

ESTUDIO QUÍMICO Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFOULING DEL OCTOCORAL CARIBEÑO *Eunicea laciniata*

Carmen Tatiana Cuadrado Silva, Leonardo Castellanos Hernández*, Oscar Eduardo Osorno Reyes, Freddy Alejandro Ramos Rodríguez y Carmenza Duque Beltrán

Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia

Mónica Puyana Hegedus

Programa de Biología Marina, Universidad Jorge Tadeo Lozano, Bogotá, Colombia

Recebido em 11/6/09; aceito em 11/9/09; publicado na web em 24/2/10

CHEMICAL STUDY AND ANTIFOULING ACTIVITY OF CARIBBEAN OCTOCORAL *Eunicea laciniata*. The bioassay guided purification of the octocoral *Eunicea laciniata* organic extract, collected at Santa Marta bay, Colombia, allowed the isolation of the new compound (-)-3 β -pregna-5,20-dienyl- β -D-arabinopyranoside (**1**), along with the known compounds 1(*S**),11(*R**)-dolabell-3(*E*),7(*E*),12(18)-triene (**2**), 13-keto-1(*S*),11(*R*)-dolabell-3(*E*),7(*E*),12(18)-triene (**3**), cholest-5,22-dien-3 β -ol (**4**), cholesterol (**5**), y brassicasterol (**6**). The structure and absolute configuration of **1** was determined on based spectroscopic analyses (NMR and CD). The extract showed antifouling activity against five strains of marine bacteria associated to heavy fouled surfaces. Also showed activity against the cypris of the cosmopolitan barnacle *Balanus amphitrite*, and low toxicity in *Artemia salina* test.

Keywords: antifouling assay; *Eunicea laciniata*; (-)-3 β -pregna-5,20-dienyl- β -D-arabinopyranoside (**1**).

INTRODUCCIÓN

El *fouling* puede ser descrito como la acumulación de material particulado, microorganismos, plantas y animales sobre superficies sumergidas en un medio acuoso.¹ Este proceso se desarrolla en varias etapas de manera secuencial. En el momento de la inmersión empieza la adhesión a la superficie sumergida de glicoproteínas y otros compuestos, seguida del asentamiento de bacterias, diatomeas y protozoos (*microfouling*), los cuales acondicionan la superficie para el posterior asentamiento de esporas de algas y larvas de invertebrados, que a su vez crecen y se desarrollan sobre la superficie inmersa (*macrofouling*).² El proceso del *fouling* obedece a la necesidad que tienen muchos organismos de asentarse sobre una superficie como parte de su ciclo de vida, y si bien se da naturalmente, y en muchos casos es deseable, se ha convertido en un problema para la industria naval y petrolera principalmente, ya que las embarcaciones, plataformas y demás estructuras sumergidas se van deteriorando de manera gradual, requiriendo extensos, complejos y costosos procesos de limpieza. Para disminuir el asentamiento de organismos sobre superficies sumergidas se han venido utilizando recubrimientos de variada naturaleza, complementados con la acción de biocidas, tales como el tributilestano y algunos derivados de cobre, que si bien disminuyen el *fouling*, también generan grandes problemas ambientales debido a su toxicidad y bioacumulación,³ por lo que su uso está regulado y en algunos casos prohibido.

En la actualidad se están estudiando nuevas alternativas a los biocidas tradicionales, de estos *antifoulants* se espera que no generen impactos negativos en el medio ambiente. Un ejemplo de ello es el uso de productos naturales marinos, provenientes de plantas e invertebrados que mantienen de manera natural su superficie limpia de epibiontes. El hecho de mantener su superficie limpia, a pesar de estar inmersos en el medio marino donde el régimen de *fouling* es intenso, podría indicar que estos organismos poseen mecanismos de control de este proceso, uno de los cuales puede ser la producción de compuestos con actividad *antifouling*.⁴ Las investigaciones en

este campo han permitido identificar *antifoulants* naturales entre los que podemos citar: los terpenos con función isociano obtenidos, principalmente, de esponjas del orden Halichondrida,⁵ y los terpenos tipo renillafoulinas aislados del octocoral *Renilla reniformis*.⁶ Por tal razón, en el grupo de Productos Naturales Marinos de la Universidad Nacional de Colombia hemos venido estudiando los organismos marinos como fuente de compuestos *antifouling* con el fin de dar un aprovechamiento a los recursos naturales del país.

