

AISLAMIENTO Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE UN TERPENO DE LA ESPONJA MARINA *APLYSINA FISTULARIS*.

VILMA LANZA¹, OSCAR CRESCENTE² & WILLIAN HENRÍQUEZ²

¹ *Postgrado en Ciencias Marinas, Instituto Oceanográfico de Venezuela.*
vlanzacastillo@yahoo.es

² *Departamento de Química, Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre.*

RESUMEN: la esponja marina *Aplysina fistularis* fue colectada en Isla Larga, bahía de Mochima, Venezuela, cortada en trozos y sumergida en metanol, filtrada al vacío y extraída cada 24 h. El extracto acuoso fue particionado con acetato de etilo (FAE). FAE fue separado por cromatografía sobre sílica gel obteniéndose 15 fracciones; a partir de la F₅ se adquirieron 15 fracciones y de la F_{5,5} se aisló el terpeno 3,5-dibromo-1-hidroxi-4,4-dimetoxi-2,5-ciclohexadien-1-acetamida elucidada por RMN ¹³C y ¹H con actividad antibacteriana. Las pruebas químicas revelaron la presencia de alcaloides y esteroides en las fracciones probadas.

Palabras claves: *Aplysina fistularis*, esponja marina, terpenos

ABSTRACT: A specimen of the marine sponge *Aplysina fistularis* collected off the coast of Isla Larga, in the Bay of Mochima, Venezuela (10°20'-10°24'N, 64°19'-64°22'W) was cut into pieces and submerged in methanol for 24 hours, thus resulting an exudate suspension that was vacuum-filtered and separated into fractions with ethyl acetate. The fractions in ethyl acetate (FEA) were in turn separated by silica gel chromatography to produce 15 fractions, from which further fractions were obtained. The subfraction resulting from F₅, videlicet, F_{5,5}, yielded a precipitate crystal identified by ¹³C- and ¹H-NMR as the terpen 3,5 dibromo-1-hydroxy-4,4-dimethoxy-2,5-cyclohexadien-1-acetamide, whose antibacterial effect was positively tested against several bacterium strains. Chemical assays also revealed the presence of alkaloids and sterols in the fractions assayed.

Keys words: *Aplysina fistularis*, marine sponge, terpenes

INTRODUCCIÓN

Los poríferos son uno de los grupos marinos con mayor cantidad y variedad de compuestos químicos secundarios con potencial farmacológico (FENICAL, 1982; RODRÍGUEZ & PIÑA, 1993), cuyos posibles usos van desde compuestos antibacteriales (HU *et al.* 2002), antiparasitarios (LE PAPE *et al.* 2000), antiinflamatorios antivirales, anticoagulantes, cardiotónicos, antitumorales (KONDG & ANDERSEN, 1994; KOBAYASHI *et al.* 1996a, 1996b; TSUDA *et al.* 2001), insecticidas (EDRADA *et al.* 1996), inmunomoduladores incluyendo toxinas hasta pinturas antifouling (ACOSTA & RODRÍGUEZ, 1992; GARCÍA *et al.* 1994).

Se ha investigado la producción de metabolitos brominados derivados de la tirosina aislados de las esponjas perteneciente al orden Verongida, tal es el caso de los

compuestos: fistularin-1, [¹⁴C]-L-tirosina, [¹⁴C]-L-3-bromotirosina, [¹⁴C]-L-3,5-dibromotirosina, aerotionina, dibromoverongiaquinol, aeroplysinina-1, cavernicolina-1, aplysamina-1 (CARNEY *et al.* 1995), aplysilina A (GULAVITA *et al.* 1995) y el 11-Deoxifistularina-3 (COMPAGNONE *et al.* 1999); por otro lado, SILVA *et al.* (1991), propusieron que todas las esponjas son capaces de biosintetizar esteroides, asimismo, CARBALLEIRA *et al.* (1992), señalaron que *A. lacunosa* y *A. fistularis* contenían grandes cantidades de los esteroides aplisterol y verongulasterol.

