et al.</i> , 1995
	<i>Aplysina cavernícola</i>	Mediterráneo	Ciminiello <i>et al.</i> , 1997
	<i>Aplysina cauliformis</i>	Mediterráneo	Ciminiello <i>et al.</i> , 1999
<b>Aeroplysinina-2</b>	<i>Aplysina cunulosa</i>	Brasil	Pereira <i>et al.</i> , 2006
	<i>Aplysina fistularis</i>	Brasil	Gandolfi <i>et al.</i> , 2010
	<i>Aplysina fulva</i>	Mediterráneo	Ciminiello <i>et al.</i> , 1994
<b>Aerophobina-1</b>	<i>Aplysina aerophoba</i>	Bahamas	Gunasekera & Gunasekera, 1989
	<i>Aplysina fulva</i>	Brasil	Núñez <i>et al.</i> , 2008
	<i>Aplysina insularis</i>	Caribe	Fendert <i>et al.</i> , 1999
<b>Aerophobina-2</b>	<i>Aplysina fulva</i>	Brasil	Núñez <i>et al.</i> , 2008
	<i>Apysinia insularis</i>	Caribe	Fendert <i>et al.</i> , 1999
	<i>Aplysina aerophoba</i>		Toms <i>et al.</i> , 2004
	<i>Aplysina aerophoba</i>	Mediterraneo	Cimino <i>et al.</i> , 1983
	<i>Aplysina aerophoba</i>	Mediterraneo	Köppel <i>et al.</i> , 2008
	<i>Aplysina cavernicola</i>		Toms <i>et al.</i> , 2004

Actividad biológica de compuestos aislados del género *Aplysina*.

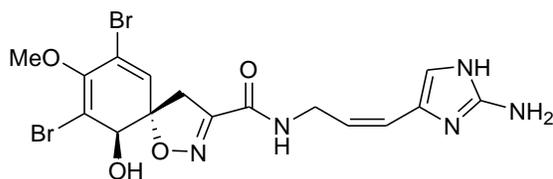
Este tipo de compuestos presentan diversos tipos de actividades biológicas, entre las cuales se puede mencionar que son inhibidores enzimáticos (Koulman *et al.*, 1996), presentan actividad frente a los protozoarios *Plasmodium falciparum* y *Trypanosoma cruzi* (Gutiérrez *et al.*, 2005), inmunosupresores (Gunasekera *et al.*, 1991), citotóxicos frente a diferentes líneas de células tumorales humanas (Gopichand & Schmitz, 1979; Cimino *et al.*, 1983; Acosta & Rodríguez, 1992; Rodríguez & Piña, 1993; Ciminiello *et al.*, 1999; Compagnone *et al.*, 1999; Hernández-Guerrero *et al.*, 2007), antiviral (Gunasekera & Cross, 1992), antiangiogénica (Rodríguez-Nieto *et al.*, 2002) y actividad antibacteriana, que es una de las más significativas. En la tabla II se muestran los compuestos aislados de este género que presentan actividad antibacteriana frente a diferentes cepas.

**Tabla II.** Actividad antibacteriana de diversos compuestos aislados de esponjas del género *Aplysina*

Compuesto	Especie (Localidad)	Actividad (cita)
<b>Aereoplisinina-2</b> 	<i>A. Aerophoba</i> (Panamá)	<i>S. aureus</i> <i>S. pyogenes</i> <i>Samonella typhi</i> <i>Shigella sonnei</i> (Minale <i>et al.</i> , 1976)
<b>Aeroplisinina-1</b> 	<i>A. aerophoba</i>	<i>S. albus</i> <i>B. cerus</i> <i>B. subtilis</i> (Fattorusso <i>et al.</i> , 1972).

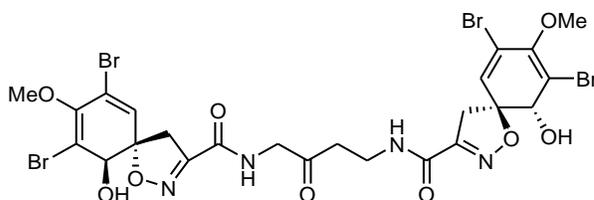
**Aplisinadieno***A. aerophoba*

*S. aureus*  
*S. pyogenes*  
*Samonella typhi*  
*Shigella sonnei*  
 (Norte & Fernández,  
 1987).

*P.aeruginosa***Aplisinamisina-1**

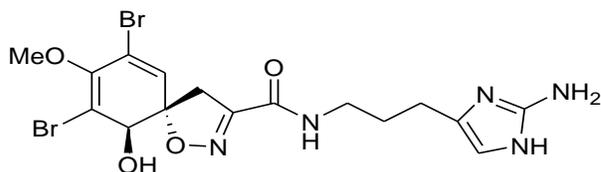
*A. cauliformis*  
 (Venezuela)

(Ávila-Nuñez, 2000)  
*E. coli*,  
*P. aeruginosa*  
*S. aureus*  
 (Rodríguez & Piña,  
 1993)

**11-oxoaereothionina**

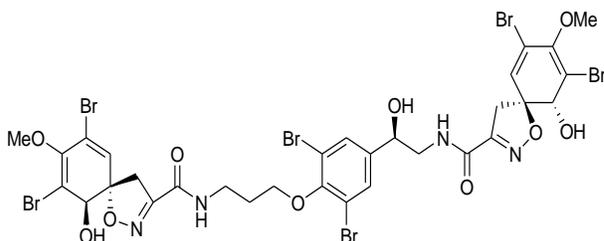
*A. lacunosa*  
 (Puerto Rico)

*E. coli*  
*P. aeruginosa*  
*S. aureus*  
 Mic=30µg mL-1  
 (Acosta &  
 Rodríguez, 1992).

**Aerofobina-2**

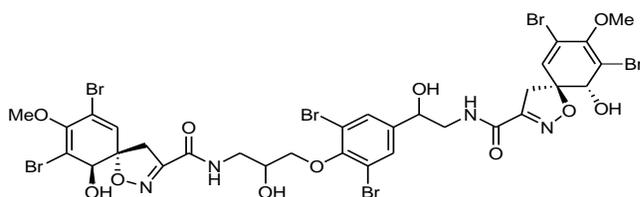
*A. lacunosa*  
 (Venezuela)

*E. coli*  
 (Ávila-Nuñez, 2000).

**11-desoxifistularina-3**

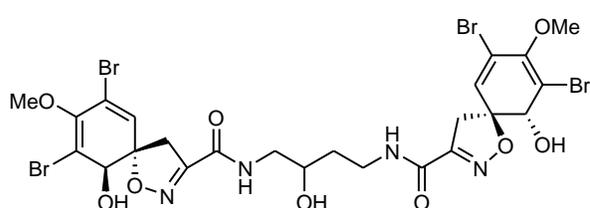
*A. lacunosa*  
 (Venezuela)

*P. aeruginosa*  
*S. aureus*  
 (Ávila-Nuñez, 2000)

**Fistularina-3**

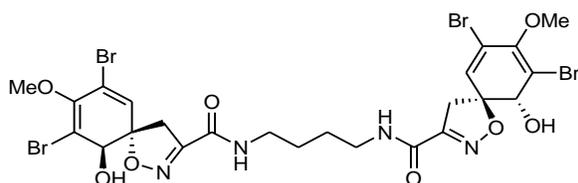
*A. caissara*  
(Brasil)

*E. coli*  
*P. aeruginosa*  
*S. aureus*  
(De Lira *et al.*, 2006).

**11-hidroxiaereothionina**

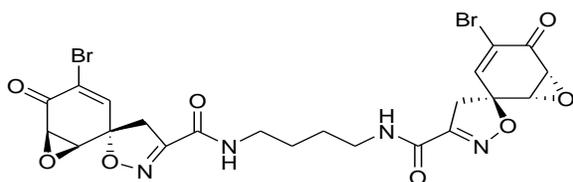
*A. caissara*  
(Brasil)

*E. coli*  
*P. aeruginosa*  
*S. aureus*  
(De Lira *et al.*, 2006).

**Aerothionina**

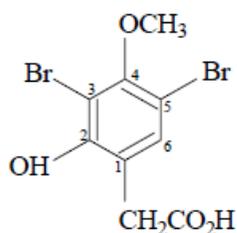
*A. gerardogreeni*  
(México)

*M. tuberculosis*  
H37Rv  
monoresistentes  
MIC= 12.5 µg.mL<sup>-1</sup>  
(Encarnacion-  
Dimayuga *et al.*,  
2003)

**Calafianina**

*A. gerardogreeni*  
(México)

*M. tuberculosis*  
H37Rv  
multiresistentes  
MIC= 6.5 µg mL<sup>-1</sup>  
(Encarnacion-  
Dimayuga *et al.*,  
2000)

**2-hidroxi-3,5-dibromo-4-metoxifenil**

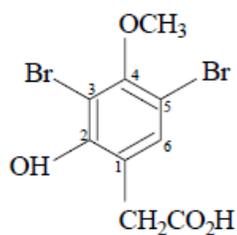
*A. gerardogreen*  
(México)

*S. aureus*  
(MIC=250µg mL<sup>-1</sup>)  
*Bacillus subtilis*  
(MIC= 250 µg mL<sup>-1</sup>)  
*Streptococcus faecalis*  
MIC = (62.5 µg mL<sup>-1</sup>)  
*E. coli* (MIC= 500 µg mL<sup>-1</sup>).  
*Vibrio harveyi*  
(MIC = 500 µg mL<sup>-1</sup>)  
*Candida albicans*  
(MIC = 500 µg mL<sup>-1</sup>)  
(León-Deniz, 2003).

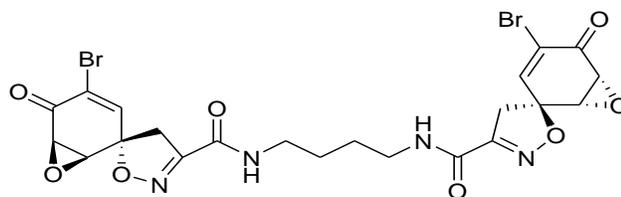
*Diversidad de compuestos aislados de Aplysina gerardogreeni y su actividad biológica.*

De la esponja *Aplysina gerardogreeni* se han aislado diversos compuestos (Fig. 3) con actividad antibacteriana, antimicobacteriana y citotóxica. Encarnación-Dimayuga *et al.* (2000) realizaron el aislamiento de los compuestos, aerothionina y el nuevo compuesto calafianina. La estructura de este último fue determinada por análisis de RMN y espectrometría de masas. Posteriormente se realizó una revisión de la estructura de la calafianina, la cual reveló una relación *trans* de los átomos de oxígeno entre el epóxido y la isoxazolina (Ogamino *et al.*, 2006). Tanto la calafianina como la aerothionina presentaron actividad frente a diferentes variantes de *M. tuberculosis* (Tabla I) (Encarnación-Dimayuga *et al.*, 2003). Por otra parte el compuesto ácido (2-hidroxi-3,5-dibromo-4-metoxifenil) acético presentó actividad antibacteriana (Tabla I) (León-Deniz, 2003). Posteriormente Hernández-Guerrero *et al.* (2007) aislaron 18 compuestos derivados de la dibromotirosina, de los cuales cuatro fueron descritos por primera vez, las

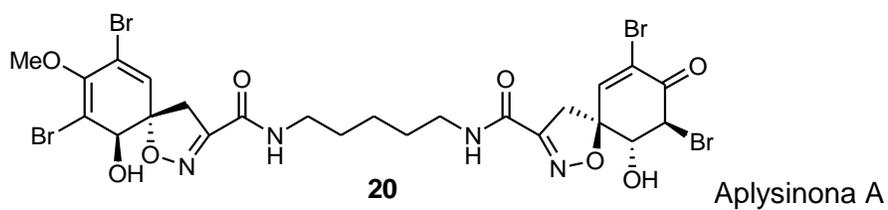
aplysinonas A-D, las cuales mostraron actividad citotóxica frente a las líneas de células tumorales humanas MDA-MB-3231, A-549 y HT-29.



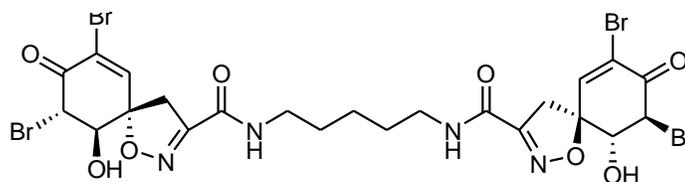
2-hidroxi-3,5-dibromo-4-metoxifenil



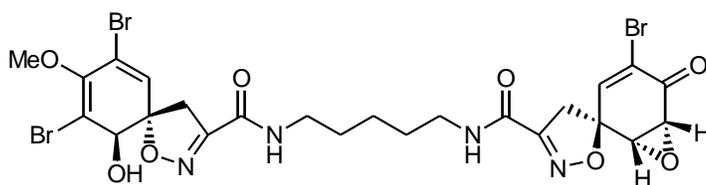
Calafianina

**20**

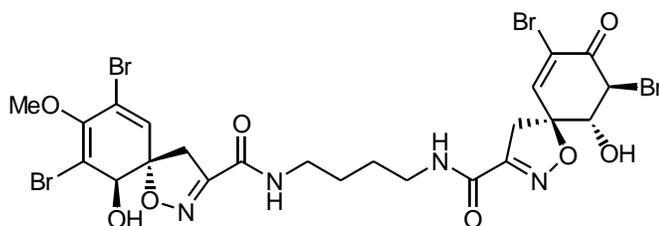
Aplysinona A



Aplysinona B



Aplysinona C



Aplysinona D

**Figura 3.** Compuestos aislados a partir de la esponja *Aplysina gerardogreeeni*

*Variación espacio-temporal de productos naturales marinos.*

Las esponjas sintetizan compuestos químicos llamados sustancias alelopáticas, que pueden ser disuasorias específicas o incluso “armas letales” cuya función ecológica es la defensa contra depredadores o competidores por el espacio (Pawlik *et al.*, 1995; Brusca & Brusca, 2005). Algunos de estos metabolitos secundarios no son sintetizados de manera continua dando lugar a una variabilidad en su producción, la cual ha sido documentada a nivel inter e intra-específico y de manera menos frecuente dentro del espécimen (Turón *et al.*, 2009); los factores que dan explicación estas variaciones, pueden ser genéticos, biológicos y ambientales (Uriz *et al.*, 1996).

En diversas especies se ha observado que la producción de los metabolitos secundarios presenta una evidente variación estacional con picos máximos de producción en una época del año determinada. Así la concentración del compuesto ascididemina producido por la ascidia *Cystodytes sp.*, presentó una periodicidad anual con valores mínimos en primavera y máximos en verano, justo después de la época de reproducción (López-Legentil *et al.*, 2006). Es también en verano cuando se presenta la mayor concentración del compuesto salicylahamida A producido por la esponja *Haliclona sp.*, pero en este caso se determinó que estaba relacionado con la temperatura del agua de mar (Abdo *et al.*, 2007). En esponjas que habitan cuevas en el Mediterráneo, la bioactividad de sus compuestos también presenta variaciones estacionales, dependiendo de la morfología, tasa de crecimiento y contacto con otras especies, lo que sugiere un balance entre la inversión de energía en defensa y otras funciones. Estos resultados ponen de manifiesto el importante papel de las interacciones mediadas por sustancias químicas en comunidades de esponjas (Turón *et al.*, 2009).

Estudios de la variabilidad espacio-temporal de los compuestos han puesto de manifiesto que también se observan cambios en la producción dependiendo de la región geográfica. En la esponja *Mycale hentscheli*, los metabolitos secundarios mayoritarios (mycalamida A, pateamina y pelorusida A) contenidos en la esponja, presentaron la mayor concentración en primavera, sin embargo, las variaciones fueron más evidentes a nivel espacial debido a las condiciones fisiográficas de

cada zona (Page *et al.*, 2005). Otro estudio de la variabilidad espacio-temporal de los compuestos se realizó con la esponja *Luffariella variabilis* la cual produce los compuestos manoalida, monoacetato de manoalida y Luffariellina A, que presentan un gran potencial antiinflamatorio, a pesar que estos mostraron variación tanto espacial como temporal, se reporta que la variación más interesante se dio entre organismos (Ettinger-Epstein *et al.*, 2008).

De igual forma, en la esponja *Spongia lamella* se analizó la variación en la producción de metabolitos secundarios entre diferentes poblaciones, los resultados mostraron que existe una variación y un incremento de los compuestos dependiendo de la ubicación geográfica (Noyer *et al.*, 2011). También se han observado variaciones significativas en la concentración de los metabolitos presentes en la esponja *Stylissa massa* en diferentes sitios y profundidades de la cuenca del Pacífico (Rohde *et al.*, 2012).

Estudios realizados en esponjas del género *Aplysina*, han puesto de manifiesto que existe una variabilidad en la composición y concentración de los compuestos dependiendo de la profundidad, tipo de tejido de la esponja, condiciones ambientales, simbiontes presentes y condiciones de estrés. Con respecto a este último, se ha planteado que algunos compuestos mayoritarios (aerothionina y homoaerethionina) son almacenados y exudados *in situ* de manera continua por esponjas de este género para crear una barrera protectora ante ataques o posibles infecciones (Thompson *et al.*, 1983; Thompson, 1985; Walker *et al.*, 1985). Por otra parte estudios realizados con *A. aerophoba* del Mediterráneo han sugerido que compuestos de alto peso molecular sufren una transformación mediante acción enzimática en respuesta a un daño en el tejido de la esponja (Teeyapant & Proksch, 1993). Sin embargo, en estudios *in situ* y en laboratorio realizados con *A. insularis* y *A. archeri* del Caribe, la composición de los metabolitos de alto peso molecular no se modificó aun cuando el organismo estuvo sujeto a sufrir lesiones (Puyana *et al.*, 2002; Puyana *et al.*, 2003).

La influencia de la profundidad en el perfil químico de las esponjas *A. aerophoba* y *A. cavernícola* ha sido estudiada en el Mediterráneo, la primera especie, habita zonas menos profundas (por debajo de los 11 m), y presenta un

perfil químico caracterizado por los compuestos aerophobina-2 e isofistularina-3, mientras que *A. cavernícola* se distribuye en zonas más profundas (entre 14 y 39 m) de la misma localidad y presenta como componentes prioritarios a la aerotionina y aplysinamisina-1 (Cimino *et al.*, 1983; Ciminiello *et al.*, 1997). Al realizar estudios de trasplante de estas esponjas de zonas someras a profundas y viceversa, se esperaba que el perfil químico cambiara por efecto de las modificaciones en las condiciones ambientales (luz, temperatura), sin embargo, los compuestos fueron característicos de cada especie, lo que denota que existe una barrera bien definida entre estos dos químiotipos (Putz, 2009; Putz *et al.*, 2009; Klöppel *et al.*, 2009).

