

ACTIVIDAD BIOLÓGICA VS. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL EXTRACTO CLOROFORMICO DE LA ESPONJA MARINA *DIDISCUS OXEATA*

C. DUQUE*

S. ZEA**

DE SILVESTRI***, A. CALDERON y A. MEDINA

* Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, A.A. 14490, Bogotá, Colombia.

** Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia, A.A. 14490, Bogotá, Colombia.

*** Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia, A.A. 14490, Bogotá, Colombia.

Key words: Biological active metabolite, marine metabolite, marine sesquiterpene, marine sponge, Demospongiae.

RESUMEN

Del extracto cloroformico de la esponja marina *Didiscus oxeata* utilizando métodos cromatográficos y espectroscópicos (UV, IR, RMN-¹H, RMN-¹³C, EM y rotación específica) se aisló e identificó el compuesto 2-[(1'S)-1',5'-dimetil-4'-hexenil]-5-metil fenol o (+)-curcuphenol, responsable de la fuerte actividad de la esponja contra microorganismos gram (+), hongos y levaduras (Concentración mínima inhibitoria entre 38.6 y 5.3 µg/ml.).

ABSTRACT

2-[(1'S)-1',5'-Dimethyl-4'-hexenyl]-5-methyl phenol or (+)-curcuphenol was isolated from the marine sponge *Didiscus oxeata* by chromatographic means and identified by UV, IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, MS and specific rotation. It was also found that this compound was responsible for the previous strong antimicrobial activity showed by crude extracts of this marine sponge and that the minimum inhibitory concentration of (+)-curcuphenol against gram positive microorganisms ranged between 36.8 and 5.3 µg/ml.

INTRODUCCION

Las esponjas son invertebrados marinos que durante la última década se han convertido en una fuente muy importante de un sinnúmero de compuestos químicos con estructuras novedosas (1-3). Esta diversidad química comprende nuevos sesquiterpenos, sesquiterpenos halogenados, alcaloides, triterpenos, éteres, polialcoholes, pigmentos de tipo carotenoide, ácidos grasos, esteroides... etc. Además de la diversidad estructural antes mencionada, muchas de estas sustancias presentan actividad antimicrobiana, antiviral, antiinflamatoria, antineoplásica, citotóxi-

ca, antifúngica, cardiovascular, respiratoria, gastrointestinal, vasodilatadora... etc. (4) y además presentan toxicidad contra peces, ratones y otros animales. Es por esta razón que en los últimos años en Colombia se ha despertado también un gran interés por estos invertebrados marinos.

El presente trabajo ha sido dedicado a la búsqueda del o de los compuestos presentes en el extracto clorofórmico de la esponja marina *Didiscus oxecta* del Caribe colombiano que en trabajos preliminares (5), había presentado fuerte actividad antimicrobiana, citotóxica e ictiotóxica.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiales y Equipo

Los espectros fueron tomados en los siguientes equipos: UV en un espectrofotómetro Beckman-25, IR en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 467, EM en un espectrómetro Shimadzu 9020-DF y la rotación específica en un polarímetro digital Perkin-Elmer 241.

Las separaciones cromatográficas fueron hechas utilizando sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck) y sílica gel 60 (0.063-0.200 mm Merck). La comprobación de pureza fue hecha por Cromatografía de Gases en un aparato Hewlett-Packard 5700A con detector de ionización de llama y una columna capilar de sílica fundida entrecruzada con metil silicona OV-101 y un programa de temperatura de 160-260°C a 4°C/min y He como gas de arrastre a 0.5 ml/min y por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia en un equipo Beckman modelo 332 con un detector UV Hitachi 100-40 y una columna Beckman ODS de 5 μ m con hexano como fase móvil a 0.6 ml/min.

Para los ensayos microbiológicos se utilizaron caldo infusión cerebro corazón (Quimirel), agar isosensitest (Merck), una incubadora Theico 32 M de la Precisión Scientific Company, un medidor de halos de inhibición de antibióticos Fischer-Lilly de la Fischer Scientific Company y un multinoculador diseñado por el Dr. R. Mantilla del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia.