A. fistularis (PALLAS, 1766), pertenece al phylum Porifera, clase Demospongiae, subclase Ceractinomorpha, orden Verongida, familia Aplysinidae. Son de formas tubulares cilíndricas unidas en la base, de aproximadamente 4 a 60 cm

de altura, color mostaza que cambia a marrón oscuro al ser preservada; habita en profundidades entre 2 a 6 m sobre sustrato coralino, rocoso o arenoso (AMARO, 2002).

Se estimó conveniente evaluar la actividad antibacteriana y aislar sustancias bioactivas de la esponja marina *Aplysina fistularis*, la cual pudiera ser fuente natural de agentes terapéuticos en la medicina moderna.

MATERIALES Y MÉTODOS

La colecta de la esponja marina *A. fistularis* se realizó en la Bahía de Mochima, sector Isla Larga, Estado Sucre, Venezuela (10°21'05" y 10°21'38" Lat. N.-64°21'05" y 64°21'25" Long. W).

La esponja fresca (9,5 kg) fue cortada en trozos, los cuales fueron extraídos en metanol por maceración. Se filtró al vacío la solución obtenida, y el solvente fue evaporado a presión reducida a 40°C. Obteniéndose una suspensión acuosa, la cual se extrajo con acetato de etilo. Posteriormente, la fase orgánica fue rotaevaporada y se obtuvo la fracción en acetato de etilos (FAE).

El efecto antibacteriano de las fracciones y compuesto aislado, se detectó por la técnica de difusión en agar o método de antibiograma (BAUER *et al.* 1966) y fototóxico según DANIELS (1965), se utilizaron las cepas bacterianas: *Escherichia coli* (ATCC 10536), *Proteus vulgaris* (ATCC 9920), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Bacillus cereus* (ATCC 9634) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). Las placas de Petri se sirvieron con agar Müller-Hinton (HI MEDIA), e inocularon con una suspensión bacteriana estandarizada por comparación con un patrón McFarland 0,5. Para ambas pruebas se utilizaron discos estériles de papel de filtro Whatman N° 3 de 10 mm (FAE) y de 5 mm de diámetro (subfracciones y el compuesto), impregnados con 25 y 7 ml, respectivamente, con una solución de 40 mg/ml (FAE), 20 mg/ml (subfracciones) y 5 mg/ml (compuesto). Para la actividad fototóxica, los discos impregnados con la(s) solución(es) se irradiaron por intervalos de 2, 4, 6, 8 horas con una lámpara de inmersión de mercurio de alta presión de 450 Watios, colocada a una altura de 30 cm sobre los discos. La inhibición del crecimiento bacteriano por parte de la(s) sustancia(s) fototóxica(s) se cuantificó usando la técnica descrita por BAUER *et al.* (1966).

El análisis químico cualitativo para triterpenos pentacíclicos, esteroides insaturados y alcaloides se realizó

mediante las técnicas descritas por Domínguez (1973) y MARCANO & HASEGAWA (2002).

Los extractos crudos y las fracciones, se separaron por cromatografía de columna rápida (CCR) de resolución moderada (STILL *et al.* 1978) y cromatografía de columna al vacío (TARGETT *et al.* 1979), sobre sílica gel G seg. Stahl, tipo 60, Merck (FAE) y sílica gel 70-270 mesh, 60Å Aldrich (F₅ y F₅₋₅); sílica gel para capa fina Kiesegel D, 5-40 mm, Riedel de Haën AG Cada una de las muestras (FAE, F₅ y F₅₋₅) se eluyeron con solventes de polaridad creciente diclorometano, acetona, acetato de etilo, metanol y la F₅₋₅ se eluyó hasta ácido acético al 10%.

Los espectros de RMN se registraron en un aparato Bruker de 400 MHz y la Espectrometría de Masas en un cromatógrafo Hewlett Packard 5890 con detector de masas Hewlett Packard 5952.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Actividad biológica.

Se mostró un efecto antibacteriano de FAE (38,81 g) frente a: *E. coli*, *B. cereus*, *S. aureus*, *P. vulgaris*, *S. typhimurium*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* (TABLA 1), cuyos resultados son similares a los de MORALES *et al.* (2000), quienes demostraron actividad antibacteriana de los extractos en acetato de etilo frente a *E. coli*. Sólo se observó efecto fototóxico a las 6 h de irradiación en *S. typhimurium* (aumento el halo de inhibición de 25 a 29 mm) y en *P. aeruginosa* (desde 22 hasta 25 mm).