En este trabajo presentamos el estudio químico del gorgonáceo *Eunicea laciniata*, así como la actividad *antifouling* de algunos de sus compuestos. En la bibliografía se encuentran estudios químicos para este especie a partir de ejemplares recolectados en Tobago, Puerto Rico, Barbados y Venezuela, que permitieron identificar once diterpenos tipo dolabelano,⁷ uno tipo cubitano,⁸ al igual que tres esteroides derivados del gorgosterol,⁹ y un compuesto tipo saponina.⁸ Sin embargo, hasta el momento este es el primer reporte de la valoración *antifouling* de compuestos químicos aislados del extracto de *Eunicea laciniata*.

PARTE EXPERIMENTAL

General

La cromatografía en capa delgada (CCD) se desarrolló sobre cromatoplas de sílica gel 60 F₂₅₄ Merck, (de 20 x 20 y 0,30 mm de espesor), usando como eluyente mezclas binarias de hexano, benceno, acetato de etilo y metanol, y revelando con una lámpara UV (254 nm) y una solución de sulfato cérico amónico en ácido sulfúrico con posterior calentamiento a 100 °C. La cromatografía en columna (CC) se realizó sobre sílica gel tipo 60 (60-230 mesh ASTM, Merck), en una columna con longitud de sílica de 15 cm y un diámetro interno de 1,5 cm. Las fracciones recolectadas fueron monitoreadas por CCD.

Los análisis por CGAR-EM se realizaron en un cromatógrafo de gases GC-17A Shimadzu acoplado a espectrómetro de masas QP-5050A Shimadzu, en modo de ionización por impacto electrónico (IE) a 70 eV, equipado con una columna DB-1 (25 m, 0,25 mm, 0,25 μ m). Se inyectó en todos los casos 1 μ g de muestra disuelta en 1 μ L

*e-mail: lcastellanosh@bt.unal.edu.co

de acetona. Como gas de arrastre se empleó Helio a una velocidad de 1 mL min⁻¹. Se detectaron los iones positivos con masas entre 40 y 500 u. Las temperaturas del inyector, columna y detector se mantuvieron a 300 °C durante el análisis.

Los espectros infrarrojos se registraron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer FT-IR Paragon 500 Serie 1000. Los espectros ESI de alta resolución se tomaron en un equipo VG Autospec-Bruker. Los espectros de RMN ¹H y RMN ¹³C mono- y bidimensionales se registraron en un espectrómetro Bruker Avance 400 (400 MHz para RMN ¹H y 100 MHz para RMN ¹³C) empleando como solvente cloroformo deuterado con grado de deuteración 99,5% y 1% en volumen de tetrametilsilano (TMS) y piridina deuterada. La rotación óptica se tomó en un equipo Polartronic E, Schmidt+Haensch, empleando una celda de 5 cm de longitud.

Material animal

Ejemplares del gorgonáceo *Eunicea laciniata* se recolectaron en la isla El Morro, Bahía de Santa Marta en la costa Caribe de Colombia, mediante buceo autónomo a una profundidad de 9 m durante el mes de septiembre de 2006. La identificación fue realizada por la Dra M. Puyana, Bióloga marina de la Universidad Jorge Tadeo Lozano. Se depositaron vouchers en la colección del ICN (Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia) bajo el código ICN-MHN-CR 106. Las muestras recolectadas se secaron a la sombra y posteriormente se almacenaron en el congelador hasta el momento de su extracción.