Estudios de la variación estacional de los compuestos de *Aplysina aerophoba* (aerophobina 1, aerophobina 2, aplysinamisina-1 e isofistularina-3) en un periodo de dos años, puso de manifiesto que aun cuando es difícil identificar a los factores ambientales que afectan la producción de los compuestos, estos presentaron una mayor concentración durante el verano (Sacristán-Soriano *et al.*, 2012). Mientras que las variaciones a pequeña y gran escala geográfica van a depender del tipo de compuestos, algunos compuestos (aerophobina 1 y aerophobina 2) presentaron variaciones a pequeña escala, mientras que aplysinamisina-1 e isofistularina-3 sólo presentaron variaciones a una mayor escala espacial (Sacristán-Soriano *et al.*, 2011). Al comparar los compuestos en los diferentes tejidos de la esponja (coanosoma y ectosoma) se observó que la mayor concentración se presenta en el ectosoma (Sacristán-Soriano *et al.*, 2012).

Con respecto a la relación entre organismos simbioses y variación de los compuestos, se relacionó la clorofila a como una medida de densidad de simbioses autotróficos, con la producción de metabolitos, pero no se encontró una relación evidente y el papel de los simbioses en la producción de los metabolitos aún resulta una incógnita (Sacristán-Soriano *et al.*, 2011).

En México, únicamente se han realizado estudios de la variación estacional de la actividad antibacteriana a nivel de extractos, el primero de ellos realizado con la esponja *Aplysina fistularis*, recolectada en la isla Espíritu Santo, donde se observa que la actividad antibacteriana se ve modificada en función de la

variación de la temperatura (Betancourt *et al.*, 1998). El otro estudio realizado con *A. gerardogreeni* de Punta Arena de la Ventana, mostró una evidente variación estacional en la actividad antibacteriana de extractos de frente a las cepas de bacterias patógenas *S. aureus* y *E. coli.*, siendo en otoño cuando se presenta la mayor actividad con halos de inhibición de entre 24.6 y 24.4 mm (Montes-Plascencia *et al.*, 2010)

### III. JUSTIFICACIÓN

La búsqueda de nuevas sustancias bioactivas con aplicaciones farmacológicas a partir de organismos marinos representa un gran potencial económico. En este sentido, las esponjas del género *Aplysina* presentan una gran cantidad de metabolitos bromados derivados de la tirosina que se han caracterizado por presentar diversas actividades biológicas interesantes, destacando la actividad antibacteriana. Por lo que diferentes investigaciones se han abocado en aislar y caracterizar y evaluar la actividad biológica de los compuestos de esponjas de este género en diferentes partes del mundo. En años recientes los estudios han empezado a abordar aspectos de la variación espacial y temporal de estos compuestos (Sacristan-Solano *et al.*, 2011; 2012). En México, este género se distribuye en el Pacífico mexicano y en particular en el arrecife rocoso de Punta Arena de la Ventana, B.C.S., dentro del Golfo de California, *Aplysina gerardogreeni* se encuentra ampliamente representada. Se ha observado que los extractos orgánicos presentan una interesante actividad antibacteriana (Valencia-Agami, 2010), así como una variación estacional significativa (Montes-Plascencia *et al.*, 2010). Sin embargo, no existen estudios que describan la variación de los compuestos responsables de la actividad a lo largo del tiempo, ni el efecto en las variaciones debido a cambios en la profundidad, temperatura y nutrientes. Por lo que este trabajo pretende abordar estos aspectos y contribuir a generar un mayor conocimiento acerca de los principales metabolitos de *Aplysina gerardogreeni*.

#### IV. HIPÓTESIS

Bajo las premisas antes planteadas, surgieron las siguientes preguntas: ¿Existe un patrón estacional en la variación de los metabolitos bromados de la esponja *A. gerardogreeni*, dada por algunos parámetros ambientales (profundidad, temperatura y disponibilidad de nutrientes?, ¿estos compuestos se producen de manera constante y todos presentarán actividad antibacteriana? Lo que generó la siguiente hipótesis de trabajo:

Los compuestos mayoritarios de la esponja *A. gerardogreeni* del Arrecife de Punta Arena de la Ventana presentarán variaciones temporales en su composición y concentración, siendo la aerotionina uno de los compuestos mayoritarios que produce de manera constante, además de que presentarán una actividad antibacteriana significativa.

#### V. OBJETIVOS

##### **General.**

Describir el patrón temporal de los compuestos mayoritarios de la esponja *Aplysina gerardogreeni* del arrecife rocoso de Punta Arena de la Ventana y evaluar la actividad antibacteriana de los diferentes compuestos obtenidos.

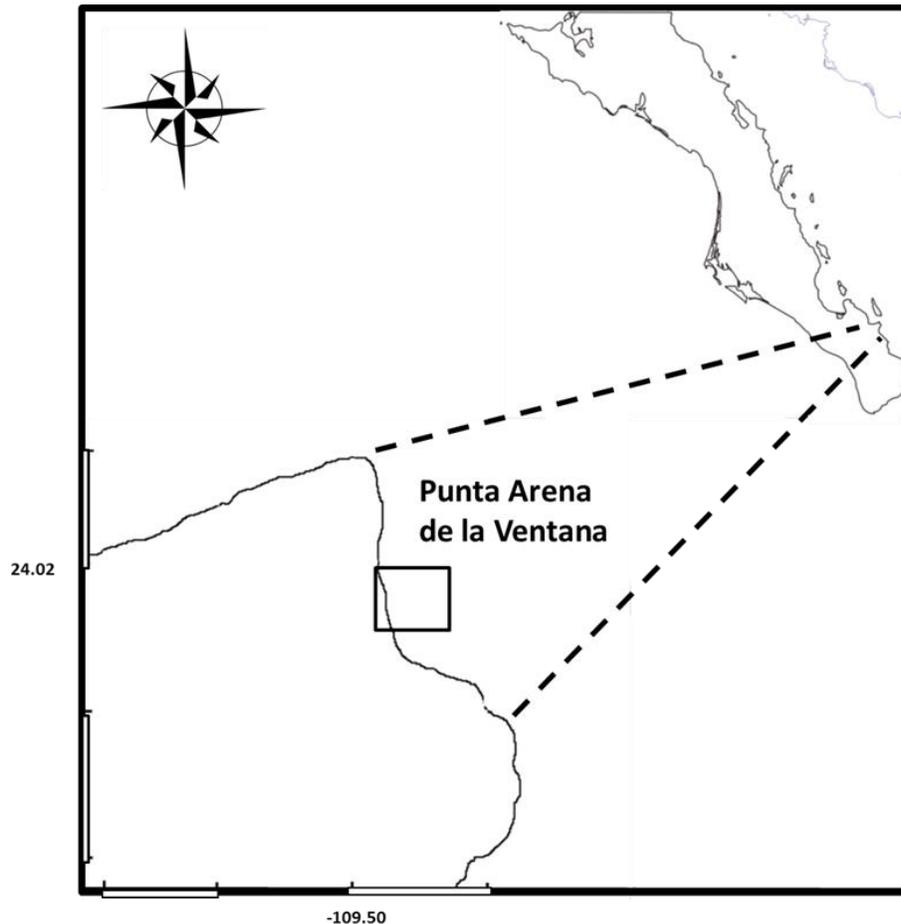
##### **Particulares.**

1. Determinar el perfil cromatográfico de los compuestos derivados de la dibromotirosina de la esponja *A. gerardogreeni*.
2. Aislar y caracterizar estructuralmente los compuestos mayoritarios de la esponja.
3. Determinar la variación espacio-temporal de la concentración relativa de los compuestos.
4. Evaluar la actividad antibacteriana de los compuestos puros frente a cepas patógenas para el hombre.

## VI. ÁREA DE ESTUDIO

La recolección de los ejemplares se llevó a cabo en la localidad de Punta Arena de la Ventana, localizada en el litoral de Baja California Sur entre los  $24^{\circ}03'$  N y los  $109^{\circ}49'$  W (Fig. 4). El área está formada por un macizo batolítico llamado Bloque de Los Cabos, constituido principalmente de rocas graníticas metamórficas y clásticas originadas en el cretácico (Suárez, 2002).

En Punta Arena de la Ventana se observa una plataforma rocosa submarina paralela a la costa, que tiene por su parte más ancha 70 m y una profundidad máxima de 3 m; al término de la plataforma se advierte un borde vertical que descende a una profundidad no mayor a 7 m (Suárez, 2002).



**Figura 4.** Punta Arena de La Ventana entre los  $24^{\circ}03'31.50''$  N y los  $109^{\circ}49'46.02''$  W

## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

### VII.1 Perfil cromatográfico de los compuestos derivados de la dibromotirosina de la esponja *Aplysina gerardogreeni*

#### *Obtención del material biológico.*

Los ejemplares de *Aplysina gerardogreeni* se recolectaron a mano mediante buceo SCUBA en Punta Arena de la Ventana (Fig. 4). La recolecta se realizó en los meses de marzo, abril, junio, septiembre, octubre, noviembre y diciembre de 2008 así como en enero y febrero de 2009 a tres profundidades (2, 4 y 6 m) que es la zona donde se distribuye la esponja. Las esponjas debidamente etiquetadas se trasladaron en hielo al laboratorio de microbiología del CICIMAR, donde se mantuvieron a -30° C hasta su estudio químico. Una muestra de esponja de cada profundidad fue debidamente preservada y se envió al Laboratorio de Ecología del Bentos en el Instituto de Ciencias del Mar y Limnología (Campus Mazatlán) para su identificación taxonómica.

#### *Registro de temperatura.*

Los datos de temperatura se obtuvieron mediante registros *in situ* con un medidor de temperatura tipo HOBO que se instaló en el área de estudio. Con esta información se construyó una base de datos y se obtuvieron los valores promedio para cada mes.

#### *Toma de muestras de agua para análisis de nutrientes.*

Para determinar la concentración de los nutrientes: nitritos ( $\text{NO}_2$ ), nitratos ( $\text{NO}_3$ ) y ortofosfatos ( $\text{PO}_4$ ), las muestras de agua de mar fueron recolectadas por triplicado en botellas de policarbonato de 500 mL (2m, 4m y 6m). Las cuales fueron filtradas a través de una membrana de fibra de vidrio, (Whatman GF/F) para eliminar la materia orgánica particulada y congeladas a -20° C para su posterior análisis. La determinación de los nutrientes fue realizada en el CIDIR-IPN (Sinaloa), donde se obtuvieron los valores utilizando las técnicas

colorimétricas descritas en Strickland & Parsons (1972). Los nitritos se determinaron utilizando el método de Bendschneider & Robinson (1952); los nitratos se determinaron utilizando el método de Morris & Riley (1963) y el ortofosfato se determinó utilizando el método de Murphy & Riley (1962). Las lecturas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro (Milton Roy Spectronic, modelo 1201).

#### *Obtención de extractos orgánicos.*

De cada mes y profundidad se obtuvieron extractos orgánicos, para lo cual se registró el peso de los organismos y se realizó una extracción con una mezcla de acetona/metanol 1:1 a temperatura ambiente. La disolución resultante se filtró y el disolvente se evaporó a presión reducida, a cada extracto se le añadió repetidamente metanol y se separó la parte del extracto soluble en metanol. Esta disolución se evaporó a presión reducida para dar lugar a 27 extractos de metanol de color marrón y aspecto oleoso.

#### *Técnicas cromatográficas utilizadas.*

##### - Cromatografía en capa fina (CCF)

Se realizó sobre placas de gel de sílice Kiesegel 60 F<sub>254</sub> (Merck) de 0.2 mm de espesor, con indicador fluorescente. Las cromatografías se siguieron por UV (254 nm) y se revelaron mediante pulverización con una disolución de sulfato de cerio en ácido sulfúrico 2N y posterior calentamiento.

##### - Cromatografía en columna (CC)

Se efectuó a presión atmosférica, utilizando gel de sílice Merck (60-200 µm), compactada con el mismo disolvente a utilizar como primer eluyente de la columna. Las muestras se introdujeron disueltas en ese mismo disolvente. Para la elución de las columnas se utilizaron mezclas de disolventes en orden de polaridad creciente. Los disolventes empleados fueron: Hexano (He), acetato de etilo (AcOEt), cloroformo (CHCl<sub>3</sub>) y metanol (MeOH).

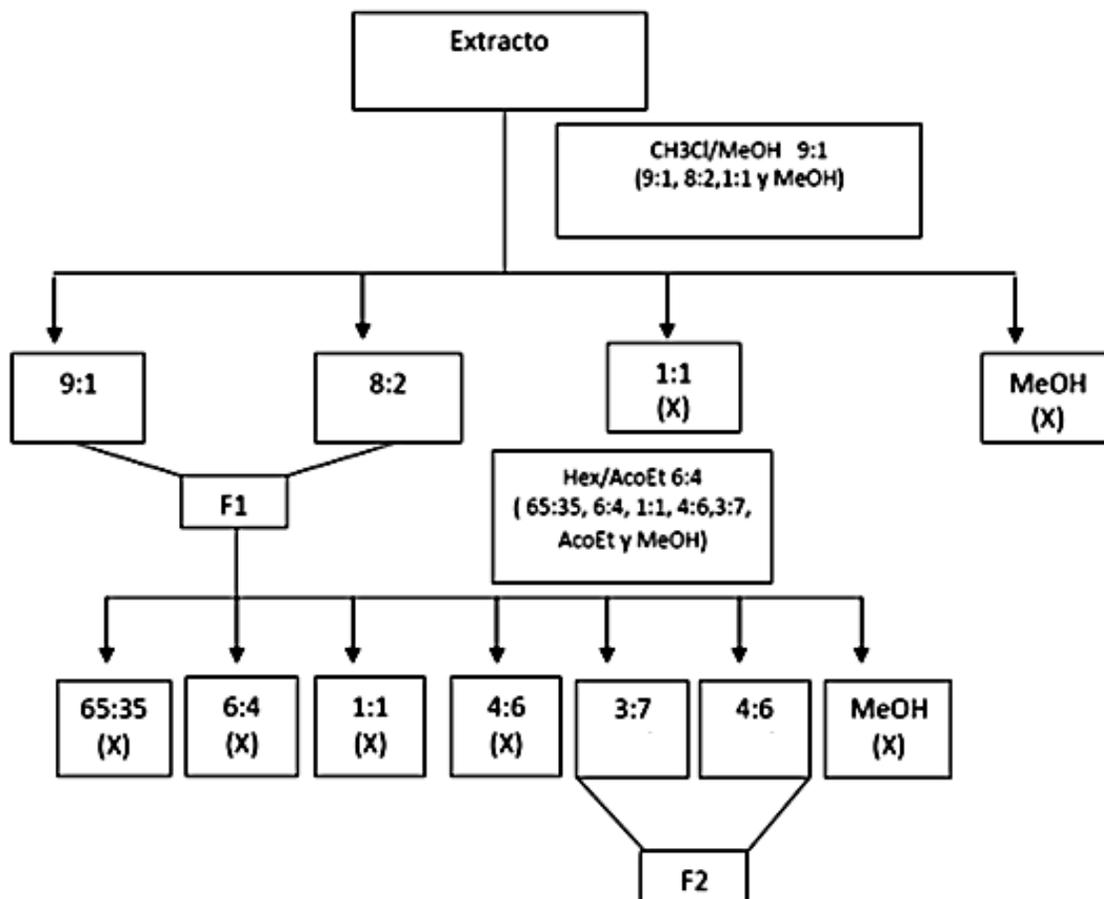
#### - Cromatografía líquida de Alta Eficacia (HPLC)

Se utilizó un aparato Merck-Hitachi de la serie LaChrom equipado con un detector UV (Merck L-7400). Se emplearon columnas analíticas (4 x 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) y semipreparativa (10 x 250 mm, 7  $\mu\text{m}$ ) con relleno LiChrospher Si-60. La separación fue en fase normal con un flujo de elución de 1 mL/min en la columna analítica y de 3 mL  $\text{min}^{-1}$  con la columna semipreparativa. Las muestras se filtraron a través de filtros Tecknokroma con poro de 0.45  $\mu\text{m}$ . Los disolventes orgánicos empleados ( $\text{CHCl}_3$  y MeOH), eran grado HPLC o destilados y filtrados antes de su uso sobre filtros Millipore de 0.45  $\mu\text{m}$ .

#### *Fraccionamiento de extractos mediante Cromatografía en Columna.*

Los extractos se sometieron a fraccionamiento mediante CC compactada con una mezcla de  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (9:1), y utilizando como eluyentes mezclas de  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  de polaridad creciente 9:1, 8:2, 1:1 y MeOH. El análisis mediante CCF utilizando como fase móvil una mezcla de  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (9:1) permitió reunir a las alícuotas 9:1 y 8:2, denominando a esta fracción la F1 (Fig. 3).

La fracción F1 de cada extracto fue sometida nuevamente a un proceso de purificación mediante CC, compactado con una mezcla de He/AcOEt (65:35), utilizando como eluyente mezclas de He/AcOEt de polaridad creciente (65:35, 6:4, 1:1, 4:6, 3:7, AcOEt) y MeOH, posteriormente las alícuotas obtenidas fueron analizadas por CCF utilizando como fase móvil He/AcOEt (65:35), lo que dio lugar a reunir las alícuotas 3:7 y AcOEt para obtener la fracción F2 (Fig. 5).



**Figura 5.** Esquema de fraccionamiento mediante cromatografía en columna de los extractos de MeOH obtenidos de ejemplares de la esponja *Aplysina gerardogreeni*.

#### *Obtención del perfil cromatográfico de los diferentes extractos.*

Para la obtención de los cromatogramas que mostraran la variación de los compuestos, la fracción F2 de cada extracto fue separada mediante el uso de un equipo de HPLC. En primera instancia se realizó el análisis utilizando una columna analítica, con un sistema de eluyente de  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (99:1), inyectando una concentración de 0.55 mg en 100  $\mu\text{L}$ . Se utilizaron estándares de los compuestos puros (aerotionina, homoaerotionina y fistularina-3) previamente identificados en otro estudio para poder obtener los tiempos de retención e identificar los diferentes compuestos mayoritarios.

## VII.2 Aislamiento y caracterización estructural de los compuestos

### *Separación de los compuestos mayoritarios.*

Para la separación de compuestos se repitió el mismo procedimiento que para la obtención del perfil cromatográfico pero esta vez utilizando una columna semipreparativa con las mismas condiciones pero inyectando una concentración de 10 mg en 150  $\mu$ L. Los diferentes picos de los compuestos mayoritarios fueron aislados y concentrados a presión reducida, de esta forma se obtuvo cantidad para la caracterización y pruebas de actividad.

### *Caracterización estructural de los compuestos puros.*

La caracterización de los compuestos puros se realizó mediante estudios espectroscópicos de resonancia magnética nuclear ( $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN). Los cuales fueron realizados en un equipo Varian INOVA 400 en el Servicio Central de Ciencia y Tecnología de la Universidad de Cádiz. Como disolventes se utilizaron cloroformo ( $\text{CDCl}_3$ ), metanol ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) o acetona ( $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ) deuterados. Los desplazamientos químicos se expresan en la escala  $\delta$  (ppm) y en los espectros de protón ( $^1\text{H}$ -RMN) se utilizó como referencia interna la señal del disolvente residual no deuterado,  $\delta$  7.26 para el cloroformo,  $\delta$  3.30 para el metanol y  $\delta$  2.04 para la acetona. Los desplazamientos de las señales de los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN de los diferentes compuestos se compararon con señales de la literatura de espectros de compuestos conocidos.