DANIELS (1965) al diseñar un método microbiológico para demostrar la presencia de sustancias fototóxicas, propuso que dichas sustancias están asociadas con la exposición a las radiaciones solares, las cuales tienen la particularidad de ser activadas por acción de la luz.

La fotoprotección es utilizada para la conservación evolutiva de las especies, incluso los microorganismos más primitivos poseen métodos endógenos que los escudan de cantidades excesivas de radiación ultravioleta, entre ellos pigmentos absorbentes de luz, proteínas y sistemas enzimáticos utilizados para reparar los daños causados por la exposición a la radiación ultravioleta (ARNASON *et al.* 1983; PATHAK, 1986; MECKES-LOZOYA & GASPARI, 1993).

Análisis químico

Se detectó la presencia de esteroides y alcaloides

TABLA 1. Actividad antibacteriana de la fracción en acetato de etilo de *Aplysina fistularis* (expresada en mm).

Microorganismos							
	<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>
Diámetro	18	25	23	19	22	31	28

débilmente básicos; resultados similares a reportes previos realizados en especies de *Aplysina*, en los que sólo se ha señalado la presencia de alcaloides (HOLLENBEAK *et al.* 1976; GOO & RINEHART, 1980; CIMINIELLO *et al.* 1994 y esteroides (LAWSON *et al.* 1988; CATALAN *et al.* 1985; WALKUP *et al.* 1981).

Fraccionamiento

Las fracciones obtenidas se evaluaron basándose en la mayor actividad antibacteriana así como la masa de las mismas, con la finalidad de lograr el aislamiento del compuesto activo (TABLA 2). Las fracciones F₁ (108,8 mg), F₁₃ (1402,0 mg), F₁₄ (319,6 mg) y F₁₅ (1300,1 mg) no produjeron actividad antibacteriana. Se puede observar que la fracción FAE una vez particionada aumentó la acción

inhibitoria del crecimiento bacteriano notablemente en la F₅ y F₆, lo cual pudiera deberse a un efecto antagónico de algunas sustancias presentes. La actividad fototóxica se notó sobre *K. pneumoniae* con la F₇ (de 12 a 21 mm a 4 h de irradiación) y en *P. vulgaris* (de 18 a 32 mm a las 6 h).

Fraccionamiento de la F₅

Se obtuvieron 15 subfracciones, de las cuales sólo ocho presentaron actividad antibacteriana contra la mayor cantidad de las cepas ensayadas (TABLA 3); las fracciones F₅₋₁ (5,6 mg), F₅₋₁₀ (16,1 mg), F₅₋₁₁ (5,5 mg), F₅₋₁₂ (3,7 mg), F₅₋₁₃ (25,2 mg), F₅₋₁₄ (81,8 mg) y F₅₋₁₅ (2,1 mg) no mostraron actividad antibacteriana ni fototóxica.

TABLA 2. Actividad antibacteriana de las subfracciones obtenidas a partir de la fracción en acetato de etilo de *Aplysina fistularis* (expresada en mm).

Microorganismos								
Fracción	Masa (mg)							
		<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>P. aeruginosa</i>
F2	1609,0	-	7	-	-	-	-	-
F3	476,8	-	11	-	-	-	-	-
F4	243,2	-	11	-	-	7	-	-
F5	2341,9	48	39	36	43	48	18	40
F6	533,7	28	30	26	27	25	21	-
F7	256,6	12	20	12	19	24	21	-
F8	186,3	15	15	18	13	13	11	13*
F9	211,8	12	11	-	7	10	-	15*
F10	384,3	7	7	-	-	-	-	-
F11	291,7	11	10	7	7	7*	-	9
F12	1639,3	12	10	-	7*	15	-	12

(*): Colonias resistentes en la zona de inhibición (-): no activo

A partir de la F_{5,5} se obtuvo un precipitado parcialmente soluble en metanol, el cual fue lavado con metanol varias veces produciéndose dos sólidos a los que se les realizó la prueba de actividad antibacteriana, los cristales resultantes del segundo lavado mostraron actividad inhibitoria del crecimiento bacteriano sólo frente a *E. coli* con un diámetro de 13 mm.