Extracción y fraccionamiento

El material animal seco (222 g) fue cortado en trozos y se extrajo cuatro veces con 1 L de cloroformo-metanol (1:1), el solvente se eliminó por destilación a presión reducida para obtener 12 g de extracto. El extracto se sometió a partición agua-diclorometano. La fracción de diclorometano (7 g) fue separada mediante CC al vacío sobre sílica gel, empleando un gradiente discontinuo de polaridad (benceno, acetato de etilo, metanol) obteniendo doce fracciones (F1 a F12). La fracción F1 (eluida con benceno, 4,8 g) fue separada por CC sobre sílica gel usando mezclas de hexano y benceno obteniendo 8 fracciones (F1.1 a F1.8), en la fracción F1.1, eluida con hexano, se obtuvo el compuesto **2** (0,2 g) y en la fracción F1.7, eluida con hexano-benceno 6:4, se recuperó el compuesto mayoritario **3** (3,2 g), estos compuestos fueron identificados por técnicas espectroscópicas IR, EM, RMN ¹H y ¹³C mono- y bidimensionales. La fracción F2 (0,7 g), eluida con benceno-acetato de etilo 95:5, fue separada mediante CC sobre sílica gel usando un gradiente discontinuo de estos mismos solventes y, obteniendo así siete fracciones (F2.1 a F2.7). La fracción F2.4 (0,4 g), eluida con benceno-acetato de etilo 95:5, fue sometida a CC sobre sílica gel bajo presión, usando mezclas de benceno y acetato de etilo, hasta obtener cinco fracciones (F2.4.1 a F2.4.5). La fracción F2.4.4 (0,2 g), eluida con benceno-acetato de etilo 95:5, correspondió a la mezcla de esteroides (compuestos **4** a **6**) y fue analizada por CGAR-EM. De la fracción F8, eluida con acetato de etilo, se aisló un sólido blanco (54mg) por recristalización en éter etílico, que se identificó como el compuesto **1**.

Obtención del compuesto peracetilado 1a

Sobre una disolución de **1** (28 mg) en piridina seca (0,5 mL) se añadieron 0,5 mL de anhídrido acético. La mezcla se dejó reaccionar durante toda la noche con agitación constante, y a temperatura ambiente. Posteriormente, la mezcla de reacción se vertió sobre hielo/ácido clorhídrico (5%), y se extrajo con cloroformo. La fase

orgánica concentrada se purificó por cromatografía en columna sobre sílica gel, usando un gradiente hexano-acetato de etilo (100:0 hasta 0:100), obteniendo 26 mg del compuesto **1a** con un porcentaje de rendimiento del 72%.

Obtención del compuesto perbenzoilado 1b

Sobre una disolución del compuesto **1** (1 mg) en piridina seca (0,3 mL), se añadieron 0,3 mL de cloruro de benzoilo. La mezcla se dejó reaccionar durante toda la noche con agitación constante y a temperatura ambiente. Posteriormente, ésta se vertió sobre hielo/ácido clorhídrico (5%), y se extrajo de la mezcla con cloroformo. Al concentrar esta solución se obtuvo un sólido blanco que se redisolvió en tolueno para purificarlo por medio de CCDP sobre sílica gel usando como fase móvil hexano, obteniéndose 0,5 mg del compuesto **1b** con un porcentaje de rendimiento del 30%.

