

1746-Q
V335
C.1

METABOLITOS DE ALGUNAS
PORIFERAS DEL LITORAL CHILENO

TESIS
ENTREGADA A LA
UNIVERSIDAD DE CHILE
EN CUMPLIMIENTO PARCIAL DE LOS REQUISITOS
PARA OPTAR AL GRADO DE
MAGISTER EN CIENCIAS QUIMICAS CON MENCIÓN EN QUIMICA

FACULTAD DE CIENCIAS

POR

MARIA DE LA LUZ A. VASQUEZ MARTINEZ

DIRECTOR : DR. AURELIO SAN MARTIN B.

1989



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS

INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias,
que la Tesis de Magister presentada por el Candidato

MARIA DE LA LUZ A. VASQUEZ MARTINEZ

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como
requisito para optar al Grado de Magister en Ciencias con mención
en Química.

DIRECTOR DE TESIS
Prof. Dr. Aurelio San-Martín B.

COMISION INFORMANTE DE TESIS

Prof. Q.F. Francesca Faini

Prof. Dr. Jorge Medina

Prof. Ms. René Torres



A mi esposo e hijos

A mis padres y hermano



AGRADECIMIENTOS

Mis más sinceros agradecimientos a todas aquellas personas que directa o indirectamente contribuyeron a la realización de esta Tesis.

En forma muy especial al Dr Aurelio San Martín por la ayuda y entrega de conocimientos a lo largo del presente estudio.

A la Dra Juana Roviroso por su constante apoyo durante estos años.

A los correctores de esta Tesis, Sra y Sres: Francesca Faini, René Torres y Jorge Medina por sus valiosas sugerencias.

A mis amigas (os) del laboratorio: Isabel, María Inés, Yesica, Margarita, Loreto, Mauricio, Arturo, Elías y especialmente a Luis Astudillo por su desinteresada ayuda en esta memoria.



INDICE

	PAG.
RESUMEN	
INTRODUCCION	1
I GENERALIDADES	1
II ASPECTOS GENERALES DE LAS PORIFERAS	4
1. CLASIFICACION DE LAS PORIFERAS	5
2. ASPECTOS QUIMICOS Y BIOLOGICOS DE LAS PORIFERAS	9
Esteroles	16
a) Distribución	19
b) Biosíntesis	20
c) Esteroles marinos	27
d) Comparación de esteroles terrestres y marinos	37
e) Papel de los esteroles en los animales	40
f) Esteroles de esponjas	45
g) Uso quimiotaxonómico de los esteroles en las Poríferas	45
III CARACTERISTICAS GENERALES DE LA ESPECTROMETRIA DE MASA DE LOS ESTEROLES	56
1. INSATURACIONES EN LA CADENA LATERAL	59
2. HIDROXILO EN LA CADENA LATERAL	64
3. CARBONILO EN LA CADENA LATERAL	65
4. INSATURACIONES EN EL ANILLO	65
5. CETOESTEROIDES	69

OBJETIVOS	73
MATERIALES Y METODOS	83
I RECDLECCION	87
II PROCEDIMIENTOS GENERALES DE EXTRACCION	87
III FRACCIONAMIENTO Y ESTUDIO DE LOS ESTEROLES	90
IV ESTUDIO DE LOS ESTEROLES ACETILADOS	90
V FRACCIONAMIENTO Y ESTUDIO DE LOS CETOES- TEROIDES	101
DISCUSION DE RESULTADOS	102
I ANALISIS DE LOS NUCLEOS ESTEROIDALES	111
II ANALISIS DE LAS CADENAS LATERALES	113
III ANALISIS DE LOS CETOESTEROIDES	122
CONSIDERACIONES QUIMIOTAXONOMICAS	130
CONCLUSIONES	145
BIBLIOGRAFIA	148

INDICE DE TABLAS

TABLA		PAG.
1	Subdivisión de la Clase de Demospongiae	7
2	Funciones biológicas de algunos metabolitos de esponjas	10
3	Requerimientos estructurales de los esteroides para estabilizar la membrana plasmática	42
4	Clasificación de algunas especies de Demospongiae	49
5	Clasificación y área de recolección de algunas esponjas	53
6	Datos generales de las esponjas	88
7	Composición y Trr de los esteroides de esponjas.	108
8	Desglose del % de esteroides en especies del género <u>Tedania</u>	132
9	Contenido esterooidal del género <u>Tedania</u>	133
10	Tipos de núcleos en especies del género <u>Tedania</u>	133
11	Desglose del % de esteroides de especies del género <u>Reniera</u>	135
12	Contenido esterooidal del género <u>Reniera</u>	136
13	Tipos de núcleos en especies del género <u>Reniera</u>	136
14	Desglose del % de esteroides en especies del género <u>Haliclona</u>	140

15	Contenido esteroidal del género <u>Haliclona</u>	140
16	Tipos de núcleos en especies del género <u>Haliclona</u>	142

INDICE DE ESQUEMAS

ESQUEMA		PAG.
1	Diferentes metabolitos aislados de esponjas	14
2	Biosíntesis del escualeno	21
3	Ciclación del escualeno	24
4	Origen biogenético de 23-metil-esteroles	28
5	Esteroles C ₃₀ -C ₃₁ derivados de $\Delta^{24(28)}$	29
6	Metilación de esteroles	31
7	Posible origen del núcleo 3 β -hidroxi- Δ^5	36
8	Fragmentación del colesterol	58
9	Fragmentación Δ^{22}	59
10	Fragmentación Δ^{22}	60
11	Fragmentación Δ^{23}	60
12	Fragmentación Δ^{24}	61
13	Fragmentación Δ^{24}	61
14	Fragmentación Δ^{24}	62
15	Sustituyente en C ₂₄	62
16	Fragmentación Δ^{25}	63
17	Fragmentación $\Delta^{17(20)}$	63
18	Fragmentación $\Delta^{20(22)}$	64
19	Fragmentación de cadena lateral con hidroxilo	64

20	Fragmentación de cadena lateral con carbonilo	65
21	Fragmentación de esteroides Δ^5	66
22	Fragmentación de esteroides Δ^7	66
23	Fragmentación de esteroides $\Delta^{5,7}$	67
24	Fragmentación de esteroides $\Delta^{9,11}$	67
25	Fragmentación de esteroides $\Delta^{7(9,11)}$	68
26	Fragmentación de esteroides $\Delta^{7(9,11)}$	68
27	Fragmentación del Δ^4 -3-cetoesteroides	70
28	Fragmentación de 7-cetoesteroides	72
29	Esquema de extracción general de las esponjas	89
30	Esquema del fraccionamiento de esteroides acetilados obtenidos de <u>Tedania excavata</u>	91
31	Esquema del fraccionamiento de esteroides acetilados obtenidos de <u>Reniera macropora</u>	92
32	Esquema del fraccionamiento de esteroides acetilados obtenidos de <u>Haliclona aglutinata</u>	92
33	Cadenas laterales y núcleos de los esteroides aislados de <u>I. excavata</u> , <u>R. macropora</u> y <u>H. aglutinata</u>	107

INDICE DE FIGURAS

FIGURA		PAG.
1	β -sitosterol	17
2	Colesterol	17
3	Ergosterol	18
4	Isopreno	18
5	ciclopentanoperhidrofenantreno	18
6	Epóxido de escualeno	23
7	Cicloartenol	23
8	Lanosterol	23
9	24-nor-colesterol	27
10	Codisterol	30
11	Clerosterol	30
12	Mutasterol	30
13	25-metil-xestosterol	30
14	Xestospongesterol	30
15	3 β -hidroximetil-A-nor-esterol	33
16	Gorgosterol	35
17	23-demetil-gorgosterol	35
18	Dinosterol	36
19	Esterol terrestre	38
20	Esterol marino	39

21	5- β -estanol	44
22	19-nor-estanol	44
23	Esteroles marinos con R= \geq 3 atomos de carbono	44
24	Esteroles marinos con R= 11 atomos de carbono	44
25	Aplisterol	50
26	<u>I. mucosa</u>	74
27	<u>I. laminariae</u>	75
28	<u>R. cibriformis</u>	79
29	<u>R. pulvinar</u>	79
30	<u>H. sabulosa</u> n. sp	80
31	<u>H. cratera</u>	80
32	Cromatograma de gases de esteroles acetilados de <u>Tedania excavata</u>	103
32	Cromatograma de gases de esteroles acetilados de <u>Reniera macropora</u>	104
34	Cromatograma de gases de esteroles acetilados de <u>Haliclona aglutinata</u>	105
35-39	Núcleos de los esteroles aislados	112
40	Espectro infrarrojo del compuesto R ₁₀ (T ₉ , H ₈)	117
41	Espectro RMN- ¹ H del compuesto R ₁₀ (T ₉ , H ₈)	119
42	Espectro infrarrojo de cetoesteroides	123

43	Cromatograma de gases de cetoesteroides	124
44	Espectro de masa del compuesto M ₂₋₁	127
45	Espectro de masa del compuesto M ₂₋₂	128
46	Estructuras propuestas para cetoesteroides	129

RESUMEN

Durante mucho tiempo se ha sostenido que la diversidad filogenética de los organismos generalmente se ve reflejada por una correspondiente diversidad química, confirmándose en los grupos más primitivos donde las diferencias filogenéticas son mucho mayores.

El medio marino comparado con la tierra es un rico precursor de estos organismos, desde los cuales hasta ahora se han aislado e identificado una gran cantidad de metabolitos secundarios, comprobándose que algunos de ellos son sintetizados por tejidos especializados de vegetales e incorporados posteriormente a través de la dieta en invertebrados, de ahí que aparecen metabolitos análogos e incluso idénticos proveniente tanto de vegetales como de animales.

De las esponjas (Phylum Porífera), incluidas en este grupo de organismos primitivos y que se encuentran en forma abundante en nuestras Costas chilenas, también se han aislado e identificado metabolitos de interés químico y biológico.

Estas esponjas tienen ciertos problemas taxonómicos, los cuales se han tratado de resolver a través del análisis de su composición química, obteniéndose ciertas correlaciones dentro de algunos géneros y familias. Por estas razones hemos analizado químicamente 3 esponjas del litoral chileno, entre las que se incluyen 2 especies de agua fría (Tedania excavata y Reniera macropora) y 1 de agua templada (Haliclona aglutinata), con el objeto de aportar mayor información al estudio taxonómico de estos animales.

No se encontraron metabolitos secundarios, sin embargo fue posible identificar un total de 21 esteroides ya descritos en la literatura. Así mismo se aislaron dos nuevos cetosteroides, cuyas estructuras se proponen.

INTRODUCCION

I GENERALIDADES

La variedad de metabolitos presentes en algas e invertebrados marinos es muy grande, tanto por su tamaño (desde el metano hasta polímeros), como por las funciones orgánicas que ellos presentan (desde hidrocarburos hasta compuestos con diversos heteroátomos). Es por ésto que se considera que el ambiente marino constituye una fuente inagotable de nuevas estructuras moleculares (1,2,3), las cuales podrían ser responsables de distintas funciones biológicas. De hecho, de la literatura se desprende que no sólo existe un gran número de moléculas cuya función biológica no ha sido determinada, sino que también sobre la prioridad que hay que seguir en la investigación de los organismos marinos. En un estudio realizado por J. D. Martin, (4) se determinó que el 10% de los organismos marinos contienen compuestos citotóxicos, lo cual es un valor elevado si se compara con el 2 o 3% de los organismos terrestres. Se ha comprobado también que el porcentaje de metabolitos secundarios encontrados en invertebrados marinos es superior al de las algas; el de invertebrados inmóviles y desprovistos de caparazón, superior a los que gozan de movilidad

y protección, y el de aguas templadas superior al de aguas frías.

Se ha verificado que algunos de esta enorme cantidad de metabolitos marinos conocidos, son sintetizados por tejidos especializados de vegetales, e incorporados posteriormente a través de la dieta en invertebrados, con o sin modificaciones químicas, de ahí que se encuentran metabolitos análogos e incluso idénticos tanto en vegetales como en animales (5,6,7,8,9,10, 11,12). En otras ocasiones se originan por biosíntesis de novo, a partir de acetyl Co-A.

En general, se considera que los métodos para realizar estudios en productos naturales marinos, son los mismos que para los terrestres. Sin embargo, en los primeros la investigación realizada hasta ahora es comparativamente menor en relación a sus homólogos terrestres, debido principalmente a problemas tales como: recolección del material, separación y purificación de los productos, inestabilidad de los mismos y las pequeñas concentraciones en que éstos suelen presentarse. A pesar de ello se han incrementado los esfuerzos en la búsqueda de metabolitos secundarios, tanto por su interés químico como por su aplicación en distintas áreas de la biología y farmacología.

Hasta ahora se han realizado varios estudios de la flora y

fauna marina. Entre ellos destacan las realizadas con las algas rojas de los géneros Plocamium y Laurencia y de la vasta División de invertebrados, las esponjas son las que más han atraído la atención de los químicos.

II. ASPECTOS GENERALES DE LAS PORIFERAS

Del Phylum Porífera se han descrito aproximadamente 10.000 especies. Ocupan una de las posiciones más bajas dentro de la escala zoológica, por lo que se dice que entre los organismos multicelulares (13) son animales bastante primitivos. Se caracterizan por tener una organización relativamente simple, ya que carecen de tejidos y órganos verdaderos; son sésiles y viven exclusivamente en aguas saladas, salvo una familia que es dulceacuícola. Las esponjas abundan en zonas donde existen rocas, conchas, maderas sumergidas o corales, los cuales son usados como sustrato. Una minoría de especies viven sobre arenas blandas, movedizas o en fondos lodosos. La mayoría habita en aguas superficiales, mientras que las otras se encuentran en aguas profundas como es el caso de las esponjas vítreas. Se alimentan de detritus y organismos del plancton que llegan a ellas por las corrientes, como ocurre con protozoos, diatomeas y bacterias.

Las esponjas en nuestro país, se distribuyen a lo largo de todo el litoral chileno, llegando hasta la Antártica. Recientemente R. Desqueyroux y M. Moyano (14) han publicado un estudio sobre esponjas, que incluye 28 familias de Demospongiae distribuídas desde Arica hasta el Cabo de Hornos, incluyendo el Archipiélago de Juan Fernández.

1. CLASIFICACION DE LAS PORIFERAS

Las esponjas tienen una extraordinaria diversidad filogenética y tradicionalmente se han agrupado según el tipo de esqueleto que presentan, distinguiéndose tres Clases (13,15):

1) Calcárea o Calcispongiae: Poseen espículas de carbonato de calcio, monoaxónicas con tres o cuatro prolongaciones. La mayoría son pardogrisáceas y de unos diez cm de longitud. Se encuentran generalmente en aguas costeras, en zonas relativamente superficiales.

2) Hexactinélida o Hyalospongiae. Se les conoce también como esponjas vítreas. Tienen espículas silíceas, triaxónicas o de seis radios. Son las más simétricas y especializadas de las esponjas. Tienen una altura media de 10 a 30 cm y coloración pálida. Son principalmente de aguas profundas y tropicales.

3) Demospongiae: Incluye el mayor número de especies más comunes y conocidas del mundo. Pueden o no tener esqueletos de espículas silíceas, de espongina, o de ambas sustancias. Cuando existen espículas, éstas son generalmente mono o tetraxónicas pero no triaxónicas.

Las clases Calcárea y Demospongiae han sido las más estudiadas por los químicos de productos naturales. En la Tabla 1 vemos una de las más recientes clasificaciones de la Clase Demospongiae, publicada por P. R. Bergquist and R. J. Wells (16). Esta tabla involucra la mayor cantidad de órdenes, géneros y familias conocidas del mundo, basados en estudios previos, realizados principalmente por Levis en 1973, Bergquist (1978 y 1980) y Wiedenmayer en 1977, los cuales incluyen no sólo las características del esqueleto, que presentan bastantes imperfecciones, sino también características reproductivas, bioquímicas, histológicas y ultraestructurales.

TABLA 1

Subdivisión de la Clase Demospongiae

SUBCLASE	ORDEN	FAMILIA	GENERO
Homoscleromorpha	Homosclerophorida	Oscarellidae	<u>Oscarella</u> , <u>Octavella</u>
		Plakinidae	<u>Plakina</u> , <u>Plakortis</u>
Tetractinomorpha	Choristida	Stellettidae	<u>Stelletta</u> , <u>Ancorina</u>
		Geodidae	<u>Geodia</u> , <u>Rhabdosrella</u> , <u>Erylus</u>
		Calthropellidae	<u>Calthropella</u>
		Pachastrellidae	<u>Pachastrella</u> , <u>Dercitus</u>
		Theneidae	<u>Thenea</u>
		Thrombidae	<u>Thrombus</u>
		Jaspidae	<u>Asteropus</u> , <u>Jaspis</u>
		Tetillidae	<u>Tetilla</u> , <u>Cinachya</u> , <u>Paratetilla</u>
		Suberitidae	<u>Suberites</u> , <u>Terpios</u>
		Polymastidae	<u>Polymastia</u> , <u>Sphaerotylus</u>
		Spirastrellidae	<u>Spirastrella</u> , <u>Spherospongia</u>
		Clionidae	<u>Cliona</u> , <u>Thoosa</u>
		Placospongiidae	<u>Placospongia</u>
		Tethyidae	<u>Tethya</u> , <u>Kaptos</u> , <u>Xenospongia</u>
		Chondrosiidae	<u>Chondrosia</u> , <u>Chondrilla</u>
		Stylocordylidae	<u>Stylocordyla</u> , <u>Plethycordyla</u>
		Timeidae	<u>Timea</u> , <u>Juplastrella</u>
Latrunculidae	<u>Latrunculia</u> , <u>Sigmoscepterella</u>		
Axinellidae	<u>Axinella</u> , <u>Ceratopison</u> , <u>Phakellia</u> , <u>Auleta</u> , <u>Acanthella</u> , <u>Pilocaulis</u> , <u>Pararaphoxya</u> , <u>Pseudaxinella</u> , <u>Hoxinella</u> , <u>Bubaris</u>		
Ceractinomorpha	Halichondrida	Trachycladidae	<u>Trachycladus</u>
		Hemiassterellidae	<u>Hemiassterella</u> , <u>Adreus</u> , <u>Paratimea</u>
		Deomoxylidae	<u>Deomoxya</u> , <u>Hirginsia</u> , <u>Myrmecloderma</u>
		Sigmaxinellidae	<u>Sigmaxinella</u> , <u>Sigmaxia</u>
		Rhabderemidae	<u>Rhabderemia</u>
		Raspallidae	<u>Raspallia</u> , <u>Eurypon</u> , <u>Cyamon</u> , <u>Ectyoplasia</u> , <u>Echinodictyum</u>
		Apelasidae	<u>Apelas</u>
		Halichondriidae	<u>Halichondria</u> , <u>Trachyopsis</u> , <u>Ciocalyptha</u>
		Hymeniacionidae	<u>Hymeniacion</u> , <u>Stylinos</u> , <u>Ulosa</u>

SUBCLASS	ORDER	FAMILY	GENERO
	Poecilosclerida	Mycalidae Hamacanthidae Cladorhizidae Siemnidae Desmacionidae.	<u>Mycale</u> , <u>Paraesperella</u> , <u>Zygomycale</u> <u>Hamacantha</u> , <u>Pozziella</u> <u>Cladorniza</u> , <u>Chondrociadia</u> <u>Siemna</u> , <u>Desmacella</u> , <u>Vylodesma</u> <u>Desmacion</u> , <u>Esperiopsis</u> , <u>Homeodic-</u> <u>tya</u> , <u>Neobibularia</u> , <u>Guitarra</u> , <u>Echinostylinos</u> , <u>Srambe</u>
		Coelosphaeridae Crellidae Myxillidae	<u>Inflatella</u> , <u>Amphiastrella</u> <u>Crella</u> , <u>Grayella</u> <u>Myxilla</u> , <u>Ectomyxilla</u> , <u>Lissodendoryx</u> , <u>Lochon</u>
		Tedanidae Kymedesmiidae Anchinoidae Clathriidae	<u>Tedania</u> <u>Kymedesmia</u> , <u>Stylopus</u> <u>Anchinoe</u> , <u>Pronax</u> , <u>Hamigera</u> <u>Clathria</u> , <u>Microciona</u> , <u>Gphlitaspongia</u> <u>exociella</u>
	Nepheliospongiida	Nepheliospongiidae	<u>Petrosia</u> , <u>Aestospongia</u> , <u>Strongy-</u> <u>lopora</u>
	Haplosclerida	Oceanapiidae Halicionidae Callyspongiidae Adocidae Spongiillidae Potamolepidae Lumbomirskiidae Spongiidae	<u>Oceanapia</u> , <u>Calyx</u> <u>Haliciona</u> <u>Callyspongia</u> , <u>Dactylia</u> <u>Agocia</u> , <u>Sigmadocia</u> <u>Spongiilla</u> , <u>Sphyrdatia</u> <u>Potamolepis</u> <u>Lumbomirskia</u> <u>Spongia</u> , <u>Hippospongia</u> , <u>Phyllospongia</u> , <u>Leiosella</u> , <u>Carterospongia</u> , <u>Lenden-</u> <u>feldia</u>
	Dictyoceratida	Thorectidae	<u>Cacospongia</u> , <u>Hyrtilos</u> , <u>Ircinia</u> , <u>Sarco-</u> <u>tragus</u> , <u>Thorecta</u> , <u>Thorectandra</u> , <u>Maonura</u> , <u>Fasciospongia</u> , <u>Aplysino-</u> <u>sis</u> , <u>Smenospongia</u>
		Dysideidae Aplysillidae	<u>Dysidea</u> , <u>Euryospongia</u> <u>Aplysilla</u> , <u>Pteraplysilla</u> , <u>Chelonaplysi-</u> <u>lla</u> , <u>Dendrilla</u> , <u>Darwinella</u>
	Dendroceratida	Dictyodendrillidae Haliscaridae Aplysinidae Aplysinellidae Lanthellidae	<u>Igernella</u> , <u>Dictyodendrilla</u> <u>Haliscara</u> <u>Aplysinia</u> , <u>Verongula</u> <u>Pseudoceratina</u> , <u>Sammaplysilla</u> <u>Lanthella</u>
	Verongida		

2. ASPECTOS QUIMICOS Y BIOLOGICOS DE LAS PORIFERAS

Aquellas esponjas particularmente sin espículas, como las pertenecientes a la Clase Demospongiae, generalmente producen grandes cantidades de metabolitos secundarios, cuya principal función en el medio marino es actuar como antipredadores o inhibidores del crecimiento de organismos vecinos. Vale decir, actúan como mecanismo de defensa (17,18,19,20,21), fenómeno frecuente en algunos invertebrados marinos (22,23,24), resultado de un proceso evolutivo como respuesta a la predación.

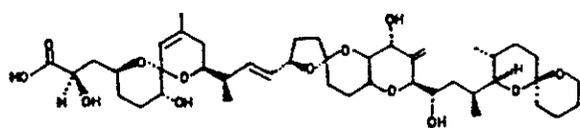
Debido a que muchos invertebrados contienen organismos simbióticos, es algo incierto el verdadero origen de sus metabolitos. Se ha demostrado que la mayoría de ellos son producidos en células especializadas de los animales hospederos, sin embargo en casos excepcionales (5), las evidencias sugieren que estas sustancias son producidas por organismos simbióticos e incorporados con o sin modificaciones en las esponjas. En todo caso, para determinar el origen exacto de los compuestos en estudio, es necesario realizar experimentos biosintéticos que excluyan dichas interacciones.

Las esponjas continúan siendo uno de los más interesantes organismos marinos de los que se obtienen metabolitos secundarios con importantes funciones biológicas (25) y farmacológicas (26), como se ilustra en la Tabla 2.

TABLA 2

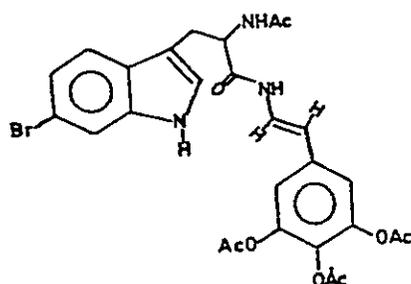
Funciones biológicas de algunos metabolitos de esponjas.

Fórmula Estructural'	Actividad Biológica	Referencia
----------------------	---------------------	------------

gén. Halichondria

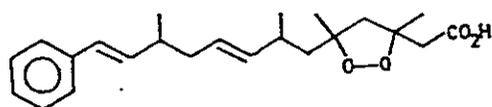
citotóxico

25

Cliona celata

antibiótico

27

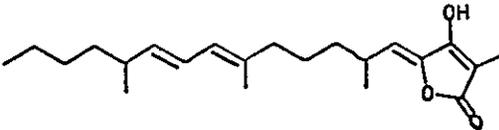
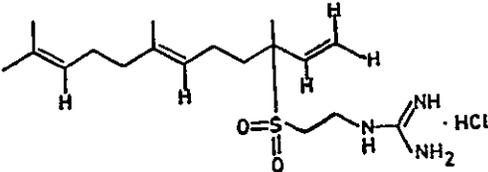
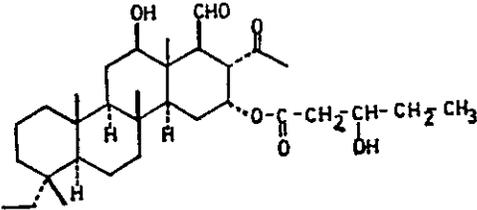


Fam. Plakinidae

fungicida

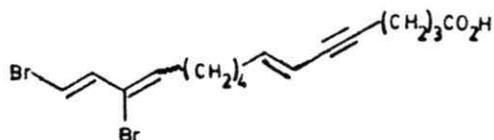
28

Continuación Tabla 2

<u>Fórmula Estructural</u>	<u>Activ. Biol.</u>	<u>Refer.</u>
	inhibidor de división celular en huevo ferti- lizado.	29
<u>Cacospongiae scalaris</u>		
	antiespasmódico	30
<u>Agelas sp</u>		
	anti-inflamatorio	31,32
<u>Phyllospongia foliascens</u>		

Continuación Tabla 2^a

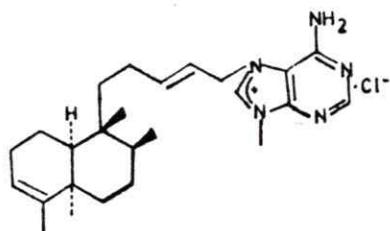
Fórmula Estructural Activ. Biológ. Refer.



Xestospongia muta

antitumoral

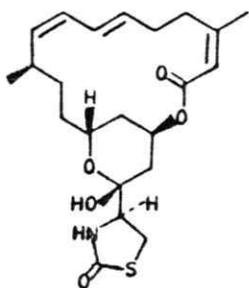
- 5,26



Agelas sp

antimicrobiano, e-
fecto inhibitorio
sobre Na,K,ATP asa

33



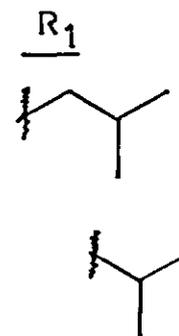
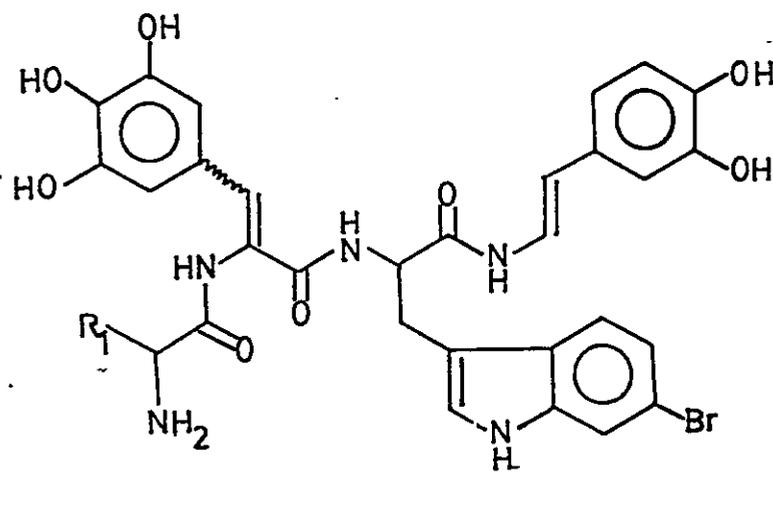
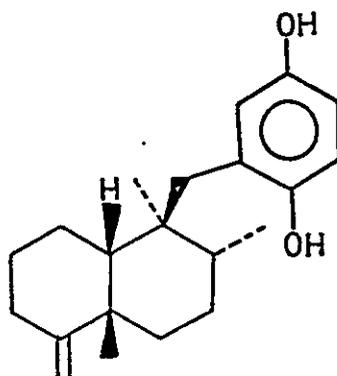
Latruncularia magnifica ictiotoxina

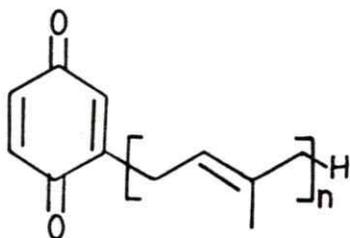
5,34

En general, la composición química de las Poríferas es bastante diversa, conociéndose hasta el momento casi un millar de compuestos aislados de estos animales, entre los cuales podemos mencionar: derivados fenólicos (16), ácidos carboxílicos (16) incluyendo ácidos grasos (35), peróxidos cíclicos (36), derivados bromopirrólicos (37), quinonas (38), hidroxiquinonas (39), alcaloides (40,41), derivados de bromotirosina (42,16), y una gran cantidad de esqueletos de origen terpénico como sesquiterpenos (43), diterpenos (44,45), furanoterpenos (46), lactonas diterpénicas (47), sesterterpenos (48,49), carotenos (50), etc. Algunos de estos metabolitos pueden verse en el Esquema 1 con sus respectivas referencias y nombre de la (s) esponja (s) de donde se han aislado.

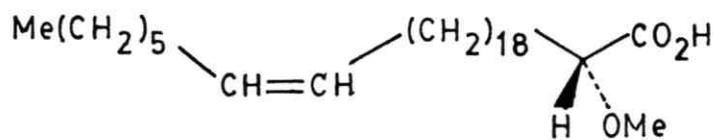
ESQUEMA 1.

Diferentes metabolitos aislados de esponjas

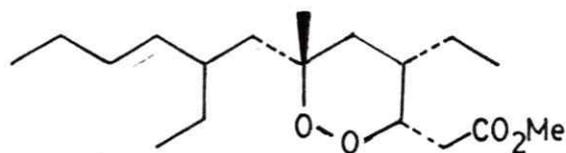
Cliona celata (51)Dysidea arenaria (52)



Ircina spinosula (53,54)



Higginsia tethyoides (5,35)



Plakortis halichondrioides (36)

Para clasificar las esponjas de acuerdo a su composición química, no existe un patrón único de compuestos, ya que se han hecho estudios quimiotaxonómicos considerando diferentes tipos de metabolitos (55,56,57,58,59,60,16). Ultimamente, los esteroides han recibido especial atención, fundamentalmente por su amplia distribución en el Phylum.

ESTEROLES

Los esteroides naturales (del griego stereos= sólido), se encuentran muy difundidos tanto en el ambiente marino como terrestre (61). Pueden presentarse en forma libre o esterificados con ácidos alifáticos o como glicósidos. Se encuentran en vegetales (ej.: β -sitosterol, Fig.1), en animales (ej. colesterol, Fig.2) y también en hongos (ej.: ergosterol, Fig.3). Se forman por condensaciones de 6 unidades de isopreno (Fig.4). El esqueleto fundamental es el ciclopentanoperhidrofenantreno, mostrado en la Fig.5; el R en el C-17 corresponde a una cadena lateral formada por 8 a 10 átomos de carbono, la cual frecuentemente puede sostener un grupo metilo (serie del ergostano) o un grupo etilo (serie del stigmastano), especialmente en el C-24. Si aparece un grupo metilo en los carbonos 4 o 14, reciben el nombre de metilesteroides.