Análisis instrumentales

Los cristales obtenidos del segundo lavado de la F_{5,5} se analizaron por RMN ¹H y ¹³C, identificándose un compuesto fundamentalmente puro, presentando las siguientes señales en el espectro de protones un singlete a 2,41 ppm cuya integral corresponde a dos protones pertenecientes a un grupo CH₂, además de dos picos intensos a 2,98 y 3,04 ppm cada uno, representados como un singlete que de acuerdo a sus integrales corresponde a dos grupos metoxílicos. Otras señales, que se obtuvieron a campos más bajos son: un singlete a 6,02 ppm, cuya integral da para un protón asignable a un grupo oxidrilo (OH), también se observa un singlete a 6,80 ppm cuya integral representa a dos protones que pueden estar unidos a un átomo de nitrógeno (NH₂), por último aparecen dos multipletes a 7,00 y 7,41 ppm, cuyas integrales corresponden a un protón cada una.

En carbono trece (¹³C) se observan ocho señales, siendo la señal que aparece a campo más bajo la correspondiente al carbono del grupo carbonilo; la que se observa a campo más alto corresponde al carbono metilénico (Fig. 1).

La espectrometría de masas reporta un ión molecular de 371 m/e, el cual coincide con la masa molar del compuesto C₁₀H₁₃NO₄Br. Los demás iones resultantes que contienen dos átomos de bromo son: unos picos a 340 (M-OCH₃), 322 [(N-OCH₃)-H₂O], 313 (M-CH₂CONH₂). Asimismo, la pérdida de dos átomos de bromo 290 (M-Br)

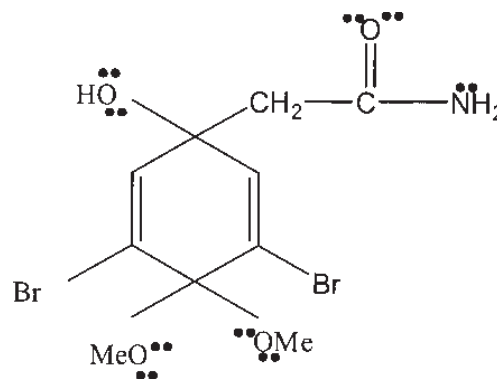


Fig. 1. Estructura del terpeno 3,5-dibromo-1-hidroxi-4,4-dimetoxi-2,5-ciclohexadien-1-acetamida aislada de *Aplysina fistularis*

y 210 [(M-Br)-Br]. Estos resultados coinciden con los reportados por SHARMA *et al.* (1970), quienes también señalaron que *A. fistularis* no presentó actividad inhibitoria del crecimiento bacteriano; sin embargo, en este trabajo la 3,5-dibromo-1-hidroxi-4,4-dimetoxi-2,5-ciclohexadien-1-acetamida mostró una actividad antibacteriana contra *E. coli* (13 mm).

TABLA 3. Actividad antibacteriana de las fracciones obtenidas a partir de la F₅ de *Aplysina fistularis* (expresada en mm).

Fracción	Masa (mg)	Microorganismos						
		<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>
F5-2	6,8	-	-	-	-	-	-	8*
F5-3	206,4	43	34	34	24	-	27	26
F5-4	142,7	22*	20	21	20	-	10	16
F5-5	413,4	42	34	38	22	7	25	29*
F5-6	145,7	10	10	12*	12	-	7*	10
F5-7	61,4	9	11	12*	12	-	7*	8
F5-8	10,5	7	8*	-	-	-	-	8*
F5-9	33,0	11	-	-	-	-	10*	-

(*): Colonias resistentes en la zona de inhibición, (-): no activo

En lo que respecta a compuestos halogenados del género *Aplysina* se tiene que es muy común la presencia de compuestos halogenados derivados de la tirosina (bromotirosina) pudiendo ser posible considerar a la tirosina, como el compuesto de base para la biosíntesis de estos (MAKARIEVA *et al.* 1981; TYMIK & RINEHART, 1981; NAGARAJA & SHAW, 1982; GUNASEKERA & CROSS, 1992; RODRÍGUEZ & PIÑA, 1993; CARNEY *et al.* 1995).