(-)-3β-Pregna-5,20-dienil-β-D-arabinopiranosido (**1**)

Se aisló como un sólido de color blanco, con un punto de fusión: 222-224 °C. $[\alpha]_D^{22} = -176^\circ$ (c 0,25; cloroformo/metanol 1:1). IR (KBr) ν (cm⁻¹): 3431 (mf), 2934 (m), 2852 (m), 1637 (m), 1082 (m). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ_H : 5,76 (ddd, $J=16,8; 11,6; 8,0$ Hz, 1H, CH-20); 5,36 (bd, $J=4,7$ Hz, 1H, CH-6); 4,99 (bd, $J=16,8$ Hz, 1H, CH-21a); 4,99 (bs, 1H, CH-1'); 4,96 (bd, $J=11,6$ Hz, 1H, CH-21b); 3,92 (m, 1H, CH-3'); 3,89 (m, 1H, CH-5'a); 3,78 (m, 1H, CH-4'); 3,76 (m, 1H, CH-2'); 3,64 (d, $J=10,7$ Hz, 1H, CH-5'b); 3,48 (m, 1H, CH-3); 2,38 (dd, $J=13,0; 3,3$ Hz, 1H, CH-4 ecuatorial); 2,23 (t, $J=13,0$ Hz, 1H, CH-4 axial); 2,00 (m, 1H, CH-7a); 1,97 (m, 1H, CH-17); 1,89 (m, 1H, CH-1a); 1,89 (m, 1H, CH-2a); 1,79 (m, 1H, CH-16a); 1,72 (m, 2H, CH₂-12); 1,70 (m, 1H, CH-15a); 1,60 (m, 1H, CH-2b); 1,58 (m, 1H, CH-7b); 1,58 (m, 1H, CH-11a); 1,58 (m, 1H, CH-16b); 1,49 (m, 1H, CH-8); 1,44 (m, 1H, CH-11b); 1,18 (m, 1H, CH-15b); 1,09 (m, 1H, CH-1b); 1,02 (m, 1H, CH-14); 1,02 (s, 3H, CH₃-19); 0,97 (m, 1H, CH-9); 0,61 (s, 3H, CH₃-18). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ_C : 140,1 (C-5); 139,6 (CH-20); 121,7 (CH-6); 114,2 (CH₂-21); 97,1 (CH-1'); 77,2 (CH-3); 69,7 (CH-4'); 69,0 (CH-3'); 68,9 (CH-2'); 62,5 (CH₂-5'); 55,7 (CH-14); 55,1 (CH-17); 50,2 (CH-9); 43,1 (C-13); 38,2 (CH₂-4); 37,1 (CH₂-1); 37,1 (CH₂-12); 36,6 (C-10); 31,8 (CH₂-7); 31,8 (CH-8); 29,3 (CH₂-2); 27,0 (CH₂-16); 24,6 (CH₂-15); 20,4 (CH₂-11); 19,1 (CH₃-19); 12,5 (CH₃-18). RMN ¹H (400 MHz, piridina deuterada) δ_H : 5,82 (m, 1H); 5,53 (d, $J=3,1$ Hz, 1H); 5,08 (d, $J=4,03$ Hz, 1H); 4,68 (dd, $J=9,3; 3,1$ Hz, 1H); 4,57 (dd, $J=9,3; 3,1$ Hz, 1H); 4,48 (m, 1H); 4,26 (bd, $J=11,8$ Hz, 1H); 4,12 (dd, $J=11,8; 2,1$ Hz, 1H); 3,76 (m, 1H); 0,95 (s, 3H); 0,59 (s, 3H). RMN ¹³C (100 MHz, piridina deuterada) δ_C : 141,1 (C); 140,2 (CH); 121,9 (CH); 115,1 (CH₂); 99,2 (CH); 77,4 (CH); 71,2 (CH); 70,7 (CH); 70,4 (CH); 64,4 (CH₂); 56,0 (CH); 55,7 (CH); 50,8 (CH); 43,7 (C); 39,1 (CH₂); 37,8 (CH₂); 37,7 (CH₂); 37,2 (C); 32,3 (CH₂); 32,3 (CH); 30,2 (CH₂); 27,6 (CH₂); 25,2 (CH₂); 21,1 (CH₂); 19,6 (CH₃); 13,0 (CH₃). EM-IE (70 eV), m/z (Int. Rel.): 300 [M-C₅H₈O₄]⁺ (4); 282 [M-C₅H₁₀O₃]⁺ (100); 267 [M-C₅H₁₀O₃-CH₃]⁺ (40); 213 [M-C₅H₁₀O₃-C₅H₉]⁺ (25). HRESI-TOFMS m/z 455,2762 (calculado para C₂₆H₄₀O₅Na, 455,2767).