Para los diferentes compuestos, se determinó el tiempo de retención (TR) en el cromatograma de HPLC y el factor de retención (Rf) mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Rf} = \frac{\text{Distancia que recorre la mancha del producto}}{\text{Distancia recorrida por el disolvente}}$$

### VII.3 Variación temporal de los compuestos mayoritarios de *A. gerardogreeni*

*Cuantificación de los compuestos mayoritarios.*

Se calculó el porcentaje relativo y la concentración relativa de cada compuesto, esta última expresada en mg mL<sup>-1</sup>. Los cuales fueron determinados mediante las siguientes ecuaciones (López de la Torre, 2010):

$$\% \text{ relativo} = (A_x / A_T) \cdot 100$$

$$[C] \text{ relativa} = \frac{[(A_x) (P_M)]}{A_T V_M}$$

Donde

$A_x$  = área bajo la curva del pico correspondiente al compuesto de interés

$V_M$  = Peso de la muestra incorporada a la muestra cromatográfica (mg)

$A_T$  = área bajo la curva de todos los picos.

$V_M$  = Volumen del aceite incorporado a la muestra (mL)

*Análisis estadísticos y relación entre parámetros ambientales y la concentración relativa de los compuestos.*

Se construyó una base de datos con los valores de concentración relativa de cada uno de los compuestos y los diferentes parámetros ambientales, profundidad, temperatura, nitratos, nitritos y fosfatos. La relación entre estos valores se determinó mediante el coeficiente de correlación de Pearson empleando el programa Statistica 8.

Tomando en cuenta que la profundidad no fue un factor que explicará la variación en la concentración de los productos, se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) de una vía entre los diferentes meses.

#### VII.4 Ensayo de actividad antibacteriana de los compuestos puros

Los ensayos se llevaron a cabo mediante el método de difusión en agar (NCCLS, 1993; Elyakov, 1996) frente a las cepas de bacterias patógenas *Staphylococcus aureus* (Gram positiva, ATCC BAA-42) y *Escherichia coli* (Gram negativa, ATCC BAA-196).

A partir de cada una de las cepas patógenas se realizó un pre-inoculo en medio TSA, los cuales fueron incubados por 24 h a 35° C. Además se preparó medio Müller Hinton, el cual se colocó en alícuotas de 12 mL en tubos de ensaye (esto permitió estandarizar la susceptibilidad del bioensayo y obtener un mismo grosor de las placas, ya que se sabe que este es uno de los factores que pueden modificar la difusión de las sustancias sobre el agar) que fueron esterilizadas a 15 libras de presión durante 15 minutos. En ambiente estéril cada alícuota fue vaciada en cajas Petri de 10 cm de diámetro.

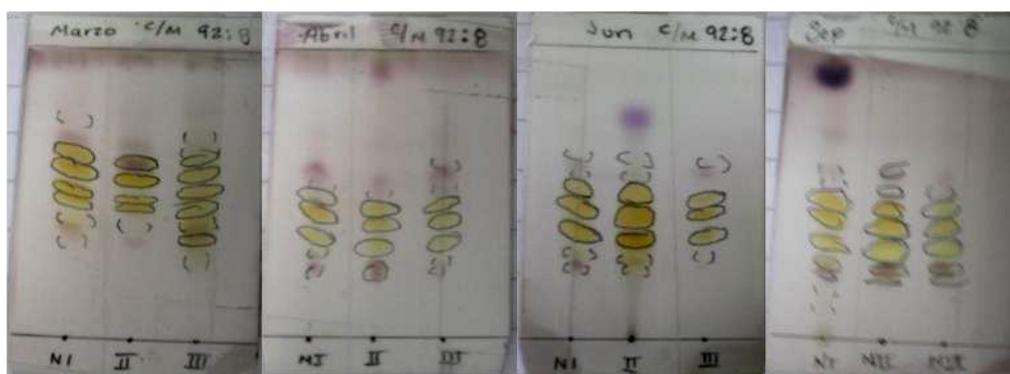
Para la preparación de los sensi-discos, se utilizaron discos de papel filtro Whatman de 6mm de diámetro, a los cuales en condiciones estériles se les agregaron 25  $\mu\text{L}$  del compuesto puro, previamente disuelto en metanol a una concentración de 8  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para obtener una concentración final en cada disco de 200  $\mu\text{g}$ . Como control negativo se prepararon discos con 25  $\mu\text{L}$  del disolvente utilizado para diluir el compuesto puro. Para los ensayos de actividad, con cada cepa patógena se preparó una suspensión celular de aproximadamente  $1 \times 10^8$  cel  $\text{mL}^{-1}$ , esta suspensión fue inoculada en el medio con ayuda de un hisopo estéril. Posteriormente se colocaron los discos previamente preparados con los compuestos y el control negativo. A cada placa se le realizaron perforaciones en el centro con ayuda de un sacabocados de 6 mm de diámetro, donde se colocaron alícuotas de 25  $\mu\text{L}$  de ampicilina a una concentración de 30  $\mu\text{g}$ , la cual se utilizó como control positivo. Todas las pruebas fueron realizadas por triplicado.

Las cajas de Petri se colocaron a 4° C durante 40 min, con el fin de retardar el crecimiento microbiano mientras las sustancias antibióticas se difunden sobre el agar. Posteriormente, las cajas de Petri fueron incubadas a 35° C durante 24 h. Transcurrido este tiempo se midió el diámetro de los halos de inhibición (en mm) y se calculó su media y desviación estándar.

## VIII. RESULTADOS

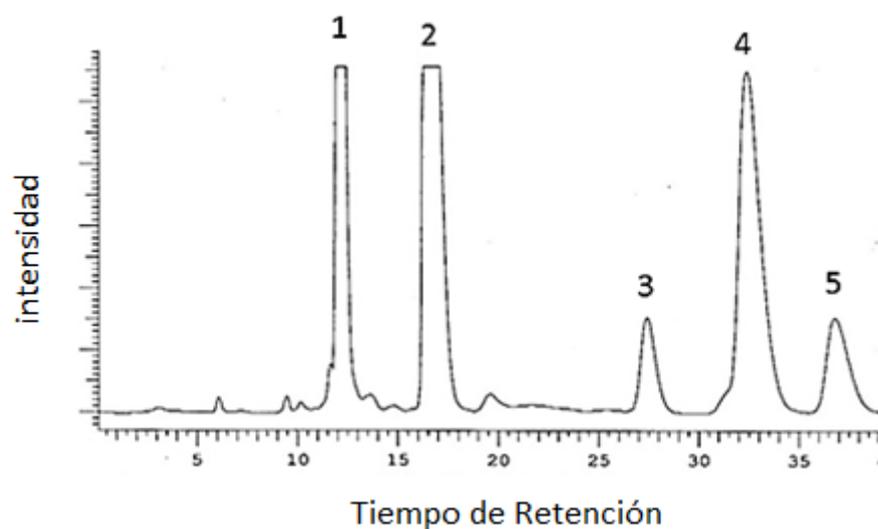
### VIII.1 Perfil cromatográfico de los compuestos derivados de la dibromotirosina de la esponja *A. gerardogreeni*.

El análisis de cromatografía en capa fina (CCF) de la fracción semipurificada (F2) de los diferentes extractos de *A. gerardogreeni* reveló la presencia de varios compuestos con un Rf entre 0.3 y 0.6 (Fig. 6).

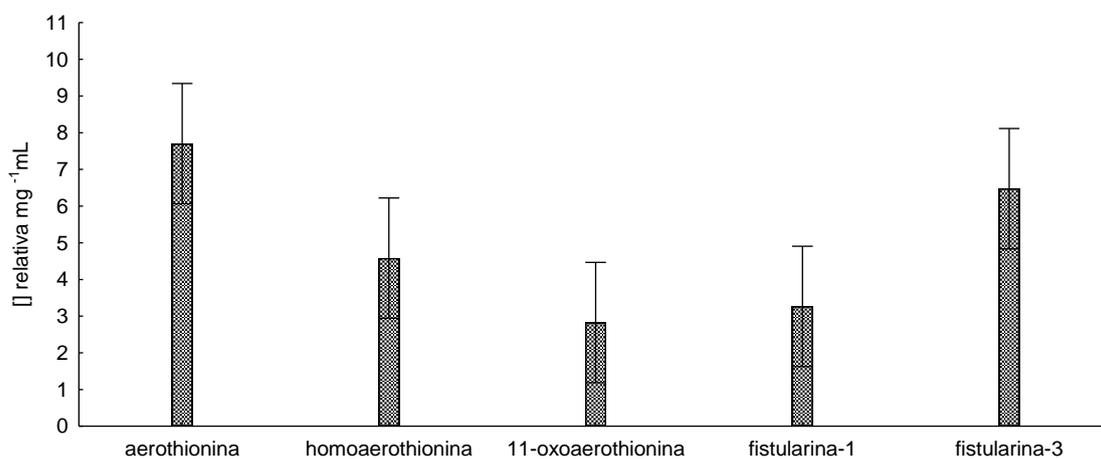


**Figura 6.** Placa cromatografica de los compuestos de la esponja *Aplysina gerardogreeni* en las diferentes profundidades (2, 4 y 6 m) y meses de muestreo. Manchas visibles a la luz UV (254 nm), sistema de elución  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  92:8, revelada con sulfato de cerio.

El perfil cromatográfico en HPLC de la fracción F2 de los diferentes meses de estudio, mostró de manera general la presencia de cinco compuestos mayoritarios (Fig. 6). Los cuales fueron identificados mediante espectroscopia de RMN como compuestos derivados de la dibromotirosina descritos anteriormente como la aerothionina (**2**), homoaerothionina (**1**), 11-oxo-homoaerothionina (**3**), fistularina-1 (**5**) y fistularina-3 (**4**). La concentración relativa de los compuestos mostró diferencias significativas (ANOVA,  $F_{(4, 130)}=6.3160$   $P=0.00011$ ), el compuesto **1**, presentó la mayor concentración relativa, mientras que los compuesto **3** y **5** presentaron una menor concentración dentro de la esponja *A. gerardogreeni* (Fig. 7).



**Figura 7.** Perfil cromatográfico que muestra la presencia de cinco compuestos mayoritarios en la esponja *Aplysina gerardogreeni*, donde 1) homoaerotionina, 2) aerotionina, 3) 11-oxohomoaerotionina, 4) fistularina-3 y 5) fistularina-1.



**Figura 8.** Concentración relativa (mg mL<sup>-1</sup>) de los compuestos mayoritarios obtenidos de la esponja *A. gerardogreeni* en los diferentes meses muestreados.

## VIII.2 Aislamiento y caracterización estructural de los compuestos.

### Caracterización de la aerotionina (2)

Este compuesto se aisló como un sólido amorfo de color blanco que en CCF eluida con  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  9:1 presentaba un  $R_f = 0.44$ , fluorescente a la luz UV y revelaba de color café ocre con sulfato de cerio. Con un tiempo de retención en HPLC (sistema elución  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  9:1) de 17 minutos.

El espectro de  $^1\text{H}$ -RMN en de este compuesto en acetona- $d_6$  (Fig. 9) mostraba las señales de un metoxilo a  $\delta_{\text{H}}$  3.71 (s), un metino olefínico a  $\delta_{\text{H}}$  6.50 (bs), dos metilenos, uno de ellos a  $\delta_{\text{H}}$  3.81 (d,  $J=18.2$  Hz) y a  $\delta_{\text{H}}$  3.16 (d,  $J=18.2$  Hz), y el otro a  $\delta_{\text{H}}$  1.60 (m), así como un hidroxilo a  $\delta_{\text{H}}$  5.42 (s) y un grupo amino a  $\delta_{\text{H}}$  7.72 (t) (Tabla III).

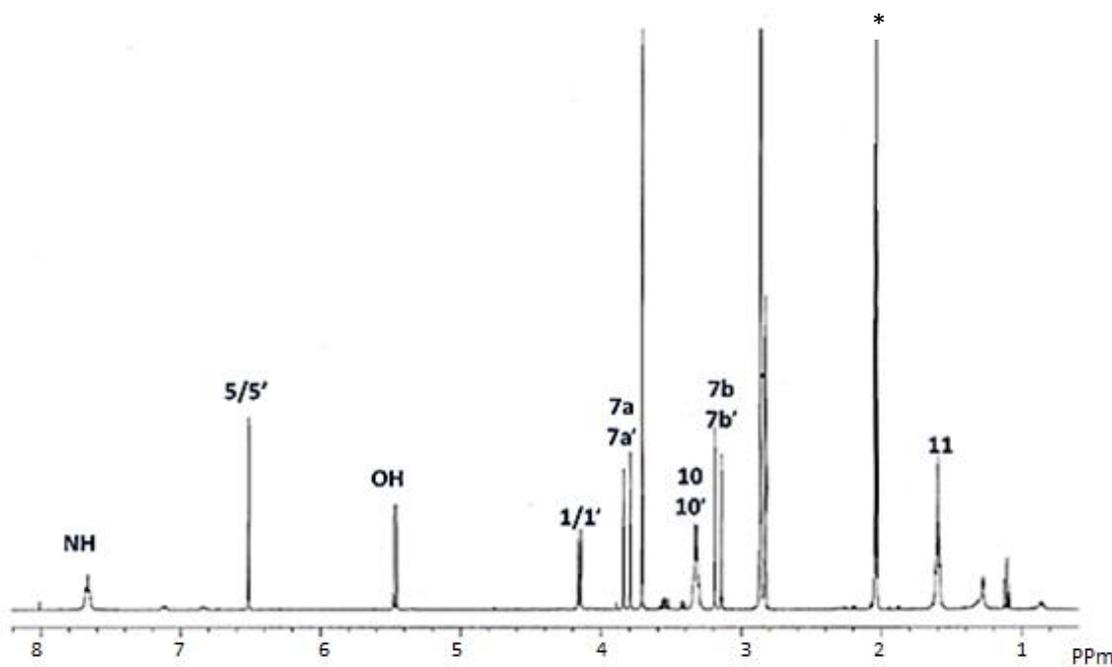
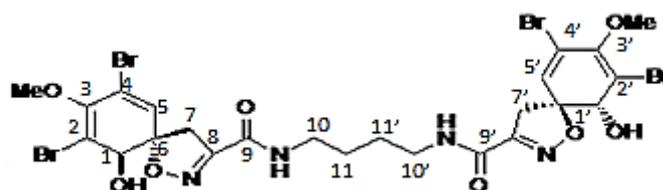


Figura 9. Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de la aerotionina (2) en acetona- $d_6$  (\*señal del disolvente).

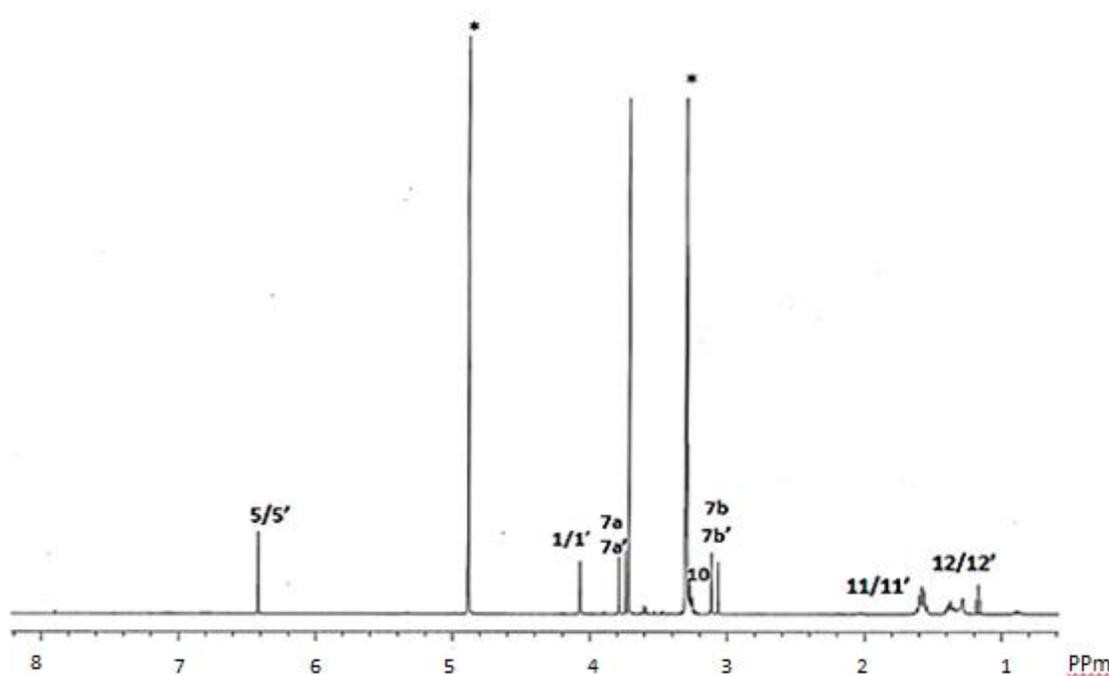


2

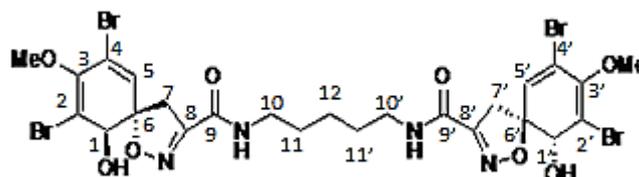
### Caracterización de la homoaerotionina (1).

Este compuesto se aisló como un sólido amorfo de color blanco, en CCF eluida con  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  9:1 presentaba un  $R_f = 0.52$  fluorescente a la luz UV y revelaba de color café ocre con sulfato de cerio. Presenta un tiempo de retención en HPLC (sistema de elución  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  9:1) de 13 minutos.

En el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de este compuesto (Fig. 10) en metanol deuterado ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) mostraba señales muy similares a las del espectro de la aerotionina (Tabla III), con la diferencia de que adicionalmente se observaba la señal de un metileno a  $\delta_{\text{H}}$  1.37 (m) lo que indicaba que presentaba una cadena central de cinco carbonos, por lo que la estructura de este producto era simétrica.