Se han reportado algunos trabajos que destacan el aislamiento de sustancias de naturaleza terpenoidal con propiedades antibacteriales en esponjas marinas (CAPELLE *et al.*, 1980; GONZÁLEZ *et al.*, 1984; DE GIULLIO *et al.*, 1989; CARBALLEIRA *et al.*, 1992 y GARRIDO *et al.*, 1997), cuyas propuestas se confirman en esta investigación, puesto que los resultados dieron pruebas positivas para triterpenos pentacíclicos y son contrarias a las afirmaciones de CIMINIELLO *et al.* (1994), el cual expresa que las esponjas marinas del orden Verongida carecen de terpenos.

CONCLUSIONES

1.- La FAE presenta actividad antibacteriana frente a las cepas Gram positivas: *S. aureus*, *B. cereus* y Gram negativas: *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. vulgaris*, *S. typhimurium* y *P. aeruginosa* y fototóxica frente a las dos últimas.

2.- El análisis químico reveló presencia de esteroides y alcaloides en la FAE.

3.- Las subfracciones aisladas de la FAE mantienen su acción antibacteriana contra las cepas Gram positivas y Gram negativas.

4.- Se caracterizó la 3,5-dibromo-1-hidroxi-4,4-dimetoxi-2,5-ciclohexadien-1-acetamida mediante CG/EM, RMN ¹H y ¹³C.

5.- El compuesto aislado presentó actividad antibacteriana frente a *E. coli*.

6.- *Aplysina fistularis* representa una fuente promisoría de compuestos activos que pudieran ser considerados de interés terapéutico en la medicina moderna.

Recomendaciones:

1.- Evaluar la citotoxicidad *in vitro* e *in vivo* para descartar efectos tóxicos de la 3,5-dibromo-1-hidroxi-4,4-dimetoxi-2,5-ciclohexadien-1-acetamida.

AGRADECIMIENTO

Al Dr. CARSTEN CRISTOPHERSEN del Departamento de Química, Sección de Química Marina de la Universidad de Copenhagen, Dinamarca, por la realización de los espectros de RMN.

BIBLIOGRAFÍA

- ACOSTA, A. & A. RODRÍGUEZ. 1992. 11-oxoaerotionin: A cytotoxic antitumor bromotyrosine-derived alkaloid from the caribbean marine sponge *Aplysina lacunosa*. *J. Nat. Prod.* 55: 1007-1012.
- AMARO, M. 2002. Demospongiae (Porifera) de Isla Larga, Bahía de Mochima, Venezuela. *Bol. Inst. Oceanog. Venezuela. Univ. de Oriente*, 41 :45-53.
- ARNASON, T., P. MORAND, J. SALVADOR, I. REYES, J. LAMBERT & N. TOWERS. 1983. Phototoxic substances from *Flaveria trinervis* and *Simira salvadorensis*. *Phytochemistry* 22: 594-595.
- BAUER, A., W. KIRBY, I. SHERRIS & M. TURK. 1966. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45: 493-496.
- CAPELLE, M., J. BRAEKMAN, D. DALOZE & B. TURSCH. 1980. Chemical studies of marine invertebrates. XLVI. Three new spongian diterpenes from *Spongia officinalis*. *Bull. Soc. Chim. Belg.* 89: 399-404.
- CARBALLEIRA, N., A. EMILLANO, J. RODRÍGUEZ & E. REYES. 1992. Isolation and characterization of novel 2-hydroxy fatty acids from the phospholipids of the sponge *Smenospongia aurea*. *Lipids* 27: 681-685.
- CARNEY, J., R. RINEHART & L. KENNETH. 1995. Biosynthesis of brominated tyrosine metabolites by *Aplysina fistularis*. *J. Nat. Prod.* 58: 971-985.
- CATALAN, C., J. THOMPSON, W. KOKKE, & C. DJERASSI. 1985. Biosynthetic studies of marine lipids 3-1. Experimental demonstration of the course of side chain extension in marine sterols. *Tetrahedron* 41: 1073-1084.
- CIMINIELLO, P., V. COSTANTINO, E. FATTORUSSO, S. MANGONIS & M. PANSINI. 1994. Chemistry of Verongida sponges, II. Constituents of the Caribbean sponges