2',3',4'-tri-O-Acetil-3β-pregna-5,20-dienil-β-D-arabinopiranosido (**1a**)

Se obtuvo como un sólido de color blanco. $[\alpha]_D^{22} = -144^\circ$ (c 0,25; cloroformo). IR (KBr) ν (cm⁻¹): 2933 (m), 1741 (f), 1636 (m), 1072 (m). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ_H : 5,75 (ddd, $J=16,2; 11,2; 7,8$ Hz, 1H, CH-20); 5,36 (bd, $J=3,5$ Hz, 1H, CH-6); 5,36 (dd, $J=10,1; 3,6$ Hz, 1H, CH-3'); 5,33 (bs, $W_{h/2} = 2,8$ Hz, 1H, CH-4'); 5,21 (d, $J=3,6$ Hz, 1H, CH-1'); 5,10 (dd, $J=10,1; 3,6$ Hz, 1H, CH-2'); 4,99

(*bd*, $J=16,2$ Hz, 1H, CH-21a); 4,98 (*bd*, $J=11,2$ Hz, 1H, CH-21b); 4,05 (*bd*, $J=12,7$ Hz, 1H, 5'a); 3,63 (*dd*, $J=12,7$; 1,4 Hz, 1H, 5'b); 3,42 (*m*, 1H, CH-3); 2,20 (*m*, 2H, CH₂-4); 2,13 (*s*, 3H); 2,08 (*s*, 3H); 2,01 (*m*, 1H, CH-7a); 2,00 (*s*, 3H); 1,97 (*m*, 1H, CH-17); 1,87 (*m*, 1H, CH-1a); 1,85 (*m*, 1H, CH-2a); 1,80 (*m*, 1H, CH-16a); 1,71 (*m*, 2H, CH₂-12); 1,68 (*m*, 1H, CH-15a); 1,61 (*m*, 1H, CH-2b); 1,57 (*m*, 1H, CH-7b); 1,57 (*m*, 1H, CH-16b); 1,55 (*m*, 1H, CH-11a); 1,45 (*m*, 1H, CH-8); 1,45 (*m*, 1H, CH-11b); 1,19 (*m*, 1H, CH-15b); 1,08 (*m*, 1H, CH-1b); 1,01 (*m*, 1H, CH-14); 1,01 (*s*, 3H, CH₃-19); 0,94 (*m*, 1H, CH-9); 0,60 (*s*, 3H, CH₃-18). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ_C: 170,4 (C); 170,3 (C); 170,1 (C); 140,2 (C-5); 139,7 (CH-20); 122,1 (CH-6); 114,5 (CH₂-21); 94,8 (CH-1'); 77,2 (CH-3); 69,3 (CH-4'); 68,6 (CH-2'); 67,3 (CH-3'); 60,4 (CH₂-5'); 55,9 (CH-14); 55,3 (CH-17); 50,4 (CH-9); 43,4 (C-13); 38,5 (CH₂-4); 37,3 (CH₂-1); 37,3 (CH₂-12); 36,8 (C-10); 32,0 (CH₂-7); 32,0 (CH-8); 29,4 (CH₂-2); 27,2 (CH₂-16); 24,9 (CH₂-15); 20,9 (CH₃); 20,8 (CH₃); 20,7 (CH₃); 20,7 (CH₂-11); 19,3 (CH₃-19); 12,7 (CH₃-18). EM-IE (70 eV), *m/z* (Int. Rel.): 558 [M]⁺; 474 [M-C₂H₂O]⁺ (5); 282 [M-C₁₁H₁₆O₈]⁺ (90); 213 [M-C₁₁H₁₆O₈-C₅H₉]⁺ (25); 157 [M-C₂₀H₃₃O₈]⁺ (60); 139 [M-C₂₂H₂₇O₈]⁺ (100).