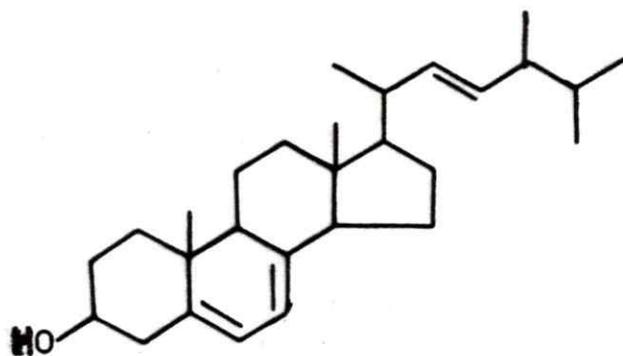


Fig. 3. Ergosterol

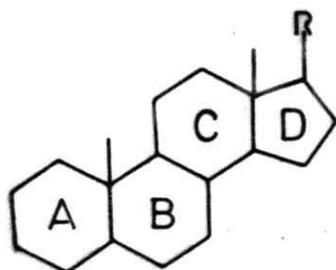
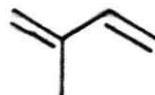
Fig. 5. Ciclopentano-
perhidrofenantreno

Fig. 4. Isopreno

El continuo interés en los esteroides de organismos marinos comenzó con los estudios de Henze y Dorée (62), los cuales revelaron que aparte del colesterol, el cual se estableció era el esteroide predominante en mamíferos, y cuya estructura aún no se conocía, las esponjas contenían otros esteroides; este interés se mantuvo con los estudios en algas y principalmente con la clásica investigación de Bergmann (55), que fue realmente la que cimentó la importancia del estudio de esteroides que hoy se realiza en invertebrados marinos.

Aunque hace pocos años se pensaba que la investigación en este campo estaba prácticamente concluida en lo que se refiere a estructuras químicas, aislamiento de compuestos nuevos, biosíntesis y funciones biológicas, recientemente ha sido debatido este planteamiento ya que se han extraído numerosos nuevos esteroides de organismos marinos (63,64,65), los cuales presentan variaciones estructurales no detectadas en plantas terrestres, abriendo así nuevas interrogantes en cuanto a su biosíntesis y funciones biológicas (66,67,68).

a) Distribución

Los esteroides se han encontrado en un gran número de especies y probablemente estén presente en todas las

angiospermas y gimnospermas. Existen también, en musgos, hierbas, helechos, líquenes, hongos, algas, bacterias, etc.

Todos los tejidos de las plantas se consideran potenciales sintetizadores de esteroides, sin embargo, su grado de síntesis depende del tipo y edad del tejido (69).

Durante muchos años se consideró que el colesterol era exclusivo de los animales, pero más tarde se encontró también en muchos tejidos vegetales, y actualmente se ha comprobado que existe en todos los órganos de las plantas, especialmente en las semillas.

b) Biosíntesis

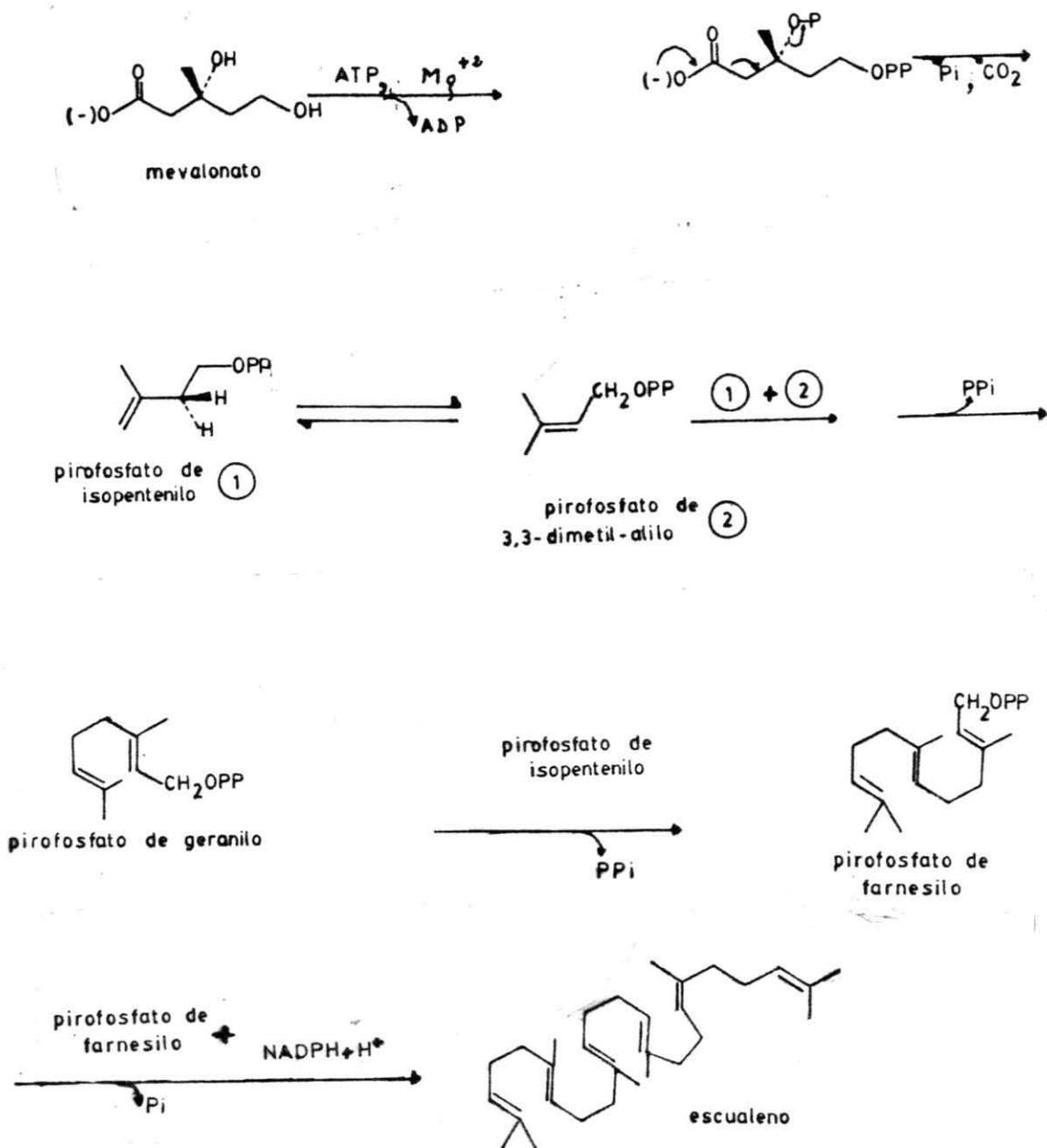
Los esteroides (70) se biosintetizan por la misma ruta mediante la cual se da origen a los terpenos, en la que se distinguen dos etapas importantes que son:

- i) Biosíntesis del escualeno.
- ii) Ciclación del escualeno.

i) Biosíntesis del escualeno

Esta ruta (Esquema 2), es generada por la conocida vía del acetato, acetoacetato, ácido hidroximetilglutárico, ácido mevalónico, pirofosfato de isopentenilo, pirofosfato de 3,3-

dimetilalilo, pirofosfato de geranilo, y por último dos unidades de farnesilo para terminar en la formación del escualeno. El mecanismo propuesto para este proceso, involucra necesariamente la presencia de enzimas.



ESQUEMA 2. Biosíntesis del escualeno.

ii) Ciclación del escualeno

El escualeno formado originalmente por dos unidades de pirofosfato de farnesilo, es el precursor fundamental de los esteroides que dan origen al sistema ciclopentanoperhidrofenantreno, a partir del epóxido de escualeno (Fig.6); éste es el intermediario en las rutas biosintéticas de plantas y animales, diferenciándose éstas en la formación del cicloartenol en plantas (Fig.7) y del lanosterol en animales (Fig.8).

La ciclación es estereoespecífica. Johnson (71) propone un mecanismo de cierre concertado, que se inicia con la protonación del epóxido de escualeno, generando un centro catiónico en el C-2, el cual ataca el enlace olefínico de los carbonos 6 y 7, iniciando la formación del enlace sigma 2,7. Paralelamente el centro catiónico que se forma en el C-6, comienza un ataque electrofílico sobre el enlace olefínico 10-11, generando el enlace sigma 6-11 y así sucesivamente.

Tanto en plantas como en animales las etapas de ciclación y oxidación ocurren separadamente. La formación del anillo esteroideal tetracíclico se lleva a cabo mediante un reordenamiento molecular, con migración de dos átomos de hidrógeno y de los metilos del C-8 al C-14 y del C-14 al C-13, como se ve en el Esquema 3.

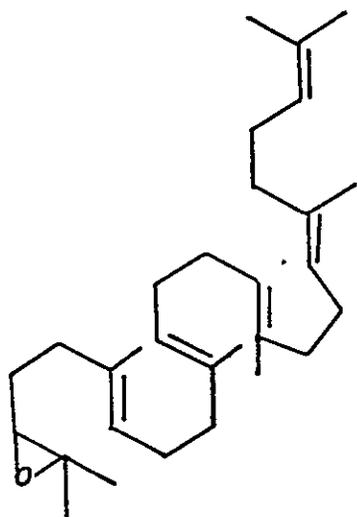


Fig. 6. Epóxido de escualeno

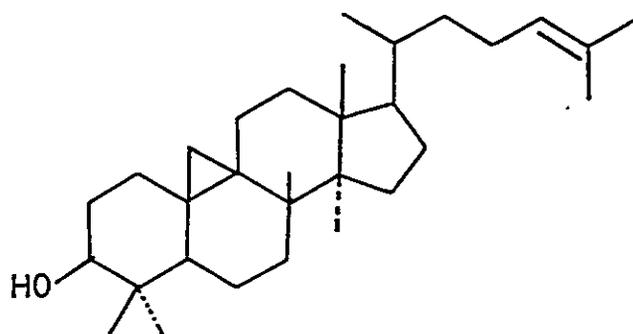


Fig. 7. Cicloartenol

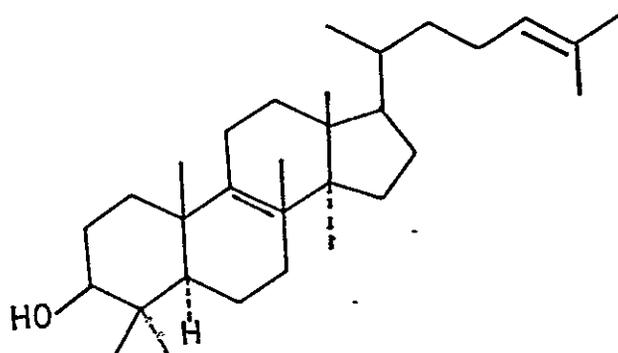
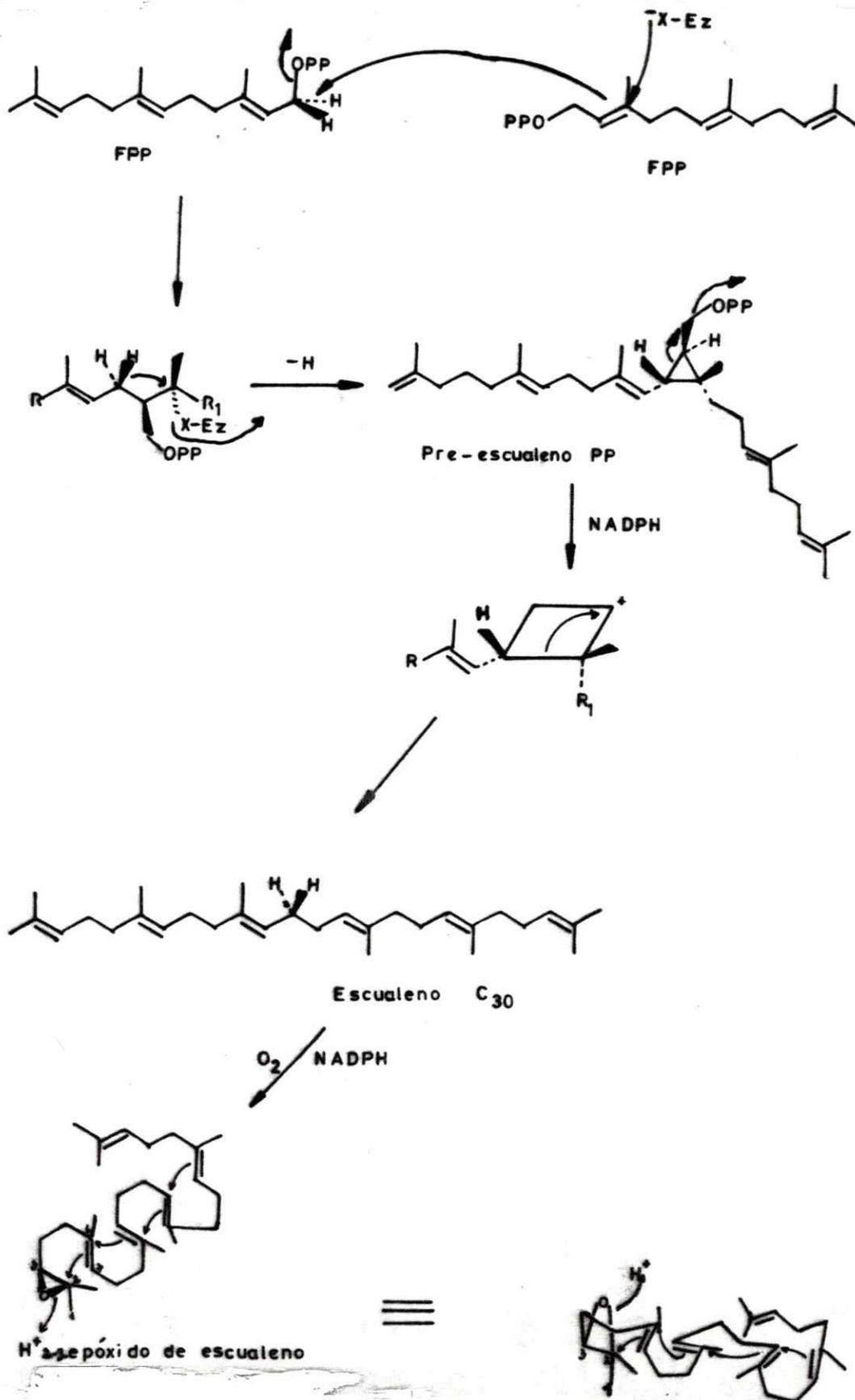
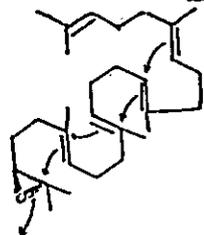


Fig. 8. Lanosterol

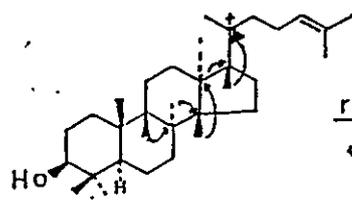
ESQUEMA 3:

Ciclación del escualeno

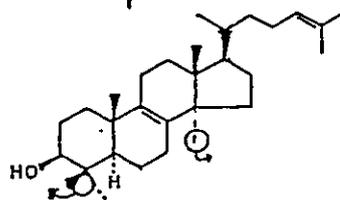




2,3-epóxido de escualeno

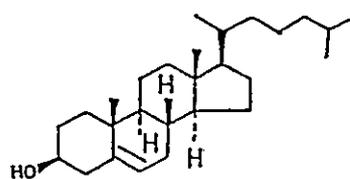


reordenamiento



lanosterol

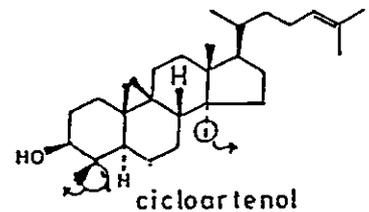
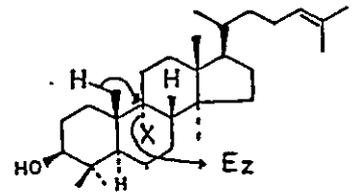
- 3 Me
reducción



colesterol

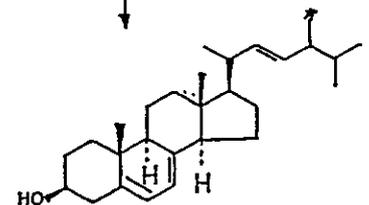
hormonas sexuales
ácidos biliares, Vit. D

reordenamiento
+ E_z X[⊖]

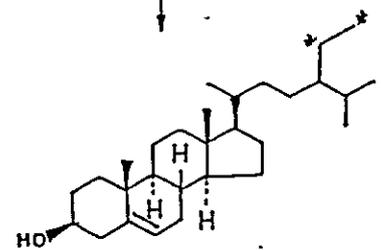


cicloartenol

- 3 Me
+ Me* desde metionina



ergosterol



sitosterol y otros
fitoesteroles

El grupo 3β -hidroxilo deriva del oxígeno atmosférico y no del agua. El paso de escualeno a 2,3-óxido de escualeno es catalizado por una epoxidasa ubicada en los microsomas, cuyos requerimientos son NADPH y oxígeno molecular. La conversión del 2,3-óxido de escualeno a cicloartenol es anaeróbica, y está catalizada por una ciclasa también de localización microsomal. Ambas enzimas son específicas para estas reacciones.

Algunos experimentos realizados con precursores de esteroides radioactivos, sugieren que el cicloartenol es un punto de ramificación no sólo para la biosíntesis del colesterol, sino también para la síntesis de otros importantes fitoesteroides (69).

c) Esteroles marinos

El origen de los esteroles marinos es bastante incierto, y hasta ahora no se han racionalizado sus rutas biosintéticas y funciones biológicas. Se han hecho algunos estudios experimentales (72) proponiéndose ciertas rutas, según las cuales el origen de estos metabolitos sería por uno de los siguientes procesos:

- 1) Biosíntesis de novo a partir de acetil-CoA, ácido mevalónico y escualeno.
- 2) Incorporación a partir de la dieta sin sufrir cambios químicos posteriores.
- 3) Absorción de la dieta con modificaciones químicas.
- 4) Relaciones simbióticas entre un huésped animal y un simbiote (ej. algas, hongos o bacterias).

Algunos esteroles de la dieta presentan características estructurales muy típicas semejantes a las presentadas por los contribuyentes específicos dentro de la cadena alimenticia, por ejemplo: los esteroles con la cadena lateral del 24-nor-colesterol (Fig.9), cuyo origen casi siempre es fitoplanctónico.

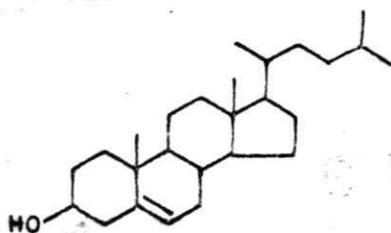
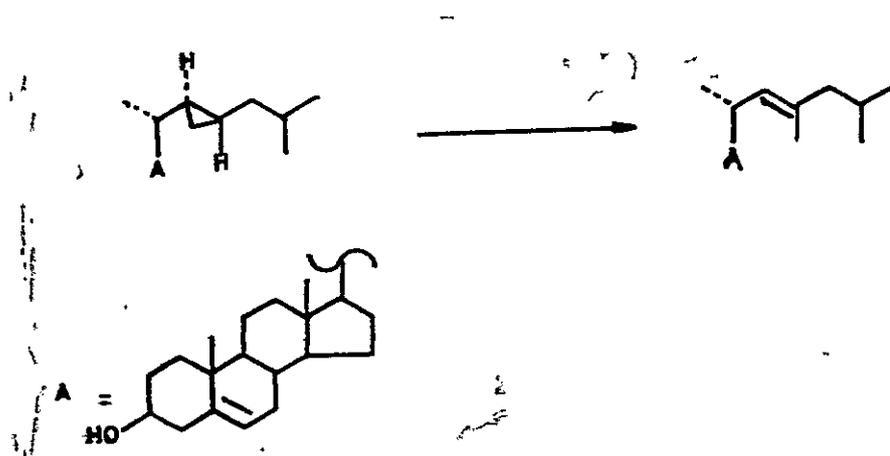


Fig. 9. 24-nor-colesterol

Al contrario del 24-nor-colesterol, el aislamiento de esteroides del tipo colesterol, cuyas cadenas laterales no están sustituidas o tienen una sustitución de uno o dos átomos de carbono en el C-24, sólo ocasionalmente son de origen dietético.

Los esteroides cuyas cadenas laterales llevan un metilo en el C-23, han sido aislados de organismos marinos como algas y corales. Su posible origen ha sido bastante cuestionado y finalmente se sugirió en forma más acertada, que existiría una isomerasa capaz de convertir el ciclopropano de la cadena lateral, en el 23-metil-esterol del tipo Δ^{22} (Esquema 4).



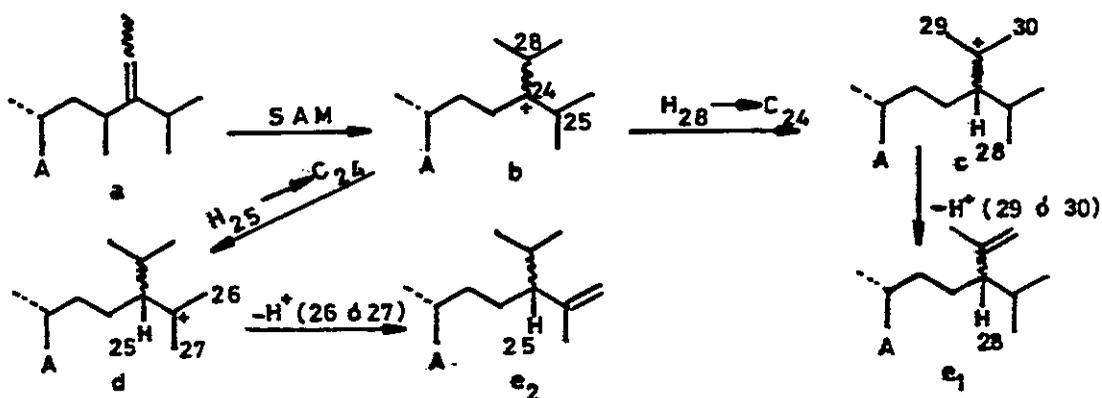
ESQUEMA 4

En los esteroides marinos existen dos características exclusivas:

- i) La bioalquilación en las posiciones 22 y 23 de la cadena lateral.

ii) La existencia de cadenas laterales más largas que se han formado por metilaciones triples o cuádruples.

Desde el punto de vista biosintético, los esteroides del tipo C-30, C-31 pueden derivarse de precursores como $\Delta^{24(28)}$ y Δ^{25} . En el primer caso los esteroides con 30 átomos de carbono son aquellos que tienen isopropilo o isopropenilo en la cadena lateral, los cuales se formarían por metilaciones con S-adenosín metionina (SAM), en el C-28 de un esteroide simple como fucosterol o isofucosterol (a). Posteriormente la migración del hidrógeno del C-28 o del C-25, forman los isómeros e_1 y e_2 respectivamente como se ilustra en el Esquema 5.



ESQUEMA 5

Los compuestos cuyo precursor es el Δ^{25} , son estructuralmente más interesantes, ya que comprenden todos los esteroides aislados recientemente con cadenas laterales más largas que aquellas

existentes en los esteroides convencionales del tipo colesterol.

Se caracterizan en que la cadena lateral sufre una elongación a través de una alquilación de los C-26 y/o C-27. Los únicos precursores biosintéticos serían codisterol (Fig.10) y clerosterol (Fig.11), los cuales han sido encontrados en algas.

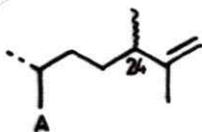


Fig. 10

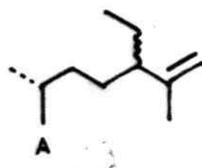


Fig. 11

Los compuestos mutasterol, 25-metilxestosterol y xestospongesterol (Fig.12,13,14 respectivamente), obtenidos de la esponja Xestospongia muta, presentan un carbono cuaternario en la cadena lateral, originado por cuatro metilaciones dando esteroides C-30 y C-31 (72).

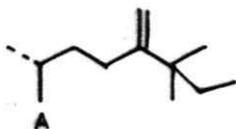


Fig. 12

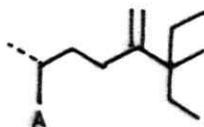


Fig. 13

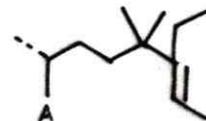
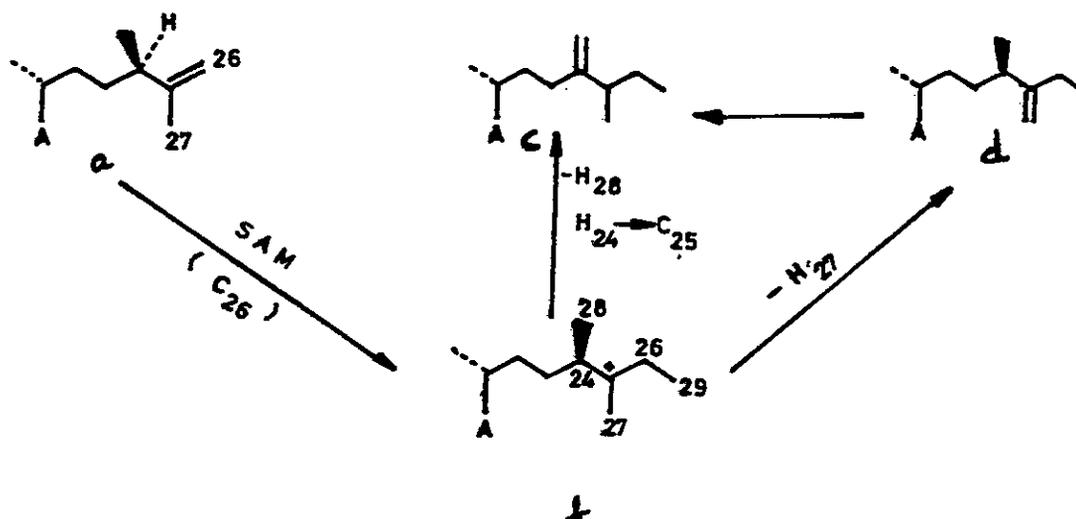


Fig. 14

El proceso de metilación de los esteroides en el carbono cuaternario, puede ocurrir a través de un mecanismo ilustrado en el Esquema 6.



ESQUEMA 6

El mecanismo ilustrado en el Esquema 6 involucra:

- a) Etapa de metilación (SAM) del doble enlace (Ej. a \rightarrow b).
- b) Eliminación de un protón desde el carbono adyacente al ion carbonio resultante (b \rightarrow d).
- c) Migración 1,2 de un hidrógeno terciario a un carbono terciario, seguido por pérdida de un protón (b \rightarrow c).
- d) Migración del doble enlace tal vez por hidrogenación bioquímica (d \rightarrow c).

La aparición del núcleo 3 β -hidroximetil-A-nor-esterano (Fig.15), es una evidencia clara de que en las esponjas ocurren modificaciones químicas en los esteroides, posteriores a su incorporación desde la dieta.

En el estudio realizado por C. Djerassi (72), se analizaron 5 esponjas de la fam. Axinellidae, comprobándose que contenían casi exclusivamente A-nor-esteroides, mientras que dos miembros de la fam. Hymeniacidonidae, tenían además esteroides Δ^5 o 5- α -saturados. Estas observaciones se consideran de utilidad taxonómica en esta familia de esponjas.

Se observó también que casi la mayoría de los A-nor-esteroides con cadenas laterales convencionales y no convencionales han sido encontrados en estas esponjas, demostrando que ellas tienen un sistema enzimático eficiente que puede transformar los esteroides originados en algunos miembros de la cadena alimenticia, a un tipo de esteroide modificado.

La ausencia de esteroides con núcleos convencionales en algunas de las Axinellidae, sugieren que los A-nor esteroides reemplazan a los esteroides con el núcleo de colesterol, como constituyente de la membrana celular.

P. R. Bergquist (56) comenta que los Δ^7 -A-nor-esteroides presentes en cantidades trazas en las esponjas, provienen de

otro eslabón de la cadena alimenticia, ya que se ha encontrado en forma abundante la insaturación del tipo Δ^7 en estrellas de mar, peces y holoturias (73).

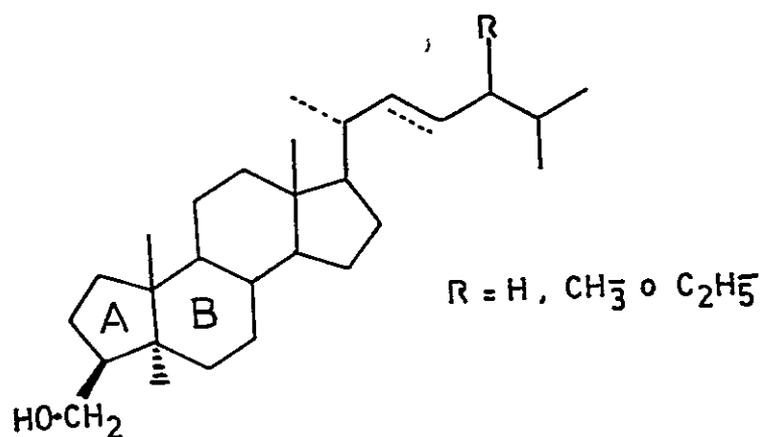


Fig. 15 : 3 β -hidroximetil-A-nor-esterol

Para determinar el posible origen simbiótico de los esteroides, se realizó un estudio con gorgonias (Celenterados) taxonómicamente diferentes entre sí, las cuales presentan grandes cantidades de gorgosterol (Fig.16) y 23-demetil-gorgosterol (Fig.17). Estos organismos contienen algas simbióticas conocidas como zooxantelas, de modo que el estudio se centró en investigar el verdadero origen de los esteroides 16 y 17 (72).

Se observó que al vivir ambas especies juntas, producían en forma abundante el núcleo esteroide A, 3- β -hidroxi del tipo Δ^5 . En cambio al cultivar zooxantelas solas, se vió que estas producían casi exclusivamente el núcleo B, 4- α -metil-3 β -hidroxi-5 α -esterol, (Ver Esquema 7).

Una posible explicación a este fenómeno fue que:

-gorgosterol y otros esteroides afines no eran sintetizados por zooxantelas.

Al realizar cultivos con zooxantelas, se vió que contenían grandes cantidades de dinosterol (Fig. 18), un posible precursor del gorgosterol, el cual podía ser convertido por el huésped en el núcleo A. Esto constituiría la primera vez que se introduce un enlace doble, en el C-5 de un núcleo 4- α -metil saturado.

En los cultivos de zooxantelas C. Djerassi (72) encontró también pequeñas cantidades del núcleo 4- α -metil-3- β -hidroxi

del tipo Δ^5 (C), cuya cadena lateral es la del dinosterol.

Por lo tanto, se pensó que el núcleo A se origina más probablemente a partir de C que de B. (Ver Esquema 7).