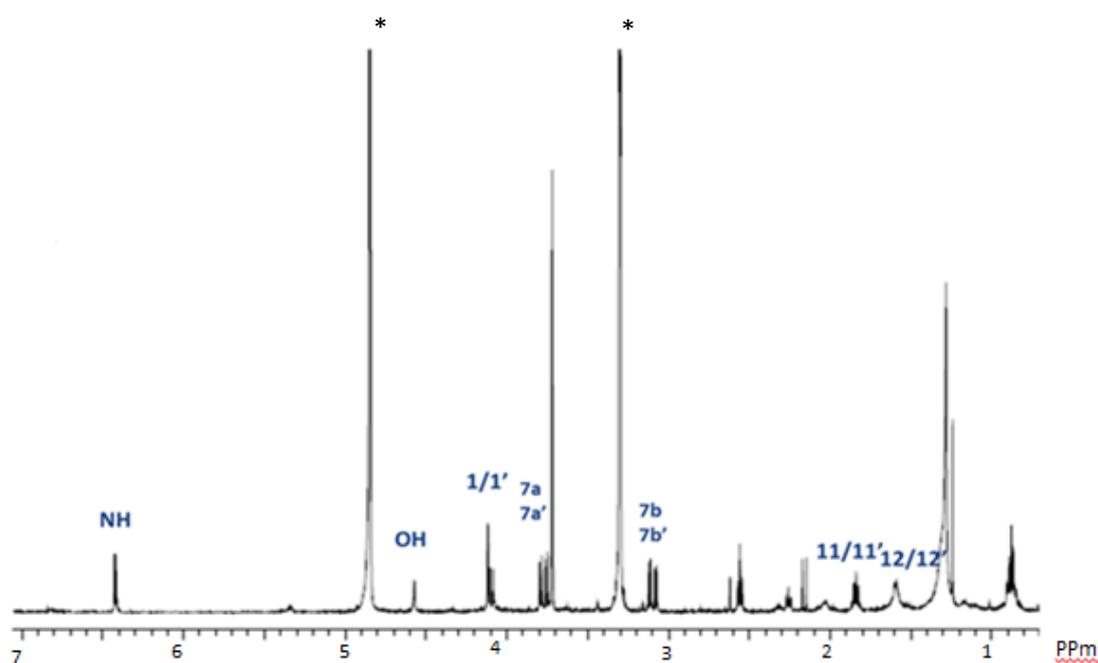
**Figura 10.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de la homoaerotionina (1) en  $\text{CD}_3\text{OD}$  (\*señal del disolvente).



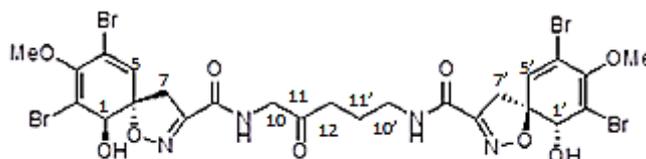
### Caracterización de la 11-oxohomoaerotionina (3).

Este compuesto se aisló como un sólido amorfo de color blanco, el cromatograma obtenido en el HPLC mostraba un tiempo de retención para este compuesto de 27 min, y en CCF presenta un Rf de 0.46

Al comparar las señales de  $^1\text{H}$ -RMN de este compuesto (Fig. 11) con las de la homoaerotionina se observaba que varias de ellas eran similares, sin embargo, se presentaban diferencias fundamentales en la cadena central, ya que no se observaba la señal característica del  $\text{H}_{11}$ , y las señales correspondientes a los protones  $\text{H}_{10}$  y  $\text{H}_{12}$  estaban desapantalladas dando lugar a desplazamientos de  $\delta$  4.09 y  $\delta$  2.56 respectivamente (Tabla III). Estos datos junto con las señales en el espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de un carbonilo cetónico ( $\delta$  206.1) confirmaron que se trataba del compuesto conocido 11-oxohomoaerotionina.



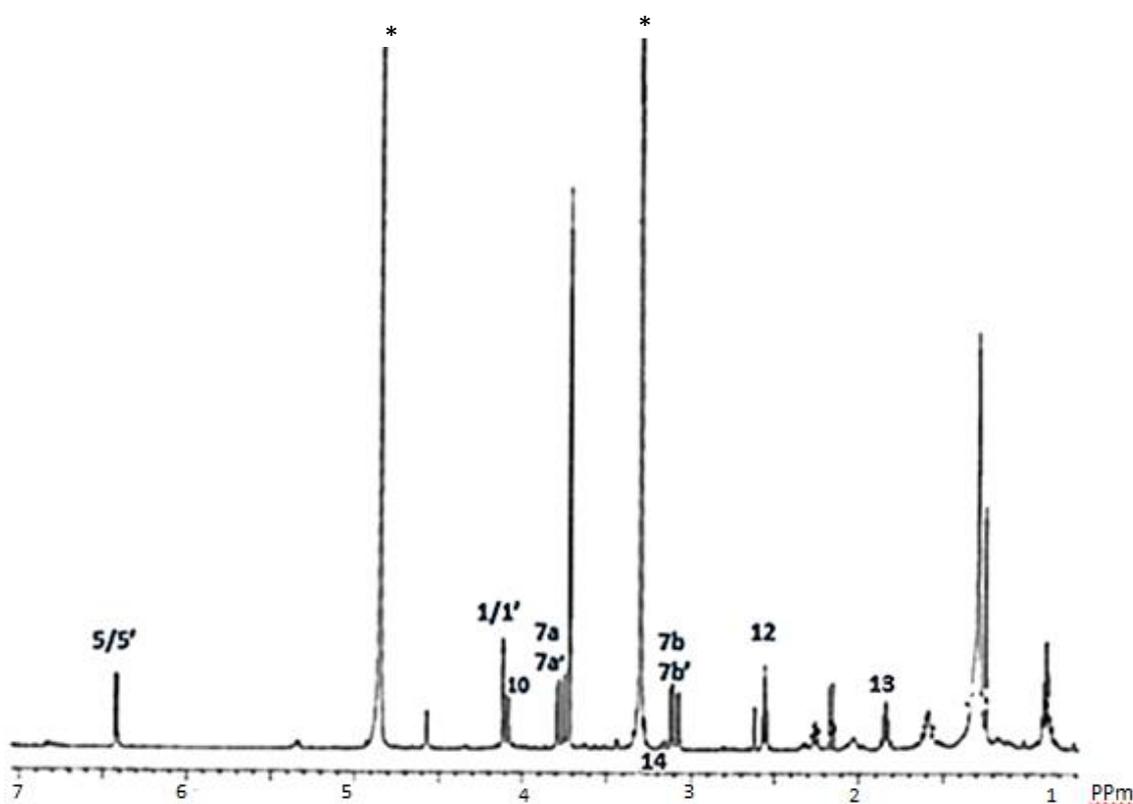
**Figura 11.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de la 11-oxohomoaerotionina (3) en  $\text{CD}_3\text{OD}$  (\*señal del disolvente).



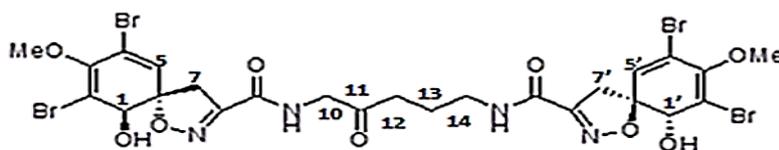
**3**

### Caracterización de la fistularina-1 (5)

El tiempo de retención en HPLC para el compuesto **5** fue de 27 min. Mientras que en CCF presentaba un  $R_f$  de 0.41. Al comparar las señales de  $^1\text{H}$ -RMN de este compuesto (Fig. 12) con la literatura se determinó que se trataba de la fistularina-1. El espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto en acetona- $d_6$  mostraba las señales características del sistema espiránico de ciclohexadieno-dihidroisoxazol, además de la señal a  $\delta$  7.71 (s) correspondientes a los protones  $\text{H}_{15}$  y  $\text{H}_{17}$  de un anillo de benceno tetra-sustituido, además de las señales de un metino a  $\delta$  5.64 (dd,  $J=8.4$  y  $7.0$  Hz) y un metileno a  $\delta$  3.53 (ddd,  $J=9.2, 7.0$  y  $1.1$  Hz)/ 4.04 (m) (Tabla III).



**Figura 12.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de la fistularina-1 en acetona- $d_6$  (\*señal del disolvente).



**5**



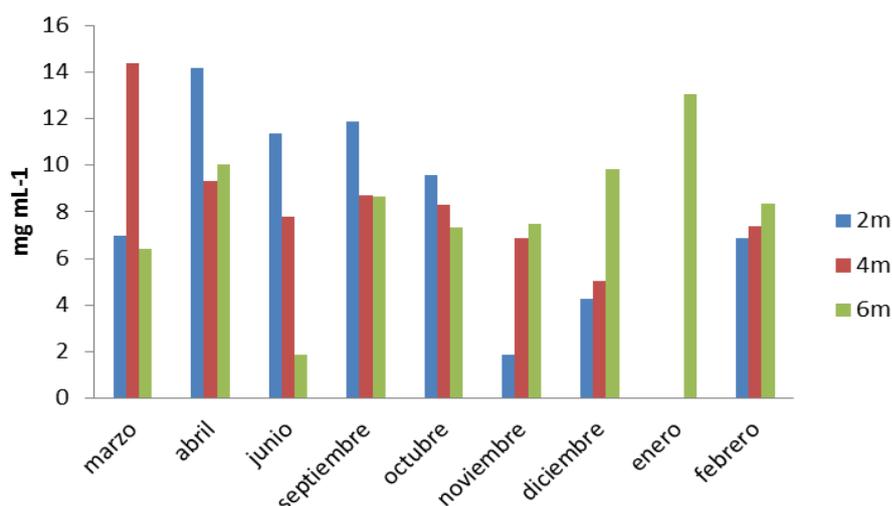
**Tabla III.** Desplazamientos químicos de  $^1\text{H}$ -RMN de los compuestos mayoritarios aislados de la esponja *A. gerardogreeni* (multiplicidad,  $J$  en Hz).

# H	Aerotherionina Acetona- $\text{d}_6$	Homoaerotherionina $\text{CD}_3\text{OD}$	11-oxoaerotherionina $\text{CD}_3\text{OD}$	Fistularina-1 Acetona $\text{d}_6$	Fistularina-3 Acetona- $\text{d}_6$
1	4.15 (d, 7.2)	4.08 (d, 0.6)	4.12(s) / 4.11(s)	4.18 (dd, 8.1, 1.0)	4.18 (d, 8.0) 4.17 (d, 8.0)
5	6.50 (bs)	6.41 (d, 0.8)	6.43 (d,0.7) / 6.42 (d,0.7)	6.52 (d, 1.0)	6.52 (d, 0.8) 6.50 (d, 1.3)
7a	3.16 (d,18.2)	3.09 (d, 18.2)	3.10 (d, 18) /	3.19 (d,18.3)	3.18 (d, 18.5) /
7b	3.81 (d,18.2)	3.77 (d, 18.2)	3.09 (d, 18.3) 3.78 (d, 18.3) / 3.76(d, 18)	3.85 (d,18.3)	3.15 (d, 18.5) 3.84 (d, 18.2) / 3.81 (d, 18.2)
10	3.32 (m)	3.28 (m)	4.09 (d,9.5)	3.79(ddd,13.6, 6.2, 4.4) 3.76 (ddd,13.6, 6.2, 4.4)	3.77 (m) 3.52 (m)
11	1.60 (m)	1.58 (m)		4.25 (m)	4.24 (m)
12		1.37 (m)	2.56 (t, 7)	4.08(dd,9.2, 5.5) 4.05 (dd, 9.2, 5.9)	4.05 (dd, 9.0, 5.9) 4.02 (dd, 9.0, 5.4)
13			1.84 (pent, 7)		
14			3.30 (m)		
15,17				7.71 (s)	7.65 (s)
19				5.64 (dd,8.4, 7.0)	4.89 (dt, 7.2, 4.4)
20				4.04 (m) 3.53 (ddd, 9.2, 7.0,1.1)	3.59 (ddd, 13.6, 6.3, 4.5) 3.47 (m)
OH-1	5.40 (d7.5)			5.45 (d,8.1)	5.47 (d, 8.2) 4.47 (d, 8.2)
OH-11				4.50 (d,5.1)	4.49 (d, 5.4)
OH-19					5.06 (d, 4.4)
OCH3	3.77 (s)	3.72 (s)	3.75 (s)	3.72 (s)	3.71 (s)
NH	7.60			7.65 (brt)	7.68 / 7.64(bt)

### VIII.3 Variación temporal de los compuestos mayoritarios de *A. gerardogreeni*.

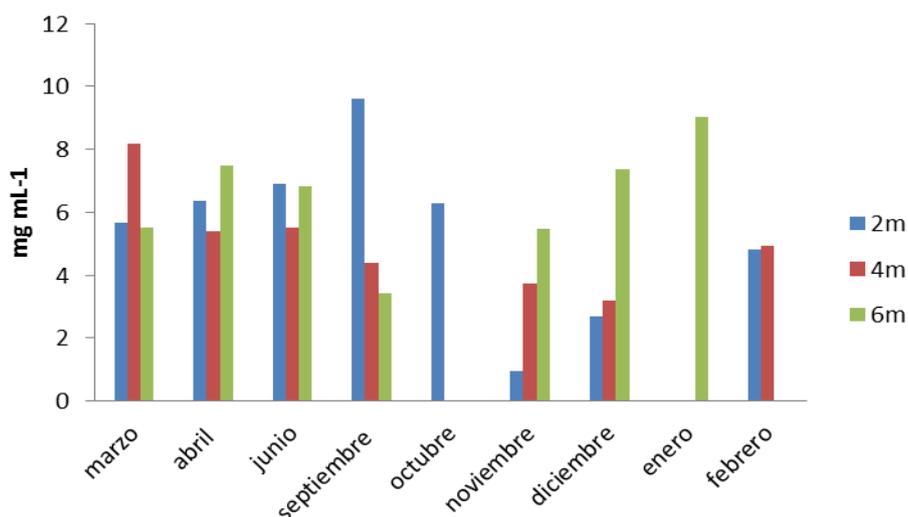
Aun cuando se observan variaciones en la concentración relativa de los cinco compuestos mayoritarios de *A. gerardogreeni* en de los diferentes meses y profundidades, cuando se toman las diferentes profundidades como replicas, se observa que no existen diferencias estadísticamente significativas.

La aerotionina (2) fue el compuesto más abundante, llegando a representar entre el 20 y 35 % en prácticamente todos los meses, con una concentración relativa de entre 1.8 y 14 mg mL<sup>-1</sup> (Fig. 14). Este compuesto se encontró durante todos los meses y profundidades a excepción de enero que solo estuvo presente en las esponjas recolectadas a 6 m de profundidad, sin embargo, no se observan diferencias significativas entre los diferentes meses ( $F_{(8,18)} = 0.98$ ,  $P=0.48$ ).



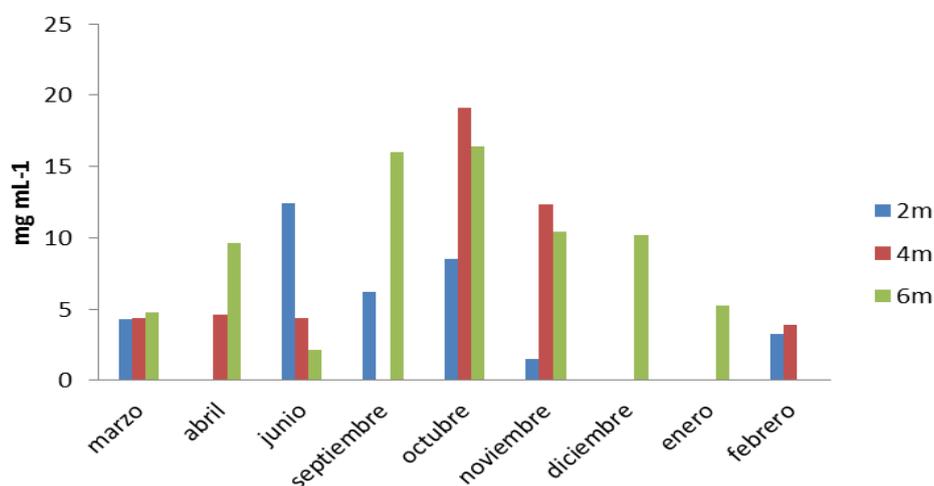
**Figura 14.** Variación temporal y por profundidad de la concentración relativa del compuesto aerotionina aislado a partir de la esponja *A. gerardogreeni*.

La homoaerotionina (1) al igual que el compuesto 2 se presentó en todos los meses, pero no en todas las profundidades, este compuesto llegó a representar el 23.1% y presentó una concentración relativa entre 0.9 y 9.6 mg mL<sup>-1</sup> (Fig. 15). Estadísticamente no se observaron variaciones significativas en la concentración relativa entre los meses de muestreo ( $F_{(8,18)} = 1.06$ ,  $P=0.43$ ).



**Figura 15.** Variación temporal y por profundidad de la concentración relativa de la homoerotionina aislada de la esponja *A. gerardogreeni*.

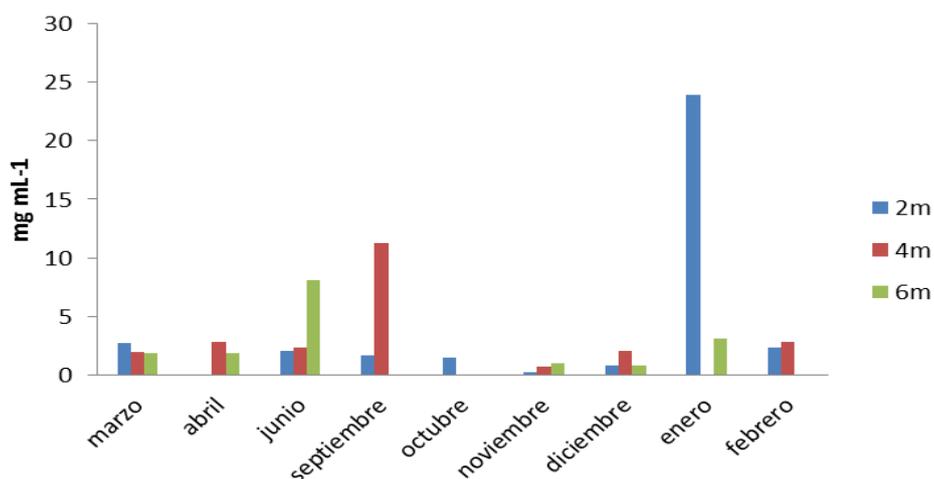
La fistularina-3 (**4**) presentó el mayor pico de concentración relativa en octubre ( $19.1 \text{ mg mL}^{-1}$ ), representando un porcentaje relativo del 50% y los menores valores en marzo y febrero ( $4.3$  y  $3.2 \text{ mg mL}^{-1}$  respectivamente) (Fig. 16). Aún cuando se observa una estacionalidad, la diferencia no fue significativa ( $F_{(8,18)} = 1.81$ ,  $P=0.14$ ).