- Aplysina fistularis forma fulva*. *J. Nat. Prod.* 57: 705-712.
- COMPAGNONE, R., R. AVILA, A. SUAREZ, O. ABRAHMS, H. RANGEL, F. ARVELO, C. PIÑA & E. MERENTES. 1999. 11-Deoxyfistularin-3, a new cytotoxic metabolite from the Caribbean sponge *Aplysina fistularis insularis*. *J. Nat. Prod.* 62: 1443-1444.
- DANIELS, F. 1965. A simple microbiological method for demonstrating phototoxic compounds. *J. Invest. Dermatol.* 44: 259-263.
- DE GIULLIO, A., S. DE ROSA, G. DI VINCENZO & N. ZAVODNIK. 1989. Terpenoids from the North Adriatic sponge *Spongia officinalis*. *J. Nat. Prod.* 52: 1258-1262.
- DOMÍNGUEZ, X. 1973. *Métodos de investigación fitoquímica*. Editorial Limusa, México, 281 pp.
- EDRADA, R., P. PROKSCH, V. WRAY, L. WITTE, W. MUELLER & R. VAN-SOEST. 1996. Four new bioactive manzanine type alkaloids from the Phillipine marine sponge *Xestospongia ashmorica*. *J. Nat. Prod.* 59: 1056-1060.
- FENICAL, W. 1982. Natural products chemistry in the marine environment. *Science*, 215 (4535): 923-928.
- GARCÍA, I., J. MARTÍNEZ, A. ANEIROS, M. LLANIO, K. ACOSTA, M. DÍAZ, A. CONCEPCIÓN, S. LLORENTE, M. PÉREZ & A. MORALES. 1994. Organismos marinos de la plataforma cubana como fuente de nuevas sustancias bioactivas. III Congreso de Ciencias del Mar. Ciudad de la Habana, Cuba. pp. 200.
- GARRIDO, L., E. ZUBIA, M. ORTEGA & J. SALVA. 1997. New furanoterpenoids from the sponge *Spongia officinalis*. *J. Nat. Prod.* 60: 794-797.
- GONZÁLEZ, A., D. ESTRADA, V. MARTIN, C. PÉREZ & R. PÉREZ. 1984. New antimicrobial diterpenes from the sponge *Spongia officinalis*. *Tetrahedron* 40 : 4109-4113.
- GOO, Y. & K. RINEHART. 1980. Constituents of *Aplysina fistularis*. *Diss. Abstr. Int.* B, 41:569.
- GULAVITA, N., S. POMPONI & A. WRIGHT. 1995. Aplysillin A, a thrombin receptor antagonist from the marine sponge *Aplysina fistularis fulva*. *J. Nat. Prod.* 58 : 954-957.
- GUNASEKERA, S. & S. CROSS. 1992. Fistularin 3 and 11-ketofistularin 3. Feline leukemia virus active bromotyrosine metabolites from the marine sponge *Aplysina archeri*. *J. Nat. Prod.* 55: 509-512.
- HOLLENBEAK, K., F. SCHMITZ & P. KAUL. 1976. Cardiotoxic agents from marine sponges: isolation of histamine and n-methylated histamines. *Food Drugs from the Sea-Proc.* 1974-1976: 282.
- HU, J., J. SCHETZ, M. KELLY, J. PENG, K. ANG, H. FLOTOW, C. LEONG, S. BEE, A. BUSS, S. WILKINS & M. HAMANN. 2002. New Antiinfective and Human 5-HT₂ Receptor Binding Natural and Semisynthetic Compounds from the Jamaican Sponge *Smenospongia aurea*. *J. Nat. Prod.* 65: 476-480.
- KOBAYASHI, M., S. AOKI, K. GATO & I. KITAGAWA. 1996a. Marine natural products. 38. Absolute stereostructures of altoheptin A, B and C and 5-decacyllaltohyrtin A, potent cytotoxic macrolides, from the Okinawan marine sponge *Hyrtios alterm*. *Chem. Pharm. Bull. Tokyo* 44 : 2142-2149.
- _____, Y. CHEN, K. HIGUCHI, S. AOKI & I. KITAGAWA. 1996b. Marine natural products. 37. Aragusteroketals 4 and C, two novel cytotoxic steroids from marine sponge of *Xestospongia* sp. *Chem. Pharm. Bull. Tokyo* 44 : 1840-1842.
- KONDG, F. & R. ANDERSEN. 1994. Madangamine A, a novel cytotoxic alkaloids from the marine sponge *Xestospongia ingens*. *J. Am. Chem. Soc.* 116: 6007-6008.
- LAWSON, M., J. THOMPSON & C. DJERASSI. 1988. Localization of long-chain fatty acids and unconventional sterols in spherulous cell of a marine sponge. *Lipids* 23 : 1037-1048.
- LE PAPE, P., M. ZIDANE, H. ABDALA & Y. MORÉ. 2000. A glycoprotein isolated from the sponge, *Pachymatisma johnstonii* has anti-leishmanial activity. *Cell Biol. Intern.* 24: 51-56.
- MAKARIEVA, T., V. STONIK, P. COLADO & Y. ELYAKOR. 1981. Comparative study of the halogenated tyrosine derivatives from Demospongiae (Porifera). *Comp. Biochem. Physiol.* 68B : 81-84.