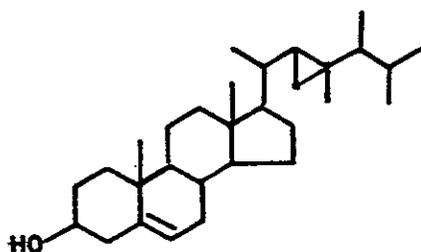


Fig. 16. Gorgosterol

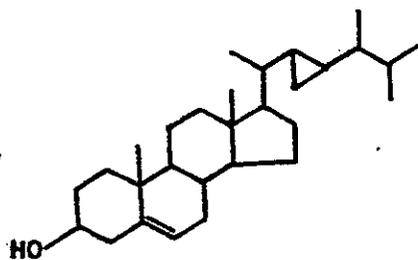
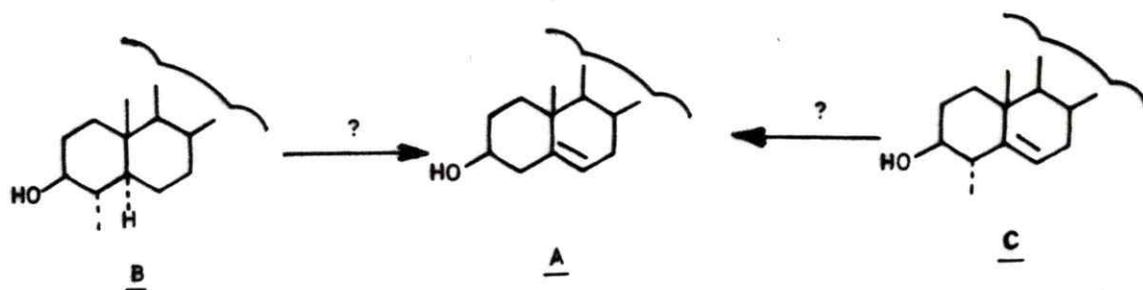


Fig. 17. 23-demetil-gorgosterol



ESQUEMA 7: Posible origen del núcleo
 3β -hidroxi- Δ^5

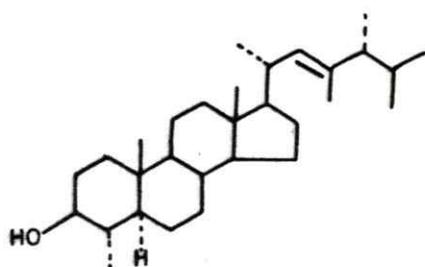


Fig. 18. Dinosterol

-Tal vez otra alternativa, la cual no excluye lo anterior, es que las zooxantelas sintetizen diferentes esteroides, dependiendo si viven solas o en simbiosis con un huésped.

La mayoría de estos esquemas biogénicos corresponden a especulaciones que se han formulado en base a estudios realizados y sólo algunos, como el caso del 3β -hidroximetil-A-nor-esterano y el de las gorgonias, han sido comprobados biosintéticamente (72).

d) Comparación de esteroides terrestres y marinos

Los esteroides de origen terrestre presentes en plantas y animales, difieren de los esteroides marinos en la sustitución del C-24 (Fig.19), sin considerar insaturaciones y estereoquímica de la cadena lateral. El R_0 corresponde a un hidrógeno, en esteroides producidos por animales terrestres, y a cadenas de uno o dos carbonos en plantas terrestres.

El caso de los esteroides marinos es bastante diferente (Fig.20), ya que existen al menos cinco sitios posibles de alquilación (C-22, C-23, C-24, C-26 y C-27) y cuatro centros probables para la formación de un ciclopropano, representado por línea punteada.

Dentro de los esteroides marinos se han encontrado compuestos del tipo $3-\alpha$ -hidroxi, los cuales no han sido detectados en

esteroles terrestres. Lo mismo ocurre con el núcleo A-nor-esterano (74,75), hasta ahora exclusivo de organismos marinos y que fue discutido anteriormente.

Así vemos que la complejidad y diversidad de esteroles en organismos marinos, es mucho mayor que en especies terrestres.

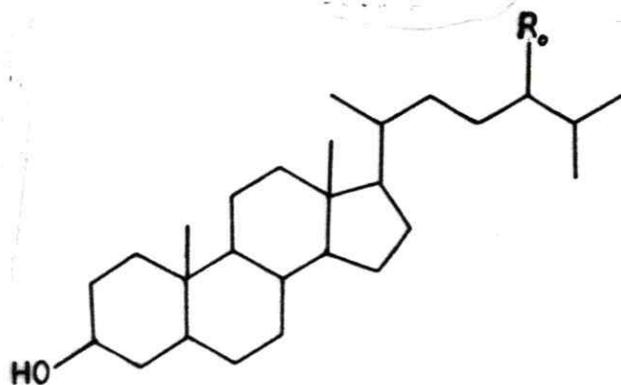
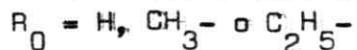


Fig. 19. Estructura general o más común de un esteroI terrestre.



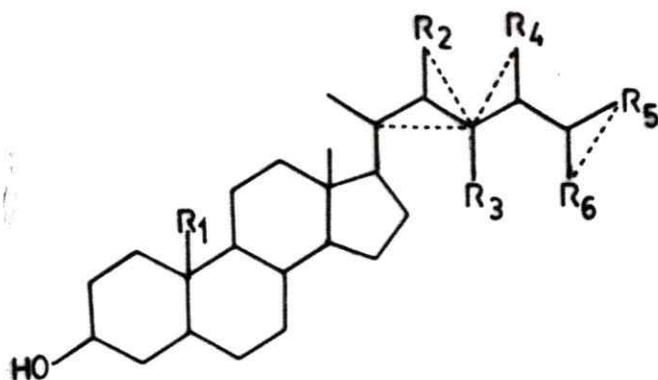


Fig. 20. Estructura más común o general de un esteroide marino.

$R_1, R_2, R_3 = H, CH_3-$ y a veces como carbono ciclopropílico.

$R_4 = H, CH_3-, C_2H_5-, n\text{-propil, isopropilo}$ o como carbono isopropílico.

$R_5, R_6 = H, CH_3-, C_2H_5-,$ o carbono isopropílico.

e) Papel de los esteroides en los animales

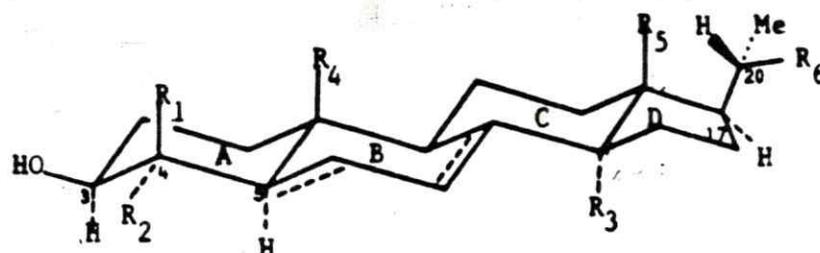
Estos metabolitos constituyen la materia prima fundamental de compuestos biológicamente activos, transformándose así en estructuras esenciales para el mantenimiento de los seres multicelulares.

Se cree que esta función de los esteroides pudo haber sido clave en la evolución de los eucariontes, hecho basado en la existencia de un extraordinario número de esteroides, derivados de un precursor común y que poseen una sorprendente diversidad de funciones biológicas, encontrándose involucrados en importantes procesos como: metabolismo del calcio (Vit.D), digestión (ácidos biliares), mecanismo de muda en artrópodos (ecdisonas) (70), venenos (saponinas en insectos venenosos), reproducción en hongos (anterioridio y oogonio) (76), regulación iónica y reproducción en mamíferos (hormonas). A diferencia de lo anterior, existen otros esteroides en la naturaleza con funciones desconocidas como por ejemplo esteroides polihidroxilados provenientes de especies marinas.

Sabiendo que el primer sitio de interacción célula-célula y célula-medio ambiente, corresponde precisamente a la membrana plasmática, resulta entonces interesante conocer el mecanismo de acción de los esteroides a este nivel. Por ello se han hecho numerosos estudios e investigaciones al respecto, dando como

resultado una serie de generalizaciones en relación a los requerimientos estructurales que deben tener estos compuestos, para cumplir con tan importante función, los cuales se han obtenido fundamentalmente en base al colesterol, aunque éste no es el esteroles predominante en todos los organismos marinos. Existen numerosos ejemplos de esteroides marinos que contradicen dichos requerimientos (Tabla 3) (66).

TABLA 3. Requerimientos estructurales de los esteroides para estabilizar la membrana celular (66),



Requerimientos

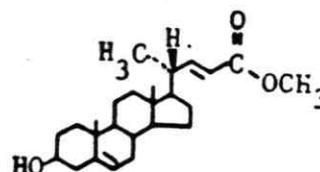
Excepciones (esteroides marinos)

1. Núcleos esteroidales planos
La fusión de los anillos A/B y C/D debe ser trans

5 β -estanoles, 21
- por ser componente minoritario, probablemente sin función en la membrana

2. Configuraciones 20 R y 17 β
(20-S fuerza a la cadena lateral del esteroide a salir fuera del plano del núcleo)

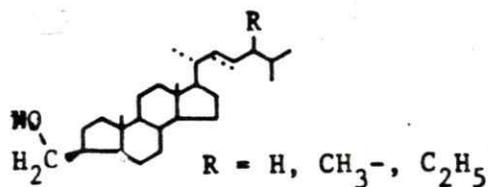
- 20-S-isoesteroides, por ejemplo del Ptilosarcus gurneyi



- no estabiliza la membrana

3. Grupo 3 β -hidroxilo
(3 α -hidroxi, 3-ceto y ésteres de ácidos grasos en C-3, no presentan rol en la membrana)

A nor esteroides



- en ausencia de esteroides convencionales
- componente(s) mayoritario(s), por lo que probablemente tenga un rol en la membrana.

4. Núcleos 4 o 14-demetil
(R₁ = R₂ = R₃ = H)

- dinosterol, 18 es el principal esteroide de un dinoflagelado marino y probablemente cumpla un papel en la membrana

5. Núcleo esteroidal debe poseer metilos angulares en C-18 y C-19
($R_4 = R_5 = CH_3$)
6. La cadena lateral debe tener más de 5 átomos de carbono
($R_6 > 5C$)
7. Cadena lateral debe tener menos de 10 átomos de carbono
($R_6 < 10C$)
- 19-nor-estanoles, por ejemplo 22
- en ausencia de esteroides convencionales
- por ser componente minoritario, tal vez no tenga función en la membrana.
- esteroides marinos, 23
- componentes minoritarios y probablemente sin función en la membrana
- esteroides marinos, 24
- probable función en la membrana depende de: su concentración y ausencia de esteroides convencionales

Las figuras 21, 22, 23 y 24 se ilustran en la página siguiente.

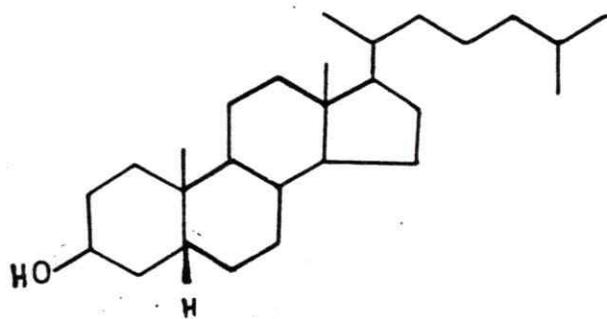
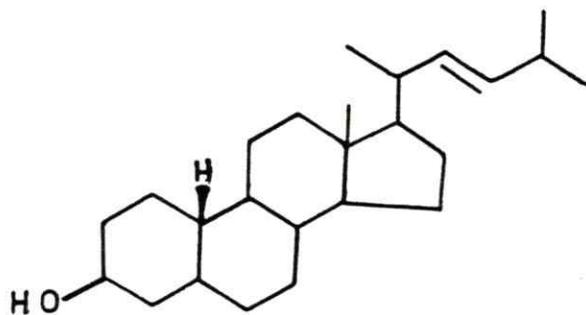
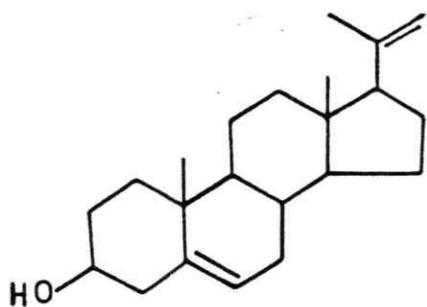
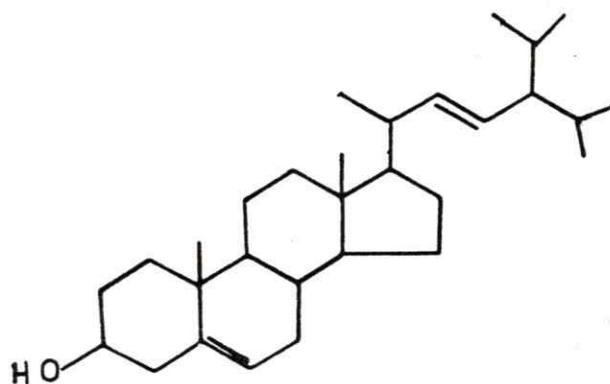
Fig. 21. 5 β -estanol

Fig. 22. 19-nor-estanol

Fig. 23. Esterol marino con
R = 3CFig. 24. Esterol marino con
R = >10 C

f) Rol de los esteroides en las esponjas

Dentro del Phylum invertebrado, las esponjas son una rica fuente de esteroides (77,78,79), ya que de ellas se han obtenido la mayor cantidad de tales compuestos conocidos. La estructura y forma de las esponjas es tal, que la superficie de sus membranas es realmente inmensa comparada con la de otros organismos, y como los esteroides son los constituyentes de esta importante estructura, el gran número y diversidad de ellos puede también reflejar la importancia de la membrana celular en la vida de las esponjas.

A nivel de membrana plasmática los esteroides favorecen su fluidez y estabilidad, siendo fundamentales en todas las formas de vida eucariótica (66). Es importante señalar que en algunos organismos la estabilización de la membrana puede realizarse a través de un mecanismo no esteroideo, aunque generalmente, es en base a este tipo de compuestos.

g) Uso quimiotaxonómico de los esteroides en las Poríferas

Uno de los principales intereses en el estudio de los esteroides, es la posibilidad de que estos puedan servir como base para un ordenamiento quimiotaxonómico del Phylum Porífera (56,59). Debido a que resulta bastante difícil, incluso para los especialistas, identificarlos siguiendo sus rasgos

anatómicos y morfológicos, existiendo aun muchos problemas a nivel de orden, familia y género; se han realizado serios intentos de análisis taxonómicos en base a diferentes tipos de compuestos, tales como: pigmentos (16), aminoácidos libres (16,80), ácidos grasos (35), ácidos mucopolisacáridos (16), compuestos de bromotirosina (46), furanoterpenos (46) y derivados de bromopirrol (16), siendo así evidente que el estudio químico de estas especies puede ser una contribución importante a la taxonomía de las esponjas.

Con respecto a la utilización de los esteroides, el primero en sistematizar la composición química fue Bergmann (55), quien comprobó que existían especies con un alto contenido de esteroides saturados, como la fam. Hymeniacionidae y esteroides insaturados en miembros de la fam. Halichondriidae.

También comento la abundancia de esteroides saturados en miembros de la familia Suberitidae, lo que se fundamentó con estudios realizados por Bergquist et. al. en 1980 (56), sin embargo las relaciones entre estos grupos taxonómicos todavía no han sido resueltas desde el punto de vista bioquímico y biológico.

Otras relaciones sistemáticas hechas por Bergmann fueron:

- 1) Se señaló que dentro de las Haploscléridas, las especies del género Haliclona son un grupo heterogéneo, lo que se confirma

porque las especies estudiadas por Bergmann se reagruparon en 2 ordenes y 3 géneros.

2) El bajo contenido de esteroides en la fracción lipídica de miembros de la familia Spongiidae, fue contrastada con la condición vista en el género Aplysin = Verongia. El último género fue clasificado en una subfamilia dentro de la familia Spongiidae, pero aún así, fue agrupada con otras esponjas que contenían una baja cantidad de esteroides.

Los últimos trabajos, enfatizaron la diferencia entre las familias Verongidae y Spongiidae, basándose en los distintos patrones de aminoácidos libres, esteroides nuevos, derivados de bromotirosina, características histológicas y diferencias en el tipo de reproducción entre los dos grupos.

Posteriores estudios de Minale revelaron que todos los esteroides descritos hasta 1972, contenían núcleos tetracíclicos convencionales con una cadena lateral de ocho átomos de carbono en el C-17, la cual puede ser modificada por adición de uno o dos átomos de carbono en el C-24. Todas las otras diferencias radican en las insaturaciones del núcleo y de la cadena lateral, o en la estereoquímica del C-20 y C-24.

Sin embargo, un caso interesante en la taxonomía de las esponjas marinas, por presentar variaciones estructurales sin precedentes y además de ser fuentes potenciales de nuevos

esteroles, son las especies pertenecientes a la fam. Axinellidae e Hymeniacionidae. De Axinella verrucosa (72,74,75) se aisló por primera vez el núcleo 3 β -hidroximetil-A-nor-esterano (Fig.15).

Estudios posteriores de especies pertenecientes a esta familia, demostraron sólo la presencia de este tipo de compuestos en un muy alto porcentaje, al igual que en miembros de la fam. Hymeniacionidae (80), ambas taxonómicamente emparentadas. En las Axinellas se han reconocido cinco patrones esteroideos, entre ellos el $\Delta^{5,7}$ y 19-nor-estanoles.

Los estudios más recientes en la quimiotaxonomía de las esponjas son los de Bergquist, (56,58,59). En uno de ellos (56) se analizaron 55 especies de Demospongiae que representaban 41 géneros, 25 fam. y 11 de los 13 órdenes que incluye esta clase.

En base a 45 esteroides diferentes, P. R. Bergquist y colaboradores (56) agruparon las especies en 7 órdenes y 13 fam. dentro de las Ceractinomorfos, y 4 órdenes con 12 fam. incluidas en las Tetractinomorfos, como se ilustra en la Tabla 4.

TABLA 4. Clasificación de algunas especies de Demospongiae. (56)

Especies	posición taxonómica	Localidad de recolección
	CERACTINOMORPHA	
	DENDROCFRATIDA	
<i>Aplysilla rosea</i>	Aplysillidae	New Zealand
	VERONGIDA	
<i>Pseudoceratina durissima</i>	Verongidae	Gt Barrier Reef
<i>Verongia</i> sp.		Gt Barrier Reef
<i>V. cavernicola</i>		Mediterranean
<i>V. aerophoba</i>		Mediterranean
<i>Ianthella labelliformis</i>	Ianthellidae	Gt Barrier Reef
	DICTYOCERATIDA	
	Spongiidae	
<i>Heteronema erecta</i>		Gt Barrier Reef
<i>Ircinia oros</i>		Mediterranean
<i>Spongia officinalis</i>		Mediterranean
<i>Spongia</i> sp.		Gt Barrier Reef
<i>Cacospongia scalans</i>		Mediterranean
<i>Phyllospongia radiata</i>		Gt Barrier Reef
<i>P. tokasensis</i>		Gt Barrier Reef
<i>P. papyracea</i>		Gt Barrier Reef
<i>Silospongia</i> sp.		New South Wales
<i>Thorecta marginalis</i>	Thorectidae	New South Wales
<i>Dysidea herbacea</i>	Dysideidae	Gt Barrier Reef
<i>Dysidea tufa</i>		Mediterranean
	HAPLOSCLERIDA	
<i>Cacocheilina bitamellata</i>	Callyspongiidae	New South Wales
<i>Callyspongia ridleyi</i>		Gt Barrier Reef
<i>Haliciona</i> sp.	Halicionidae	New Zealand
<i>Adocia carbonaria</i>		Gt Barrier Reef
	NEPHELIOSPONGIDA	
<i>Petrosia testudinaria</i>	Nepheleospongiidae	Gt Barrier Reef
	POECILOSCLERIDA	
<i>Tedania ignis</i>	Tedaniidae	New South Wales
<i>Neofibularia irata</i>	Esperopsidae	Gt Barrier Reef
	HALICHONDRIDA	
<i>Halichondria moorei</i>	Halichondriidae	New Zealand
<i>Halichondria</i> sp.		New Zealand
<i>Ciocalypia polymastia</i>		New Zealand
<i>Trachyopsis</i> sp.		Gt Barrier Reef
<i>Hymeniacidon hauraki</i>	Hymeniacionidae	New Zealand
<i>Hymeniacidon perleve</i>		New Zealand
	TETRACTINOMORPHA	
	AXINELLIDA	
<i>Axinella australensis</i>	Axinellidae	New Zealand
<i>Axinella damicornis</i>		Mediterranean
<i>Pseudaxinella n.sp.</i>		Gt Barrier Reef
<i>Pararaphoxya n. sp.</i>		New Zealand
<i>Acanthella</i> sp.		Gt Barrier Reef
<i>Phakellia aruensis</i>		Gt Barrier Reef
<i>Raspailia topsenti</i>	Raspailidae	New Zealand
<i>Agelas mauritiana</i>	Agelasidae	Gt Barrier Reef
<i>Agelas oroides</i>		Mediterranean
	HADROMERIDA	
<i>Suberites domuncula</i>	Suberitidae	Mediterranean
<i>Polymastia lusca</i>	Polymastiidae	New Zealand
<i>Polymastia granulosa</i>		New Zealand
<i>Spirastrella poculoides</i>	Spirastrellidae	New South Wales
<i>Latrunculia brevis</i>	Latrunculidae	New Zealand
<i>Cliona celata</i>	Clionidae	New Zealand
<i>Tethya deformis</i>	Tethyidae	New Zealand
<i>Tethya ingali</i>		New Zealand
<i>Tethya aurantium</i>		New Zealand
<i>Tethya n.sp.</i>		New Zealand
<i>Aaptos aaptos</i>		New Zealand
<i>Chondrosia reniformis</i>	Chondrosidae	Mediterranean
<i>Chondrilla nucula</i>		Mediterranean
	SPIROPHORIDA	
<i>Cinachyra</i> sp.	Tetillidae	New Zealand
	CHORISTIDA	
<i>Ancorina alata</i>	Stelletidae	New Zealand

Algunos de los resultados y conclusiones obtenidos en este estudio fueron que:

a) En todos los grupos se encontraron pequeñas cantidades de esteroides C-26, cuyo origen se atribuyó al plancton marino.

b) Los ordenes Dendroceratida, Dictyoceratida, Haplosclerida, Nepheliospongida, Poecilosclerida y algunas Halichondridas, mostraron ciertas semejanzas en la composición de esteroides.

c) En el orden Verongida se vió abundancia de aplistanos, (Fig. 25) compuestos prácticamente exclusivos de este grupo (60).

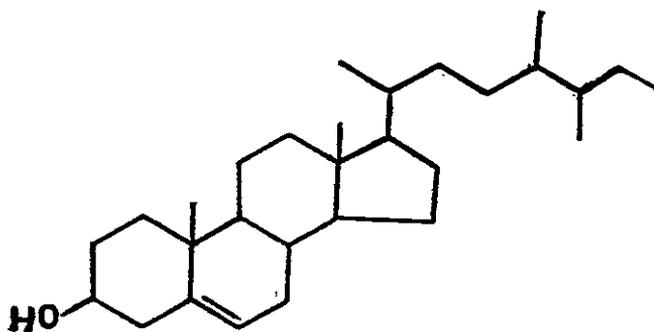


Fig. 25. Aplisterol

d) Las especies del orden Nepheliospongida tienen la capacidad de incorporar anillos de ciclopropano (eno) en sus cadenas

laterales.

e) Las especies más evolucionadas del orden Haplosclerida, como las del género Haliclona, tienen los esteroides característicos de las Ceractinomorfos, es decir, C-27-, C-28 y C-29 del tipo Δ^5 , excepto la presencia de aplisterol, lo que hace pensar que sería un atributo primitivo de las Ceractinomorfos y que se mantiene en las Haplosclerida. Se cree que en los órdenes Haplosclerida, Verongida y Nepheliospongida existen mecanismos biosintéticos comunes, donde los dos primeros pueden metilar el C-26 y Nepheliospongida puede originar anillos ciclopropano (eno) en la cadena lateral.

f) En el orden Poecilosclerida, el tipo de alquilación es el típico de las Ceractinomorfos (compuestos C-27, C-28 del tipo Δ^5), aunque en este análisis el orden no ha sido bien representado.

g) Se observó una severa discrepancia entre los esteroides de Dictyoceratida analizados, y los estudiados por Rosa et al. (60), quien encontró un 92% de esteroides C-27, C-28, C-29 y C-30 del tipo $\Delta^{5,7}$ en cambio Bergquist aisló un 64% de esteroides C-27 del tipo Δ^5 y Δ^7 sin hallar ni siquiera trazas de $\Delta^{5,7}$.

El otro estudio de Bergquist (59) incluyó 29 especies de esponjas, de las cuales 25 eran miembros de la clase Demospongiae y 4 especies de la clase Calcárea, hasta entonces muy poco estudiada. Se agruparon en 6 órdenes y 11 fam. incluídas en las Ceractinomorfos y 3 órdenes con 4 fam. en las Tetractinomorfos como se ve en la Tabla 5.

TABLA 5. Clasificación y área de recolección de especies estudiadas por
Bérgquist. (59)

Especies	Posición taxonómica	Localidad de recolección
	DEMOSPONGIAE CERACTINOMORPHA	
<i>Verongia</i> n. sp. <i>Verongia pedunculata</i> <i>Anornioianthella popeae</i>	VERONGIDA Verongiidae lanthellidae	Camaron, Western Australia Dongera, Western Australia Dongera, Western Australia
<i>Thorectandra</i> n. sp.	DICTYOCERATIDA Thorectidae	Dongera, Western Australia
<i>Callyspongia diffusa</i> <i>Callyspongia latituba</i> <i>Adocia venustina</i> <i>Adocia parietaloides</i>	HAPLOSCLERIDA Callyspongiidae Adocidae	Castor Bay, Auckland, New Zealand Gt. Barrier Is., New Zealand Castor Bay, Auckland, New Zealand Castor Bay, Auckland, New Zealand
<i>Xestospongia</i> n. sp. <i>Xestospongia exigua</i>	NEPHLEIOSPONGIDA Nepheliospongiidae	Camaron, Western Australia Iwayama Bay, Palau Island
<i>Clathria</i> sp. <i>Isociella</i> sp. <i>Crella incrustans</i> <i>Iophon minor</i> <i>Iophon proximum</i> <i>Desmacella dendyi</i>	POECILOSCLERIDA Clathriidae Crellidae Myxillidae Biemnidae	Camaron, Western Australia Camaron, Western Australia Muriwai, Auckland, New Zealand Kawau Island, New Zealand Hen & Chickens Island, New Zealand Hen & Chickens Island, New Zealand
<i>Hymeniacion</i> <i>auraki</i>	HALICHONDRIDA Hymeniacionidae	Takatu Peninsula, Auckland, N. Z.
<i>Phakellia</i> n. sp. <i>Axinella australiensis</i> <i>Echinodictyum cancellatum</i>	TETRACTINOMORPHA AXINELLIDA Axinellidae	Great Aust. Bight, South Australia Hen & Chickens Island, New Zealand Great Aust. Bight, South Australia
<i>Chondrilla</i> sp. <i>Polymastia</i> n. sp.	HADROMERIDA Chondrosiidae Polymastiidae	Camaron, Western Australia Takatu Peninsula, Auckland, N. Z.
<i>Penares tylostaster</i> <i>Ancorina stalagmoides</i> <i>Stelletta maori</i>	CHORISTIDA Stellettidae	Hen & Chickens Island, New Zealand Hen & Chickens Island, New Zealand Takatu Peninsula, Auckland, N. Z.
<i>Clathrina</i> sp. <i>Ascandra</i> sp.	CALCAREA CALCINEA CALCARONEA	Hen & Chickens Island, New Zealand Hen & Chickens Island, New Zealand Hen & Chickens Island, New Zealand Hen & Chickens Island, New Zealand

Algunos de sus resultados y conclusiones fueron que:

- a) La fam. Verongidae (orden Verongida) tiene el tipo de esteroides característico de las especies pertenecientes a estas familias, ya que contienen un 67 a 79% de aplisteroides.
- b) La fam. Ianthellidae (orden Verongida), carece de aplisteroides, existiendo así una clara separación de las fam. dentro del orden Verongida.
- c) Se comprobó que el único representante de Dictyoceratida contenía baja cantidad de esteroides, característico de otras especies de este orden.
- d) El tipo de esteroides para las especies del orden Haplosclerida fueron similares a los obtenidos en el estudio anterior.
- e) Las especies del género Xestospongia (orden Nepheliospongia) presentaron una alta cantidad de esteroides C-29 del tipo Δ^5 ; no se encontraron compuestos con anillos ciclopropanos (enos) en la cadena lateral, atribuyéndose esta característica a otras especies de este orden.

f) En el orden Poecilosclerida no se encontraron esteroides nuevos, enfatizando la presencia de compuestos C-27 y C-28 del tipo Δ^5 . Sin embargo, hay que hacer dos consideraciones importantes en la fam. Clathriidae:

- Clathria spp. tiene un patrón de esteroides diferente a las Poeciloscleridas normales, ya que contiene compuestos C-27, Δ^0 y también Δ^7 y $\Delta^{7,22}$. Morfológicamente se asemeja a la fam. Axinellidae (orden Axinellida), que se caracteriza por tener compuestos del tipo Δ^7 y Δ^0 .

- La especie Isociella sp (orden Poecilosclerida, fam. Clathriidae), morfológicamente se parece más a las Poeciloscleridas típicas, y su composición esteroideal es también similar a la de este orden.

III CARACTERISTICAS GENERALES DE LA ESPECTROMETRIA DE MASA DE LOS ESTEROLES

Los conocimientos de espectrometría de masa de esteroides, se han desarrollado de tal manera, que han llegado a constituir una herramienta útil y muchas veces suficiente para una exacta identificación de estos compuestos.

El Esquema 8 presenta la fragmentación general de esteroides, mediante el espectro de masas del colesterol (81), donde se indica la relación m/z de los iones generados y su correspondiente ruta de formación.

La señal m/z 386 corresponde al ion molecular (M^+) y el resto de los fragmentos son rupturas posteriores de este ion, los cuales dan información sobre la longitud de la cadena lateral y las posibles insaturaciones que se presentan en ella o en el sistema anular.

Los iones de mayor importancia son:

- 1) m/z 255, correspondiente a la pérdida de agua y de la cadena lateral a partir del ion molecular (M^+).
- 2) Del ion 255 se origina posteriormente m/z 213, por la ruptura de los enlaces C13-C17 y C14-C15 del anillo D y formación de un enlace doble (Δ^{13}). Es posible que este fragmento se forme también a partir del ion m/z 231, mediante la pérdida de una molécula de agua. El ion m/z da

información sobre la cadena lateral al igual que el fragmento g_m , m/z 273.

3) La señal l_m a m/z 253 se origina por pérdida de la cadena lateral con transferencia de dos átomos de hidrógeno a partir del ion d_m .

4) El ión f_m , de m/z 231 se origina por la pérdida de la cadena lateral y 3 átomos de carbono del anillo D.