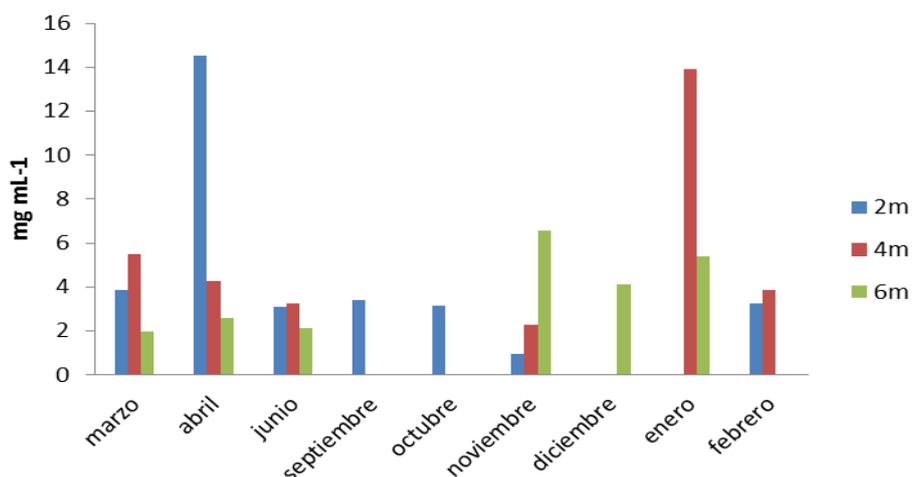
**Figura 16.** Variación temporal y por profundidad de la concentración relativa de la fistularina-3 aislada de la esponja *A. gerardogreeni*.

Por otra parte, los compuestos menos abundantes fueron 11-oxohomoerotionina (Fig. 17) y fistularina-1 (Fig. 18), los cuales presentaron de manera general, concentraciones relativas por debajo de los  $5 \text{ mg mL}^{-1}$ , a

excepción del mes de enero cuando la 11-oxohomoaerotherionina presentó una concentración relativa de  $23.8 \text{ mg mL}^{-1}$  y en abril presentando la Fistularina-1 una concentración de  $14.5 \text{ mg mL}^{-1}$ . En ambos casos las diferencias no fueron significativas ( $F_{(8,18)} = 0.88$ ,  $P=0.55$ ;  $F_{(8,18)} = 1.09$ ,  $P=0.41$ , respectivamente).

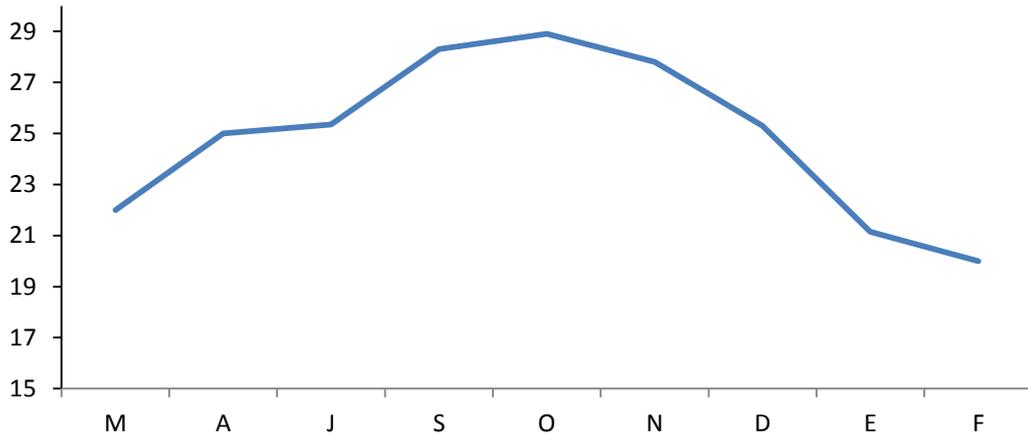


**Figura 17.** Variación temporal y por profundidad de la concentración relativa de la 11-oxohomoaerotherionina aislada de la esponja *A. gerardogreeni*.



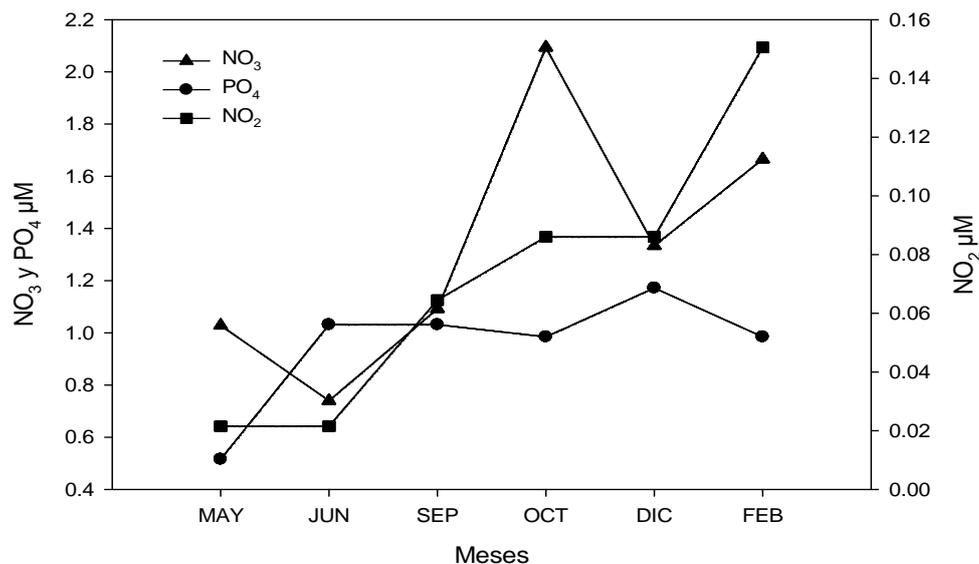
**Figura 18.** Variación temporal y por profundidad de la concentración relativa de la fistularina-1 aislada de la esponja *A. gerardogreeni*.

Con respecto a los datos ambientales de la zona de estudio, los valores promedio de la temperatura muestran un evidente variación temporal con un máximo en octubre ( $28.5 \text{ }^\circ\text{C}$ ) y un mínimo en febrero ( $19 \text{ }^\circ\text{C}$ ) (Figura 19).

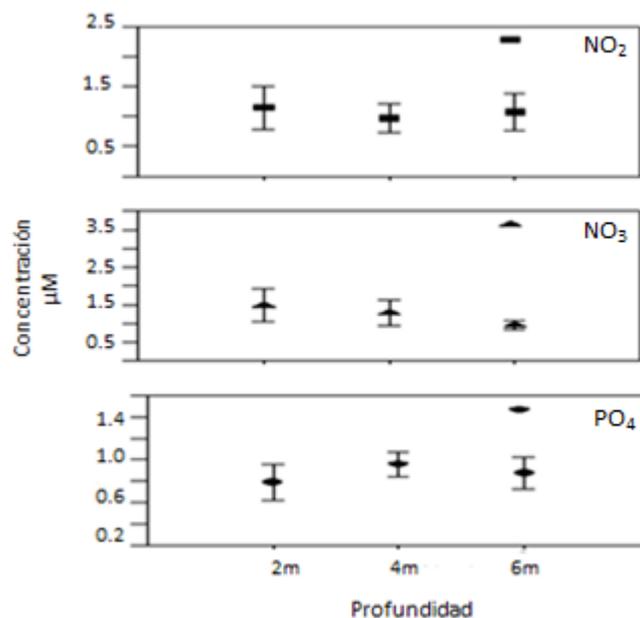


**Figura 19.** Valores promedio de la temperatura del agua de mar en el área de Punta Arena de la Ventana, B.C.S.

En el caso de los nutrientes, también se presentó una variación temporal en su concentración. Para los nitritos ( $\text{NO}_2$ ) se observan las mayores concentraciones en febrero ( $0.15 \mu\text{M}$ ) y las menores en mayo ( $0.02 \mu\text{M}$ ). Para los nitratos ( $\text{NO}_3$ ) las mayores concentraciones se presentaron en octubre ( $2.1 \mu\text{M}$ ) y las menores en junio ( $0.7 \mu\text{M}$ ). Con respecto a los fosfatos las variaciones fueron menos marcadas con un máximo en diciembre ( $1.1 \mu\text{M}$ ) y un mínimo en mayo ( $0.5 \mu\text{M}$ ) (Figura 20). En cuanto a la variación de estos entre las diferentes profundidades, 2, 4 y 6 m, no se observaron diferencias significativas (Fig. 21).



**Figura 20.** Variación temporal de nutrientes en el área de Punta Arena de la Ventana, B.C.S.



**Figura 21.** Variación de los nutrientes en el área de Punta Arena de la Ventana con respecto a la profundidad.

El coeficiente de correlación de Pearson permitió establecer relaciones positivas entre la concentración relativa de los compuestos aerotionina (2), homoaerotionina (1) y fistularina-1 (5). Mientras que la correlación entre la concentración de los compuestos y la profundidad no fue significativa. Con respecto a la relación entre la concentración relativa de los compuestos y los parámetros ambientales, únicamente dos compuestos presentaron una relación significativa; la aerotionina que se correlaciona de forma negativa con los nitritos ( $r = -0.55$ ;  $p < 0.05$ ), y la fistularina-3 que se correlaciona positivamente con la temperatura ( $r = 0.53$ ;  $p < 0.05$ ) y de manera inversa con los nitritos y nitratos (Tabla IV).

**Tabla IV.** Coeficiente de correlación entre la concentración relativa de los compuestos Aerothionina (Aero), Homoaerothionina (Homo), 11-oxohomoaerothionina (11-oxo), Fistularina-3 (Fist-3), Fistularina-1 (Fist-1), la profundidad y los parámetros ambientales temperatura (T°C), Nitritos (NO<sub>2</sub>) Nitratos (NO<sub>3</sub>) y fosfatos (PO<sub>4</sub>).

	Aero	Homo	11-oxo	Fist-3	Fist-1	T (°C)	NO <sub>2</sub>	NO <sub>3</sub>	PO <sub>4</sub>
Prof	0.08	0.03	-0.13	0.33	-0.06	-0.01	-0.01	-0.01	0.08
Aero		<b>0.67*</b>	-0.04	0.38	<b>0.40*</b>	0.13	<b>-0.55*</b>	-0.29	-0.36
Homo			0.36	0.24	<b>0.58*</b>	-0.04	-0.18	0.038	-0.06
11-oxo				-0.26	0.09	-0.31	0.31	0.35	0.40
Fist-3					0.027	<b>0.53*</b>	<b>-0.56*</b>	<b>-0.49*</b>	-0.34
Fist-1						-0.33	-0.25	0.12	0.17
T (°C)							-0.44	<b>-0.76*</b>	<b>-0.75*</b>
NO <sub>2</sub>								<b>0.75*</b>	<b>0.59*</b>
NO <sub>3</sub>									<b>0.86*</b>

\*correlación significativa  $P < 0.05$ ,  $n = 27$

#### VIII.4 Ensayos de actividad antibacteriana de los compuestos puros.

Las pruebas de actividad antibacteriana se realizaron frente a las cepas patógenas *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aureuginosa* y *Escherichia coli*. Debido a que de los compuestos 11-oxohomoaerothionina y fistularina-1 se aisló muy poca cantidad no fue posible realizar los ensayos de actividad. Encontrando así que solo la aerothionina presentó actividad frente a *S. aureus*, mientras que para *E. coli* y *P. aureuginosa* no se observó ningún halo de inhibición (Tabla V).

**Tabla V.** Resultados de los halos de inhibición (expresados en mm) presentados por los diferentes compuestos a una concentración de 200 µg frente a las cepas de referencia. El control positivo fue ampicilina 25 µg.

Cepas de referencia	Compuestos			
	aerothionina	homoaerothionina	Fistularina-3	CP
<i>S. aureus</i>	9 ± 0	-	-	15.6 ± 1.15
<i>P. aureuginosa</i>	-	-	-	
<i>E. coli</i>	-	-	-	25 ± 0

## IX. DISCUSIÓN

### IX.1 Perfil cromatográfico de los compuestos derivados de la dibromotirosina de la esponja *A. gerardogreeni*.

En este trabajo se observó que los compuestos producidos en mayor medida por la esponja *A. gerardogreeni* recolectada en el área de Punta Arena de la Ventana B.C.S., fueron la aerothionina, la homoaerothionina y la fistularina-3, seguidos por la 11-oxohomoaerothionina y la fistularina-1. Esto concuerda con diversos trabajos realizados con el género *Aplysina*, donde se ha observado que dependiendo de la especie y su distribución geográfica se pueden encontrar diferentes metabolitos, siendo la aerothionina, homoaerothionina y fistularina-3, los compuestos más comúnmente aislados en esponjas de este género (Ver citas y especies en Tabla II).

*Aplysina gerardogreeni* mostró de manera general el mismo patrón de metabolitos, tanto en los diferentes meses como profundidades. En este género, se ha observado que las esponjas de un sitio específico, muestran un patrón de compuestos brominados muy estable, que no se modifica aun cuando cambien las condiciones ambientales como luz, temperatura y salinidad (Putz *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2010). Sin embargo, se han observado modificaciones entre los perfiles químicos de especies de diferentes localidades geográficas o amplios cambios en la profundidad (Putz, 2009). De tal forma que las diferencias pueden ser a nivel intra o interespecíficas dentro de la población, por lo que dicho perfil puede ser utilizado como una ayuda en la identificación de algunas especies con características morfológicas muy similares, como fue el caso de *A. cavernícola* y *A. aerophoba* (Silva-Lira *et al.*, 2011).

La aerothionina y la homoaerothionina fueron los dos compuestos con mayor concentración relativa dentro de *A. gerardogreeni*, resultados similares se han observado en trabajos realizados con *Aplysina fistularis* que acumula a estos compuestos en células denominadas “esferulosas” (Thompson *et al.*, 1983) y que son exudados continuamente por la esponja, especialmente en condiciones de estrés, en niveles muy similares a los contenidos en el cuerpo para crear una barrera protectora (Thompson *et al.*, 1983, Thompson, 1985;

Walker *et al.*, 1985). Se ha sugerido que presentan un papel como precursores de compuestos derivados, como por ejemplo la 11-oxoaerotionina (Silva *et al.*, 2010).

Otro de los compuestos mayoritarios de *A. gerardogreeni* fue la fistularina-3, el cual si bien no es exudado por las esponjas de este género, juega un papel importante en la biotransformación a otros compuestos (Ebel *et al.*, 1997) y dentro de su papel ecológico se ha observado que inhibe el ataque de depredadores (Gochfeld *et al.*, 2012).

La 11-oxoaerotionina y la fistularina-1 presentaron menores concentraciones relativas en comparación con los otros compuestos, son pocos los estudios que han logrado su aislamiento. La 11-oxoaerotionina ha sido aislada a partir de *A. fulva*, *A. archeri* y *A. aerophoba* recolectadas en las costas de Bahamas y Australia (Gopichand *et al.*, 1979; Gunasekera & Cross, 1992; Webster *et al.*, 2008); mientras que la fistularina-1, un compuesto muy inestable y de rápida descomposición después del paso final de purificación (Gulavita *et al.*, 1995) ha sido aislado de *A. lactua* y *A. sulangea* de las costas de Brasil (Silva *et al.*, 2010). Se ha observado que la concentración de este compuesto no tiene relación con el estado de salud de la esponja, por lo que su función ecológica aun es desconocida (Webster *et al.*, 2008).

## IX.2 Aislamiento y caracterización estructural de los compuestos.

Los cinco compuestos mayoritarios aislados en este trabajo ya habían sido descritos anteriormente.

### Aerotionina (2).

Al comparar los desplazamientos químicos de los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN en acetona deuterada del compuesto **2** con los obtenidos por Nishiyama y Yamamura (1985) (Anexo XII.2) se observó que las señales eran muy similares por lo que se estableció que este compuesto era la aerotionina. La cual fue aislada originalmente de las esponjas *Aplysina aerophoba* y *Verongia thiona* (Fattorusso, 1970) y desde entonces ha sido re-aislada en diversas especies del género (Moody *et al.*, 1972; Andersen & Faulkner 1973; Gopichand & Schmitz, 1979; McMillan *et al.*, 1981; Acosta & Rodríguez, 1992; Ciminiello *et*

*al.*, 1994; Compagnone *et al.*, 1999; Encarnación-Dimayuga *et al.*, 2000; Puyana *et al.* 2002; Thoms *et al.*, 2004; Hernández-Guerrero *et al.*, 2007, Valencia-Agami, 2010, Sacristan-Soriano *et al.*, 2011, entre otros), lo cual confirma que es uno de los principales componentes de estas esponjas, presentando aproximadamente un rendimiento del 10% (Minale, 1976). Este compuesto es un derivado de la 3,5-dibromotirosina y la cadena central C<sub>4</sub>N<sub>2</sub> se deriva de la ornitina (Peng *et al.*, 2005), del cual se ha logrado su síntesis completa (Nishiyama y Yamamura, 1985).

### **Homoaerothionina (1).**

Las señales obtenidas en el espectro de <sup>1</sup>H-RMN para este compuesto fueron comparadas con las reportadas en Moody *et al.* (1972) (Anexo XII.2), lo cual permitió confirmar que la estructura **1** correspondía a la homoaerothionina. El cual fue aislada por primera vez a partir de las esponjas *A. aerophoba* y *A. thiona* (Moody *et al.*, 1972), y a partir de entonces se le ha vuelto a aislar a partir de diversas especies de este género (ver Tabla IV), los trabajos más recientes son Hernández-Guerrero *et al.* (2007) y Sacristan-Soriano *et al.* (2011). Este compuesto es un derivado de la 3,5-dibromotirosina y la cadena central C<sub>5</sub>N<sub>2</sub> se deriva de la lisina (Silva-Lira, 2011). Y junto con la aerothionina se logró su síntesis completa a mediados de la década de los 80's (Nishiyama y Yamamura, 1985).

### **11-oxohomoaerothionina.**

El compuesto 11-oxohomoaerothionina, fue confirmado al comparar los desplazamientos químicos de <sup>1</sup>H-RMN con las señales registradas en Ciminello *et al.* (1997) (Anexo XII.2).

Trabajos anteriores han establecido que la aerothionina y homoaerothionina son precursores de compuestos oxidados (Teeyapant & Proksch, 1993), dado que la cadena central pueden sufrir oxidación o descarboxilación (Cimino *et al.*, 1983). Por lo que se puede deducir que este compuesto proviene de la oxidación del C<sub>11</sub> de la cadena central de la homoaerothionina.

### **Fistularina-1**

Las señales de la fistularina-1 descritas por Gopichand & Schmitz (1979) fueron comparadas con los desplazamientos de  $^1\text{H-RMN}$  obtenidos a partir del compuesto **5**, confirmando que se trataba de este compuesto (Anexo XII.2).

La fistularina-1 se aisló por primera vez a partir de la esponja *Aplysina fistularis* forma *fulva* (Gopichand & Schmitz, 1979). Se ha establecido que este compuesto se deriva de la degradación enzimática de la fistularina-3, a través de un proceso de biotransformación (Rogers & Molinsky, 2007).

### **Fistularina-3**

La comparación de los desplazamientos químicos de  $^1\text{H-RMN}$  del compuesto **4** con la literatura confirmó la presencia de la fistularina-3 como producto mayoritarios de *A. gerardogreeni* (Anexo XII.2).