Aislamiento y Purificación

La esponja marina fue recolectada en la bahía de Santa Marta a 13 m de profundidad y clasificada en el Instituto de Investigaciones Marinas de Punta de Betín como *Didiscus oxecta*. Ochocientos once gramos de esponja fueron sometidos a un lavado con metanol y luego a una extracción con cloroformo (4 l) con agitación y durante 24 hr. Parte del extracto clorofórmico obtenido (11 g) fué fraccionado repetitivamente a través de una columna de sílica gel con benceno como eluyente, hasta obtener un compuesto líquido de color naranja oscuro (2 g) que presentó un $R_f = 0.41$ (Sílica 0.25 mm, benceno) revelando con sulfato cérico amónico/H₂SO₄. Para determinar la pureza del compuesto, éste se sometió primero a Cromatografía de Gases y luego a Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia. Luego el compuesto fué sometido a análisis espectral (UV, IR, EM, RMN-¹H, RMN-¹³C y rotación específica) y a análisis antimicrobiano utilizando *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus epidermis*, *Sarcina lutea*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Sal-*

monella sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia marcescens*, *Shigella sonnei*, *Proteus vulgaris*, *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp.

RESULTADOS Y DISCUSION

El compuesto líquido puro (presentó una sola señal en Cromatografía de gases y en Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia) obtenido del extracto clorofórmico de *Didacus oxata* presentó en el espectro UV absorciones en 211 nm ($\epsilon = 8190$), 276nm ($\epsilon = 1942$) y 282 nm ($\epsilon = 1785$) con desplazamiento batocrómico después de la adición de metóxido de sodio, regresando a su valor original luego de la adición de HCl, comportamiento característico de compuestos fenólicos. El espectro IR mostró una banda ancha entre 3550 y 3450 cm^{-1} característica de alcoholes y fenoles y otras bandas en la región de 3000, 885, 810, 1590 y 1520 que corroboran el carácter aromático del compuesto. El espectro de masas presentó un ión molecular en m/z 218 correspondiente a la fórmula $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}$ y los fragmentos m/z : 91, 77, 65, 51 y 39 indicando la presencia de un núcleo aromático. La diferencia entre el ión molecular m/z 218 y el pico base m/z 135 sugirió la presencia de un sustituyente alquénico en el anillo aromático.

El espectro de Resonancia magnética nuclear protónica (Fig. 1), muestra tres protones aromáticos a δ 7.02 ppm (d, 1H, $J = 7.7$ Hz), δ 6.71 ppm (d, 1H, $J = 7.7$ Hz), y δ 6.57 ppm (s, 1H) característicos de trisustitución 1,2,4. La señal a δ 4.7 ppm que desaparece cuando se añade D_2O corresponde al -OH fenólico de este compuesto, la señal a δ 2.26 ppm (s, 3H) puede asignarse a un metilo aromático y la señal a δ 2.95 ppm (sexteto, 1H, $J = 7.0$ Hz) a un protón bencílico. A δ 5.11 ppm aparece un triplete ancho con $J = 7.0$ Hz que integra para 1H, el cual asignamos a un protón vinílico y las señales para metilos a δ 1.67 ppm (s, 3H) y a δ 1.53 se atribuyeron a dos metilos vinílicos. La otra señal para grupo metilo a δ 1.20 ppm (d, 3H, $J = 7.0$ Hz) debe estar acoplada al protón bencílico. Además se presentan otro par de señales que integran cada una para 2H en δ 1.60 ppm y δ 1.92 ppm que parecen corresponder a dos grupos metilénicos. Revisando la bibliografía se encontró que los datos espectroscópicos anteriores son iguales a los mostrados por (-)-curcufenol aislado en 1979 de un gorgónido (6). Sin embargo la rotación específica $[\alpha]_D = +6.0$ del compuesto aislado de *Didacus oxata* fue opuesta a la encontrada para (-)-curcufenol $[\alpha]_D = -7.0$ lo que indica una fórmula estructural epimérica para nuestro compuesto. Del análisis espectroscópico y de toda la información anterior, se pudo establecer la siguiente estructura para el compuesto: 2-[(1'S)-1',5'-dimetil-4'-hexenil]-5-metil fenol o (+)-curcufenol. Los datos de RMN- ^{13}C están en perfecto acuerdo con el análisis anterior y sus asignaciones se muestran en las Tablas I y II indicando el respectivo patrón de comparación utilizado (7-9).