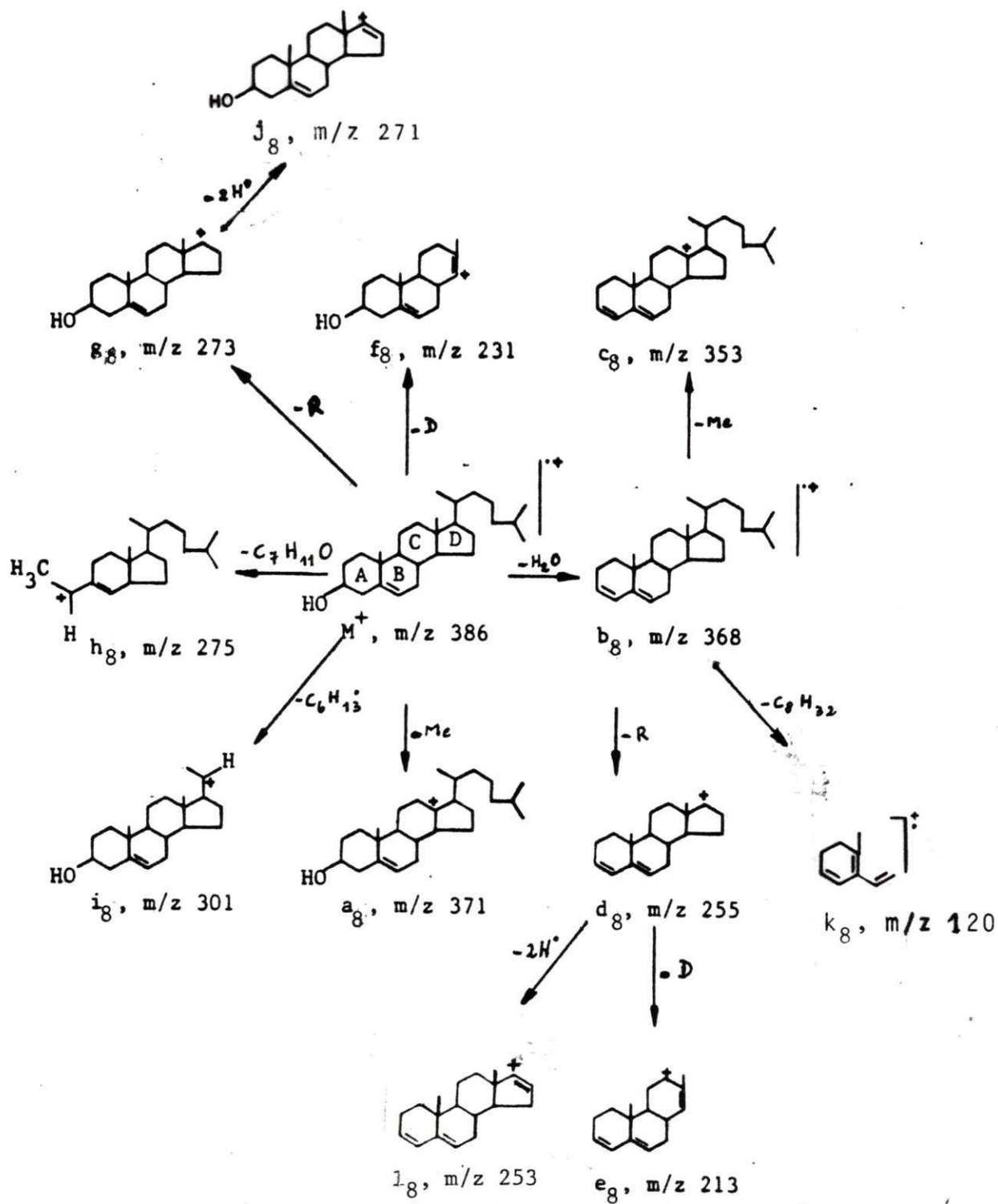
5) La señal g_m de m/z 273 se debe a la pérdida de la cadena lateral saturada ($C_{17}H_{33}$) unida al C-17.

6) El fragmento h_m de m/z 275 merece especial atención, debido a que indica la presencia de un enlace doble en el C-8, que se origina a partir del ion molecular mediante ruptura de los enlaces C1-C10, C5-C10 y C7-C8, formándose un enlace doble en el C-8.

7) El ion j_m a m/z 271 se origina a partir del ion molecular con pérdida de dos átomos de hidrógeno y de la cadena lateral.

8) La presencia del ion k_m , m/z 120 se ha señalado como característico de los compuestos $\Delta^4,5$, el cual se formaría por la pérdida de agua a partir del ion molecular ($M^+ - H_2O$) o ($M^+ - AcOH$) en el caso de los esteroides acetilados.

ESQUEMA 8:
Fragmentación del colesterol.

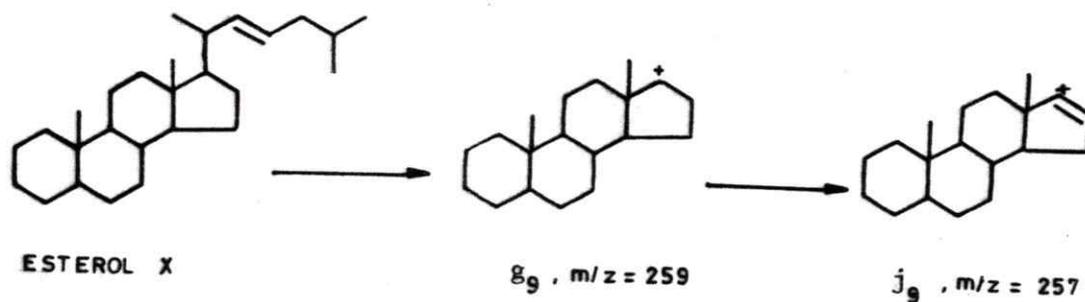


1. Insaturaciones en la cadena lateral

La presencia del doble enlace en la cadena lateral da nuevas señales no encontradas en el espectro de masa de sus análogos saturados, los cuales son muy útiles en el estudio estructural de los esteroides provenientes de organismos marinos. Estas insaturaciones (81,82) se describen a continuación:

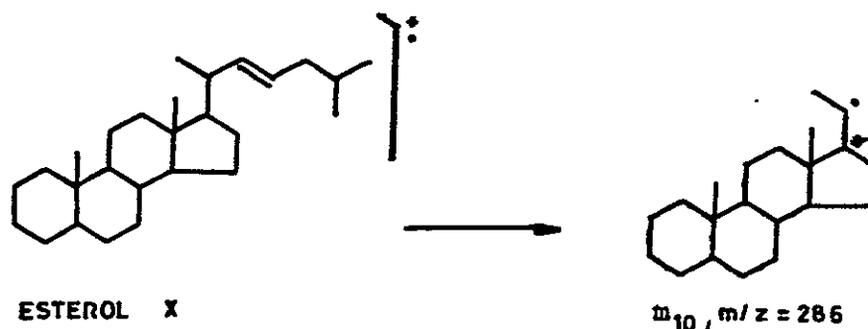
1.1 Δ^{22}

La presencia de una insaturación en el C-22, induce la formación del ion g_9 y j_9 , siendo equivalente a m/z 273 para el caso del colesterol, cuyo origen radica en la ruptura entre el C-17 y el C-20, es decir, salida de la cadena lateral con y sin pérdida de hidrógeno, observándose así dos pares de señales (259 y 257) separadas por dos u.m.a. como se ilustra en el Esquema 9.



ESQUEMA 9

Otra señal importante es el ion m_{10} (m/z 286) que se forma por una ruptura entre el C-20 y el C-22, con pérdida de un hidrógeno desde el fragmento cargado (ver Esquema 10).

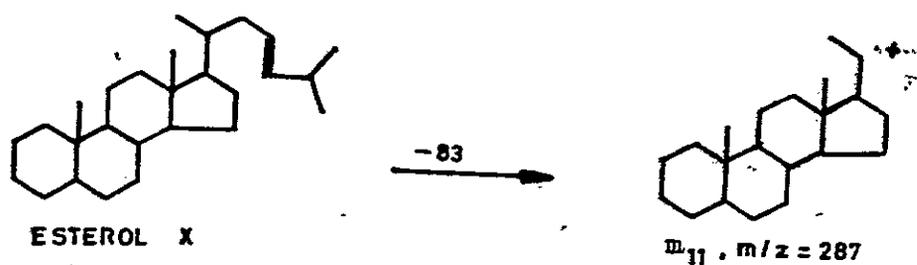


ESQUEMA 10

1.2 Δ^{23}

Una insaturación poco frecuente es en el C-23, que se caracteriza por una ruptura entre el C-20 y el C-22, apareciendo m_{11} a m/z 287, como se ve en el Esquema 11.

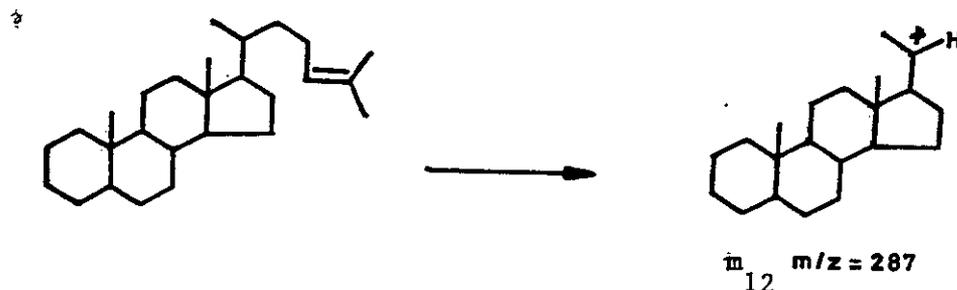
También da una señal intensa a m/z 257 (j_9).



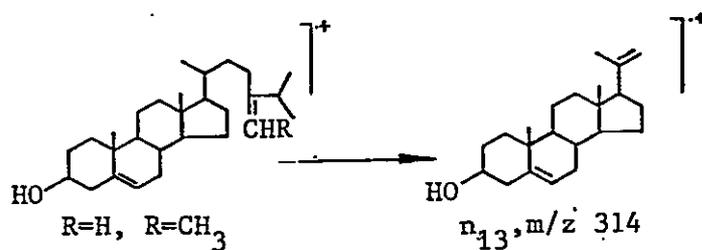
ESQUEMA 11

1.3 Δ^{24}

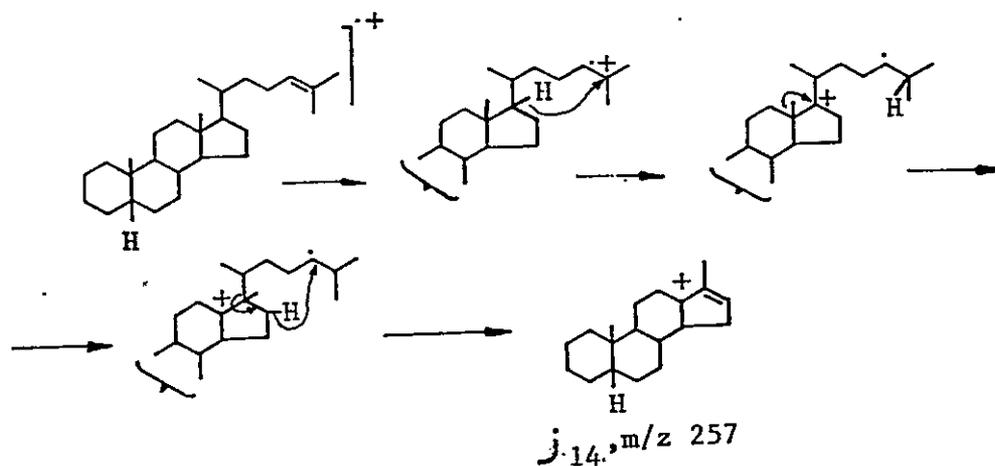
Los compuestos que tienen un enlace doble en el C-24 se caracterizan por presentar tres señales de baja intensidad a m/z 285, 286 y 287 (77), las cuales se forman por la ruptura del enlace C-20 C-22 con y sin transferencia de hidrógeno, como se ilustra en el Esquema 12.

ESQUEMA 12

Otro fragmento importante en compuestos Δ^{24} es el m/z 314 (n_{13}), producto del reordenamiento de Mc Lafferty, que implica la ruptura del C-22 y del C-23 con pérdida de un hidrógeno del C-20, como se muestra en el Esquema 13.

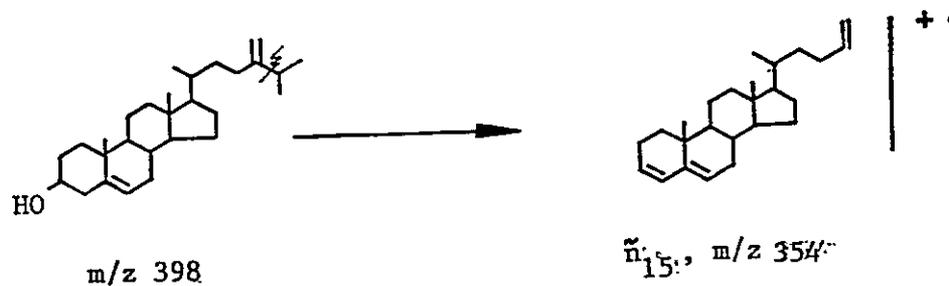
ESQUEMA 13

Un ion de baja intensidad es el j_{14} equivalente a m/z 271 en el Esquema 8, página 58; el cual se origina por pérdida de la cadena lateral con la migración de un metilo y eliminación de dos átomos de hidrógeno (Esquema 14).



ESQUEMA 14

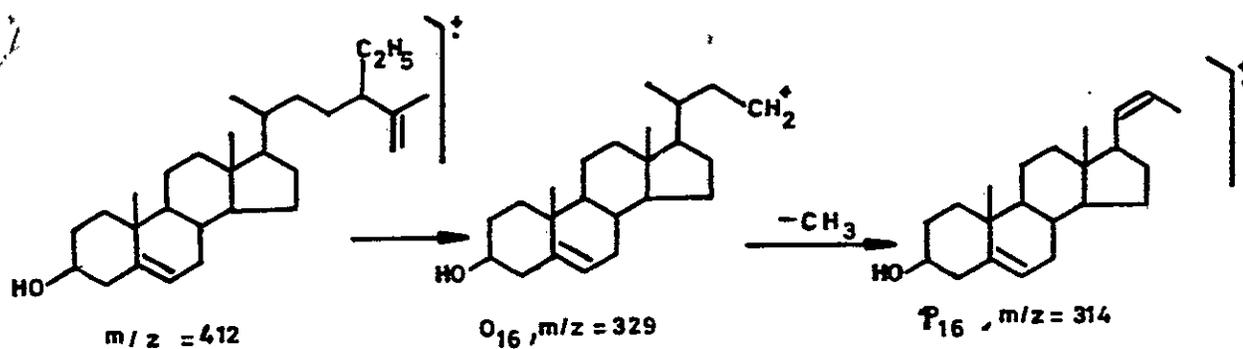
La presencia de los sustituyentes en el C-24 se puede determinar por el ion \tilde{n}_{15} ($M^+ - H_2O - 43$). La existencia de un sustituyente en el C-25, C-26 o C-27, se evidencia por un incremento de la masa del fragmento que se pierde (Esquema 15).



ESQUEMA 15

1.4 Δ_{25}

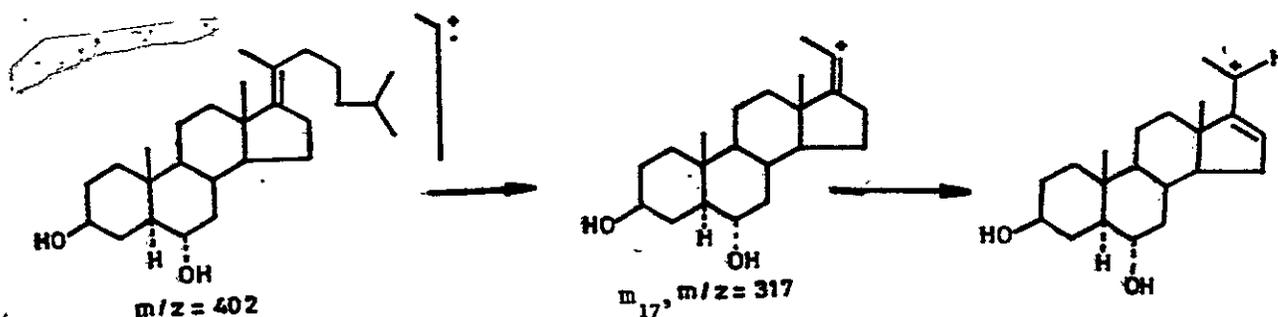
En este caso se forman dos señales importantes que se muestran en el Esquema 16. El ion a m/z 329 se origina por ruptura del enlace alílico C-23-C-24, y m/z 314 se forma a partir del fragmento mencionado, más la pérdida de un grupo metilo.



ESQUEMA 16

1.5 $\Delta_{17(20)}$

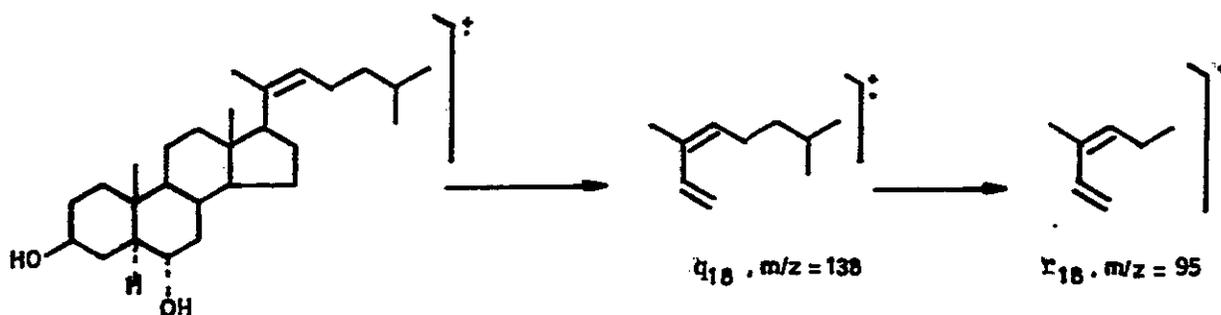
Esta olefina se caracteriza por dar una intensa señal a m/z 317, que se origina por la ruptura del enlace C-20-C-22, como se ilustra en el Esquema 17.



ESQUEMA 17

1.6 $\Delta^{20}(22)$

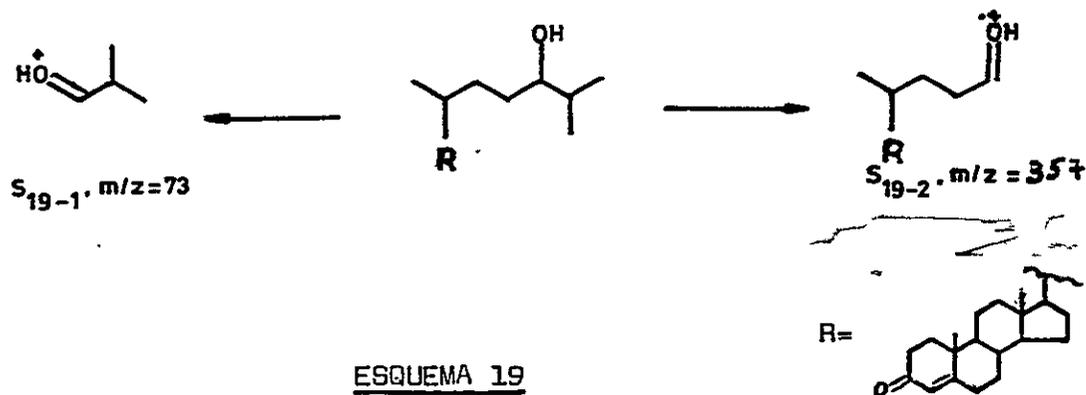
La presencia de este enlace doble puede determinarse por un fragmento importante a m/z 138 y 95, para el ejemplo analizado en el Esquema 18.



ESQUEMA 18

2. Hidroxilo en la cadena lateral

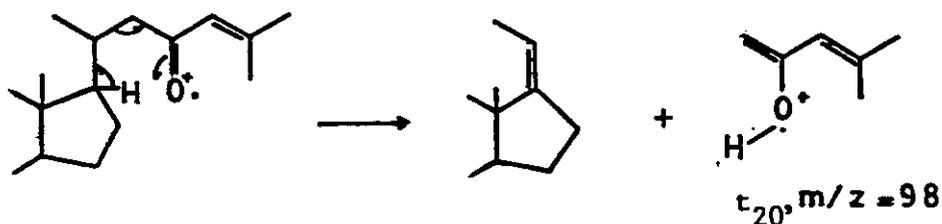
Cuando existe un grupo OH en la cadena lateral, los fragmentos característicos son producto de la ruptura α , como se muestra en el Esquema 19.



ESQUEMA 19

3. Carbonilo en la cadena lateral

El principal fragmento involucra la ruptura de la cadena lateral en el C-20-C-82 con pérdida de seis átomos de carbono, como se indica en el Esquema 20. El fragmento de la cadena lateral con m/z 98 es el pico base en el espectro, y la fragmentación ocurre aparentemente en el ion molecular (83).



ESQUEMA 20

4. Insaturaciones en el anillo

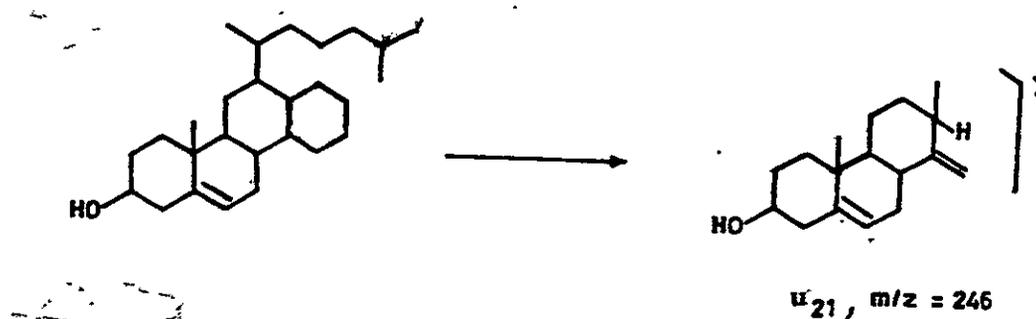
4.1 Δ^5

El enlace doble ubicado en el C-5 da un ion característico (j_a), originado por la pérdida de la cadena lateral, como se ve en el Esquema 8, página 58.

Otras señales típicas son m/z 246 y m/z 120 (k_a). La primera se genera por ruptura entre el enlace del C-16 y C-17 más la cadena lateral; la segunda corresponde a la pérdida del anillo

C y D. Ver Esquema 21 y Esquema 8, página 58 respectivamente.

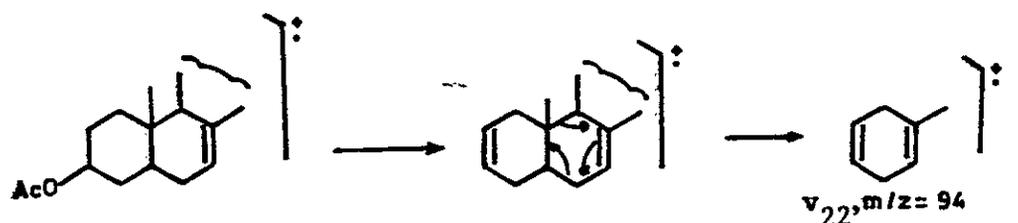
Otra señal característica es a m/z 275 (h_e).



ESQUEMA 21

4.2 Δ^7

Un fragmento importante de los esteroides 7-8 insaturados, es el m/z 94 (v_{22}) generado por una reacción retro-Diels Alder, como se ilustra en el Esquema 22.

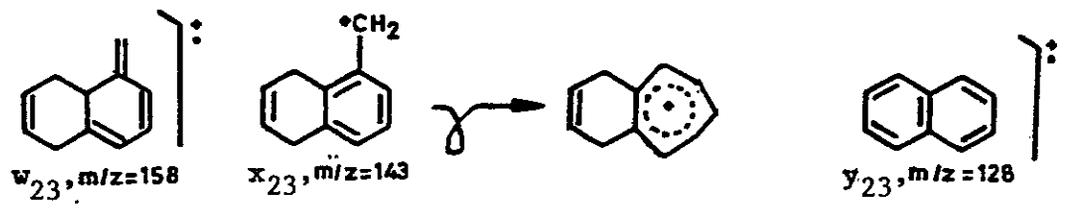


ESQUEMA 22

Los iones a m/z 246 y 271 (u_{21} y j_e) son de mayor intensidad que los esteroides Δ^5 ; además que en el espectro de los Δ^7 no aparecen las señales a m/z 120 y $M^+ - 120$, características de los compuestos Δ^5 .

4.3 $\Delta^{5,7}$ dienos

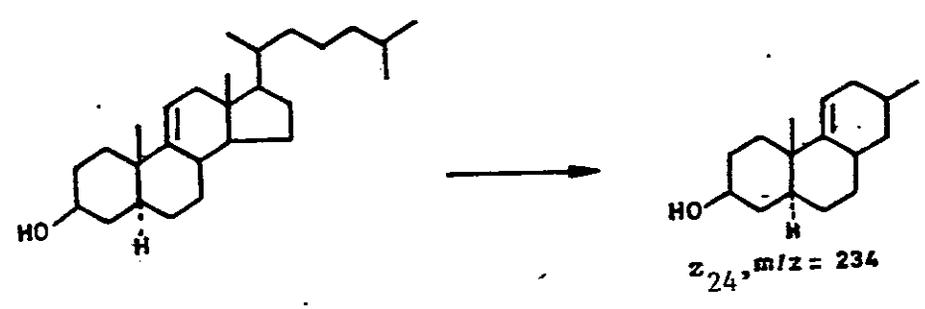
Los derivados del colestano $\Delta^{5,7}$ tienen señales importantes a m/z 143 (muy intensa) y un pico a m/z 128 de menor intensidad. El ion m/z 128 es también característica de este tipo de compuestos, como se ilustra en el Esquema 23.



ESQUEMA 23

4.4 $\Delta^9, 11$

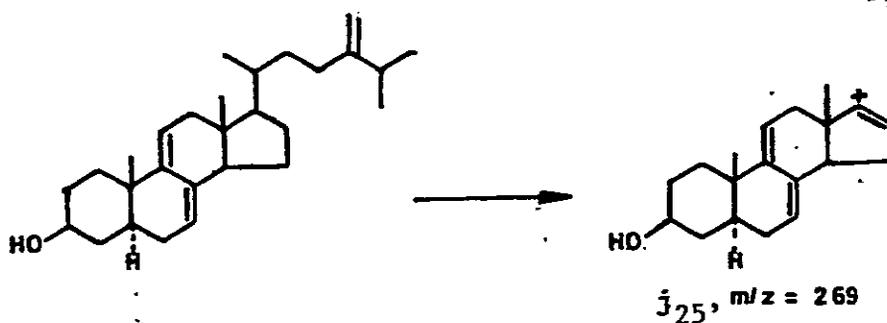
Una insaturación bastante rara se presenta en el C9-11, cuya señal clave es a m/z 234, correspondiendo a la ruptura del anillo D, descartando así una posible insaturación en este núcleo. Esquema 24.



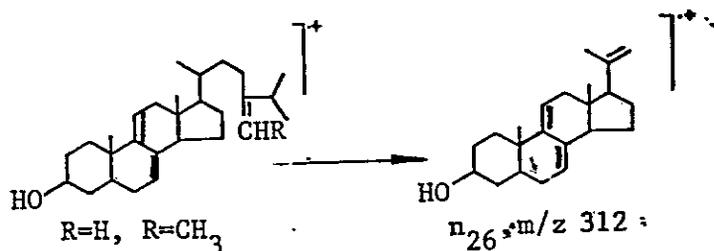
ESQUEMA 24

4.5 A7.9(11)

Este tipo de dienos son bastante raros (84), y la señal base es m/z 269, típica de compuestos diinsaturados. Este ion se genera por pérdida de la cadena lateral y transferencia de dos hidrógenos, como se muestra en el Esquema 25.

ESQUEMA 25

La insaturación en el C-24, da una señal característica del reordenamiento de Mc Lafferty a m/z 314 que se ve desplazada a m/z 312, como se demuestra en el Esquema 26.

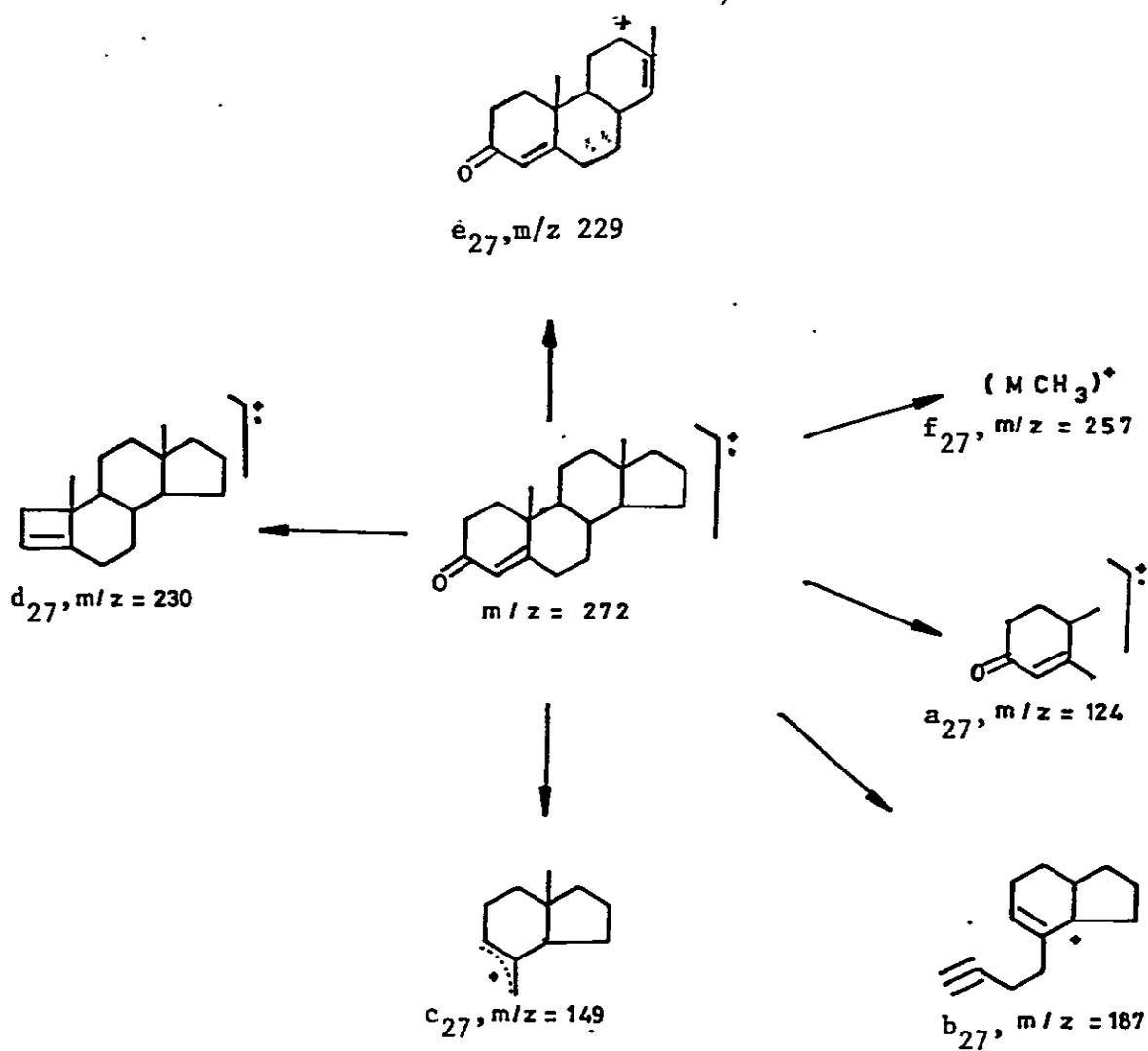
ESQUEMA 26

5. CETOESTEROIDES

5.1 Δ^4 -3-cetoesteroides

En el Esquema 27 se ven las fragmentaciones características de los Δ^4 - α,β -insaturados.