La fistularina-3 es un compuesto formado por dos restos derivados de la tirosina enlazados a través de una unidad central de naturaleza y extensión variable (Cimino *et al.*, 1983). Este es un derivado de la homoserina y utiliza al 3-amino-1-propanol como conector para unirse a otras estructuras (Silva-Lira, 2011). Cimino *et al.* (1983) aislaron una estructura muy similar a la fistularina-3, encontrando como única diferencia entre ellas, los centros quirales, este compuesto fue denominado como isofistularina-3.

### **IX.3 Variación temporal de los compuestos mayoritarios de *A. gerardogreeni*.**

En esponjas se ha observado que la concentración de los metabolitos secundarios puede presentar variaciones en función del tiempo y el espacio (Turon *et al.*, 1996; Duckworth & Battershill, 2001; Page *et al.*, 2005; Abdo *et al.*, 2007). Lo cual está dado por complejas interacciones entre factores físicos y ecológicos que influyen en la variabilidad dentro de cada especie (Page *et al.*, 2005). Aunado a esto, la producción de metabolitos secundarios les da a las esponjas una ventaja adaptativa (Walker *et al.*, 1985), por lo que su producción dependerá de las necesidades para adaptarse al hábitat y a las condiciones en las que se encuentren los organismos.

En el presente estudio no se observó una relación entre la profundidad y la concentración relativa de los diferentes compuestos de *Aplysina gerardogreeni*, resultados similares se han visto para el compuesto mycalamida A producido por la esponja *Mycale hentscheli*, donde la profundidad no fue un factor en la producción de este. Sin embargo, esta relación es variable dependiendo de la especie y no sigue un patrón específico, así compuestos como la pateamina y pelorusida A obtenidos de la misma esponja, si presentan una relación con la profundidad (Page *et al.*, 2005).

Con respecto a la variación temporal, aun cuando se observan cambios en la concentración relativa de los compuestos obtenidos de *A. gerardogreeni*, estas variaciones no fueron estadísticamente significativas. Contrario a esto diversos trabajos con esponjas han mostrado una evidente estacionalidad, es importante aclarar que estos estudios utilizan los valores de bioactividad como una medida de la biosíntesis de metabolitos (Turon *et al.*, 1996; Swearingen & Pawlik, 1998; Duckworth & Battershill, 2001; Ferreti *et al.*, 2009). En *A. aerophoba* se ha observado que la variación temporal de los compuestos depende de la parte del tejido del que se producen, así compuestos de la capa externa (ectosoma) presentan una evidente variación estacional con la mayor concentración en el verano, mientras que compuestos de capas internas (coanosoma) no muestran un patrón estacional (Sacristan-Soriano, *et al.*, 2012). En el presente trabajo los extractos de *A. gerardogreeni* se realizaron con el organismo completo, lo cual no nos permite saber si presenta un comportamiento similar.

Al relacionar la temperatura con la producción de compuestos de *A. gerardogreeni*, únicamente la fistularina-3 presentó una relación directa con este parámetro, con el pico máximo de producción en octubre (otoño), cuando la temperatura del agua de mar también alcanzó su máximo (28.5° C). Existen comportamientos similares en compuestos de otras esponjas, tal es el caso de la salicylilalamida A obtenida a partir de esponjas del género *Haliclona*, cuya concentración está fuertemente ligada con la temperatura del agua, presentando su máximo en verano y mínimo en invierno (Abdo *et al.*, 2007).

En las esponjas del género *Aplysina* se ha planteado la hipótesis de activación de defensas químicas, mecanismo por el cual compuestos poco

tóxicos son transformados mediante acción enzimática en compuestos activos cuando hay situaciones de estrés o peligro (Ebel *et al.*, 1997). Dando lugar a una correlación inversa entre los compuestos, ya que con la formación del nuevo compuesto, la cantidad del compuesto precursor decrece (Sacristan-Soriano *et al.*, 2011). Por lo que en este trabajo se hubiera esperado una correlación negativa entre la Fistularina-3 y la fistularina-1, ya que esta última se origina por biotransformación a partir de la primera (Teeyapant & Proksch 1993), sin embargo, la correlación fue positiva y no significativa. También se observó una relación directa entre los compuestos aerotionina y homoaerotionina producidos por *A. gerardogreeni*, lo cual posiblemente indique que al ser exudados al medio de manera continua (Thompson *et al.*, 1983; Walker *et al.*, 1985) su producción se encuentra estrechamente relacionada.

Con respecto al efecto que pueden tener los nutrientes en la producción de metabolitos secundarios y sus variaciones temporales, son muy pocos los estudios realizados. Se ha observado que existe una relación directa entre fosfatos y nitritos con la actividad biológica de algunas esponjas frente a cepas de microorganismos marinos (Ortíz-Aguirre, 2012) y de igual forma se ha determinado una relación entre la concentración de nitrógeno asimilable y la concentración de compuestos activos en macroalgas y fanerógamas (Arnold *et al.*, 1995; Schupp *et al.*, 1999; Cronin & Lodge, 2003; Valdés-Iglesias *et al.*, 2010). A diferencia de estos, en el presente trabajo con *A. gerardogreeni* se observó una correlación negativa entre la concentración de nitratos y nitritos con la concentración de aerotionina y fistularina-3, lo cual podría estar relacionado con la tasa metabólica de la esponja, ya que se ha observado que estos nutrientes tienen una correlación negativa con la tasa de crecimiento en la esponja *Haliclona oculata* (Koopmans & Wijffels, 2008).

#### **IX.4 Ensayos de actividad antibacteriana de los compuestos puros.**

Los extractos de *A. gerardogreeni* de Punta Arena de la Ventana, B.C.S., han presentado actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (Valencia-Agami, 2010), la cual presenta una variación estacional (Montes-Plasencia *et al.*, 2010), por lo que resultaba interesante

identificar algunos de los compuestos responsables de dicha actividad. Sin embargo, de los tres compuestos probados, aerothionina, homoaerothionina y fistularina-3 únicamente la aerothionina presentó actividad frente a la cepa de *S. aureus* con un halo de inhibición promedio de 9 mm a una concentración de 200  $\mu\text{g disco}^{-1}$ . Resultados de actividad antibacteriana similares han sido descritos para la aerothionina que presentó actividad frente a *S. aureus* (Peng *et al.*, 2005).

Para el caso de la fistularina-3 se ha reportado que presenta una actividad moderada frente a estas dos cepas patógenas a una concentración mínima inhibitoria (MIC) de 300  $\mu\text{g mL}^{-1}$  frente a *E. coli* y de 600  $\mu\text{g mL}^{-1}$  frente a *S. aureus* (De Lira *et al.*, 2006). Por lo que se requieren realizar pruebas con diferentes concentraciones del compuesto para establecer una concentración inhibitoria. Con los compuestos 11-oxohomoaerothionina y fistularina-1, la cantidad obtenida no fue suficiente para realizar las pruebas, y en la literatura no se encuentran registros de que presenten actividad frente a estas cepas.

Estudios realizados con fracciones semipurificadas de *Apysina gerardogreeni* de la misma zona de estudio mostraron actividad frente a estas dos cepas. La fracción F3 que contenía una mezcla mayoritaria de los compuestos homoaerothionina y 11-oxohomoaerothionina, mostró halos de inhibición de 22.5 mm y 23.8 mm para *S. aureus* y *E. coli* respectivamente. Mientras que las fracciones F4 y F5 que contenían una mezcla donde fistularina-1 y fistularina-3 eran mayoritarios, presentaron halos de inhibición de entre 17.2 y 11 mm frente a *S. aureus* y de entre 18.2 y 12.7 mm frente a *E. coli* (Valencia-Agami, 2010). Lo que sugiere un efecto sinérgico de los compuestos, sin embargo, se requieren realizar más ensayos con los productos puros para poder realizar esta aseveración.

## X. CONCLUSIONES

El estudio de la esponja *Aplysina gerardogreeni* del Golfo de California permitió identificar la naturaleza química de esta especie, la cual se caracteriza por presentar cinco compuestos mayoritarios, identificados como la aerotionina, homoaerotionina, 11-oxohomoaerotionina, fistularina-1 y fistularina-3. Este patrón de compuestos es típico de las esponjas del género *Aplysina* y al igual que en otras especies del Mediterráneo y del Pacífico fue muy homogéneo a lo largo del tiempo.

La aerotionina fue el principal componente de *A. gerardogreeni*, presentando un porcentaje relativo de entre el 20 y 35%, este compuesto, al igual que la homoaerotionina y fistularina-3 se encuentran ampliamente representados dentro del género, por lo que se ha sugerido que pueden ser compuestos precursores de otros derivados bromados presentes en la esponja.

Los compuestos 11-oxohomoaerotionina y fistularina-1 fueron menos abundantes y de manera general presentaron una concentración relativa por debajo de 5 mg mL<sup>-1</sup>. Sin embargo, podría considerarse que son representativos de esta especie, ya que su distribución dentro del género *Aplysina* es más limitada.

Aun cuando la concentración relativa de los cinco compuestos mayoritarios de *A. gerardogreeni* en los diferentes meses no presentó diferencias significativas, se observa una mayor concentración relativa en los meses de marzo a septiembre, cuando la temperatura se incrementa. Mientras que en noviembre y diciembre la concentración relativa de los compuestos fue menor.

En cuanto a la relación de la concentración de los compuestos con parámetros ambientales, no se observó una relación con la profundidad, pero sí con la temperatura en el caso de la concentración relativa de la fistularina y de los nitratos y nitrito con la aerotionina y la fistularina-3, aunque en este caso fue una relación inversa. Dada la alta varianza en la concentración de los compuestos a lo largo del tiempo, resulta difícil establecer si las variaciones son debidas a parámetros ambientales o a las variaciones intra-específicas.

Con respecto a la actividad antibacteriana, únicamente el compuesto aerotionina fue activo frente a *Staphylococcus aureus*, a la concentración

probada. Este resultado fue inesperado ya que al ser una especie con antecedentes de presentar una buena actividad antibacteriana, se esperaba que los otros compuestos fueran activos.

---

**XI. LITERATURA CITADA**

- Abdo, D.A., C.A. Motti, C.N. Battershill & E.S. Harvey. 2007. Temperature and spatiotemporal variability of salicylhalamide A in the sponge *Haliclona* sp. *Journal of Chemical Ecology*, 33: 1635–1645.
- Acosta, A.L. & A.D. Rodríguez. 1992. 11-oxoaerothionin: a cytotoxic antitumor bromotyrosine derived alkaloid from the Caribbean marine sponge *Aplysina lacunosa*. *Journal of Natural Products*, 55: 1007-1012.
- Andersen, R.J. & D.J. Faulkner. 1973. A novel antibiotic from a sponge of the genus *Verongia*. *Tetrahedron Letters*, 1175-1178.
- Arnold, T.M., C.E. Tanner & W.I. Hatch. 1995. Phenotypic variation in polyphenolic content of the tropical Brown alga *Lobophora variegata* as a function of nitrogen availability. *Marine Ecology Progress Series*, 123: 177-183.
- Ávila-Núñez R. 2000. Estudio químico y actividad biológica en esponjas del género *Aplysina*. *Tesis de Doctorado*. Universidad Central de Venezuela. 125 pp.
- Becerro, M.A. & V.J. Paul. 2004. Effects of depth and light on secondary metabolites and cyanobacterial symbionts of the sponge *Dysidea granulosa*. *Marine Ecology Progress Series*, 280: 115–128.
- Belarbi, E.H., A. Contreras Gómez, Y. Chisti, F. García Camacho & E. Molina Grima. 2003. Producing drugs from marine sponges. *Biotechnology Advances*, 21: 585–598.
- Bendschneider, K. & R.J. Robinson. 1952. A new spectrophotometric method for the determination of nitrite in sea water. *Journal Marine Research*, 11: 87-96.

- Betancourt-Lozano, M., F. González-Farías, B. González-Acosta, A. García-Gasca & J.R. Bastida-Zavala. 1998. Variation of antimicrobial activity of the sponge *Aplysina fistularis* (Pallas, 1776) and its relation to associated fauna. *Journal of Experimental Marine Biology & Ecology*, 223:1-18.
- Bhakuni, D.S. & D.S. Rawat. 2005. Bioactive marine natural products. *Anamaya Publishers*, India. 382 pp.
- Blunt, J.W., B.R. Copp, M.H.G. Munro, P.T. Northcote & M.R. Prinsep. 2006. Marine natural products. *Natural Products Report*, 23: 26–78.
- Blunt, J.W., B.R. Copp, M.H.G. Munro, P.T. Northcote & M.R. Prinsep. 2007. Marine natural products. *Natural Products Report*, 24: 31–86.
- Blunt, J.W., B.R. Copp, M.H.G. Munro, P.T. Northcote & M.R. Prinsep. 2011. Marine natural products. *Natural Products Report*, 28: 196–268.
- Brusca R.C. & G.J. Brusca. 2005. Invertebrados. *McGraw-Hill Interamericana*. España. 1005 pp.
- Carney, J.R. & K.L. Rinehart. 1995. Biosynthesis of brominated tyrosine metabolites by *Aplysina fistularis*. *Journal of Natural Products*, 58: 971–985.
- Ciminiello, P., V. Constantino, E. Fattorusso, S. Magno, A. Mangoni & M. Pansini. 1994. Chemistry of *Verongida* sponges, II. Constituents of the Caribbean sponge *Aplysina fistularis*. *Journal of Natural Products*, 57: 705-712.
- Ciminiello, P., C. Dell'Aversano, E. Fattorusso, S. Magno, L. Carrano & M. Pansini. 1996. Chemistry of *Verongida* sponges. VII bromocompounds

from the Caribbean sponge *Aplysina archeri*. *Tetrahedron*, 52: 9863–9868.

Ciminiello, P., E. Fattorusso, M. Forino, S. Magno & M. Pansini. 1997. Chemistry of Verongida sponges VIII- Bromocompounds from the Mediterranean sponges *Aplysina aerophoba* and *Aplysina cavernicola*. *Tetrahedron*, 53: 6565-6572.

Ciminiello P., V. Costantino, E. Fattorusso, S. Magno & M. Pansini. 1999. Chemistry of Verongida sponges. 9 Secondary metabolite composition of the Caribbean sponge *Aplysina cauliformis*. *Journal of Natural Products*, 62(4): 590-593.

Ciminiello, P., C. Dell'Aversano, E. Fattorusso & S. Magno. 2001. Archerine, a novel anti-histaminic bromotyrosine-derived compound from the Caribbean marine sponge *Aplysina archeri*. *European Journal Organic Chemistry*, 55-60.

Cimino, G., S. De Rosa, S. De Stefano, R. Self & G. Sodano. 1983. The bromo-compounds of the true sponge *Verongia aerophoba*. *Tetrahedron Letters*, 24: 3029-3032.

Compagnone R.S., R. Avila, A.I. Suárez, O.V. Abrams, H.R. Ragel, F. Arvelo, I.C. Piña & E. Merentes. 1999. 11-Deoxyfistularin-3, a new cytotoxic metabolite from the Caribbean sponge *Aplysina fistularis insularis*. *Journal of Natural Products*, 62(10):1143-1444.

Cronin, G. & D.M. Lodge. 2003. Effects of light and nutrient availability on the growth, allocation, carbon/nitrogen balance, phenolic chemistry, and resistance to herbivory of two freshwater macrophytes. *Oecologia*, 137: 32-41.

- Cruz, F. Quijano, L. Gómez-Garibay & F. Rios, T. 1990. Brominated metabolites from the sponge *Aplysina (Verongia) thiona*. *Journal of Natural Products*, 53, 543–548.
- D'Ambrosio, M., A. Guerriero & F. Pietra. 1984. Novel, racemic or nearly-racemic antibacterial bromo- and chloroquinols and  $\gamma$ -lactams of the verongiaquinol and the cavernicolin type from the marine sponge *Aplysina (Verongia) cavernicola*. *Helvetica Chimica Acta*, 67: 1484-1492.
- De Lira, T.O., R.G.S. Berlinck, G.G. F. Nascimento & E. Hajdu. 2006. Further dibromotyrosine-derived metabolites from the marine sponge *Aplysina caissara*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 17(7): 1233-1240.
- Dembitsky M.V., A.T. Glorizova & V.V. Poroikov. 2005. Novel antitumor agents: marine sponges alkaloids, their synthetic analogs and derivatives. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 5(3): 319-336.
- Duckworth, A.R. & C.N. Battershill. 2001. Population dynamics and chemical ecology of New Zealand Demospongiae *Latrunculia* sp. nov. and *Polymastia croceus* (Poecilosclerida: Latrunculiidae: Polymastidae). *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 35: 935–949.
- Ebel, R., M. Brenzinger, A. Kunze, H.J. Gross & P. Proksch. 1997. Wound activation of protoxins in marine sponge *Aplysina aerophoba*. *Journal of Chemical Ecology*, 23(5): 1451-1462.
- Elyakov, G., T. Kuznetsova & V. Mikhailo. 1996. From chemistry of marine natural products to marine technologies: Research at the Pacific Institute of Bioorganic Chemistry. *Marine Technology Society Journal*, 30: 21-28.

- Encarnación-Dimayuga R., E.S. Olachea, J. Malmstrom & C. Christophersen. 2000. Calafianine a bromotyrosine derivative from the marine sponge *Aplysina gerardogreeni*. *Journal of Natural Products*, 63(6): 874-875.
- Encarnación-Dimayuga, R., M.R. Ramírez & J. Luna-Herrera. 2003. Aerothionin, a bromotyrosine derivative with antimycobacterial activity from the marine sponge *Aplysina gerardogreeni* (Demospongia). *Pharmaceutical Biology*, 41(5): 384-387.
- Ettinger-Epstein, P., D.M. Tapiolas, C.A. Motti, A.D. Wrigth, C.N. Battershill & R. De Nys. 2008. Production of manoalide and it analogues by the sponge *Luffariella Variabilis* is hardwired. *Marine Biotechnology*, 10(1): 64-74.
- Fattorusso, E., L. Minale & G. Sodano. 1970. Aeroplysinin-I, a new bromo-compound from *Aplysina aerophoba*. *Chemical Communications*, (12): 751-752.
- Fattorusso, E., L. Minale & G. Sodano. 1972. Aeroplysinin-1, an antibacterial bromo-compound from the sponge *Verongia aerophoba*. *Journal Chemical Society Perkin I*, 16-18.
- Faulkner D.J. 2002. Marine Natural Products. *Natural Products Reports*, 19:1-48.
- Fendert, T., V. Wray, R.W.M. van Soest & P. Proksch. 1999. Bromoisoxazoline alkaloids from the Caribbean sponge *Aplysina insularis*. *Zeitschrift für Naturforschung*, 54C: 246–252.
- Gandolfi, R.C.; M.B. Medina, R.G.S. Berlinck, S.P. Lira, F.C.S. Galetti, C.L. Silva, K. Veloso, A.G. Ferreira, E. Hajdu & S. Peixinho. 2010. Metabólitos secundários das esponjas *Aplysina fistularis* e *Dysidea* sp. e atividade antituberculose da 11-cetofistularina-3. *Quimica Nova*, 33: 1853–1858.