(+)-Curcufenol presentó actividad contra microorganismos gram positivos, hongos y levaduras. La tabla III muestra su concentración mínima inhibitoria contra algunos de los microorganismos que inhibieron su crecimiento. Como puede verse el compuesto presentó fuerte actividad (5.3 - 10.6 $\mu\text{g/ml}$) contra *S. aureus* y *B. anthracis*, microorganismos particularmente patógenos al hombre y además contra *B. subtilis*, *S. epidermis* y *B. cereus*. Contra los otros microorganismos su actividad fue un poco menor. Es importante también anotar que el compuesto mostró actividad contra los hongos *Aspergillus* sp y *Penicillium* sp. (datos no mostrados).

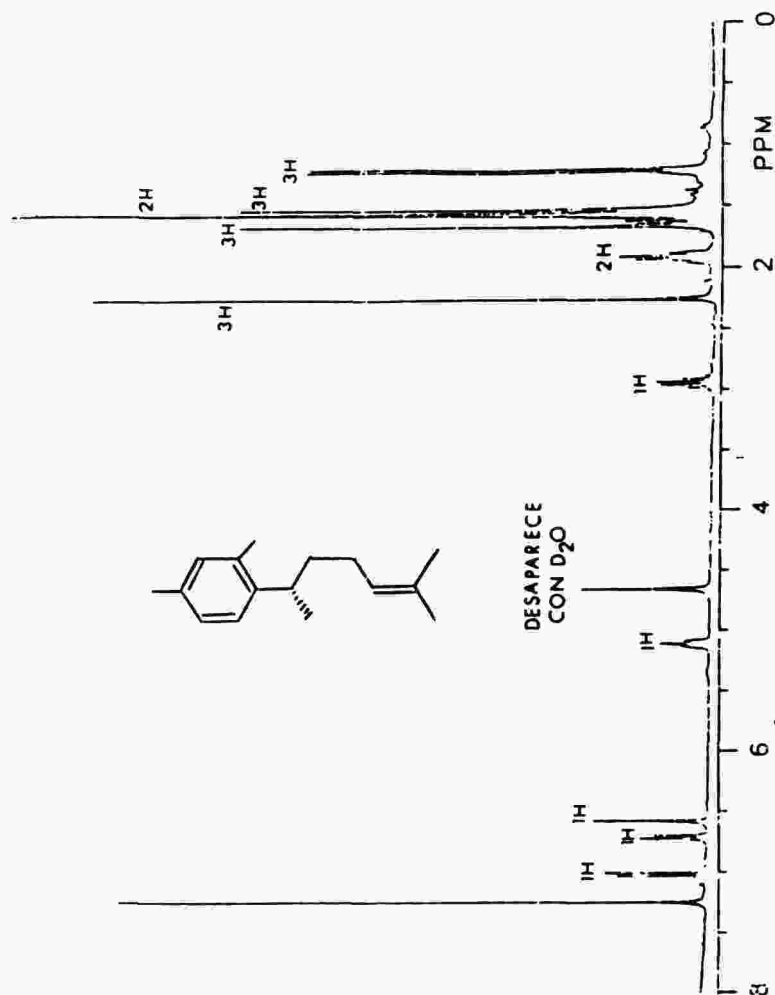


FIGURA 1 Espectro de ^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3) del compuesto biológicamente activo (+)-Curcufenal del extracto cloroformico de *Dilliscus areata*.

TABLA I Desplazamiento químico para los carbonos de la parte alifática de (+)-Curcufenol

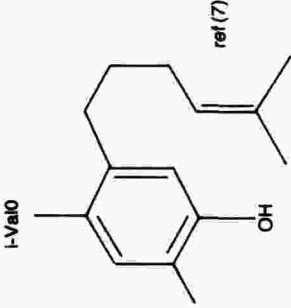
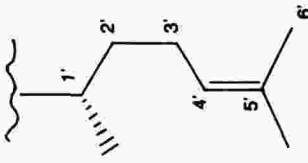
Patrones de comparación	Estructura parcial- (+)-curcufenol-	δ ppm (7)	δ ppm (8)	δ ppm encontrado
		31.9		31.37
		37.5		37.25
		26.1		26.08
		124.3	122.0	124.60
		131.2	132.0	130.01
		17.6	17.8	17.65
		25.8	25.8	25.70
		21.1		21.09