- La señal correspondiente a m/z 124 se origina por la ruptura de los enlaces alílicos de los carbonos 6 y 7 del enlace alílico del C-9,10, con transferencia de dos hidrógenos al fragmento cargado.
- El fragmento a m/z 149 se ha formado también por la fisión del enlace del C-6,7 y del C-9,10 como en el caso anterior, pero con la carga localizada en el fragmento que contiene el anillo C y D.
- El ion a m/z 230 se origina por la pérdida de una molécula de cetena.
- La eliminación de los carbonos 1, 2, 3, 10 y Me-19, genera el fragmento a m/z 187, con pérdida de 8 átomos de hidrógeno y probablemente con eliminación del hidrógeno del C-14.



Esquema 27. Fragmentación Δ^4 -3-cetoesteroides.

5.2 Δ^5 -cetoesteroides

Se ha visto que los ceto-esteroides Δ^5 también presentan el fragmento a_{27} , aunque en pequeña cantidad debido a una isomerización en la cámara de ionización.

Otro ion característico es a m/z 275 (h_a), que se ve en el Esquema 8, página 58.

5.3 7-cetoesteroides

Aquellos compuestos que contienen la función carbonilo en el C-7, pueden determinarse por algunos iones característicos, como se ve en el Esquema 28.

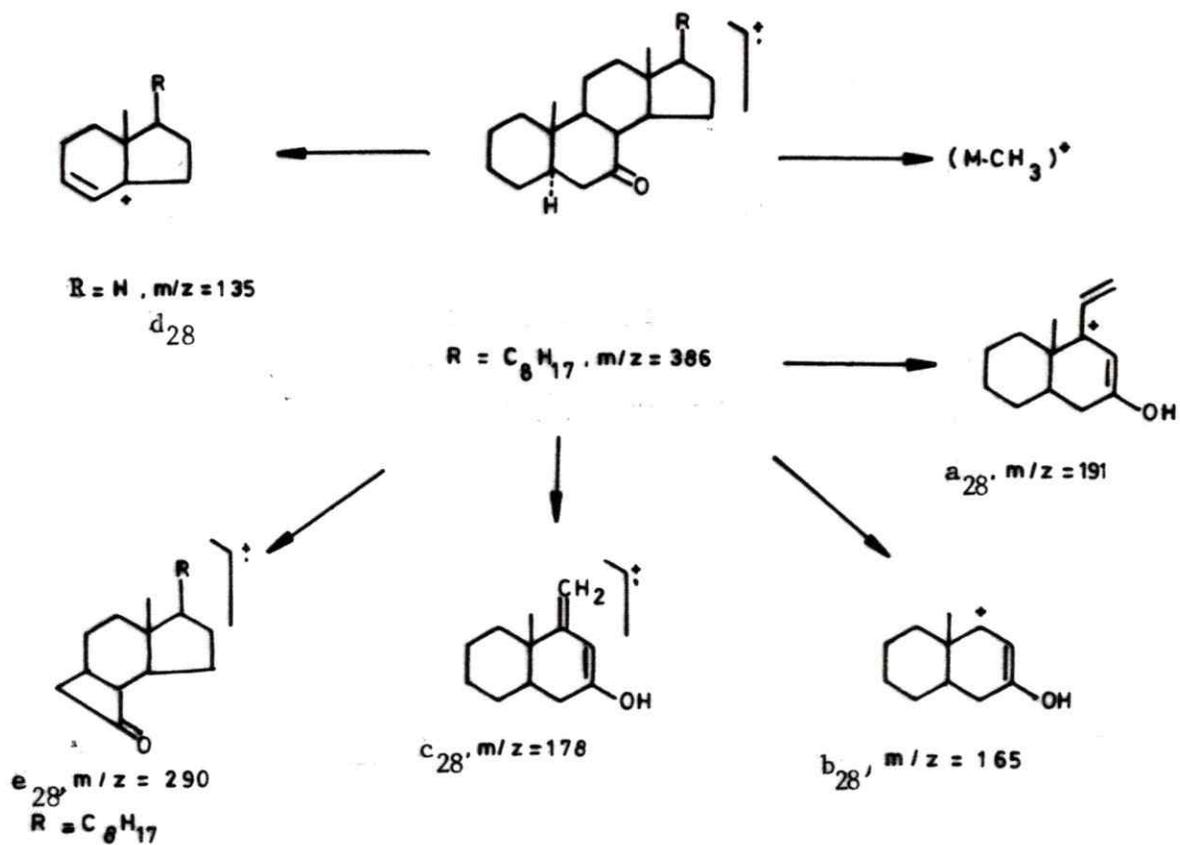
Las principales fragmentaciones provienen de una ruptura β entre:

- El C-8,14 y el C-11,12, dando una señal a m/z 178 (c_{2a}).
- El ion a_{2a} (m/z 191) se origina por ruptura entre el C-12,13 y el C-8,14.
- La señal a m/z 165 (b_{2a}) proviene de la ruptura entre los C-7,11 y C-8,14.

En la otra posición β , también ocurre el mismo tipo de ruptura que da un fragmento a m/z 290 (e_{2a}), con formación de un anillo de cuatro miembros. Ver Esquema 28.

El ion molecular sufre otra ruptura β , la cual genera la señal a m/z 135 y que va acompañada de la pérdida de dos átomos

de hidrógeno.



ESQUEMA 28

OBJETIVOS

La presente Tesis forma parte de un Proyecto desarrollado en el laboratorio de Productos Naturales (Facultad de Ciencias, Universidad de Chile), que comprende el estudio químico de organismos marinos chilenos.

Los objetivos formulados en esta Memoria son:

1. Analizar la composición química de tres especies de esponjas Tedania excavata, Reniera macropora y Haliclona aglutinata.

2. Comparar los resultados obtenidos de este análisis, con aquellos descritos en la literatura para especies de los mismos géneros, con el fin de establecer similitudes o discrepancias dentro de ellos.

El enorme interés en el estudio químico de las esponjas, radica en parte, en tratar de colaborar a la quimiotaxonomía del Phylum, como también en la búsqueda de compuestos con estructuras nuevas con o sin actividad biológica importante.

Actualmente se considera muy difícil precisar la distribución mundial de las familias y géneros de las esponjas, como también

el número de especies clasificadas hasta ahora. Sin embargo, señalaremos algunos lugares geográficos, donde se han encontrado especies pertenecientes a los géneros estudiados en esta Tesis.

Género Tedania: se caracteriza por tener un esqueleto coanosómico reticulado y compuesto de megascleres monoactinados; la mayoría con acantostilos y el esqueleto ectosómico de espículas diactinadas. Los microscleres son de oniquetes. Las Fig. 26 y 27, representan dos especies del género Tedania.

De este género se han identificado 21 especies distribuidas en la Costa Este de Sud-América (Cabo de Hornos y Costa de Chile), Mediterráneo, Océano Atlántico (Costa Atlántica de Tierra del Fuego), Antártica, el Caribe y Australia.

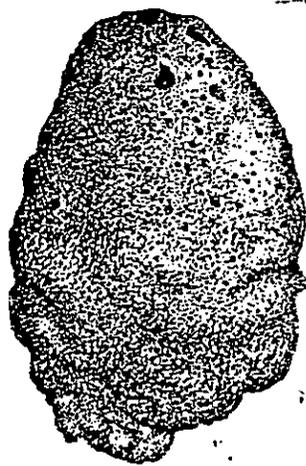


Fig.26 - Tedania mucosa

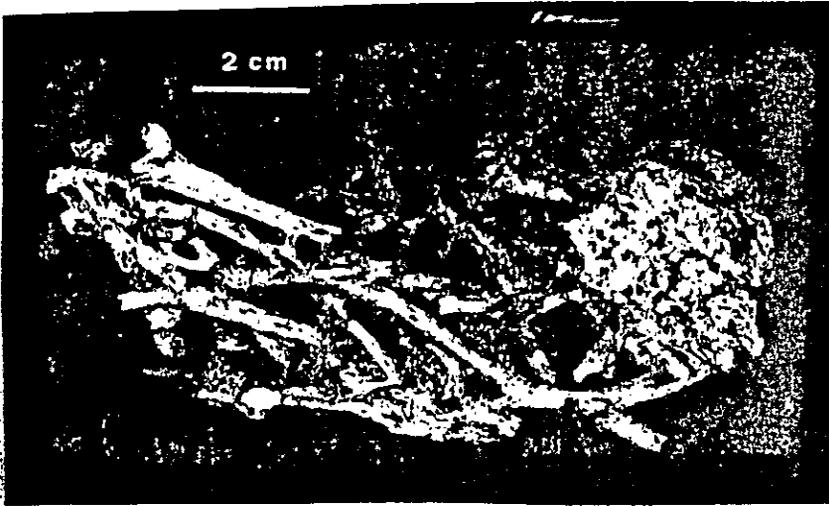


Fig. 27. Tedania laminariae

- Tedania excavata (85), es una especie endémica del litoral chileno, distribuída entre 42° y 44° de latitud Sur. Su estudio es interesante desde el punto de vista químico debido que hasta ahora no ha sido informado ningún estudio químico de especies pertenecientes a este género en nuestro país. Sin embargo, existen algunas investigaciones realizadas en el extranjero entre las cuales están: el análisis esteroidal de Tedania ignis (56,60), y otros dos estudios de la misma especie de donde se han extraído diterpenos (86) y un macrolido (87) de biogénesis mixta con actividad anticancerígena (86,87). Existen además dos análisis de la especie Tedania digitata (88,50), de donde se aisló un nucleósido derivado de purina con actividad hipotensora y un caroteno.

Las familias Haliclónidae y Renieridae serán analizadas en conjunto, dada su complejidad dentro del orden Haplosclerida.

Las esponjas de la familia Haliclónidae son las más difíciles de clasificar de todas las Haploscleridas (89). Los taxónomos se enfrentan con grandes variaciones morfológicas dentro de las especies, y ellas tienen pocos caracteres macroscópicos para trabajar. Los megascleres generalmente son oxeas y su tamaño puede variar considerablemente dentro de las especies, sin embargo, su forma puede dar a veces un criterio taxonómico

estable. Carecen de esqueleto dérmico y el esqueleto que presentan puede variar desde uno simple, a un esqueleto reticular más reforzado.

En la literatura actual existen opiniones muy diversas, tanto para el género Haliclona como para Reniera. Así, algunos expertos afirman que se trata de un sólo género. En cambio otros, sostienen que son dos géneros distintos. La confusión tiene su origen en el diferente uso histórico de los nombres genéricos, los cuales persisten hoy día, debido al inadecuado criterio para separar el esqueleto simple representativo de cada género.

Reniera ha sido corrientemente usado en la literatura de esponjas, mientras que el nombre de Haliclona ha llegado sólo a un uso general, desde que Burton en 1932 lo reutilizó.

Un detalle preciso de la validez histórica de los dos nombres, fueron resumidos por Wiedenmayer en el año 1977 (89).

Se piensa que no sería difícil distinguir los dos géneros, si en las especies existiese un esqueleto reforzado, ya sea por un aumento en el desarrollo de las espículas en el caso del género Reniera, o por un aumento en el desarrollo de espongina en el caso del género Haliclona.

El problema es decidir que sucedería con aquellas especies que tienen esqueletos simples reforzados. Tales formas fueron

descritas originalmente como Reniera.

Posteriormente en el año 1863, Bowerbanck definió como género Chalina, a especies con esqueletos reforzados de espongina. Sin embargo, en los últimos años, muchas esponjas con un esqueleto reticular simple, fueron descritas como especies del género Haliclona. Parece ser una buena solución, considerar que las especies que tienen todo el esqueleto reforzado o simple, se describieran como pertenecientes al género Reniera y reservar el género Haliclona para aquellas especies que poseen un esqueleto reforzado con espongina.

Desafortunadamente esta solución se considero simplista, no pudiendo ser aplicada porque muchas especies del género Haliclona, tienen un esqueleto que forman parte del espectro de las especies del género Reniera.

Por ello Griessinger en 1971, intentó distinguir entre las especies del género Reniera y Haliclona, las cuales poseen esqueletos reticulares simples, mediante el uso de otros criterios, tales como el tamaño de la espícula y la distribución del sistema acuífero. El concluyó, que las especies del género Haliclona tienen espículas pequeñas, esqueletos más regulares y textura más elástica, que las especies pertenecientes al género Reniera, las cuales se caracterizan por tener espículas grandes y esqueletos irregulares, o con muchas espículas. En las Fig.

28, 29, 30 y 31 se observan algunas especies de los géneros Reniera y Haliclona.

Esto corrobora una vez más, la importancia del estudio químico de las especies con el fin de ayudar a su clasificación.

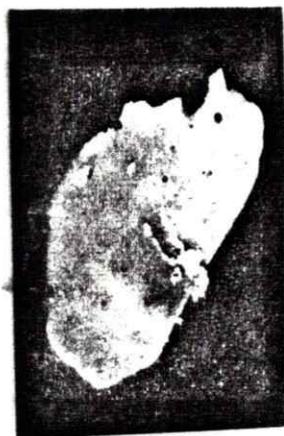


Fig. 28. Reniera cibriiformis

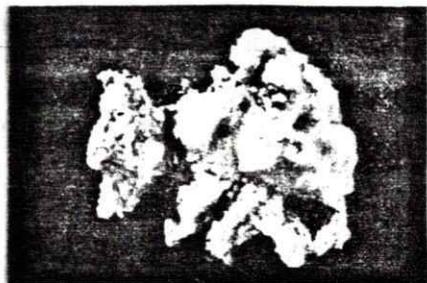


Fig. 29. Reniera pulvinar

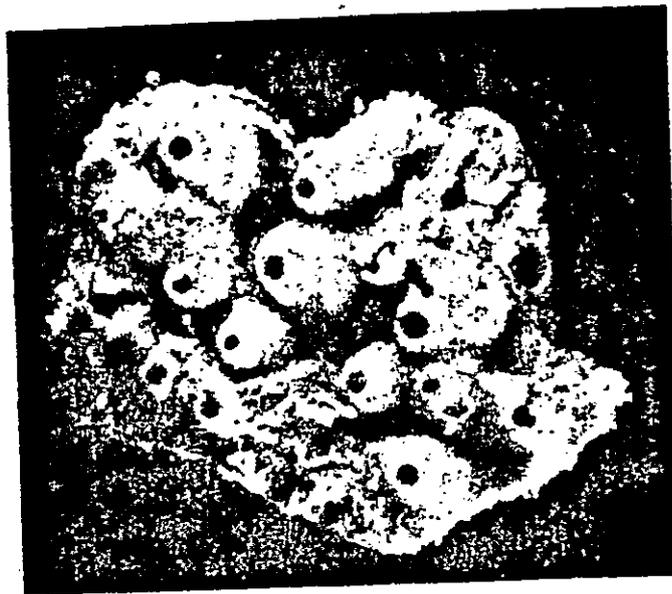


Fig. 30. Haliclona sabulosa n. sp.

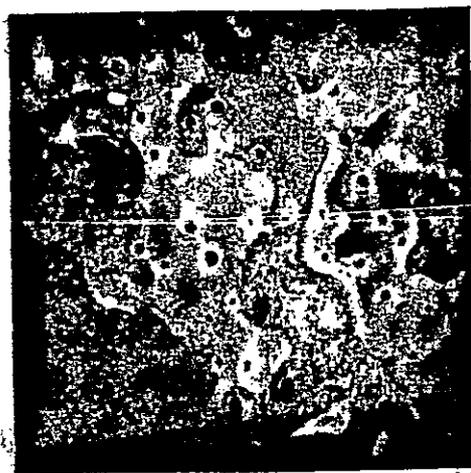


Fig. 31. Haliclona cratera

De las especies clasificadas como género Reniera, 13 de ellas se han encontrado en Indonesia, Italia, Tierra del Fuego y en la Costa chilena.

- Reniera macropora estudiada en este trabajo, también es una especie endémica del litoral chileno, distribuida entre 39° y 41° de latitud Sur, incluyendo el Archipiélago de Juan Fernández. Su análisis es interesante ya que además de los análisis esteroidales realizados en Reniera cratera (60), Reniera sarai (90) y Reniera sp (115) se han hecho otros estudios que indican la presencia de compuestos como arilcarotenos en Reniera japónica (57); acetilenos en Reniera fulva (92); isoindoles en Reniera sp (93), el compuesto 2-aminoimidazol en Reniera cratera (94) y tres alcaloides pentacíclicos en Reniera sarai (95).

De las especies identificadas como pertenecientes al género Haliclona, 47 se han encontrado en distintos lugares como: Nueva Zelandia, Tierra del Fuego, Antártica, Indonesia, Mediterráneo, Francia, Océano Atlántico, Jamaica, Canadá y Chile.

- Haliclona aglutinata. Esta es una especie descrita por primera vez por Ruth Desqueyroux Faúndez del Museo de Historia Natural, Ginebra, Suiza. Fue recolectada en Isla de Pascua y su clasificación aún no ha sido publicada. Por ello no se conoce su

trabajo químico o biológico (taxonómico), que se realiza en algunas Poríferas de Isla de Pascua.

Del género Haliclona se han hecho algunos estudios previos de esteroides (56,60,80,96,97,98,99,100), además de otro estudio químico de las especies Haliclona rubens, H. viridis y H. erina, donde se describe un polímero formado por varias unidades de piridinium, llamado halitoxina, que presentó actividad ictiotóxica, hemolítica y anticancerígena (101).

Otras dos revisiones bibliográficas de H. sp, mencionan el aislamiento de 2 nuevos alcaloides, el cloruro de manzamina A (102), que posee actividad antitumoral y haliclonadamina (103), que presenta actividad antimicrobiana.

En H. permollis se han descrito carotenoides (57).

MATERIALES Y METODOS

Las Poríferas fueron identificadas y / o clasificadas por la profesora Ruth Desqueyroux Faúndez del Museo de Historia Natural de Ginebra, Suiza.

Los espectros de infrarrojo (IR) fueron tomados en pastillas de KBr anhidro, en un espectrofotómetro Perkin-Elmer modelo 700.

Los espectros de RMN-¹H se registraron en un equipo Bruker de 360 MHz. En la realización de estos espectros se usó cloroformo deuterado (CDCl₃) como disolvente, y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna.

Las cromatografías en fase gaseosa (CG) se hicieron en un cromatógrafo Perkin-Elmer, Sigma 3B, con una columna capilar de metilsilicona, marca Perkin Elmer, de 25 metros de largo, y los cromatogramas se realizaron isotérmicamente a 270° C, con un flujo de nitrógeno de 0,85 ml/min y un detector de ionización de llama de hidrógeno.

El análisis CG-EM se realizó en un espectrómetro de masas Varian Mat Ch-7A acoplado a un cromatógrafo de gases Varian 1440, usando una columna de vidrio 3% OV-17 GCQ (1,8mm x 2,0 mm) y un computador Varian Mat Data System 166.

El fraccionamiento de los extractos se realizó por partición con distintos disolventes y el aislamiento de los productos se

llevó a cabo mediante técnicas cromatográficas en capa fina (ccf) y de columna (cc).

La ccf se efectuó en cromatoplasmas de gel de sílice G (tipo 60) F254 Merck de 0,25 mm de espesor. Se usaron placas de ccf-argéntica (ccf-AgNO₃) preparadas de acuerdo al siguiente procedimiento: se sumergen las placas en una solución acuosa de nitrato de plata al 10% y posteriormente se secan en una estufa a 80° C durante 3 minutos.

Se observaron las placas con radiación ultravioleta (UV) a las longitudes de onda de 254 y 360 nm; luego se revelaron con reactivo de Liebermann-Burchard y posteriormente se calentaron a 100° C durante tres minutos.

Las columnas cromatográficas se efectuaron en columnas de vidrio de media presión (cmp) y en columnas rápidas (cr) (105). Se usó como material de soporte gel de sílice G (tipo Merck) o gel de sílice impregnada con AgNO₃ al 10%, preparada de la siguiente forma: se disuelve la sal de plata en una mezcla de etanol:agua (9:1) y una vez disuelta, se impregna el gel de sílice en esta disolución manteniendo la relación de 1g de gel de sílice por 2 ml de solución; por último se evapora el disolvente.

Todos los disolventes usados se eliminaron en evaporador rotatorio al vacío de la trompa de agua y a la temperatura de

40° C.

Los disolventes empleados en cc y procesos extractivos fueron de grado técnico y purificados por destilación fraccionada.

Con el objeto de separar las mezclas de esteroides de Tedania excavata, Reniera macropora y Haliclona aglutinata se acetilaron, realizando este procedimiento con anhídrido acético y piridina, de acuerdo al siguiente método: se disuelve la muestra en el mínimo volumen de piridina y se adiciona el doble de anhídrido acético como agente acetilante; se sigue el curso de la reacción por medio de ccf. Una vez finalizada, se agrega MeOH, se evapora y luego HCl al 2% y hielo picado. Se extrae con una mezcla de éter de petróleo (40-60°C)-acetato de etilo (1:1), posteriormente se lava la fase orgánica con una disolución acuosa de NaHCO₃ al 3% (p/v), se seca con sulfato de magnesio anhidro, se filtra y se evapora el disolvente, para obtener la mezcla de esteroides.

La hidrólisis de los acetatos se efectuó según el siguiente procedimiento: se disuelve la muestra en acetona y agregándole una disolución de NaOH/MeOH al 5%; se mantiene a reflujo durante media hora y se controla la hidrólisis por ccf. Posteriormente se agrega agua destilada y gotas de HCl 6M; se extrae varias veces con CH₂Cl₂. Las fracciones de esteroides hidrolizados de H.aglutinata fueron posteriormente sililadas

con trimetil-sililéter (106), con el fin de hacerlas mas volátiles.

I RECOLECCION

Las esponjas Tedania excavata y Reniera macropora fueron recolectadas por buceo autónomo en la Isla de Chiloé (X Región), en Febrero de 1984 y Junio de 1983, respectivamente.

Haliclona aglutinata se recolectó en la zona intermareal de Isla de Pascua en Septiembre del año 1985.

II PROCEDIMIENTOS GENERALES DE EXTRACCION

El método de extracción general (Esquema 29) para las tres especies fue el siguiente: las esponjas frescas fueron cortadas en trozos y luego extraídas con acetona a temperatura ambiente; ésta se efectuó estrujando el material fresco y destilando el disolvente, obteniéndose una disolución acuosa que se extrajo con mezcla de éter de petróleo (40-60° C) y acetato de etilo (1:1). Este procedimiento se repitió tres veces. Luego se desechó la disolución acuosa y la fase orgánica restante se llevo a sequedad, de donde se obtuvo el extracto orgánico final.

Los extractos orgánicos de las esponjas se sometieron a un fraccionamiento primario en una columna rápida. El eluyente usado fue éter de petróleo de 40-60° C y mezclas de éter de petróleo/ acetato de etilo de polaridad creciente.

De esta columna se obtuvieron sub-extractos que fueron fraccionadas a través de sucesivas columnas rápidas y columnas

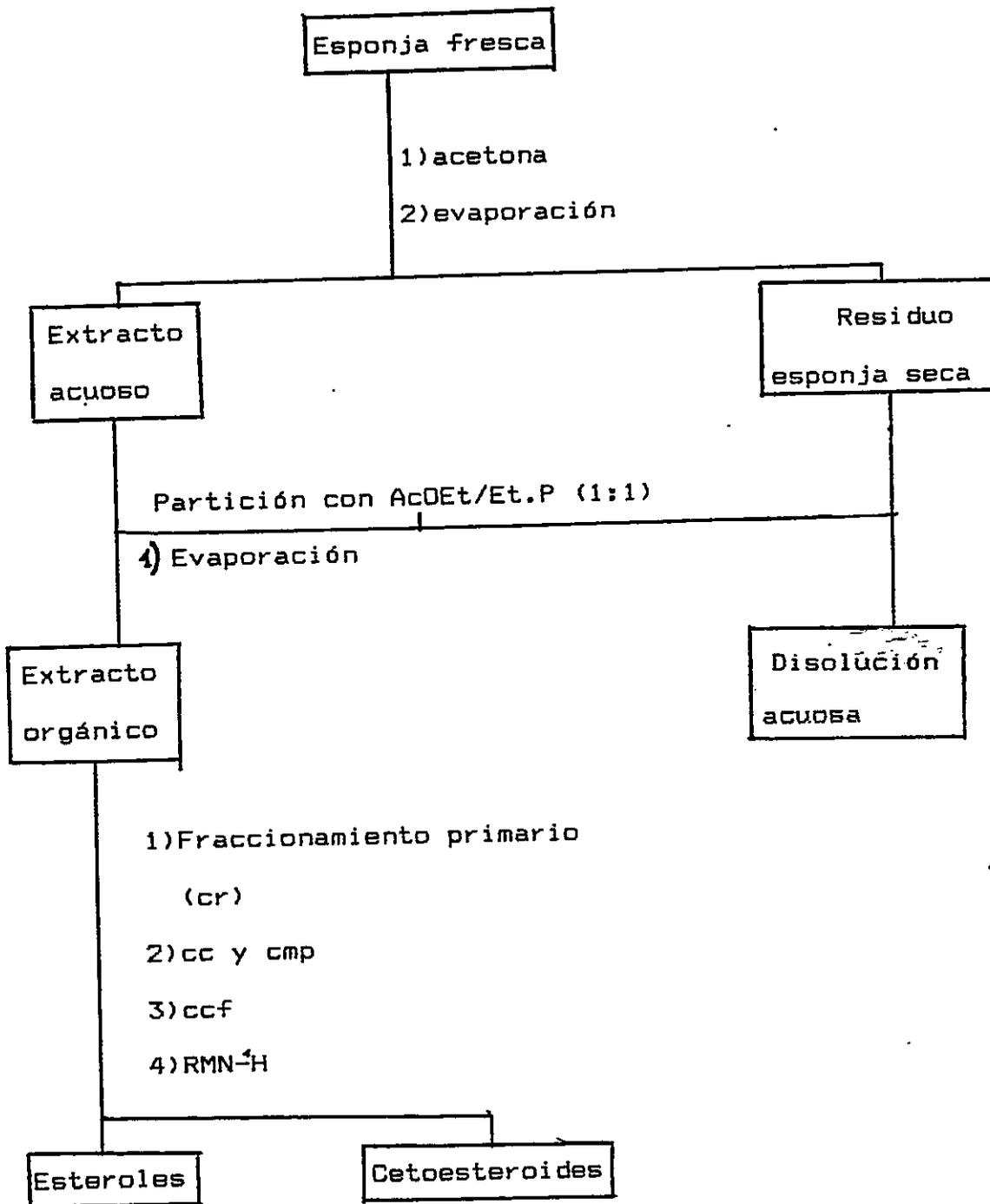
de media presión. Las fracciones aquí resultantes se analizaron por ccf y RMN-¹H, no encontrándose productos de interés químico, excepto la fracción de esteroides y cetoesteroides, base fundamental para el desarrollo de esta Tesis. Los compuestos como ceras, ácidos grasos, pigmentos, y otros de mayor polaridad, fueron desechados en este estudio.

Datos generales sobre el peso de: esponja seca, extracto orgánico y esteroides, se dan en la Tabla 6.

TABLA 6

Nombre especie	Peso esponja seca (g)	Peso extracto orgánico (g)	Peso esteroides libres (g)
<u>I. excavata</u>	103	34	3,02
<u>R. macroppora</u>	1200	57	4,02
<u>H. agglutinatta</u>	454	25	0,920

ESQUEMA 29
ESQUEMA DE EXTRACCION GENERAL



III FRACCIONAMIENTO Y ESTUDIO DE LOS ESTEROLES

Una vez aislados los esteroides de cada esponja, se procedió a acetilarlos siguiendo el curso de la reacción mediante ccf-AgNO_3 (eluyente: EP 40-60° C:Tolueno = 1:4). Los esteroides acetilados se adsorbieron en gel de sílice y fueron fraccionados a través de una cc-AgNO_3 (muestra:adsorbente = 1:70), protegida de la luz y eluyendo con una mezcla de EP (40-60° C)-AcOEt al 0,2%.

IV ESTUDIO DE LOS ESTEROLES ACETILADOS

Una vez que los esteroides se fraccionaron a través de la cc-AgNO_3 , se analizaron por ccf-AgNO_3 , CG y análisis combinado de CG-EM.

- a) De la especie Tedania excavata se reunieron 7 sub-fracciones en las cuales se identificaron un total de 15 compuestos acetilados denominados T₁, T₂, ..., T₁₅. (Ver Esquema 30).
- b) En Reniera macropora se agruparon 5 sub-fracciones identificándose 14 esteroides denominados R₁, R₂, ..., R₁₄. (Esquema 31).
- c) Las 5 sub-fracciones de esteroides acetilados y posteriormente hidrolizados de la especie Haliclona aglutinata fueron sililadas y también analizados por CG-EM, identificándose 10 compuestos designados como H₁, H₂, ..., H₁₀. (Ver Esquema 32)

Esquema 30. Extracto de Tedania excavata.

Mezcla acetilada

B	C	D	E	F	G	H
T ₄	T ₃	T ₈	T ₂	T ₁₁	T ₇	T ₇
T ₁₄	T ₄	T ₃	T ₃	T ₅	T ₅	T ₁₀
T ₃	T ₁₃	T ₁₃	T ₆	T ₇	T ₁₀	T ₉
	T ₁₄	T ₂	T ₁₂	T ₁₀		
	T ₈	T ₆	T ₁			
		T ₁₂	T ₅			
		T ₁				

Esquema 31. Extracto de Reniera macropora.

Mezcla acetilada

B	C	D	E	F
R ₇	R ₂	R ₁₂	R ₉	—
R ₁₁	R ₅	R ₁₃		
R ₁₀	R ₁	R ₁₄		
R ₆	R ₃	R ₉		
R ₂	R ₄			
R ₅	R ₈			
R ₁				

Esquema 32. Extracto de Haliciona aglutinata.

Mezcla acetilada

B	C	D	E	F
H ₅	H ₄	H ₄	H ₈	H ₈
H ₄	H ₇	H ₈	H ₄	H ₉
	H ₃	H ₁	H ₉	H ₂
	H ₆	H ₁₀	H ₂	

Los espectros de masa y tiempos de retención relativos (Trr) al colesterol, de los compuestos encontrados en las tres esponjas fueron:

T₁: m/z: 414 (34,1%), 399 (20,3%), 354 (100,0%), 273 (18,4%), 255 (22,5%), 253 (12%), 229 (34,5%), 213 (22,0%), 94 (63,8%).

Trr: 0,93

T₂: m/z: 366 (100,0 %), 351 (3,4%), 282 (68,7%), 255 (79,0%), 253 (55,2%), 228 (10,1%), 213 (18,0%), 120 (33%).

Trr: 0,96

T₃: m/z: 368 (100,0 %), 353 (24,0%), 275 (32,5%), 260 (15,0%), 255 (33,9%), 247 (18,3%), 228 (5,0%), 213 (11,0%), 120 (28,8%).

Trr: 1,00

T₄: m/z: 370 (83,0%), 355 (22,7%), 328 (1,2%), 257 (42,0%), 247 (12,7%), 215 (100).

Trr: 1,01

T₅: m/z: 380 (100,0%), 365 (9,2%), 337 (15,4%), 282 (68,1%),

255 (79,0%), 253 (55,2%), 213 (13,9%), 228 (10,2%), 120 (56,0%)

Trr: 1,03

T₄: m/z: 366 (19,2%), 351 (12,0%), 323 (10,3%), 253 (35,0%),
211 (12,8%), 143 (100%), 128 (20%).