- Gochfeld, D.J., H.N. Kamel, J.B. Olson & R. W. Thacker. 2012. Trade-offs in defensive metabolite production but not ecological function in healthy and diseased sponges. *Journal of Chemical Ecology*, 38: 451-462.
- Gopichand, Y. & F.J. Schmitz. 1979. Marine natural products: fistularin-1, -2, and -3 from the sponge *Aplysina fistularis forma fulva*. *Tetrahedron Letters*, 3921-3924.
- Gulavita, N.K., S.A. Pomponi & A.E. Wright. 1995. Aplysillin A, A, thrombin receptor antagonist from the marine sponge *Aplysina fistularis fulva*. *Journal of Natural Product*, 58(6): 954-957.
- Gunasekera, M. & S.P. Gunasekera. 1989. Dihydroxyaerothionin and aerophobin1. Two brominated tyrosine metabolites from the deep water marine sponge *Verongula rigida*. *Journal of Natural Products*, 52(4): 753-756.
- Gunasekera, S.P., M. Gunasekera, R.E. Longley & G.K. Schulte. 1991. Discodermolide: a new bioactive polyhydroxylated lactone from the marine sponge *Discodermia dissoluta*. *The Journal of Organic Chemistry*, 56: 1346.
- Gunasekera, S.P. & S.S. Cross. 1992. Fistularin 3 and 11-ketofistularin 3. Feline leukemia virus active bromotyrosine metabolites from the marine sponge *Aplysina archeri*. *Journal of Natural Products*, 55: 509-512.
- Gutiérrez, M., T. Capson, H.M. Guzmán, J. González, E. Ortega-Barría, E. Quiñoá & R. Riguera. 2005. Antiprotozoal activity against *Plasmodium falciparum* and *Trypanosoma cruzi* of Aeroplysinin-1 isolated from the new sponge *Aplysina chiriquensis*. *Pharmaceutical Biology*, 43(9): 762–765.

- Hernández-Guerrero C.J., E. Zubía, M.J. Ortega, & J.L. Carballo. 2007. Cytotoxic dibromotyrosine-derived metabolites from the sponge *Aplysina gerardogreeni*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15: 5275-5282.
- Hu, Y., Y. Xia, & Q. Fu. 2011. Tropospheric temperature response to stratospheric ozone recovery in the 21st century. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 11:7687–7699. doi:10.5194/acp-11-7687-2011.
- Kelly, S.R., P.R. Jensen, T.P. Henkel, W. Fenical & J.R. Pawlik. 2003. Effects of Caribbean sponge extracts on bacterial attachment. *Aquatic Microbial Ecology*, 31: 175–182.
- Klöppel, A., M. Pfannkuchen, A. Putz, P. Proksch & F. Brümmer. 2008. Ex situ cultivation of *Aplysina aerophoba* close to *in situ* conditions: ecological, biochemical and histological aspects. *Marine Ecology*, 29: 259-272.
- Klöppel, A., A. Putz, M. Pfannkuchen, G. Fritz, A. Jaklin, P. Proksch & F. Brümmer. 2009. Depth profile of *Aplysina* ssp. morphological, histological and biochemical aspects and their role in species distinction. *Marine Biodiversity*, C 39: 121-129.
- Koopmans, M. & R.H. Wijffels. 2008. Seasonal growth rate of the sponge *Haliclona oculata* (Demospongiae: Haplosclerida). *Marine Biotechnology*, 10: 502–510.
- Koopmans, M., D. Martens & R.H. Wijffels. 2009. Towards commercial production of sponge medicines. *Marine Drugs*, 7(4): 787-802.
- Koulman A., P. Porsch, R. Ebel, A.C. Beekman, W. Van Uden, A.W.T. Konings, J.A. Pedersen, N. Pras, & H.J. Woerdenbag. 1996. Cytotoxicity and mode of action of aeroplysin-1 and a related dienone from the sponge *Aplysina aerophoba*. *Journal of Natural Products*, 59(6): 591-594.

- Laport, M.S., O.C.S. Santos & G. Muricy. 2009. Marine Sponges: Potential Sources of New Antimicrobial Drugs. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 10: 86-105.
- León-Deniz, L.V. 2003. *Aislamiento, purificación, identificación y evaluación de la actividad antimicrobiana de un compuesto de Aplysina gerardogreeni, Gómez y Bakus, 1992 (Porifera: Demospongia)*. Tesis Maestría CICIMAR. La Paz, B.C.S., México. 77 p.
- López-Legendil, S., R. Dieckmann, N. Bontemps-Subielos, X. Turon & B. Banaigs. 2005. Qualitative variation of alkaloids in color morphs of *Cystodytes* (Asciacea) *Biochemical Systematics and Ecology*, 33: 1107-1119.
- López-Legendil, S., N. Bontemps-Subielos, X. Turon & B. Banaigs. 2007. Secondary metabolite and inorganic contents in *Cystodytes* sp. (Asciacea): temporal patterns and association with reproduction and growth. *Marine Biology*, 151: 293–299
- López de la Torre, M.A. 2010. Composición química de los aceites esenciales de la especie *Lippia alba* y su efecto antígenotóxico frente al daño inducido por la bleomicina en el SOS Chromotest. Tesis de Licenciatura. Universidad Industrial de Santander. Colombia. 54 p.
- Makarieva, T.N., V.A. Stonik, P. Alcolado & Y.B. Elyakov. Comparative study of the halogenated tyrosine derivatives from *Demospongiae* (Porifera). 1981. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 68: 481–484.
- McMillan, J.A., I.C. Paul, Y.M. Goo, K.L. Jr. Rinehart, W.C. Krueger & L.M. Pschigoda. 1981. An X-ray study of aerothionin from *Aplysina fistularis* (Pallas). *Tetrahedron Letters*, 22: 39-42.

- Minale, L. G. 1976. Natural product chemistry of the marine sponges. *Pure and Applied Chemistry*, 48: 7.
- Montes-Plascencia, C.I., C.J. Hernández-Guerrero, B. González-Acosta & R.N. Aguila-Ramírez. 2010. Seasonal variation of the antibacterial activity of *Aplysina gerardogreeni* from the Gulf of California. *Oceánides*. 25(1): 75–81.
- Moody, K., R.H. Thomson, E. Fattorusso, L. Minale & G. Sodano. 1972. Aerothionin and homoaerothionin: Two tetrabromo spirocyclohexadienylisoxazoles from *Verongia sponges*. *Journal of Chemical Society Perkin*, 1: 18-24.
- Morris, A.W. & J.P. Riley. 1963. The determination of Nitrate in sea water. *Analytica Chimica Acta*, 29: 272-279.
- Munro, M.H.G., J.W. Blunt, E.J. Dumdei, S.J.H. Hickford, R.E. Lill, S. Li, C.N. Battershill & A.R. Duckworth. 1999. The discovery and development of marine compounds with pharmaceutical potential. *Journal of Biotechnology*, 70: 15-25.
- Murphy, J. & J.P. Riley. 1962. A modified single solution method for the determination of Phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta*, 27:31-36.
- NCCLS (National committee for clinical laboratory standards). 1993. Performance standards of antimicrobial susceptibility test, approved standard. Sexta Edición. EUA. M2-A5.
- Nishiyama, S. & S. Yamamura. 1985. Total syntheses of (±)-aerothionin, (±)-homoaerothionin, and (±)-aerophobin-1. *The Chemical Society of Japan*, 58: 3453-3456.

- Norte M. & J.J. Fernández. 1987. Isolation and synthesis of aplysinadiene, a new rearranged dibromotyrosine derivative from *Aplysina aerophoba*. *Tetrahedron Letters*, 28: 1693-1696.
- Noyer, C., O.P. Thomas. & M.A Becerro. 2011. Patterns of Chemical Diversity in the Mediterranean Sponge *Spongia lamella*. *PLoS ONE*, 6(6): 1-11
- Núñez, C., E.V.R. de Almeida, A.C. Granato, S.O. Marques, K. O. Santos, F.R. Prereira, M.L. Macedo, A.G. Ferreira, E.Hadju, U.S. Pinheiro, G. Muricy, S. Peixinho, C.J. Freeman, D.F. Gleason & R.G.S. Berlinck. 2008. Chemical variability within the marine sponge *Aplysina fulva*. *Biochemical Systematics and Ecology*. 36: 283-296.
- Ogamino, T., R. Obata, H. Tomoda & S. Nishiyama. 2006. Total syntheses, structural revisión, and biological evaluation of calafianin, a marine spiroisoxazoline from the sponge, *Aplysina gerardogreeni*. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 79: 134-139.
- Ortíz-Aguirre, I. 2012. Actividad biológica de esponjas y su relación con la complejidad de la comunidad bentónica en la Bahía de La Paz, B.C.S., México. Tesis de Maestría, CICIMAR-IPN. La Paz, Baja California Sur, México. 111 p.
- Page, M., L. West, P. Nothcote, C. Battershill & M. Kelly. 2005. Spatial and temporal variability of cytotoxic metabolites in populations of the New Zealand sponge *Mycale hentscheli*. *Journal of Chemical Ecology*, 31(5): 1161-1174.
- Paul, V.J., M.P. Puglisi & R. Ritson-Williams. 2006. Marine chemical ecology. *Natural Products Reports*, 23: 153–180.
- Pawlick, J.R. 1993. Marine Invertebrate Chemical Defenses. *Chemical Reviews*, 93: 1911-1922.

- Pawlik, J.R., B. Chanas, R.J. Toonen & W. Fenical. 1995. Defenses of Caribbean sponges against predatory reef fish. I. Chemical deterrence. *Marine Ecology Progress Series*, 127: 183-194.
- Peng J., J. Li & M.T. Hamann. 2005. The marine bromotyrisine derivatives. *The Alkaloids Chemistry & Biology*, 61: 59-562.
- Pereira, F.R. S.O. Marques, A.M. Nascimento, R.C. Gandolfi, E. Hajdu, S. Peixinho, M.R. Custódio & R.G.S. Berlinck. 2006. Metabólitos Derivados da Dibromotirosina das Esponjas *Aplysina fulva*, *A. conulosa* (sp. n.) and *A. fistularis*. In *XXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*; Sociedade Brasileira de Química: Águas de Lindóia, Brazil; p. 335.
- Putz, A. 2009. Secondary metabolites from marine sponges, with focus on the chemical ecology and biochemical characterisation of the stress-induced biotransformation of *Aplysina* alkaloids. *Disertación Inaugural* "zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf". 231pp.
- Putz, A., A. Kloeppel, M. Pfannkuchen, F. Brümmer & P. Proksch. 2009. Depth-related alkaloid variation in Mediterranean *Aplysina* sponges. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, Tübingen*, 64: 279-287.
- Puyana, M., N. V. Petrichcheva, A.L. Morales, C. Duque & S. Zea. 2002. Algunos aspectos de ecología química de las esponjas del Caribe *Axinyssa ambrosia* y *Aplysina insularis*. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias*, 26(101): 565-574.
- Puyana, M., W. Fenical & J.R. Pawlik. 2003. Are there activated chemical defenses in sponges of the genus *Aplysina* from the Caribbean?. *Marine Ecology Progress Series*, 246: 127-135.

- Rodríguez, A.D., R.K. Akee & P.J. Scheuer. 1987. Two bromotyrosine-cysteine derived metabolites from a sponge. *Tetrahedron Letters*, 28: 4989–4992.
- Rodríguez, A.D. & I.C. Piña. 1993. The structures of aplysinamisines I, II and III: New bromotyrosine-derived alkaloids from the Caribbean sponge *Aplysina cauliformis*. *Journal of Natural Products*, 56: 907-914.
- Rodríguez-Nieto, S., M. González-Iriarte, R. Carmona, R. Muñoz-Chápuli, M.A. Medina & A.R. Quesada. 2002. Antiangiogenic activity of aeroplysinin-1, a brominated compound isolated from a marine sponge. *The Federation of American Society Experimental Biology Journal*, 16: 261-263.
- Rohde S., D.J. Gochfel, S. Ankisetty., B. Avula & P.J. Schupp. 2012. Spatial Variability in secondary metabolites of the Indo-Pacific sponge *Stylissa massa*. *Journal of Chemical Ecology*, 38(5): 463-475.
- Rogers, E.W. & T.F. Molinski. 2007. Highly polar spiroisoxazolines from the sponge *Aplysina fulva*. *Journal of Natural Products*, 70: 1191-1194.
- Sacristán-Soriano, O., B. Banaigs & M.A. Becerro. 2011. Relevant spatial scales of chemical variation in *Aplysina aerophoba*. *Marine Drugs*, 9: 2499-2513.
- Sacristán-Soriano, O., B. Banaigs & M.A. Becerro. 2012. Temporal trends in the secondary metabolite production of the sponge *Aplysina aerophoba*. *Marine Drugs*, 10: 677-693.
- Silva, M.M., J. Bergamasco, S.P. Lira, N.P. Lopes, E. Hajdu, S. Peixinho & R.G.S. Berlinck. 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.

- Silva-Lira, N., R. Carneiro Montes, J. Fachine Tavares, M. Sobral da Silva, E.V.L. Da Cunha, P. Filgueiras de Athayde-Filho, L.C. Rodrigues, C. Da Silva Dias, & J.M. Barbosa-Filho. 2011. Brominated Compounds from Marine Sponges of the Genus *Aplysina* and a Compilation of Their <sup>13</sup>C NMR Spectral Data. *Marine Drugs*, 9: 2316-2368.
- Strickland J.D.H. & T.R. Parsons 1972. A practical handbook of seawater analysis. *Fisheries Research Board, Canada Bulletin 167* (second edition).
- Suárez G.I. 2002. Estructura de las asociaciones de moluscos en corales del género *Pocillopora* Lamarck, 1818; en Punta Arena de la Ventana, B.C.S. México. *Tesis de Licenciatura*. Universidad Autónoma de Baja California Sur. 35 pp.
- Schupp, P., C. Eder, V. Paul & P. Proksch. 1999. Distribution of secondary metabolites in the sponge *Oceanapia* sp. and its ecological implications. *Marine Biology*, 135: 573-580.
- Teeyapant, R. & P. Proksch. 1993. Biotransformation of brominated compounds in the marine sponge *Verongia aerophoba*-Evidence for an induced chemical defense. *Naturwissenschaften*, 80: 369–370.
- Teeyapant, R., H.J. Woerdenbag, P. Kreis, J. Hacker, V. Wray, L. Witte & P. Proksch. 1993. Antibiotic and cytotoxic activity of brominated compounds from the marine sponge *Verongia aerophoba*. *Verlag der Zeitschrift für Naturforsch*, 48: 939-945.
- Thompson, J. E. 1985. Exudation of biologically-active metabolites in the sponge *Aplysina fistularis*. I. Biological evidence. *Marine Biology*, 88: 23-26.

- Thompson, J.E., Barrow, K.D. & D.J. Faulkner. 1983. Localization of two brominated metabolites, aérothonin and homoaérothonin, in spherulous cells of the marine sponge *Aplysina fistularis* (= *Verongia thiona*). *Acta Zoological*, 64: 199-210.
- Thompson, J.E., R.P. Walker & D.J. Faulkner. 1985. Screening and bioassays for biologically-active substances from forty marine sponge species from San Diego, California, USA. *Marine Biology*, 88: 11-21.
- Thompson, J.E., P.T. Murphy, P.R. Bergquist & E.A. Evans. 1987. Environmentally induced variation in diterpene composition of the marine sponge *Rhopaloeides odorabile*. *Biochememical Systematics & Ecology*, 15: 595-606.
- Thoms, C. M. Horn, M. Wagner, U. Hentschel & P. Proksch. 2003. Monitoring microbial diversity and natural product profiles of the sponge *Aplysina cavernicola* following transplantation. *Marine Biology*, 142: 685-692.
- Thoms, C., M. Wolff, K. Padmakumar, R. Ebel & P. Proksch. 2004. Chemical defense of Mediterranean sponges *Aplysina cavernicola* and *Aplysina aerophoba*. *Zeitschrift für Naturforschung*, 59: 113-122.
- Thoms, C., R. Ebel & P. Proksch. 2006. Activated chemical defense in *Aplysina* sponges revisited. *Journal of Chemical Ecology*, 32: 97-123.
- Turon, X., M.A. Becerro & M.J. Uriz. 1996. Seasonal patterns of toxicity in benthic invertebrates: the encrusting sponge *Crambe crambe* (Poecilosclerida). *Oikos*, 75: 33–40.
- Turon, X., R. Martí & M.J. Uriz. 2009. Chemical bioactivity of sponges along an environmental gradient in a Mediterranean cave. *Scientia Marina*, 73(2): 387–397.

- Tymiak, A.A. & K.L. Rinehart Jr. 1981. Biosynthesis of dibromotyrosine-derived antimicrobial compounds by the marine sponge *Aplysina fistularis* (*Verongia aurea*). *Journal of American Chemical Society*, 103: 6763-6765.
- Uriz, M.J., M.A. Becerro & X. Turon. 1996. Location of toxicity within the Mediterranean sponge *Crambe crambe* (Demospongiae, Poecilosclerida). *Marine Biology*, 124: 583-590.
- Valencia-Agami, S.S. 2010. Actividad antibacteriana del extracto y fracciones semipurificadas de la esponja *Aplysina gerardogreeni*. *Tesis de licenciatura*. Universidad Autónoma de Baja California Sur, 44 pp.
- Valdés-Iglesias, O., R. Pérez-Gil & Y. Colom. 2010. Actividad antitumoral de los organismos marinos. *Revista Electrónica de la Agencia de Medio Ambiente*, 10(19): ISSN-1683-8904.
- Walker, R.P., J.E. Thompson & D.J. Faulkner. 1985. Exudation of biologically-active metabolites in the sponge *Aplysina fistularis*. II. Chemical evidence. *Marine Biology*, 88: 27-32.
- Webster, N.S., J.R. Xavier, M. Freckelton, C.A. Motti & R. Cobb. 2008. Shifts in microbial and chemical patterns within the marine sponge *Aplysina aerophoba* during a disease outbreak. *Environmental Microbiology*. 10(12): 3366-3376.
- Weiss, B., R. Ebel, M. Elbrächter, M. Kirchner, & P. Proksch. 1996. Defense metabolites from the marine sponge *Verongia aerophoba*. *Biochemical Systematics & Ecology*, 24: 1–12.
- Wiffels, R.H. 2008. Potential of sponges and microalgae for marine biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 26:1: 26–31.