TABLA II Desplazamiento químico para los carbonos de la parte aromática de (+)-Curcufenol

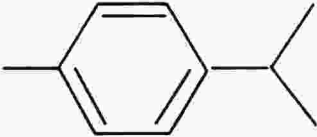
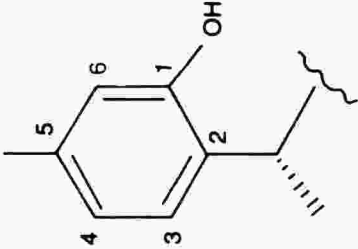
Patrón de comparación	Estructura parcial (+)-curcufenol	δ ppm (9)	δ ppm encontrado
			
	C-1	152.1	152.83
	C-2	131.8	131.86
	C-3	126.1	126.78
	C-4	121.9	121.63
	C-5	136.3	136.42
	C-6	116.3	116.14
	C-5-CH ₃	20.8	20.87

TABLA III

Concentración mínima inhibitoria para (+)-Curcufenol

Micro-organismos	36.8	21.2	10.6	5.3	2.7	1.3
	μ g/ml.					
<i>S. Aureus</i>	+	+	+	-	-	-
<i>S. faecalis</i>	+	+	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i>	+	+	+	-	-	-
<i>S. epidermis</i>	+	+	+	-	-	-
<i>B. anthracis</i>	+	+	+	-	-	-
<i>B. cereus</i>	+	+	+	-	-	-
<i>S. lutea</i>	+	+	-	-	-	-
<i>S. cerevisiae</i>	+	-	-	-	-	-
<i>C. albicans</i>	+	+	-	-	-	-

+ : Inhibición del crecimiento microbiano; -: Crecimiento-microbiano-

El aislamiento de este nuevo compuesto, además de tener importancia química 'per se' es significativamente útil pues podría estarse frente a un nuevo antibiótico que permitiera el tratamiento de las infecciones causadas por los gram positivos. Sin embargo es importante hacer primero estudios citotóxicos y farmacológicos con el objeto de conceptuar sobre su posible utilización en humanos, vegetales o animales. Por último es necesario aclarar que (+)-Curcufenol fue aislado de la naturaleza por primera vez por nuestro grupo (10) y posteriormente por Wright et al. (11) en otra esponja marina.

AGRADECIMIENTOS

Al Profesor Dr. J.P. Scheuer de la Universidad de Hawaii por la toma de los espectros de RMN- ^1H y RMN- ^{13}C , al Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia y al Programa BID-COLCIENCIAS por los aportes financieros.

BIBLIOGRAFIA

1. D.J. Faulkner, Nat. Prod. Rev. 4,539-576 (1987).
2. P.R. Bergquist 'Sponge Chemistry. A review' in 'Sponge des spongiaires'. Editions du Centre National de la Recherche Scientifique. Paris, 1979. 383-392 pp.
3. P.N. Kaul and P. Daffari, Ann. Rev. Pharm. 26, 117-142 (1986).
4. P.N. Kaul and C.J. Sinderman ed. 'Drugs and Food from the sea, myth of reality?'. The University of Oklahoma, Norman, Oklahoma, 1978.
5. S. Zea, A. Medina and C. Duque, Ann. Inst. Inv. Mar. Punta Betón 15-16 31-48 (1986).

6. F. McEnroe and W. Fenical, *Tetrahedron* 34, 1661 (1978).
7. P.J. Nathan, J.D. Hernández, L.V. Roman, E. García, V. Mondoza and S. Mendoza, *Phytochemistry* 21, 1192 (1982).
8. S. Hunects, J.D. Connolly, L.T. Harrison, R.S. Joseph and T. Pocs, *Phytochemistry* 23, 2396 (1984).
9. P.J. Nathan 'Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13' México 14, DF-México. Secretaría general de la Organización de las Naciones de Estados Americanos. 197 y 145 p.
10. C. Duque, A. Calderón, A. Medina and J. De Silvestri, "Vth International Symposium on Marine Natural Products" Paris, 1985.
11. A.E. Wright, S.A. Pomponi, O.J. McConnell, S. Komoto and P.J. McCarthy, *J. Nat. Prod.* 50, 976-978 (1987).