Trr: 1,03

T₇: m/z: 366 (75,7%), 351 (5,1%), 281 (15,3%), 282 (19,5%),
283 (14,8%), 255 (70,5%), 253 (15,7%), 228 (11,9%), 213 (80,1%),
211 (2,9%), 120 (100%).

Trr: 1,05

T₈: m/z: 382 (100,0%), 367 (3,9%), 289 (2,0%), 274 (15,0%),
261 (1,2%), 255 (33,8%), 253 (11,5), 228 (53,0%), 213 (59,0%)

Trr: 1,07

T₉: m/z: 380 (100,0%), 365 (17,0%), 296 (51,9%), 281
(22,4%), 282 (25,2%), 283 (23%), 255 (28,4%), 253 (12,6%), 228
(7,1%), 213 (17,7%), 81 (45,0%)

Trr: 1,07

T₁₀: Trr: 1,09

T₁₁: m/z: 394 (100,0%), 379 (8,1%), 351 (13,6%), 296 (3,5%),
282 (31,9%), 255 (65,6%), 253 (14,6), 228 (12,1%), 213 (16,3%),
211 (7,9%).

Trr: 1,13

T₁₂: m/z: 456 (2,8%), 413 (19,8), 396 (25,0 %), 353 (3,1%),
344 (1,2%), 315 (2,9%), 282 (29,7), 237 (40,0%), 215 (10,0%)

Trr: 1,14

T₁₃: m/z: 396 (100,0%), 381 (70,4%), 303 (1,8%), 288 (65,2%),
275 (57,7%), 255 (63,1%), 253 (31,4), 228 (14,7%), 213 (60,6%)

Trr: 1,16

T₁₄: m/z: 458 (29,0%), 398 (56,7%), 383 (13,0%), 290 (1,6%),
257 (57,7%), 255 (12,1%), 230 (2,1%), 215 (100%)

Trr: 1,17

T₁₅: m/z: 400 (100%), 382 (13,8%), 367 (10,3%), 287 (27,9%),
269 (33,8%), 213 (3,9%), 187 (12,4%), 174 (11,6%), 161 (57,5%)

Trr: 1,32

R₁: m/z: 352 (30,5%), 337 (7,0%), 300 (10,0%), 282 (23,4%),
271 (2,5%), 255 (50,2%), 213 (12,0%), 120 (100%).

Trr: 0,85

R₂: m/z: 354 (85,2%), 282 (30,5%), 275 (8,0%), 257 (35,0%),
255 (15,0%), 215 (100%).

Trr: 0,91

R₃: Trr: 0,94

R₄: m/z: 366 (100,0%), 351 (1,0%), 282 (30,0%), 255 (30,0%),
253 (15,2%), 228 (5,0%), 213 (13,0%), 120 (21,2%).

Trr: 0,97

R₅: Trr: 0,98

R₆: m/z: 368 (100,0%), 353 (8,0%), 275 (3,6%), 260 (3,1%),
255 (31,0%), 253 (22,0%), 247 (8,5%), 228 (12,0%), 213 (4,0%),
120 (15,0%)

Trr: 1,00

R₇: m/z: 370 (30,0%), 355 (5,0%), 328 (12,0%), 257 (30,0%),
247 (10,0%), 215 (100,0%).

Trr: 1,02

R₁₀: m/z: 380 (100,0%), 365 (9,0%), 337 (6,0%), 282 (25,0%),
255 (51,0%), 253 (10,3%), 213 (8,0%), 228 (4,0%), 120 (53,0%)

Trr: 1,02

R₉: m/z: 382 (100,0%), 367 (9,5%), 289 (3,0%), 274 (12,0%),
261 (3,5%), 255 (32,5%), 253 (21,2%), 228 (37,0%), 213 (30,0%)

Trr: 1,065

R₁₀: m/z: 380 (100,0%), 365 (8,5%), 296 (57,0%), 281 (15,0%),
282 (18,3%), 283 (16%), 255 (30,0%), 253 (22,0%), 228 (15,0%),
213 (12,0%).

Trr: 1,07

IR: max (cm⁻¹): 1650, 1740.

RMN-¹H, δ(360 MHz, CDCl₃): 0,65 (3H,s), 0,93 (3H,d,
J=6,5 Hz), 0,98 (3H,d,J=4,8 Hz) 0,98 (3H,s), 1,00 (3H,d, J=6,1
Hz), 1,99 (3H,s), 4,55-4,58 (1H,m), 4,62 (1H,s), 4,68 (1H,s),
5,33 (1H,da, J=4,9 Hz).

R₁₁: m/z: 384 (78,6%), 369 (15,0%), 257 (55,0%), 255 (23,2%),
215 (100,0%).

Trr: 1,08

R₁₂: m/z: 394 (100,0%), 379 (7,0%), 296 (3,0%), 282 (10,4%),
255 (43,0%), 253 (10,7%), 228 (10,0%), 213 (5,8%), 211 (3,0%)

Trr: 1,12

R₁₃: m/z: 394 (100,0%), 379 (7,0%), 296 (28,0%), 282 (4,0%),
281 (7,6%).

Trr: 1,14

R₁₄: m/z: 394 (100,0%), 379 (6,5%), 296 (19,0%), 282 (3,0%),
282 (12,0%)

Trr: 1,15

H₁: m/z: 442 (100,0%), 352 (10,5%), 337 (6,0%), 255 (30,0%),
213 (9,7%)

Trr: 0,85

H₂: m/z: 352 (100,0%), 337 (20,0%), 282 (23,0%), 255
(65,7%), 253 (42,5%), 229 (28,9), 213 (11,3%), 94 (45.1%).

Trr: 0,90

H₃: m/z: 456 (20,0%), 366 (100,0%), 351 (4,2%), 282 (20,0%),
255 (25,0%), 253 (12,0%), 228 (4,0%), 213 (4,5%)

Trr: 0,97

H₄: m/z: 458 (52,0%), 368 (18,3%), 353 (14,0%), 275 (2,8%),
260 (1,3%), 255 (12,7%), 253 (10,3%), 247 (4,0%), 228 (10,0%),
213 (9,9%), 120 (100,0%)

Trr: 1,00

H₅: m/z: 445 (5,3%), 370 (2,6%), 355 (7,9%), 263 (3,8%), 57
(25,0%), 247 (10,0%), 75 (100,0%)

Trr: 1,02

H₆: Trr: 1,03

H₇: m/z: 382 (100,0%), 367 (2,9%), 289 (2,0%), 274 (11,3%),
261 (1,2%), 255 (39,8%), 228 (23,0%), 213 (25,0%)

Trr: 1,065

H₈: m/z: 380 (100,0%), 365 (2,7%), 296 (53,0%), 281 (12,0%),
282 (15,3%), 283 (13,8%), 255 (23,0%), 253 (8,5%), 228 (5,0%),
213 (11,5%)

Trr: 1,07

H₉: Trr: 1,09

H₂O: m/z: 396 (100,0%), 381 (3,9%), 303 (20,0%), 288 (53,2%),
275 (19,5%), 255 (49,0%), 253 (23,8%), 228 (3,0%), 213 (30,0%)

Trr: 1,16

V Fraccionamiento y estudio de los cetosteroides de Haliclona aglutinata

El extracto correspondiente al 5% EP (40-60° C)/Ac.OEt. de H. aglutinata, cuyo peso era de 202 mg, fue separado por c.c. eluyendo con EP (40-60 °C) y mezcla de EP/AcOEt al 2%, obteniéndose una fracción de cetosteroides designada como M₂. Esta fue analizada por c.c.f., RMN-¹H ^{TK} CG y CG-EM, demostrándose que era una mezcla de dos compuestos (M₂₋₁ y M₂₋₂).

Los datos del espectro de IR y para la fracción M₂ fueron:

IR: / max (cm⁻¹): 860, 1220, 1370, 1660, 2860, 2945, 3400.

Los espectros de masa para los compuestos M₂₋₁ y M₂₋₂ se describen a continuación:

M₂₋₁: m/z: 352 (4,2%), 337 (7,2%), 299 (11,1%), 271 (4,2%), 269 (13,9%), 229 (22,2%), 213 (12,5%), 149 (38,9%), 124 (100,0%), 91 (84,7%), 79 (79,9%), 55 (84,7%).

M₂₋₂: m/z: 380 (5,0%), 365 (10,0%), 337 (11,7%), 299 (23,7%), 271 (10,0%), 269 (51,7%), 229 (20,0%), 149 (70,8%), 124 (94,2%), 91 (98,3%), 79 (100%), 67 (78,3%).

DISCUSION DE RESULTADOS

Con el análisis de CG-EM y Trr fue posible identificar los esteroides de las esponjas Tedania excavata, Reniera macropora y Haliclona aglutinata.

Las Fig. 32, 33 y 34 representan los cromatogramas de gases de las mezclas de esteroides acetilados de cada esponja, indicándose con números los distintos esteroides encontrados en la mezcla.

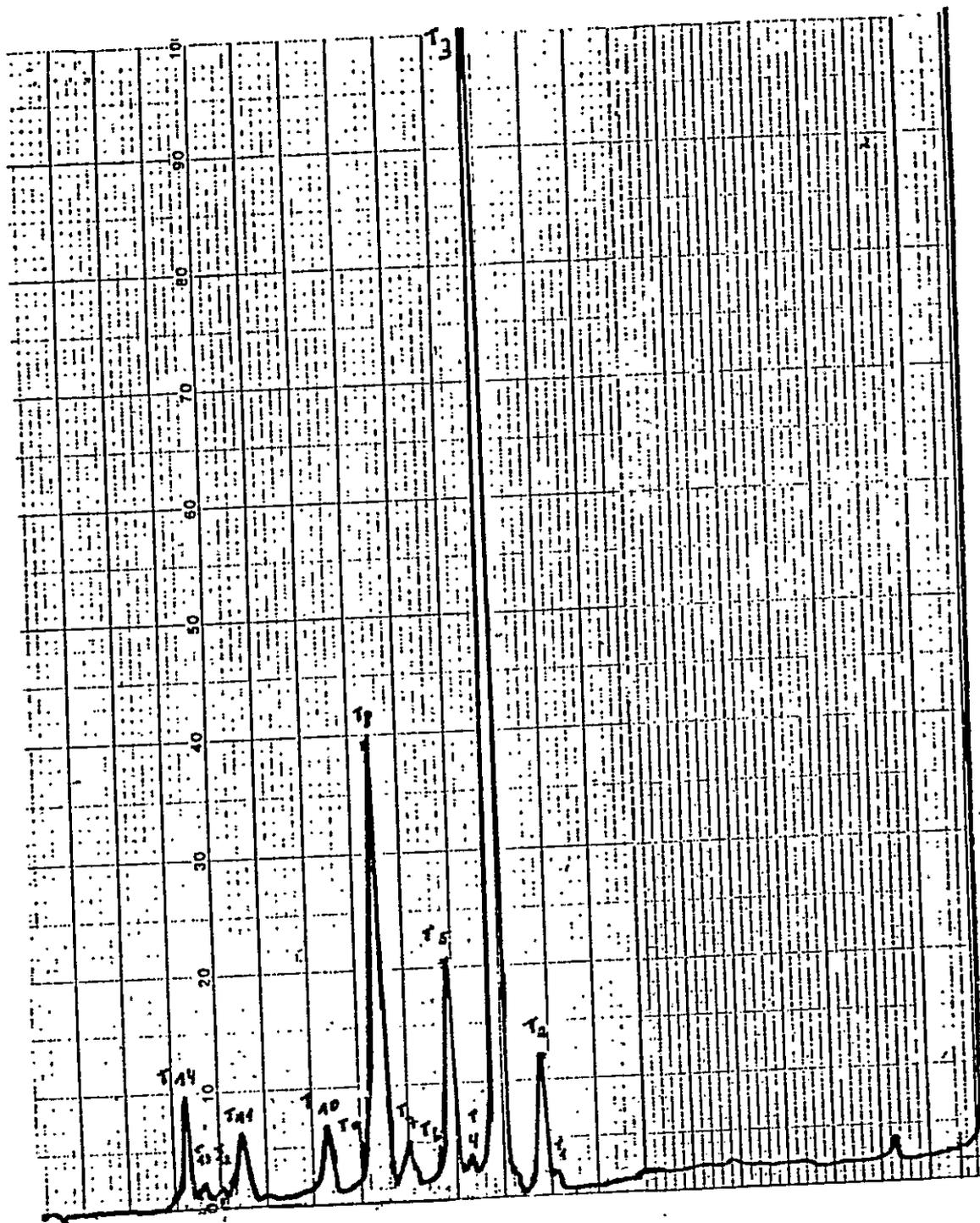


Figura 32. - Cromatograma de gases de esteroides acetilados de Tedania excavata

Temperatura = 270°C; flujo de $N_2 = 0,85$ ml/min; detector de ionización de llama de H_2 .

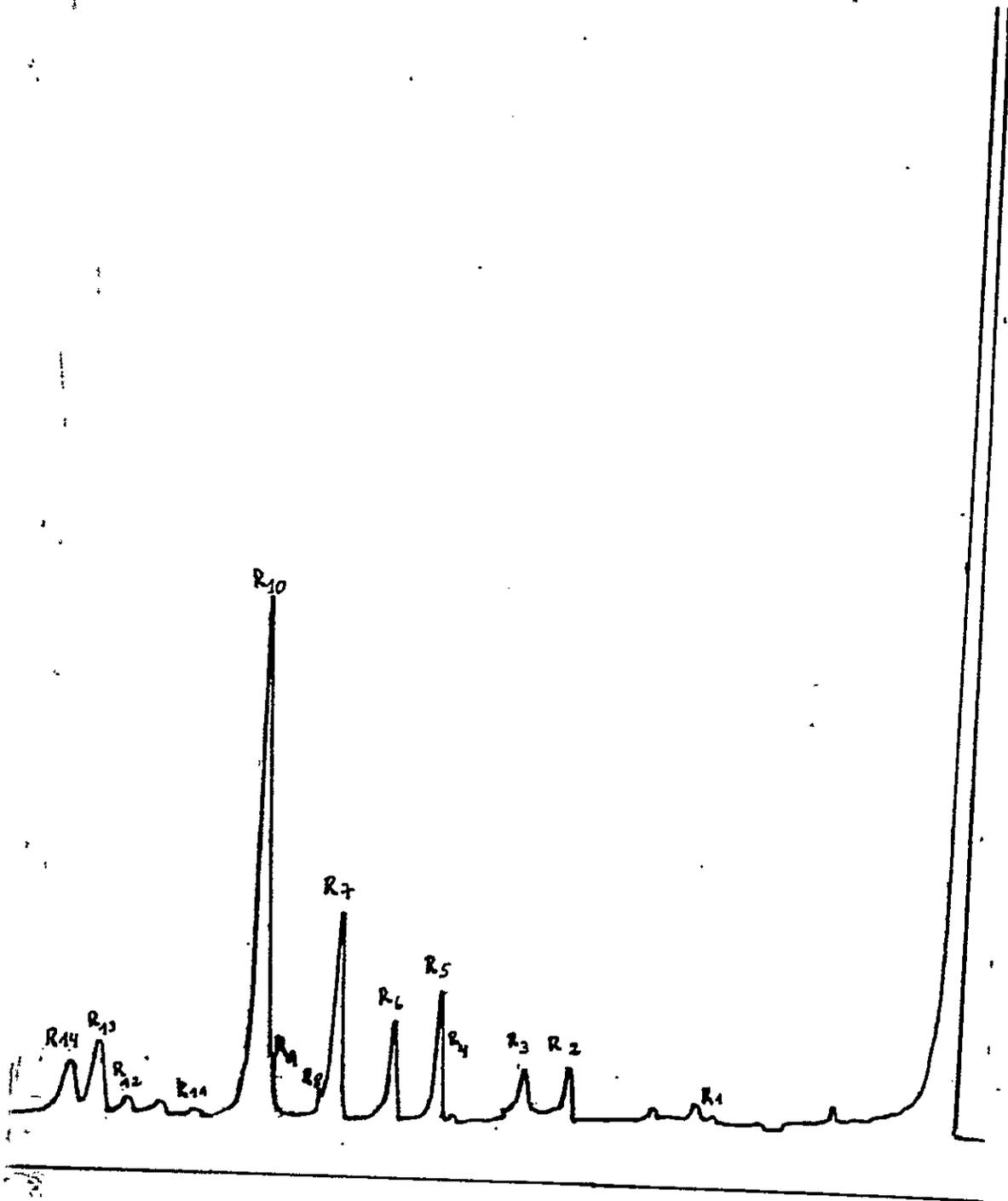


Figura 33. Cromatograma de gases de esteroides acetilados de Reniera macropora

Temperatura = 270°C; flujo de $N_2 = 0,85$ ml/min; detector de ionización de llama de H_2 .

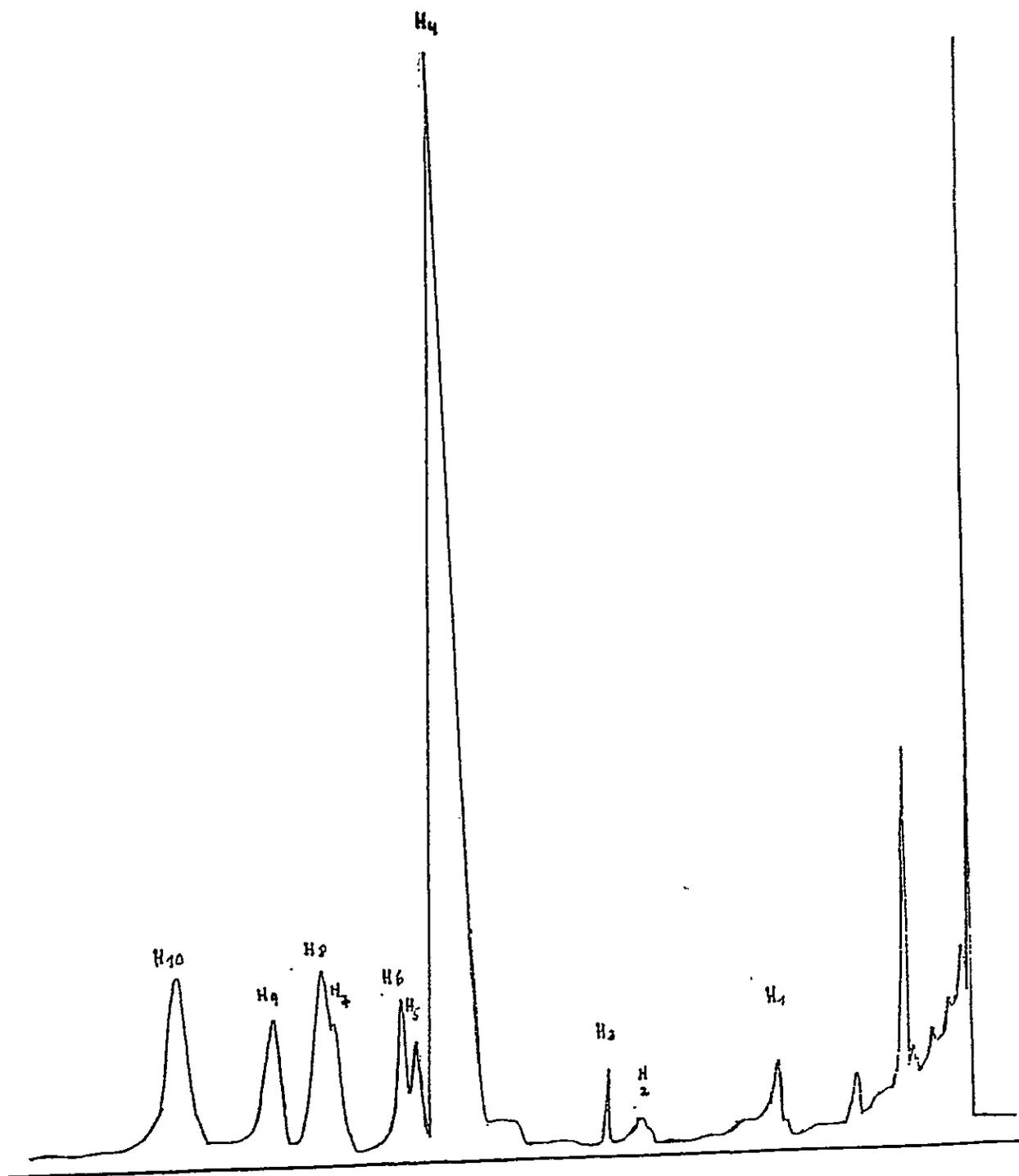
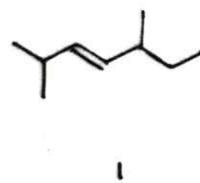
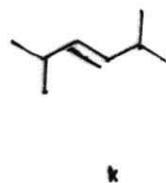
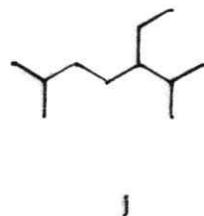
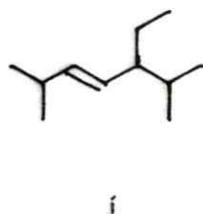
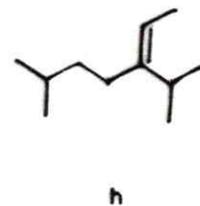
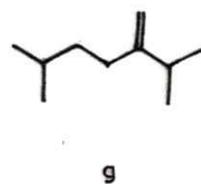
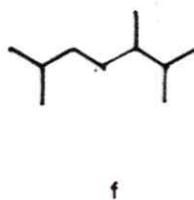
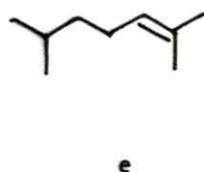
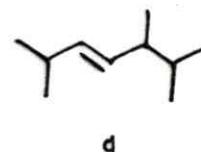
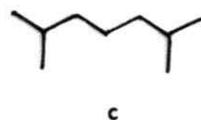
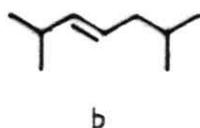
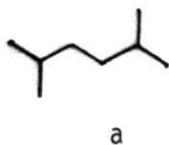
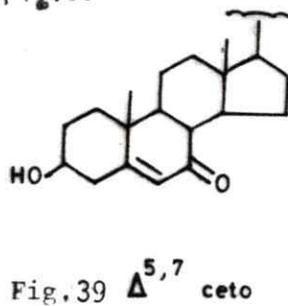
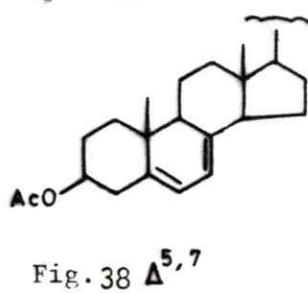
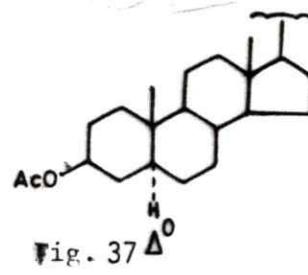
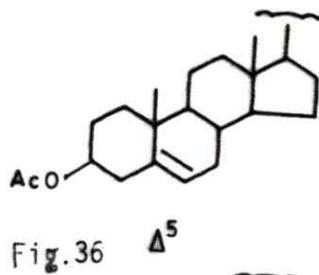
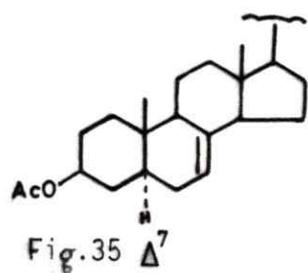


Figura 34. Cromatograma de Gases de esteroides acetilados de Haliclona aglutinata.

Temperatura = 270°C; flujo de N₂ = 0,85 ml/min; detector de ionización de llama de H₂.

Para simplificar la discusión se analizarán separadamente los 5 tipos de núcleos de las 12 cadenas laterales, que presentan los 21 compuestos diferentes identificados en las tres esponjas estudiadas, (ver Esquema 33). Algunos de ellos se encontraron en más de un animal. La composición esteroideal de las poríferas estudiadas, junto con los porcentajes en que se encuentran los esteroides en cada esponja con el tiempo de retención relativo y las referencias correspondientes, se encuentran resumidas en la Tabla 7.



ESQUEMA 33. Representación de los núcleos y cadenas laterales de los esteroides encontrados en esponjas

TABLA 7

Composición química de las Poríferas y Trr de los acetatos de esteroides.

NOMBRE COMPUESTO (referencia)	% DEL COMPUESTO			Trr			
	Tedania excavata	Reniera macropora	Haliclona aglutinata	a	b	c	lit.
24-nor-5 α -colestano- 7-en-3-ol T ₁ , 35a (106)	3,99	0,16	0,92	0,96	0,97	0,97	0,96
22-trans-colesta- 5,22-dien-3-ol T ₂ , 36b (99)	0,11	--	--	0,93	--	--	0,93
colesta-5-en-3 β -ol T ₃ , R ₆ , H ₄ , 36c (99)	55,66	5,49	58,7	1,00	1,00	1,00	1,00
5 α -colesta-3 β -ol T ₄ , H ₅ , R ₇ , 37c (99)	0,67	12,94	6,43	1,01	1,02	1,02	1,01
22-trans-24-metil- colesta-5,22-dien- 3 β -ol T ₅ , R ₈ , H ₆ , 36d (99)	7,04	0,82	3,43	1,03	1,02	1,03	1,03
colesta-5,7-dien- 3 β -ol T ₆ , 38c (107,108)	0,92	--	--	1,03	--	--	1,02
colesta,5,24-dien- 3 β -ol T ₇ , 36e (99)	1,85	--	--	1,05	--	--	1,05
24-metil-colesta- 5-en-3 β -ol T ₈ , R ₉ , H ₇ , 36f (99)	19,57	2,74	3,80	1,07	1,06	1,06	1,07
24-metil-5 α -coles- tan-24(28)-en-3 β - ol T ₁₀ , H ₉ , 37h (99,109)	2,59	--	5,54	1,09	--	1,09	1,09

24-metil-colesta-5,24(28)-dien-3 β -ol T ₉ , R ₁₀ , H ₈ , 36g (99)	1,03	50,77	8.7	1,07	1,07	1,07	1,07
22-trans-24-etil-colesta-5,22-dien-3 β -ol T ₁₁ , R ₁₂ , 36i (99)	2,88	1,57	--	1,13	1,12	--	1,13
22-trans-24-etil-colesta-22-en-3 β -ol T ₁₂ , 37i (99)	0,18	--	--	1,14	--	--	1,14
24-etil-colesta-5-en-3 β -ol T ₁₃ , H ₁₀ , 36j (99)	0,39	--	9.2	1,16	--	1,16	1,16
24-etil-colesta-3 β -ol T ₁₄ , 37j (99)	3,10	--	--	1,19	--	--	1,17
colesta-5-en-7-ceto-3 β -ol T ₁₅ , 39c (107)	n.e.	--	--	--	--	--	1.32
22-trans-24-nor-colesta-5,22-dien-3 β -ol R ₁ , H ₁ , 36k (99)	--	0,39	1,98	--	0,85	0,85	0,85
24-nor-5 α -colestan-22-en-3 β -ol R ₂ , 37k (99)	--	2,16	--	--	0,91	--	,86
22-trans-24-metil-27-nor-colesta-5,22-dien-3 β -ol R ₃ , 36l (99)	--	3,59	--	--	0,94	--	0,94
22-trans-5 α -colestan-22-en-3 β -ol R ₅ , 37b (110)	--	7,32	--	--	0,98	--	0,97

24-metil-5 α -coles- tan-3 β -ol R ₁₁ , 3,7f (99)	--	0,52	--	--	1,08	--	1,08
R ₁₃	--	6,27	--	--	1,14	--	--
R ₁₄	--	5,26	--	--	1,15	--	--
22-trans-24-nor- colesta-7,22-dien- 3 β -ol H ₂ , 35'k (99)	--	--	1,29	--	--	0,90	0,90

* Para identificar los compuestos de las mezclas de esteroides, se realizó una comparación de los T_{rr} experimentales con los ya descritos en la literatura, tomando como patrón el colesterol.

Las figuras de cada esteroide se representan en el Esquema 33.

Los compuestos obtenidos fueron designados como:

-T₁, T₂...T₁₅ para el caso de Tedania excavata.

-R₁, R₂...R₁₄ para Reniera macropora.

-H₁, H₂...H₁₀ en el caso de Haliclona aglutinata.

La primera columna, señala el nombre científico de los esteroides de cada esponja.

La segunda columna, señala el % en que se encuentra cada esteroide en las esponjas.

La tercera columna, indica el Tiempo de retención relativo de los esteroides presentes en cada esponja.

La siguiente notación 35a, significa: Figura 35, con una cadena lateral tipo a (Esquema 33, página 107).

Las referencias respectivas van indicadas entre paréntesis.

I ANÁLISIS DE LOS NÚCLEOS ESTEROIDALES

1. Δ^0

Se caracteriza por presentar una señal importante a m/z 257, equivalente a d_a en el caso del colesterol, (Esquema 8, página 58), indicando la presencia de un sistema anular totalmente saturado, el cual proviene de la pérdida de la cadena lateral y del ácido acético.

Se observa una señal intensa a m/z 215, correspondiente a la pérdida de ácido acético, cadena lateral y anillo D.

Se ve también un ión a m/z 255 (l_a , pág. 58) de menor intensidad.

Los diferentes compuestos que presentaron este tipo de núcleo fueron: T₄, T₁₀, T₁₂, T₁₄, R₂, R₁₁.

2. Δ^5

Este núcleo da señales típicas a m/z 255 y m/z 213, las cuales corresponden a d_a y e_a en el Esquema 8 del colesterol (pág 58). Otra señal característica es m/z 120 (k_a) originada por una pérdida de ácido acético y una posterior reacción retro-Diels-Alder.

El fragmento a m/z 275 (h_a , pág. 58), proviene de la pérdida parcial el anillo A.

Los distintos esteroides que presentaron este tipo de

núcleo fueron: T₂, T₃, T₅, T₇, T₈, T₉, T₁₁, T₁₃, R₁, R .

3. Δ^{5,7}

El compuesto T₄ presenta este tipo de núcleo, el cual se caracteriza por presentar una señal intensa a m/z 143 (Esquema 23, pág.67) y un pico de menor intensidad a m/z 253 (de, pág. 58'). Además los iones a m/z 128 y 211 (ea, pág. 58), corroboran la presencia de dos insaturaciones en el sistema anular.

4. Δ⁷

Los compuestos en los cuales se encuentra este núcleo fueron T₁ y H₂.

Una señal importante a m/z 94, caracteriza este tipo de enlace doble. (Ver Esquema 22, pág. 66). Otros fragmentos que presentaron estos compuestos fueron a m/z 255 y 213, descartándose la insaturación en Δ⁵ por no encontrarse los iones a m/z 120 (ka, Esquema 8, página 58) y m/z 275.

5. Δ⁵-7-ceto

El compuesto T₁₅ no se encontraba acetilado y presentó este tipo de núcleo. Los iones que llevaron a su

determinación fueron: m/z 187 (b_7), formado por la ruptura β entre el C12-C13 y C8-C14.

La señal a m/z 287 originada por la formación de un anillo de cuatro miembros a través de una ruptura β entre los C5-C6 y C9-10 (pérdida parcial del anillo A), característica de los 7-cetoesteroides, (ver Esquema 28, página 72).

II ANÁLISIS DE LAS CADENAS LATERALES

1) $C_6-\Delta^{22}$

Por diferencia entre los iones b_6 y d_6 (Esquema 8, página 58), se deduce que la cadena lateral se encuentra formada por C_6H_{12} .

El enlace doble de esta cadena se visualiza por una señal importante a m/z 282, correspondiente a una ruptura vinílica con pérdida de C_6H_{12} y transferencia de un hidrógeno desde el ión b_6 .