## XII ANEXOS

### XII.1 Biología y Taxonomía de la especie

*Aplysina gerardogreeni* (Gómez & Bakus, 1992) es una esponja tipo Leuconoide, su color natural es amarillo- ocre en la base y rojiza en la parte superior. Es de constitución masiva, provista de tubos pequeños en la cima, la superficie es finamente conulosa, con conulos no menores a 1mm de alto. La dermis mide entre 60 a 278µm de grosor. Los canales excurrentes miden de 1 - 2mm de diámetro. Las cámaras de coanocitos varían de 12 – 17 µm de diámetro. Presenta una fibroreticulación poligonal irregular, sin distinción entre primarias y secundarias, el diámetro de la fibra es de 200-2000 µm. *A. gerardogreeni* habita en las comunidades rocosas y se distribuye a lo largo de la costa del Pacífico Mexicano hasta los 33m de profundidad. Es muy frecuente encontrar a esta esponja asociada a moluscos opistobranquios del género *Tylodina*, los cuales se alimentan activamente de la esponja e incluso depositan sobre ella las puestas para que la siguiente generación eclosiona directamente sobre su alimento (Suarez, 2002).

Phyllum: porífera

Clase: Demospongia

Subclase: Ceractinomorpha

Orden: Verongida (Bergquist, 1978)

Familia: Aplysinidae (Carter, 1875)

Género: ***Aplysina*** (Nardo, 1813)

***Aplysina gerardogreeni*** (Gómez y Bakus, 1992).

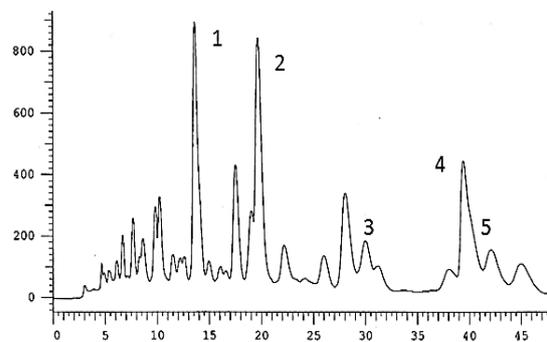
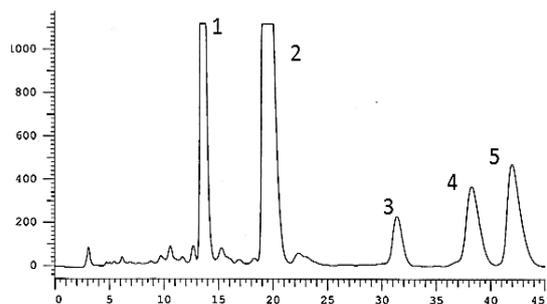
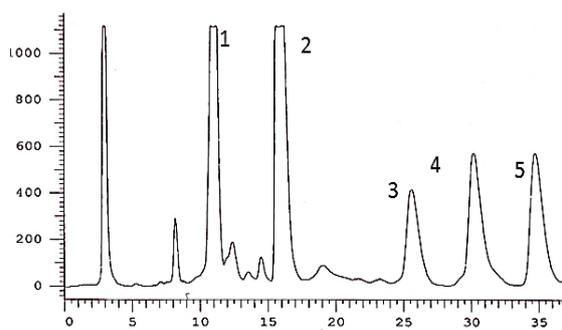


## XII.2 Desplazamientos químicos de $^1\text{H}$ -RMN de los compuestos establecidos por los autores que realizaron su descripción.

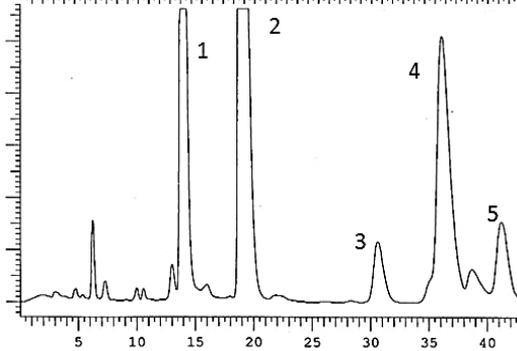
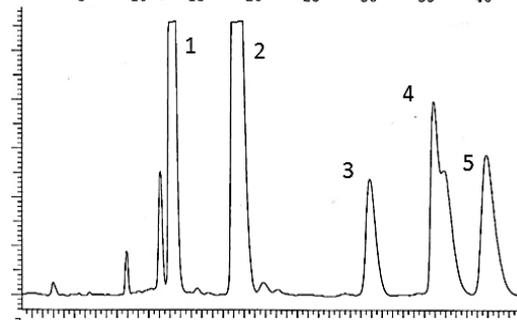
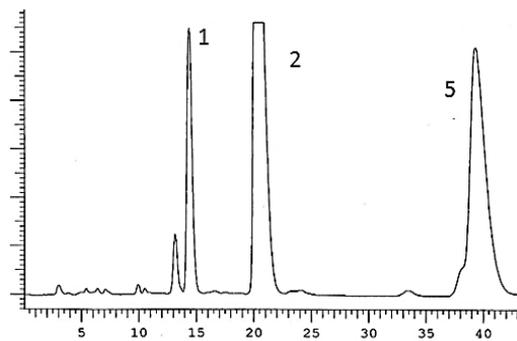
# H	$\delta$ $^1\text{H}$ (mult., J en Hz)				
	aerotherionina Nishiyama y Yamamura, 1985 Acetona- $\text{d}_6$	homoaerotherionina Moody et al., 1972 ( $\text{CDCl}_3$ -DMSO- $\text{d}_6$ )	11-oxohomoaerotherionina Ciminello, <i>et al.</i> , 1997 $\text{CD}_3\text{OD}$	Fistularina-1 Gopichand & Schmitz, 1979 $\text{CD}_3\text{OD}$	Fistularina-3 Gunasekera & Cross, 1992 Piridina- $\text{d}_5$
1	4.18 (7.5)	4.16 (s)	4.16(s) / 4.14(s)	4.21 (s)	4.61 (d, 7.9) 4.58 (d, 7.9)
5	6.53	6.28 (s)	6.47 (s) / 6.46 (s)	6.57 (s)	6.63 (s) 6.62 (s)
7a	3.15 (d, 18)	3.02 (d, 18.5 Hz)	3.15 (d, 18) ,	3.23(d, 18.0)	4.43 (ABq
7b	3.85 (18)	3.87 (d, 18.5 Hz)	3.13(d, 18) 3.82 (d, 18) , 3.80(d, 18)	3.87(d, 18.0)	18.2) / 4.40 (ABq 18.2) 3.47 (ABq, 18.2) / 3.44 (ABq, 18.2)
10	3.2, 3.5	3.35 (m)	4.12 (s)	3.80 3.96	4.25 (m) 3.98 (m)
11	1.62	1.60 (m)		4.27 (m)	4.76 (m)
12		1.37 (m)	2.60 (t, 7)	4.11(m)	4.34 (dd, 8.8, 5.5) 4.26 (m)
13			1.88 (dt, 7,7)		
14			3.32 (t, 7)		
15,17				7.75 (s)	7.93 (s)
19				5.68 (t, 8)	5.29 (dt, 4.3, 5.8)
20				4.08 (t, 8) 3.56 (t, 8)	3.97 (m) 3.81 (ddd, 15.3, 5.8, 4.3)
OH-1	5.40 (d7.5)				8.62 (d, 7.9) 8.61 (d, 7.9)
OH-11					7.23 (d, 5.2)
OH-19					7.77 (d, 4.3)
OCH3	3.77 (s)	3.73 (s)	3.75 (s)	3.74 (s)	3.63 (s)
NH	7.60				9.34 (t, 5.8) / 9.71 (t, 5.8)

**XII.3 Perfiles cromatográficos obtenidos mediante HPLC (eluyente  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  99:1) con las fracciones de los diferentes meses de muestreo.**

**Marzo**

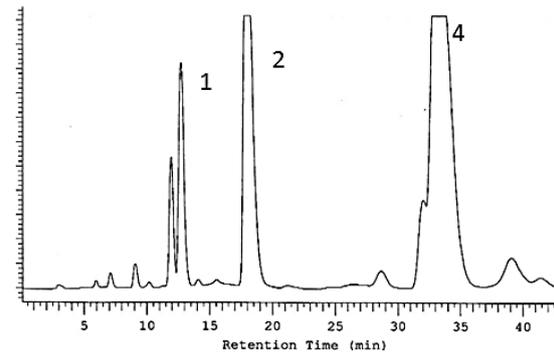
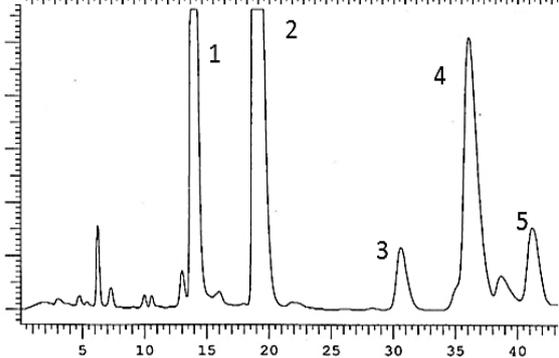
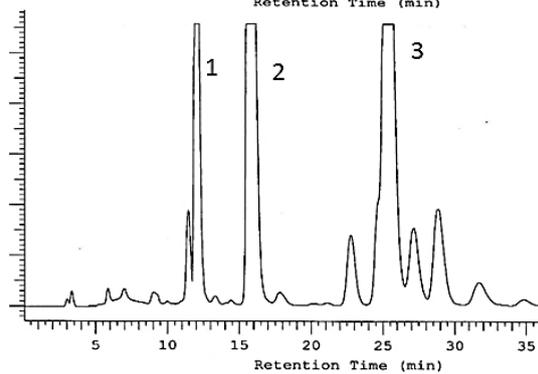
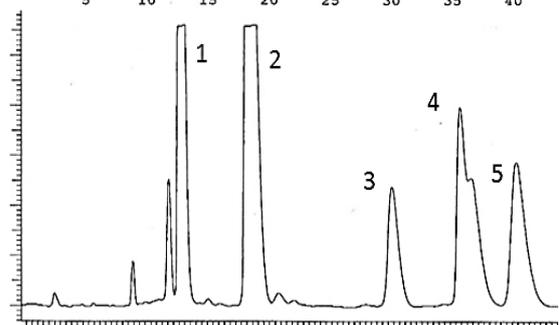
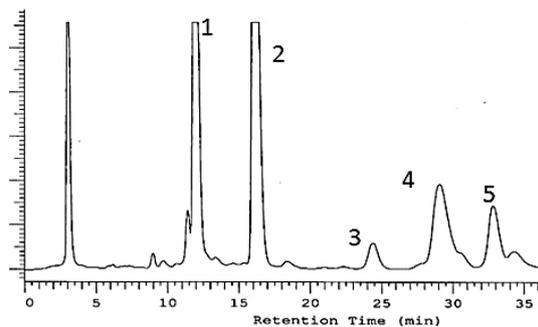
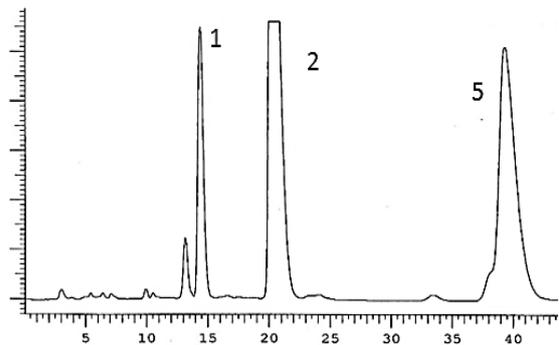


**Abril**



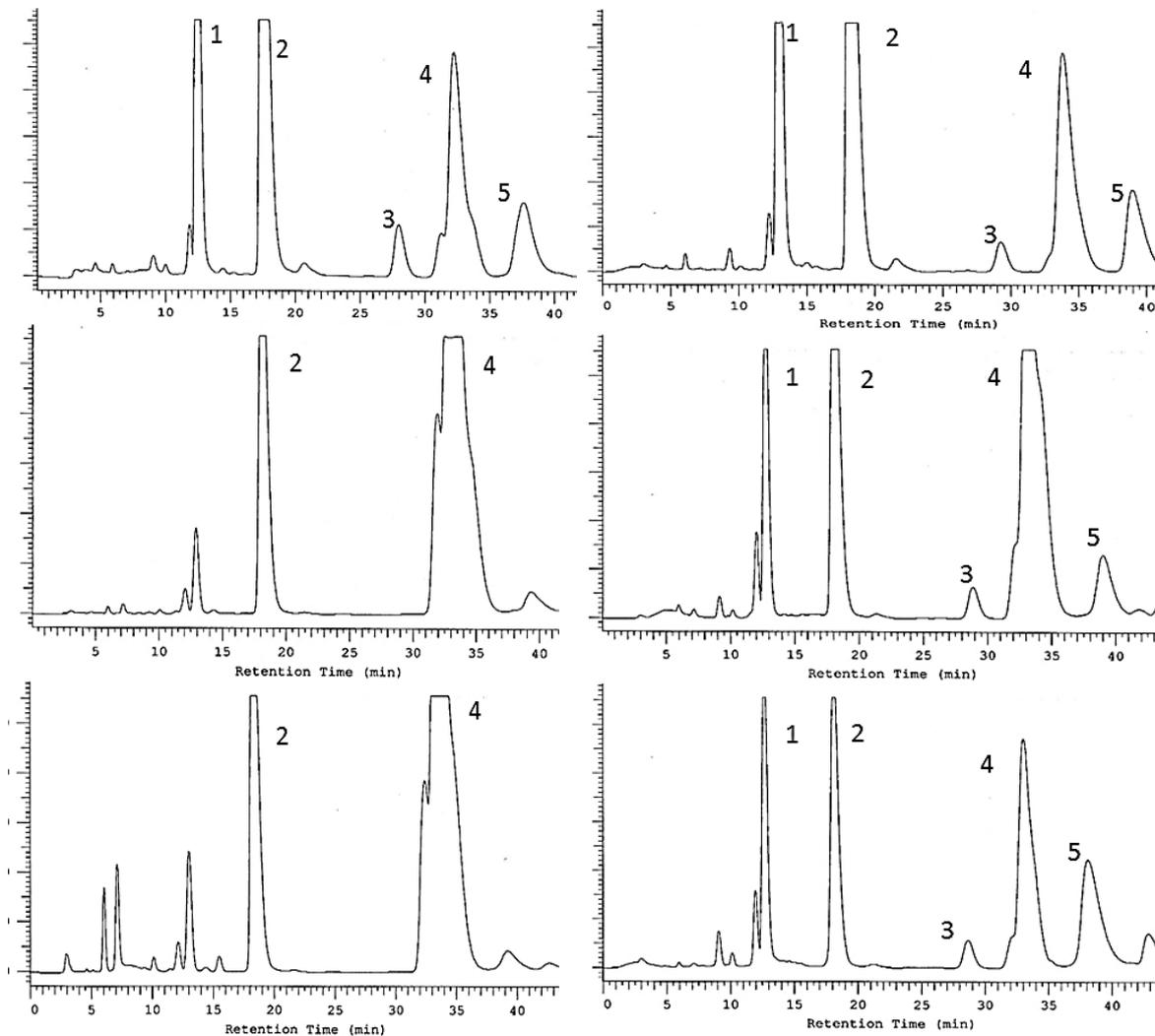
Junio

Septiembre



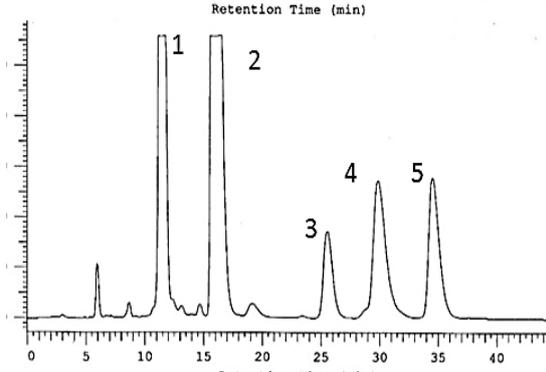
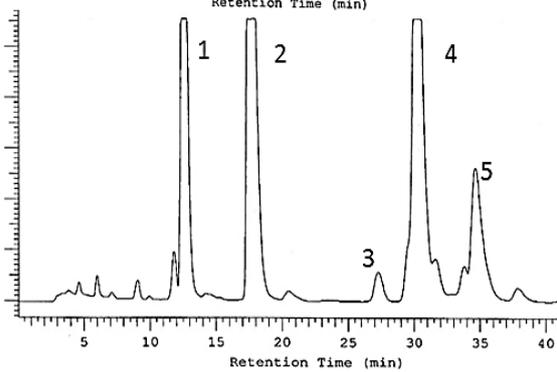
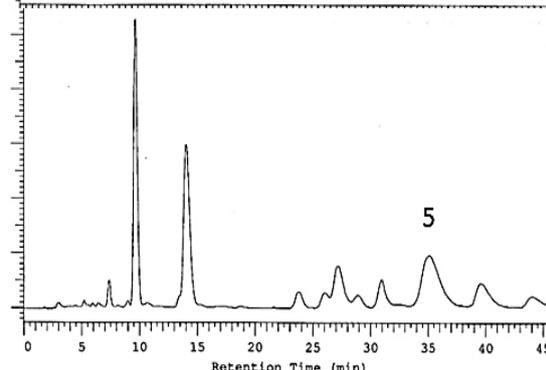
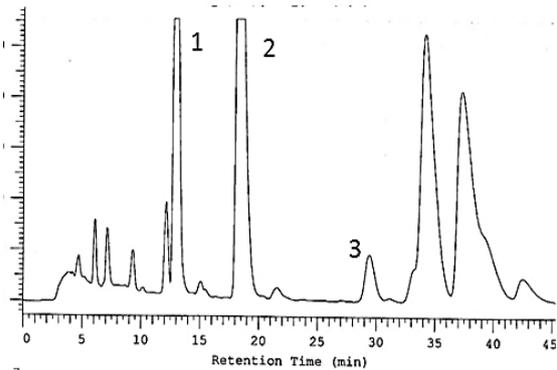
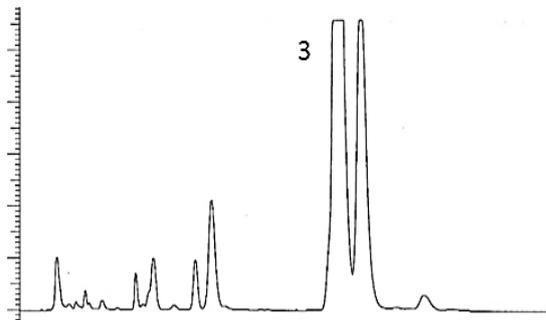
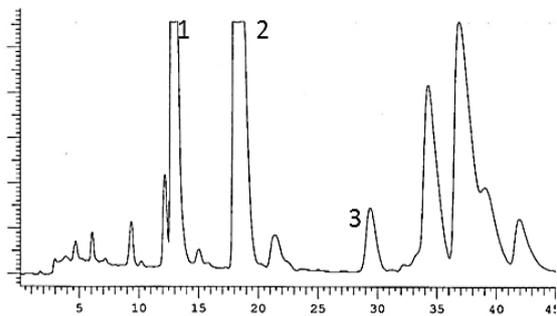
Octubre

Noviembre



Diciembre

Enero



## Febrero