- MARCANO, D. & M. HASEWAGA. 2002. *Fitoquímica orgánica*. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela. 588 pp.
- MECKES-LOZOYA, M. & J. GASPAS. 1993. Phototoxic effect of methanolic extract from *Porophyllum macrocephalum* and *Tagetes erecta*. *Fitoterapia* 65: 35-41.
- MORALES T., J. CUBERO, Z. LANZ, Y. GOMEZ & M. SEGNINI. 2000. Antimicrobial activity of organic extracts isolated from *Aplysina fistularis* (Demospongiae: Aplysinidae). *Rev. Biol. Trop.* 48: 199-206.
- NAGARAJA, K. & P. SHAW. 1982. Inhibition of wheat germ RNA polymerase II by 2,6-dibromobenzoquinone and related compounds from *Aplysina fistularis*. *Arch. Biochem. Biophys.* 215: 544-550.
- PATHAK, M. 1986. Sunscreens: topical and systemic approaches for the prevention of acute and chronic sun-induced skin reactions. *Dermatol. Clin.* 4: 321-334.
- RODRÍGUEZ, A. & I. PIÑA. 1993. The structures of Aplysinamisines I, II and III: New bromotyrosine-derived alkaloids from the caribbean sponge *Aplysina cauliformis*. *J. Nat. Prod.* 55: 1007-1012.
- SHARMA, G., B. VIG, & P. BURKHOLDER. 1970. Studies on the antimicrobial substances of sponges. IV. Structure of a bromine containing compound from marine sponge. *J. Org. Chem.* 35: 2823-2826.
- SILVA C., L. WUNSCH & C. DJERASSI. 1991. Biosynthetic studies of marine lipids. 35. The demonstration of de novo sterol biosynthesis in sponges using radiolabeled isoprenoid precursors. *Comp Biochem Physiol* 99B:763-773.
- STILL, W., M. KAHN & A. MITRA. 1978. Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolutions. *J. Org. Chem.* 43: 2923-2925.
- TARGETT, N., J. KILCOYNE & B. GREEN. 1979. Vacuum liquid chromatographic methods. *J. Org. Chem.* 44: 4962-4964.
- TSUDA, M., Y. SAKUMA & J. KOBAYASHI. 2001. Suberedamines A and b, new bromotyrosine alkaloids from a sponge *Suberea* species. *J. Nat. Prod.* 64: 980-982.
- TYMIAK, A. & K. RINEHART. 1981. Biosynthesis of dibromotyrosine derived antimicrobial compounds by the marine sponge *Aplysina fistularis* (*Verongia aurea*). *J. Nat. Prod.* 103: 6763-6765.
- WALKUP, R., G. JAMIESON, M. RATCLIFF & C. DJERASSI. 1981. Phospholipids studies of marine organisms: 2. Phospholipids-bound fatty acids and free sterols of the sponges *Aplysina fistularis* (Pallas) forma *fulva* (Pallas) = (*Verongida thiona*). Isolation and structure elucidation of unprecedented branched fatty acids. *Lipids* 16: 631-646.

RECIBIDO: Junio 2006

ACEPTADO: Septiembre 2006