El compuesto T_2 presentó esta cadena lateral.

2) $C_7-\Delta^0$

Por diferencia de iones (b_7 , d_7 , Esquema 8, página 58), se deduce que la cadena lateral está constituida por 7 átomos de carbono y 15 átomos de hidrógeno, por lo tanto no tiene insaturaciones. El compuesto que presenta esta cadena

es T_1 .

3) $C_{26}-\Delta^0$

Los esteroides que presentan esta cadena son: T_3 , T_4 , T_6 y T_{15} . Se determinó por diferencia de los iones b_6 y d_6 , deduciéndose que se trataba de una cadena lateral normal del tipo colesterol, sin insaturaciones. (Esquema 8, página 58).

4) $C_{27}-\Delta^{22}$

El compuesto T_8 fue el único que presentó esta cadena lateral, la cual se asignó de la siguiente manera: por la diferencia que existía entre los iones b_6 y d_6 (Esquema 8, pág. 58), se deduce su largo y la presencia de una insaturación. $C_{27}H_{44}$.

Se presentó un ión a m/z 282, típico de los esteroides Δ^{22} , que corresponde a la ruptura vinílica del enlace $C_{20}-C_{22}$ con pérdida de C_7H_{13} y transferencia de un hidrógeno.

El fragmento a m/z M-43 sugiere la existencia de un sustituyente en el C-24, correspondiente a un metilo.

5) $C_{28}-\Delta^{24}$

Las señales a m/z 281, 282 y 283 (Esquema 12, pág. 61), correspondiente a una ruptura β del enlace doble presente en

la cadena lateral, característico de los esteroides Δ^{22} , unida a un sistema anular insaturado.

El único compuesto que presenta esta cadena es T₇.

6) C₂₇- Δ^0

Los esteroides T₈ y R₁₁ presentaron este tipo de cadena lateral, la que se asignó por diferencia de iones entre b₈ y d₈ (Esquema 8, pág. 58), deduciéndose que no presentaba insaturaciones.

7) C₂₇- Δ^{24} , (20)

Esta cadena se determinó por una intensa señal a m/z 296, que corresponde a la pérdida del sustituyente del C-3 y un reordenamiento de Mc Lafferty con eliminación de 6 átomos de carbono de la cadena lateral, lo que implica la presencia de un enlace doble en el C-24.

El esteroide R₁₀ acetilado, equivalente a T₉ y H₈, fue el único que presentó este tipo de cadena lateral, además se obtuvo puro, lo que permitió determinar su estructura en base a otras técnicas espectroscópicas, como espectro de IR y RMN-¹H.

- el espectro de IR (Fig. 40.), presentó absorciones en 1740 y 1650 cm^{-1} , características de un grupo carbonilo del acetato y de un enlace doble respectivamente.

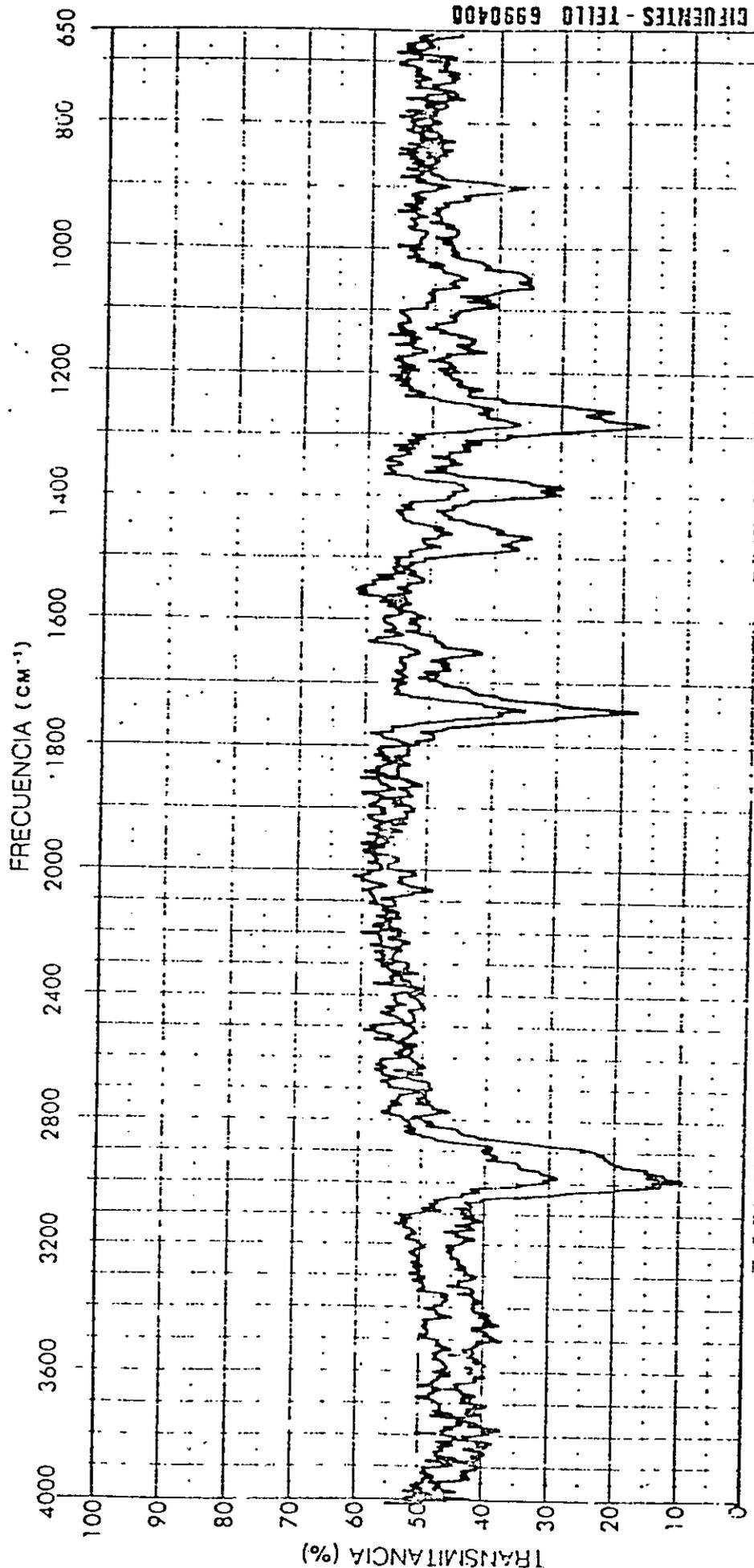


Fig. 40. Espectro infrarrojo del compuesto R₁₀ acetilado (T₉, H₈).
Pastillas de KBr anhidro.

-El espectro de RMN-¹H (Fig. 41) presentó dos singletes a δ 0,65 y 0,99 ppm, correspondiente a los metilos de los carbonos 18 y 19 respectivamente.

Se observan tres dobletes a δ 0,93 ppm con una constante de acoplamiento de 6,5 Hz, 0,98 ppm con un $J=4,8$ Hz y otro a δ 1,00 ppm con un $J=6,1$ Hz. Todos integran para tres protones asignables a los metilos en posición 21, 26 y 27.

Entre δ 4,55 y 4,58 ppm se presenta un multiplete que integra para un protón correspondiente al protón geminal al acetato, vale decir del C-3.

En δ 4,62 y 4,68 ppm se encuentran dos singletes anchos que integran para un protón cada uno y son atribuibles a los protones de un enlace doble terminal presente en el C-28. Finalmente en δ 5,33 ppm, se presenta un doblete ancho ($J=4,9$ Hz) que integra para un protón asignable a un protón olefínico (98).

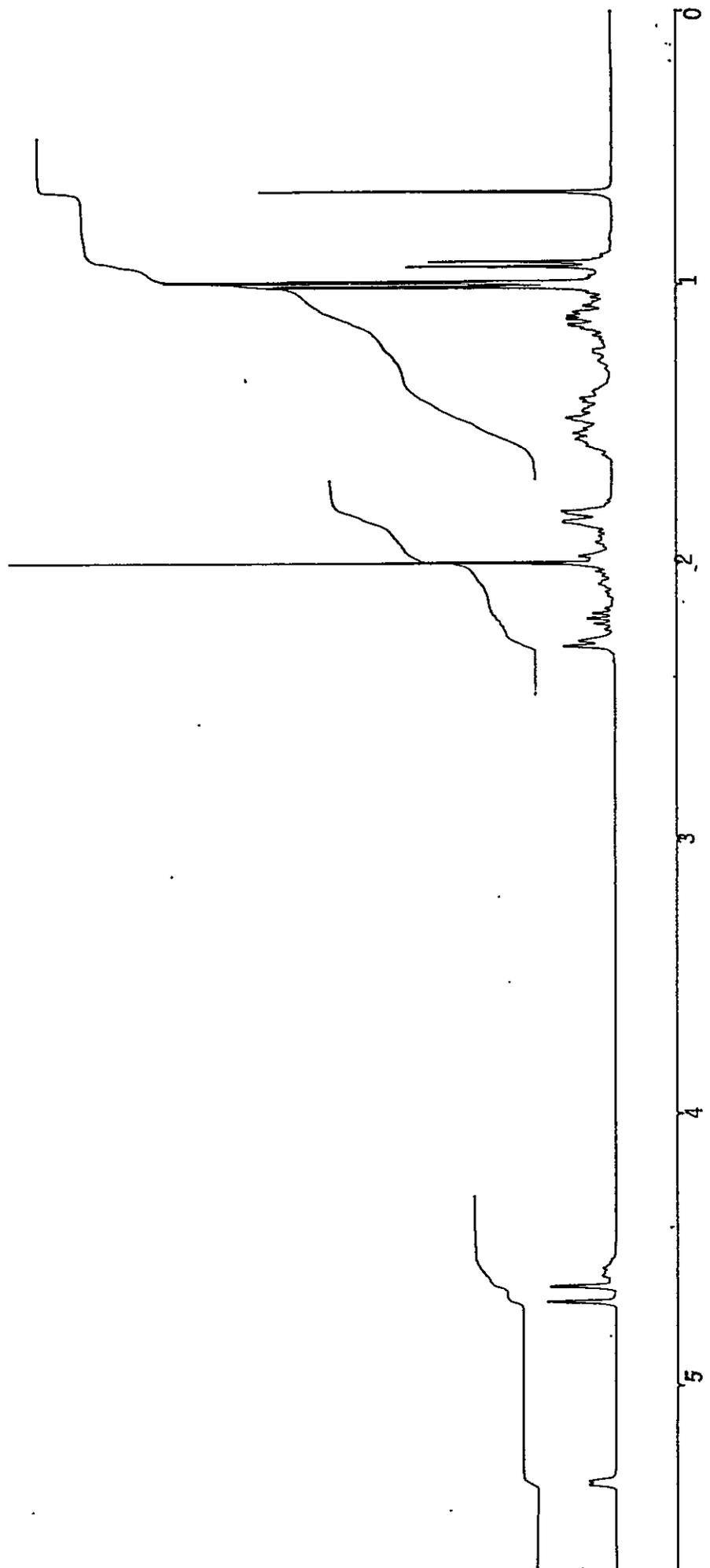


Fig. 41. Espectro RMN-¹H del compuesto R₁₀ acetilado (T₉, H₈).

Equipo de 360 MHz; disolvente= CCl₄; referencia interna= TMS.

8) C₁₀-Δ²⁴

El compuesto T₁₀ tiene esta cadena pero no se analiza su espectro de masa, ya que se determinó sólo por Trr.

9) C₁₀-Δ²²

Por diferencia de iones se deduce que la cadena lateral es C₁₀H₁₉. Se observa una señal importante a m/z 282, que caracteriza a los compuestos con enlace doble en el C-22. (Ver Equema 10, pág. 60).

Otro fragmento a través del cual se determinó esta cadena, fue el M+ -43, correspondiente a la pérdida de C₃H₇, con lo que se deduce que existe un grupo etilo.

Los diferentes esteroides que presentaban esta cadena fueron T₁₁ y T₁₂.

10) C₁₀-Δ⁰

Los compuestos T₁₃ y T₁₄ presentaron este tipo de cadena lateral, la cual fue determinada por diferencia de iones que dió la constitución de C₁₀H₂₁, sin insaturaciones.

La señal M+ -43 corresponde a la pérdida de C₃H₇, lo que sugiere la presencia de un etilo en el C-24. (Ver Esquema B, pág. 58).

11) C₇-A²²

Mediante la diferencia de los iones b_n y d_n (Esquema B, pág. 58'), se deduce que la cadena lateral se encuentra formada por 7 átomos de carbono y una insaturación, lo que se corrobora con el fragmento a m/z 282, que indica la presencia de un enlace doble en el C-22.

R₁, R₂ y H₂ presentaron esta cadena.

12) C₈-A²²

R₃ tenía este tipo de cadena lateral, pero no se analiza su espectro de masa ya que fue determinado sólo por Trr.

Considerando el análisis de los núcleos y de las cadenas laterales, podemos citar como ejemplo que para el compuesto T₁, se sugiere el acetato de 22-trans-colesta-5,22-dien-3β-ol.

II ANALISIS DE LOS CETOESTEROIDES

M₂

El espectro de infrarrojo (Fig. 42) de la mezcla de ceto-esteroides M₂, muestra una señal a 1660 cm⁻¹, típica de cetonas α,β-no saturadas.

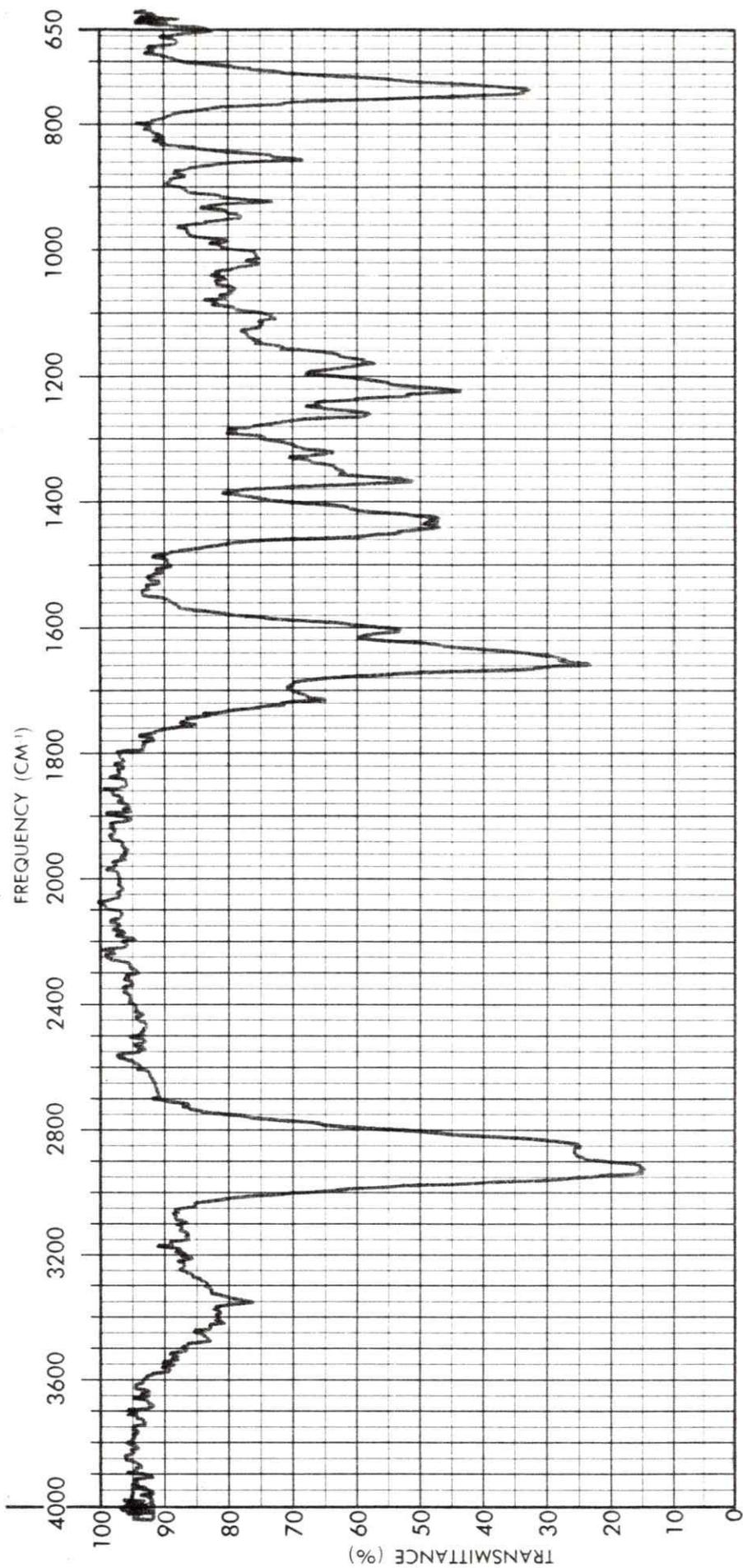


Fig. 42. Espectro infrarrojo de la mezcla de cetoesteroides (M₂).

Pastillas de KBr anhidro.

El cromatograma de gases (Fig. 43) representa la mezcla mayoritaria de dos cetosteroides.

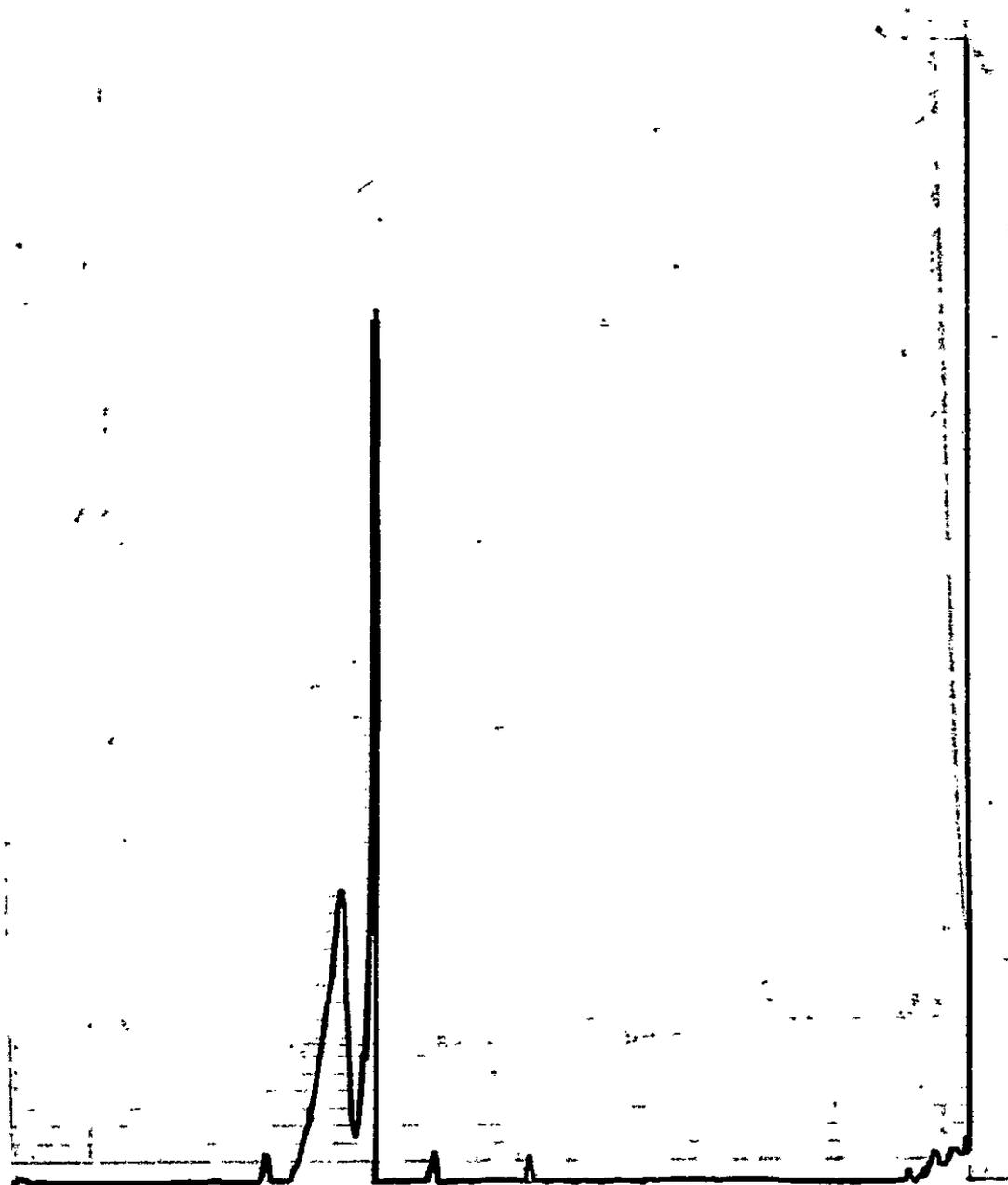


Fig. 43. Cromatograma de gases de cetosteroides (M_2).

Temperatura= 270°C; flujo de N_2 = 0,85 ml/min; detector de ionización de llama de H_2 .

Los espectros de masa de los compuestos M_{2-1} y M_{2-2} (Fig. 44 y 45), presentan rasgos generales muy semejantes, diferenciándose sólo en los iones de mayor peso molecular. Desde el ion m/z 299 hacia masas menores los espectros son prácticamente idénticos, por ello serán analizados en conjunto.

Los iones moleculares están a m/z 352 y m/z 380 para M_{2-1} y M_{2-2} respectivamente. Se observa también una señal intensa a m/z 124 (a_{27}), característica de los compuestos Δ^4 -3-cetoesteroides. Ello se confirma con los fragmentos a m/z 149 (c_{27}) y m/z 229 (e_{27}), (ver Esquema 27, pág. 70).

Los espectros muestran la pérdida de la cadena lateral, quedando un fragmento a m/z 271 y m/z 269, indicando que R debe estar formado por C_6H_{13} y C_6H_9 en M_{2-2} y M_{2-1} , por lo tanto deben existir dos insaturaciones en la cadena lateral.

Una de las insaturaciones se confirma a través del fragmento a m/z 299, que se origina de la ruptura alílica del C-20,22, con una pérdida parcial de R, sin reordenamiento ni migraciones de átomos de hidrógeno. Ello sugiere entonces la presencia de al menos una insaturación en el C-23.

La diferencia entre los dos compuestos, es que M_{2-2} pierde 43 unidades. En cambio M_{2-1} pierde sólo 15 u.m.a. que puede

o no ser de la cadena lateral. El fragmento restante de M_{2-2} , debe ser necesariamente de la cadena lateral con dos insaturaciones.

Considerando la semejanza de los espectros de masa se supone que se trata de cetoesteroides de la misma familia. Tomando en cuenta que en este género se han encontrado compuestos del tipo aplistano (56,99) y en esponjas de otros géneros han sido identificados esteroides con ciclopropanos en las cadenas laterales (111,112,113,114), se puede postular que M_{2-2} es el 24-isopropil-23,24-etiliden-colesta-4,23-dien-3-ona, (Fig. 46m) y M_{2-1} es el 24-metil-23,24-etiliden-colesta-4,23-dien-3-ona, (Fig. 46n). Para confirmar esta suposición, es indispensable disponer de otras técnicas espectroscópicas más completas y tratar de separar ambos productos, lo que no fue posible en esta Tesis.

41C1109#458* x10 Bgd=1 11-NOV-88 13:30+0:00:23 12-253 EI+
 BpM=0 I=1.5v Hm=0 TIC=20769300 Acnt:MATLIN Sys:41C11
 M2-VI-1. E.I. GC-MS COL 7. (12M-OVI) BP 6. GC=0° Cal:1CAL

HMR: 953900
 MASS: 124

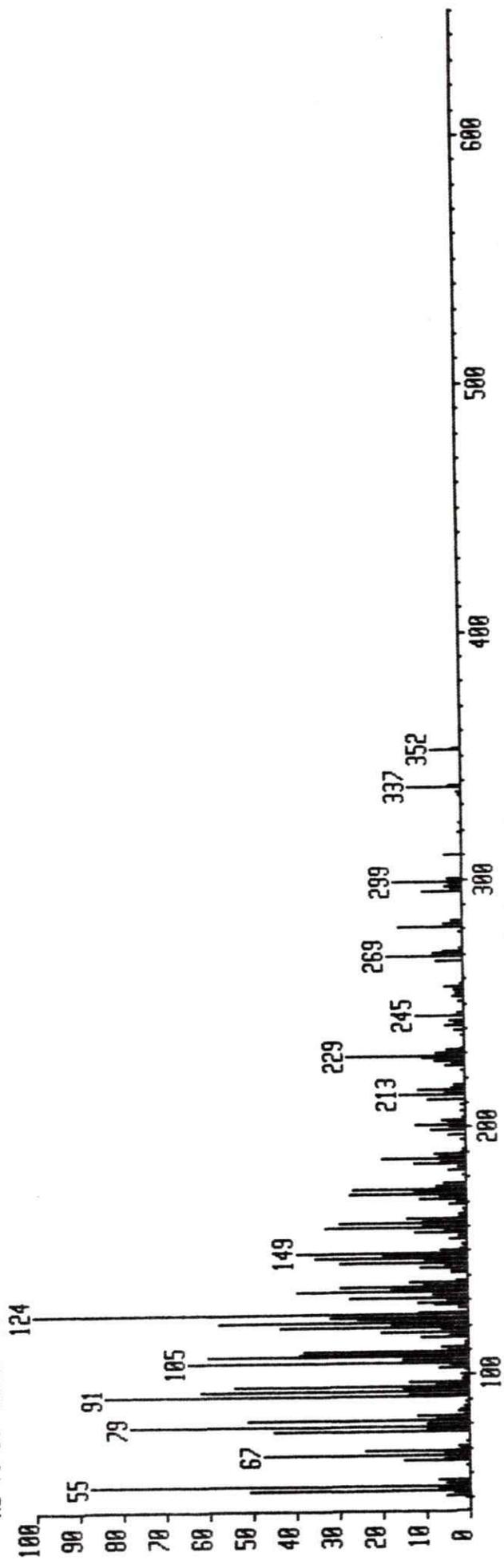


Fig. 44. Espectro de masa del compuesto M₂-1
 Espectrómetro de masa= Varian Mat Ch-7A; cromatógrafo de gases= Va-
 rian 1440; columna de vidrio= 3% OV-17 GCQ (1,8 mm x 2,0 mm); com-
 putador; Varian Mat Data System 166.

41C1T09#470* x10 Bgd=475 -11-NOV-88 13:30:08:45 12-253 EI+
 BpM=0 I=358uV Hm=0 TIC=5293900 Acnt: MATLIN Sys: 41C1T
 M2-VI-1. E.I. GC-MS COL 7. (12M-OV1) BP 6. GC= 0° Cal: ICRAL

HMR: 234800
 MASS: 55

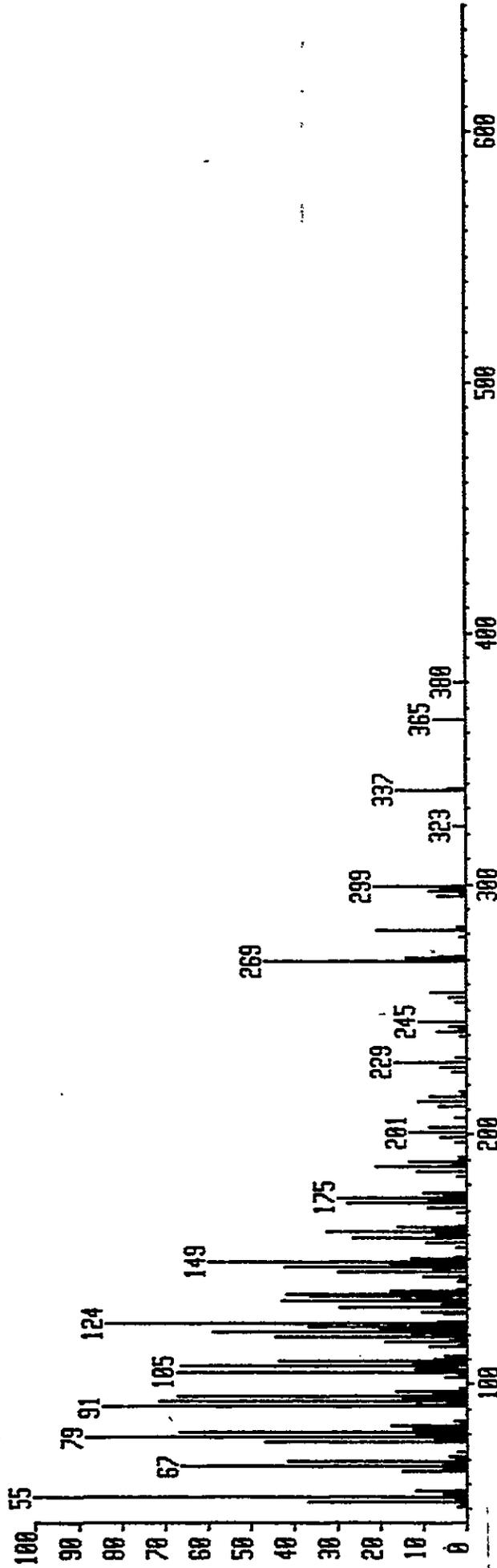


Fig. 45. Espectro de masa del compuesto M2-2

Espectrómetro de masa= Varian Mat Ch-7A; cromatógrafo de gases= Va-
 rian 1440; columna de vidrio= 3% OV-17 GC9 (1,8 mm x 2,0 mm); com-
 putador; Varian Mat Data System 166.



Figura 46. Posibles estructuras propuestas para cetoesteroides.

CONSIDERACIONES QUIMIOTAXONOMICAS.

Incluyendo los resultados de la presente Tesis, hasta el momento se han estudiado químicamente tres especies del género Tedania. En ellas se han encontrado:

Un macrolido y diterpenos como compuestos minoritarios, pero con alta actividad anticancerígena, aislados desde Tedania ignis (82, 83). Así como también esteroides Δ^5 del tipo C-27, C-28, C-29 y C-26. Todos con cadenas laterales saturadas e insaturadas, (56,60). Los esteroides C-26 estaban en cantidades trazas.

En Tedania digitata se aisló un nucleósido derivado de purina (1-metilisoguanosina), con actividad hipotensora, antiinflamatoria, antialérgica, relajante muscular en ratas (84), y un caroteno (50).

De la especie Tedania excavata (81) se identificaron en mayor cantidad esteroides Δ^5 del tipo C-27, C-28, C-29 y C-26. Estos últimos estaban en un porcentaje muy bajo. Además se detectaron un derivado $\Delta^{5,7}$, un Δ^7 y un 7-cetoesteroide.

La presencia de esteroides Δ^{5-7} , Δ^7 , un 7-ceto-derivado y esteroides C-26 en un bajo porcentaje en I. excavata, se cree que sean de origen planctónico, ya que se han encontrado en forma abundante este tipo de metabolitos en el medio marino.

El compuesto 7-ceto-derivado ha sido descrito anteriormente en gastrópodos, pero no ha sido aislado de otras esponjas.

Existen pocos estudios esteroidales en este género, por lo tanto las conclusiones que se pueden obtener en relaciones quimiotaxonómicas, pueden ser modificadas en el futuro, sin embargo, se puede decir que en el género predominan los esteroides Δ^5 del tipo C-27, siendo colest-5-en-3 β -ol el esteroide más abundante en los tres estudios.

Los datos de esteroides identificados en este género, se resumen en las Tablas 8,9 y 10.

TABLA 8. % de la composición de la mezcla de esteroides en especies pertenecientes al género Tedania.

Carbonos	<u>T. ignis</u>	<u>T. ignis</u>	<u>T. excavata</u>
C ₂₆ { A ^{5,22} A ⁷	+ -	+ -	- 0,11
C ₂₇ { A ⁰ A ⁵ A ^{5,7} A ^{5,22} A ^{5,24}	50 9	63 +	0,67 55,66 0,92 3,99 1,85
C ₂₈ { A ⁵ A ^{5,22} A ^{5,24 (28)} A ^{24 (28)}	4 12 + -	20	19,57 7,04 1,03 2,59
C ₂₉ { A ⁰ A ⁵ A ^{5,22} A ²² A	- 18 7	16	3,10 0,39 2,88 0,18
C ₃₀ A ^{5,22 (25)}		+	

A= Δ

TABLA 9. Contenido esteroideal del género Tedania.

Especie	C-26	C-27	C-28	C-29	C-30
<u>T. ignis</u>	+	59	16	18	-
<u>T. ignis</u>	+	63	20	16	+
<u>T. excavata</u>	0,11	63,09	30,23	6,55	-

+ = trazas

TABLA 10. % de los tipos de núcleos, en especies del género Tedania.

Especie	Δ^0	Δ^5	Δ^7
<u>T. ignis</u>	+	100	-
<u>T. ignis</u>	+	+++	-
<u>T. excavata</u>	3,77	96,1	0,11

+ = trazas

+++ = muy abundante

Hasta ahora se han estudiado químicamente 7 especies pertenecientes al género Reniera, de donde se han aislado:

Arilcarotenos de la esponja Reniera japónica (91), probablemente con alguna actividad biológica relacionada con la Vit. A.

De la especie Reniera fulva (92), se identificaron compuestos acetilénicos.

Isoindoles de una Reniera sp (93).

Desde Reniera cratera se obtuvo el 2-aminoimidazol (94).

En la especie R. sarai (95), se han encontrado tres alcaloides pentacíclicos.

Se ha determinado la composición esteroideal de: R. cratera (60), R. sarai (90), R. sp (115) y R. macropora estudiada en esta Tesis. Los resultados de estos estudios se describen en las Tablas 11,12 y 13.

TABLA 11. % de la composición de la mezcla de esteroides en especies del género Reniera.

Carbonos	<u>R. cratera</u>	<u>R. sarai</u>	<u>R. macropora</u> .	<u>R. sp</u>
C ₂₆ { A ²² A ^{5,22} A	2	0,60	2,16 0,39	2,00
C ₂₇ { A ⁰ A ⁵ A ^{5,22} A ^{0,26} A ^{5,24} A	46	42,00 0,50 2,00 2,40	12,94 5,49 3,75 7,32	46,00
C ₂₈ { A ⁰ A ⁵ A ^{5,22} A ^{5,24 (28)} A ^{0,22} A	37	1,80 0,50 5,10 1,00 1,40	0,52 2,74 0,82 50,77	37,00
C ₂₉ { A ^{5,22} A ^{0,22} A ⁵ A ⁰ A ^{5,24 (28)} A	14	1,80 37,12 1,20 1,20	1,57	14,00
C ₃₀ A ^{5,24 (28)}		0,90		

A = Δ

TABLA 12. Contenido esterooidal del género Reniera.

Especie	C-26	C-27	C-28	C-29	C-30
<u>R. cratera</u>	2,00	46,00	37,00	14,00	-
<u>R. sarai</u>	0,60	46,90	9,80	41,20	0,90
<u>R. macropora</u>	2,55	29,50	54,85	13,10	-
<u>R. sp</u>	3,40	29,80	58,1	8,70	-

TABLA 13. % de los tipos de núcleos, en especies del género Reniera.

Especies	Δ^0	Δ^5	n.e.
<u>R. cratera</u>	+++	+++	-
<u>R. sarai</u>	48,80	50,60	-
<u>R. macropora</u>	22,94	65,53	11,53
<u>R. sp</u>	-	100,0	-

+++ = presentes en forma abundante.

Nota: la especie R. cratera presenta principalmente esteroides del tipo Δ^0 y Δ^5 .

De R. cratera, R. sarai y se aislaron esteroides C-27, C-28 y C-29 del tipo Δ^0 y Δ^5 , además de pequeñas cantidades de C-26, con cadenas laterales saturadas e insaturadas.

El principal compuesto de R. macropora fue 24-metil-colesta-5,24(28)-dien-3 β -ol, igual que en R. cratera (50,77%) y R. sp (46,5%), en cambio en R. sarai el 5- α -colestano-3 β -ol (42%) fue el esteroide más abundante.

Reniera sarai presentó también esteroides C-30, Δ^5 y 5- α -estanoles.

En Reniera macropora al igual que en sus congéneres, se aislaron metabolitos del tipo Δ^5 , C-27, C-28, C-29, con cadenas laterales saturadas e insaturadas, y un bajo porcentaje de esteroides C-26. También están presentes compuestos del tipo 5 α -estanoles en esta especie.

Los datos obtenidos en R. macropora son coincidentes con los de dos estudios del mismo género.

Los estudios realizados en especies de este género, revelan un predominio de esteroides Δ^0 y Δ^5 .

En cuanto al número de átomos de carbono, no se puede generalizar, ya que en R. cratera, R. macropora y R. sp., son abundantes los esteroides C-27 (46%, 29,5% y 29,8% respectivamente) y C-28 (37%, 54,85% y 58,1 respectivamente), en cambio, en R. sarai, los esteroides C-27 (46,9%) y C-29 (41,2%), son los predominantes.

Desde el punto de vista químico, se han estudiado 8 especies pertenecientes al género Haliclona cuyos resultados se describen a continuación:

De las especies H. rubens, H. viridis y H. erina, se aisló un polímero formado por varias unidades de piridinium con actividad antibiótica, icctiotóxica, hemolítica y anticancerígena (101).

Se han descrito análisis esteroidales de las siguientes esponjas: H. permollis, H. simulans, H. rubens, H. oculata, H. chilensis, H. flavescens, H. aglutinata y dos especies de Haliclona no identificadas.

Los datos de la composición esteroidea de estas esponjas, se resumen en las Tablas 14, 15 y 16.

TABLA 14. % de la composición de la mezcla de esteroides en especies del género Haliclona.

bonos	<u>H. simulans</u>	<u>H. permollis</u>	<u>H. sp</u>	<u>H. rubens</u>	* <u>H. sp</u>	<u>H. flavescens</u>	<u>H. oculata</u>	* <u>H. chilensis</u>	<u>H. aglutinata</u>
26 { A ⁵ ,22 A ⁷ ,22 A ⁰ ,22	+	0,50	2,00	+	-	0,15	2,30	1,37	1,98
	-	-	-	-	-	1,00	-	0,56	1,29
	-	-	-	-	+	1,50	-	0,42	-
27 { A ⁵ ,22 A ⁰ A ⁷ ,22 A ⁰ ,22 A ⁵ ,24 A ⁷ A	63,00	30,00	51,00	20,84	35,00	+	-	21,00	58,70
	-	-	-	3,64	6,00	0,40	82,00	5,88	0,92
	-	+	1,00	-	-	32,20	-	1,83	6,43
	-	-	-	-	-	3,00	-	-	-
	-	-	-	-	-	7,90	-	-	-
	-	-	-	-	-	22,00	-	2,20	-
	-	-	-	-	-	7,20	-	-	-
28 { A ⁵ ,24(28) A ⁵ ,22 A ⁷ ,22 A ⁷ ,24(28) A ⁷ ,9(11) A ⁰ ,24(28) A ⁰ ,22 A ⁰ A ³ ,5,24(28) A	19,00	-	-	3,80	7,00	-	-	1,05	3,80
	-	26,00	20,00	-	8,00	1,20	2,40	37,02	8,70
	-	21,00	14,00	17,60	11,00	-	-	16,41	3,43
	-	-	-	-	-	17,10	-	-	-
	-	-	-	-	-	3,20	-	0,96	-
	-	-	-	-	-	0,15	-	-	-
	-	-	-	-	-	7,30	-	2,84	-
	-	-	-	-	-	10,00	-	0,82	-
	-	-	-	-	-	0,80	-	0,37	-
	-	-	-	-	-	-	-	0,10	-
	29 { A ⁵ ,22 A ⁰ ,24(28) A ⁵ ,24(28) A ⁰ A ⁷ A ⁷ ,22 A	15,00	-	-	16,38	5,00	-	-	1,02
-		1,00	1,00	3,30	+	-	-	0,90	-
-		-	-	-	-	-	-	-	5,54
-		17,00	2,00	-	4,00	-	2,90	2,30	-
-		-	-	-	-	0,60	-	0,32	-
-		-	-	n.e.	-	4,10	-	-	-
30 { A ⁰ ,22 A ⁵	-	-	-	-	-	-	-	0,22	-
	-	-	-	-	-	-	-	0,12	-

* = especies de donde se han aislado apelistanos; 0,10 y 16% para H. chilensis y H. sp respectivamente.
A = Δ

TABLA 15. Contenido esteroidal del género Haliclona.

<u>Especie</u>	C-26	C-27	C-28	C-29	C-30
<u>H. simulans</u>	+	63,00	19,00	15,00	-
<u>H. permollis</u>	0,50	30,00	47,00	18,00	-
<u>H. sp</u>	2,00	52,00	34,00	3,00	-
<u>H. rubens</u>	+	24,48	21,40	19,68 y n.e.	-
<u>H. sp</u>	+	45,00	26,00	28,00	-
<u>H. flavescens</u>	2,65	50,70	39,75	6,70	-
<u>H. oculata</u>	2,30	85,00	2,40	2,90	-
<u>H. chilensis</u>	2,35	30,91	59,57	4,76	0,12
<u>H. aglutinata</u>	3,27	66,05	15,93	14,74	-

n.e.= no especificado

+ = cantidades trazas

TABLA 16. % de los tipos de núcleos. en especies del género Haliclona.

Especie	Δ^0	Δ^5	Δ^7	$\Delta^{7,9(11)}$
<u>H. simulans</u>	-	97,00	-	-
<u>H. permollis</u>	+	95,50	-	-
<u>H. sp</u>	1,00	90,00	-	-
<u>H. rubens</u>	29,14	65,59	-	-
<u>H. sp</u>	+	92,00	-	-
<u>H. flavescens</u>	60,30	1,75	37,60	0,15
<u>H. oculata</u>	-	92,60	-	-
<u>H. chilensis</u>	6,82	89,27	1,52	-
<u>H. aglutinata</u>	11,97	86,73	1,29	-

Haliclona permollis y Haliclona simulans presentaban esteroides del tipo Δ^5 . C-27, C-28, y C-29, con cadenas laterales saturadas e insaturadas.

En las especies Haliclona rubens (97), Haliclona oculata (98) y Haliclona chilensis (100), se encontraron compuestos del tipo Δ^5 con cadenas laterales funcionalizadas con hidroxilos, grupos carbonilos, o simplemente con enlaces dobles.

Haliclona chilensis (99) presentó además esteroides Δ^5 , principalmente C-27, C-28, C-29, C-30 y pequeñas cantidades de Δ^0 y Δ^7 ; todos con cadenas laterales saturadas e insaturadas.

Existe un estudio que revela la presencia de carotenos, en la especie Haliclona permollis (57).

El metabolito más abundante en H. aglutinata fue colest-5-en-3 β -ol (58,7%), el cual fue también abundante en la especie H. chilensis, H. rubens, H. permollis, H. simulans y en otras dos especies del género Haliclona, no identificadas.

De todos los estudios esteroidales realizados hasta ahora, incluyendo H. aglutinata, se deduce que hay una

tendencia al predominio de núcleos Δ^5 del tipo C-27 y C-28. Sin embargo, en el sentido más estricto, es decir, considerando las variadas insaturaciones que presentan las cadenas laterales de las especies del género Haliclona, se nota una clara dispersión en H. chilensis, H. flavescens (84) y H. rubens del resto de las especies estudiadas.

H. rubens presenta una composición química similar al género Reniera.

H. aglutinata, H. flavescens y H. chilensis tienen rasgos semejantes, ya que en ellas se han detectado esteroides Δ^6 y Δ^7 aunque en proporciones muy variadas (entre un 6,82% a 60,3% para el caso de Δ^6 y entre 1,52% y 37,6% para esteroides Δ^7). (Ver pág.142). Esta clase de esteroides no fueron descritos en el estudio de las otras especies del género Haliclona.

Es necesario señalar que la presencia de esteroides Δ^7 en cantidad moderada en H. flavescens y Δ^6 en bajo porcentaje, hace que esta esponja sea diferente a ambos géneros, Reniera y Haliclona.

En H. chilensis y H. sp (56,93), se aislaron pequeñas cantidades de compuestos del tipo aplistano, los cuales constituyen los principales componentes de las Verónidas, (grupo anómalo dentro de las Ceractinomorfos).

Considerando esta diferencia se deduce que algunas especies del género Haliclona tienen la capacidad de sintetizar aplisteroles, siendo un rasgo ancestral que conservan algunas Haploscléridas.

Tomando en cuenta el debate histórico que ha tenido la clasificación de especies dentro del género Reniera y/o Haliclona, con este estudio esteroidal y los datos descritos en la literatura, se corrobora la existencia de dos géneros diferentes, ya que en las Renieras hay una abundancia de esteroides C-27, C-28 y C-29 del tipo Δ^5 y Δ^6 , en cambio para especies pertenecientes al género Haliclona, abundan los esteroides C-27 y C-28 del tipo Δ^5 preferentemente. Además algunas Haliclonas presentan grupos ceto ya sea en el núcleo o en la cadena lateral, los cuales no han sido descritos en especies del género Reniera. En estas últimas se han aislado también mayor cantidad de metabolitos secundarios con actividad biológica que en el caso de las Haliclonas.

CONCLUSIONES

I. Del análisis combinado de E.M. y C.G. de la esponja I. excavata, se identificaron catorce esteroides previamente acetilados y uno sin acetilar; todos ellos descritos en la literatura.

24-nor-5 α -colestano-7-en-3 β -ol

22-trans-colesta-5,22-dien-3 β -ol

colesta-5-en-3 β -ol

22-trans-24-metil-colesta-5,22-dien-3 β -ol

colesta-5,7-dien-3 β -ol

colesta-5,24-dien-3 β -ol

24-metil-colesta-5-en-3 β -ol

24-metil-colesta-5,24(28)-dien-3 β -ol

24-etil-5 β -colestano-24(28)-en-3 β -ol

22-trans-24-etil-colesta-5,22-dien-3 β -ol

22-trans-24-etil-5 α -colestano-22-en-3 β -ol

24-etil-colesta-5-en-3 β -ol

24-etil-5 α -colestano-3 β -ol

colesta-5-en-7-ceto-3 β -ol

II. Del estudio esteroide de la esponja R. macropora se identificaron los siguientes esteroides:

22-trans-colesta-5,22-dien-3 β -ol
colesta-5-en-3 β -ol
5 α -coleston-3 β -ol
22-trans-24-metil-colesta-5,22-dien-3 β -ol
24-metil-colesta-5,24(28)-dien-3 β -ol
24-metil-colesta-5-en-3 β -ol
22-trans-24-nor-colesta-5,22-dien-3 β -ol
24-nor-5 α -coleston-22-en-3 β -ol
22-trans-24-metil-27-nor-colesta-5,22-dien-3 β -ol
22-trans-5 α -coleston-22-en-3 β -ol

III. El estudio de la composición esteroidal de la esponja H. aglutinata, arrojó la presencia de los siguientes esteroides:

22-trans-colesta-5,22-dien-3 β -ol
colesta-5-en-3 β -ol
5 α -coleston-3 β -ol
22-trans-24-metil-colesta-5,22-dien-3 β -ol
24-metil-colesta-5-en-3 β -ol
24-metil-colesta-5,24(28)-dien-3 β -ol
24-etil-5 α -coleston-24(28)-en-3 β -ol
24-etil-colesta-5-en-3 β -ol
22-trans-24-nor-colesta-5,22-dien-3 β -ol

22-trans-24-nor-5 α -colestán-7,22-dien-3 β -ol.

IV. Se aislaron dos nuevos ceto-esteroides del tipo 3-ceto- Δ^4 , de la especie Haliclona aglutinata, cuyas estructuras propuestas fueron:

23-metil-23,24-etiliden-colesta-4,23-dien-3-ona

24-isopropil-23,24-etiliden-colesta-4,23-dien-3-ona.

Estos compuestos se describen por primera vez en la literatura; el anillo ciclopropeno refleja una vez más, el carácter ancestral que conservan algunas Haploscléridas.

V. Se realizaron consideraciones quimiosistemáticas, en las tres especies estudiadas, comprobándose que los datos obtenidos en esta Tesis son concordantes con estudios similares realizados en el género Tedania y Reniera. Para los 9 casos del género Haliclona, los resultados son consistentes solo con algunas especies de Haliclona, presentándose discrepancias con otras especies del mismo género.

VI. Considerando la composición esteroidal de los géneros Reniera y Haliclona, se ratifica la validez de separar taxonómicamente ambos géneros.

BIBLIOGRAFIA

1. Y.H.Kin, L.A.Pavelka and M.S.Mosher
Science 207, 195 (1980)
2. M.Suzuki, E.Kurosawa and T.Irie
Tetrahedron Letters, 821 (1974)
3. D.J.Faulkner and M.O.Stalland
Tetrahedron Letters, 1171 (1973)
4. J.D.Martin
Bol. Soc. Quím. del Perú 50, 1 (1984)
5. D.J.Faulkner
Natural Product Report 1, 552 (1984)
6. F.J.Schmitz, D.P.Michaud and K.H.Hollenbeak
J. Org. Chem. 45, 1525 (1980)
7. R.Kinnel, A.J.Duggan, T.Eisner and J.Meinwald
Tetrahedron Letters, 3913 (1977)
8. J.Hellou, R.J.Andersen and J.E.Thompson
Tetrahedron 38, 1875 (1982)
9. J.E.Hochlowski, D.J.Faulkner, G.K.Matsumoto, J.Clardy
J. Org. Chem. 48, 1141 (1983)
10. J.E.Hochlowski, R.P.Walker, C.Ireland and D.J.Faulkner
J. Org. Chem. 47, 88 (1982)
11. G.Cimino, A.Crispino, S.de Rosa, S.de Stefano, G.Sodano
Experientia 37, 924 (1981)
12. F.J.Mc Donald, D.C.Campbell, D.J.Vanderah, F.J.Schmitz,
D.M.Washecheck, J.E.Bucks and D.van der Helm
J. Org. Chem. 40, 665 (1975)
13. R.D.Barnes
Invertebrate Zoology. Second Edition, W.B.Saunders Co.
Philadelphia, London, Toronto (1968)
14. R.Desqueyroux and M.Moyano
Bol. Soc. Biol. 58, 39 (1987)

15. Storer and Usinger
General Zoology. Third Edition McGraw-Hill Book Co.
Inc. New York, Toronto, London (1957)
16. P.R.Bergquist and R.J.Wells
Marine Natural Products. Acad.Press Inc. 5, (1) (1983)
17. H.L.Sleeper and W.Fenical
J. Am. Chem. Soc. 99, 2367 (1977)
18. G.Cimino, S.de Rosa, S.de Stefano, G.Sodano and G.Villani
Science 219, 1237 (1983)
19. W.Fenical, H.L.Sleeper, V.J.Paul, M.O.Stallard, H.H.Sum
Pure and App. Chem. 51, 1865 (1979)
20. J.E.Thompson, R.P.Walker, S.J.Wratten and D.J.Faulkner
Tetrahedron 38, 1865 (1982)
21. G.R.Schlte and P.J.Scheuer
Tetrahedron 38, 1857 (1982)
22. C.Ireland and D.J.Faulkner
J. Org. Chem. 42, 3157 (1977)
23. M.L.Vásquez and A.San-Martín
Rev. Chil. Educ. Quím. 11, 8 (1986)
24. M.L.Vásquez and A.San-Martín
Rev. Chil. Educ. Quím. 12, 20 (1987)
25. K.Tachibana, P.J.Scheuer, Y.Tsukitani and H.Kikuchi
J. Am. Chem. Soc. 103, 2469 (1981)
26. F.J.Schmitz and Y.Gopichand
Tetrahedron Letters, 3637 (1978)
27. R.J.Anderson
Tetrahedron Letters, 2541 (1978)
28. D.W.Phillipson and K.L.Rinehart Jr.
J. Am. Chem. Soc. 105, 7735 (1983)
29. N.Fusetani, Y.Kato, S.Matsumaga and K.Hashimoto
Tetrahedron Letters, 25, 4941 (1984)

30. H.Nakamura, H.Wu, J.Kobayashi and Y.Ohizumi
Tetrahedron Letters, 24, 4105 (1983)
31. H.Kikuchi, Y.Tsukitani, I.Shimizu, M.Kobayashi and
I.Kitagawa
Chem. Pharm Bull. 29, 1492 (1981)
32. H.Kikuchi, Y.Tsukitani, I.Shimizu, M.Kobayashi and
I.Kitagawa
Chem. Pharm. Bull. 31, 552 (1983)
33. H.Nakamura, H.Wu, Y.Ahizumi and Y.Hirota
Tetrahedron Letters 25, 2989 (1984)
34. Y.Kashman, A.Groweiss and U.Shmueli
Tetrahedron Letters, 21, 3629 (1980)
35. E.Ayanoglu, J.M.Kornprobst, A.Aboud-Bichara, C.Djerassi
Tetrahedron Letters, 24, 1111 (1983)
36. M.D.Higgs and D.J.Faulkner
J. Org. Chem. 43, 3454 (1978)
37. G.Cimino, S.de Stefano, L.Minale and G.Sodano
Comp. Biochem. Physiol. 50B, 279 (1975)
38. G.Cimino, S.de Stefano and L.Minale
Comp. Biochem. Physiol. 47B, 895 (1974)
39. G.Cimino, P.Defuca, S.de Stefano and L.Minale
Tetrahedron 31, 271 (1975)
40. H.Nakamura, S.Deng, J.Kobayashi, Y.Ohizumi, Y.Tomotake,
T.Matsizaki and Y.Hirato
Tetrahedron Letters, 28, 621 (1987)
41. H.Nakamura, J.Kobayashi and Y.Ohizumi
J. Chem. Soc. Perkin Trans I, 173 (1987)
42. T.K.Devon and A.T.Scott
Handbook of Naturally Ocurring Compounds 1
Acad. Press, New York (1978)
43. I.Kitagawa, N.Yoshioka, C.Kanga, M.Yoshikawa and
Y.Hamamoto
Chem. Pharm. Bull. 35, 928 (1987)

44. L.Minale and R.Riccio
Tetrahedron Letters, 2711 (1976)
45. T.F.Molinski and D.J.Faulkner
J. Org. Chem. 52, 296 (1987)
46. G.Cimino, S.de Stefano and L.Minale
Experientia 30, 18 (1974)
47. G.Cimino, D.de Rosa, S.de Stefano and L.Minale
Tetrahedron 30, 645 (1974)
48. G.Cimino, S.de Stefano and L.Minale
Experientia 30, 846 (1974)
49. M.Nakagawam Y.Hamamoto, M.Ishihama, S.Hanasaki
and M.Endo
Tetrahedron Letters, 28, 431 (1987)
50. N. Okukado
Bull. Chem. Soc. Jpn 48, 1061 (1975)
51. R.J.Stonard and R.J.Andersen
J. Org. Chem. 45, 3687 (1980)
52. F.J.Schmitz, V.Lakshmi, D.R.Powell and D.van der Helm
J. Org. Chem. 49, 241 (1984)
53. G.Cimino, S.de Stefano and L.Minale
Experientia 28, 1401 (1972)
54. L.Minale, G.Cimino, S.de Stefano and G.Sodano
Fortschr. Chem. Org. Naturst. 33, 1 (1976)
55. W.Bergmann
J. Mar. Res. 8, 137 (1949)
56. P.R.Bergquist, W.Hofheinz and G.Oesterhelt
Biochem. Syst. Ecol. 8, 423 (1980)
57. S.Liaaen-Jensen, B.Renstrom, T.Ramdal, M.Hallenstrat
and P.R.Bergquist
Biochem. Syst. Ecol. 10, 167 (1982)

58. M.P.Lawson, P.R.Bergquist and R.C.Cambie
Biochem. Syst. Ecol. 12, 375 (1984).
59. P.R.Bergquist, A.Lavis and R.C.Cambie
Biochem. Syst. Ecol. 14, 105 (1986).
60. M.de Rosa, L.Minale and G.Sodano
Comp. Biochem. Physiol. 46B, 823 (1973)
61. E. Gros, A. Pomilio, A. Seldes y G. Burton.
Introduccion al estudio de los Productos Naturales.
Secretaria general de la O.E.A.. Monografia 30. 1985.
62. P.J. Scheuer
Marine Natural Products. Acad. Press In.; 2, (1978).
63. J.H.Cho and C.Djerassi
J. Org. Chem. 52, 4517 (1988)
64. G.Guilla and F.Pietra
Helv. Chim. Acta 71, 62 (1988)
65. R.R.West and J.M.Cardellina
J. Org. Chem. 53, 2782 (1988)
66. R.M.X.Carlson, C.Tarchini and C.Djerassi
Pure and Appl. Chem. 50, 211 (1978)
67. Capon and D.J.Faulkner
J. Org. Chem. 50, 4771 (1985)
68. S.B.Seidel, J.R.Proudfoot, C.Djerassi, D.Sica
and G.Sodano
Steroids 47, 49 (1986)
69. C.Grunwald
Steroids, 221 (1975)
70. J.Mann
Lectures in Organic Chemistry, University of
Reeding, Oxford, Secondary Metabolism (1978).
71. W.S. Johnson.
Bioorganic Chem., 5, 51, (1976).

72. C.Djerassi
Pure and Appl. Chem. 53, 873 (1981)
73. M. Kobayashi and H. Mitsunashi
Tetrahedron 30, 2147, 1974).
74. L.Minale and G.Sodano
J. Chem. Soc. Perkin Trans I, 2380 (1974)
75. L.Bibolino, L.Minale and G.Sodano
J. Chem. Soc. Comm., 524 (1978)
76. A.W.Barksdale, T.C.Mc Morris, R.Seshadri,
T.Arunachalam, J.A.Edwards, J.Sundeen and
D.M.Green
J. Gen. Microbiol. 82, 297 (1974).
77. E.Fattorusso, S.Magno, L.Mayol, C.Santacroce
and D.Sica
Tetrahedron 31, 1715 (1975)
78. C.A.Mattia, L.Mazarella, R.Puliti, D.Sica and
F.Zollo
Tetrahedron Letters, 41, 3953 (1978)
79. N.Theobald, R.J.Wells and C.Djerassi
J. Am. Chem. Soc. 100, 7677 (1978)
80. T.N.Makarieva, V.A.Stonik, P.Alcolado and
Y.B.Elyakov
Comp. Biochem. Physiol. 68B, 481 (1980)
81. Z.V.Zaretskii
Mass Spectrometry of Steroids. Universities
Press, Jerusalem, Israel (1976)
82. S.G.Wyllie and C.Djerassi
J. Org. Chem. 33, 305 (1968)
83. A.M.Mackie and A.B.Turner
Biochem. J. 117, 543 (1970)
84. J.Zielinski, T.Milkova, S.Popov, N.Marekov
and C.Djerassi
Steroids 39, 2976 (1982)

85. A.M.Seldes, J.Rovirosa, M.L.Vásquez, E.Gros and A.San-Martín
Biochem. Syst. Ecol. 16, 495 (1988)
86. F.J.Schmitz, O.J.Vanderah, K.H.Hollenbeak, C.E.Enwall and Y.Gopichand
J. Org. Chem. 48, 3841 (1983)
87. F.J.Schmitz, S.P.Gunasekera, Y.Gopichand, M.B.Hossain and D.van der Helm
J. Am. Chem. Soc. 106, 7251 (1984)
88. R.J.Quinn, R.P.Gregson, A.F.Cook and R.T.Bartlett
Tetrahedron Letters, 21, 567 (1980)
89. P. R. Bergquist and . P. Warne.
The marine Fauna of New Zeland: Porífera, Demospongiae, Part. 3 (Haplosclerida y Nepheliospongida). New Zeland Oceanographic Institute Memoir 87, (1980).
90. A.Dinis, V.Piccioli and R.Pronzato
Comp. Biochem. Physiol. 81B, 111 (1985)
91. T.Mamasaki, N.Okukado and M.Yamagushi
Bull. Chem. Soc. Jpn. 46, 1884 (1973)
92. G.Cimino and S.de Stefano
Tetrahedron Letters, 15, 1325 (1977)
93. J.M.Frinche and D.J.Faulkner
J. Am. Chem. Soc. 104, 265 (1982)
94. G.Cimino, S.de Stefano and L.Minale
Comp. Biochem. Physiol. 47B, 895 (1974)
95. G. Cimino, S. de Stefano, G. Scognamiglio, G. Sodano y E. Trivellone.
Bull. Soc. Chim. Belg., 95, 783, (1986).
96. M.Y.Sheikh and C.Djerassi
Tetrahedron 20, 4095 (1974)
97. J.A.Ballantine and K.Williams
Tetrahedron Letters, 18, 1547 (1977)

98. J.A.Findlay and A.D.Patil
Can. J. Chem. 63, 2406 (1985)
99. A.M.Seldes, J.Roviroso, A.San-Martín and E.G.Gros
Comp. Biochem. Physiol. 81B, 119 (1985)
100. A.M.Seldes, J.Roviroso, A.San-Martín and E.G.Gros
Experientia 41, 34 (1985)
101. F.J.Schmitz, K.M.Hollenbeak and D.C.Campbell
J. Org. Chem. 43, 3916 (1978)
102. R. Sakai and T. Siga.
Ch. W. Jefford and G. Bernardinelli.
J. Am. Chem.Soc., 108, 6404, (1986).
103. E. Fahy, T. F. Molinsky, M. K. Harper, B. W. Sullivan and D. J. Faulkner.
L. Parkanyi and J. Clardy
Tetrahedron Letters, 29, 3427, (1988).
104. W.Clark, M.Kahn and Nistra
J. Org. Chem. 43, 2923 (1978)
105. H.M.Mc Nair and E.J. Bonelli
Basis Gas Chromatography. Consolidated Printers,
Berkeley, California; 5th.Ed. p.53, (1969).
106. A.M.Seldes
Comunicación Personal, (1985).
107. M.S.Romero and A.M.Seldes
Comp. Biochem. Physiol. 84B, 125 (1986)
108. J.Roviroso, D.Muñoz and A.San-Martín
Lipids 18, 570 (1983)
109. A.M.Seldes, J.Roviroso, A.San-Martín and E.G.Gros
Comp. Biochem. Physiol. 83B, 841 (1986)
110. A.M.Seldes, J.A.Palermo, E.G.Gros, J.Roviroso and A.San-Martín
Biochem. Syst. Ecol. 16, 299 (1988)

111. M.Y.Oumus, M.Sheikh and C.Djerassi
Chem. Comm., 217 (1971)
112. E.Fattorusso, S.Magno, L.Mayol, C.Santacrose
and D.Sica
Tetrahedron 31, 1715 (1975)
113. L.N.Li, M.Li, R.W.Lang, T.Itoh, D.Sica and
C.Djerassi
J. Am. Chem. Soc. 104, 6726 (1982)
114. C.Margot, C.A.N.Catalan, J.R.Proudfoot,
G.Sodano and C.Djerassi
J.C.S. Chem. Comm., 1441 (1987)
115. M.P.Lawson, I.L.Stoilov Thompson and C.Djerassi.
Lipids, 23, 750 (1988).