2',3',4'-tri-*O*-Benzoil-3β-pregna-5,20-dienil-β-D-arabinopiranosido (1b)

Se obtuvo como un sólido amorfo de color blanco, CD (acetónitrilo; 0,0001 M) Δε (nm) 4,4 (221,8); -1,2 (240). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ_H: 8,09 (*dd*, $J=8,2$; 1,1 Hz, 2H); 8,01 (*dd*, $J=8,2$; 1,1 Hz, 2H); 7,86 (*dd*, $J=8,2$; 1,1 Hz, 2H); 7,60 (*m*, 1H); 7,59-7,39 (*m*, 6H); 7,29 (*m*, 2H); 5,95 (*dd*, $J=10,6$; 3,6 Hz, 1H, H-3'); 5,74 (*m*, 2H, H-20 y H-4'); 5,69 (*dd*, $J=10,6$; 3,6 Hz, 1H, H-2'); 5,47 (*d*, $J=3,6$ Hz, 1H, H-6); 5,25 (*bs*, 1H, H-1'); 4,99 (*bs*, 1H, CH-21a); 4,96 (*d*, $J=13,6$; 2,2 Hz, 1H, CH-21b); 4,32 (*dd*, $J=13,0$; 0,7 Hz, 1H, 5'a); 3,92 (*dd*, $J=13,0$; 1,7 Hz, 1H, 5'b); 3,49 (*m*, 1H, CH-3); 1,00 (*s*, 3H, CH₃-19); 0,59 (*s*, 3H, CH₃-18).

1(S*),11(R*)-Dolabela-3(E),7(E),12(18)-trieno (2)

Se aisló como un aceite incoloro. $[\alpha]_D^{21} = -32^\circ$ (*c* 0,6; cloroformo). Los datos espectroscópicos de IR, RMN ¹H, RMN ¹³C y EM-IE, concuerdan con los reportados por Shin y Fenical.⁷

13-Ceto-1(S),11(R)-dolabela-3(E),7(E)12(18)-trieno (3)

Se aisló como un aceite amarillo. $[\alpha]_D^{21} = +15^\circ$ (*c* 0,9; cloroformo). Los datos espectroscópicos de IR, RMN ¹H, RMN ¹³C y EM-IE, concuerdan con los reportados por Look y Fenical.¹⁰

Colesta-5,22-dien-3β-ol (4), Colesterol (5) y Brassicasterol (6)

Los datos de tiempo relativo al colesterol (trr) y EM-IE concuerdan con los reportados por Castellanos et al.,¹¹ y con patrones.

Ensayo de inhibición de bacterias involucradas en el fouling usando el método de difusión en agar con sensidiscos

Con el fin de estudiar la inhibición de la primera etapa del fouling, es decir la biopelícula bacteriana, el extracto, las fracciones y los compuestos puros obtenidos a partir de *Eunicea laciniata*, fueron evaluados frente a los aislamientos de siete bacterias marinas Gram-negativas y Gram-positivas: *Ochrobactrum pseudogrignonense* (4-4DEP), *Vibrio harveyi*, *Kocuria* sp y *Bacillus* sp, aisladas de la depresión inhalante de la esponja *Aplysina lacunosa*, *Ochrobactrum pseudogrignonense* (21-6PIN), aislada de la superficie del

pinacodermo de la esponja *Aplysina lacunosa*, y los aislamientos *Oceanobacillus iheyensis* y *Alteromonas macleodii*, obtenidos de la superficie del bivalvo *Donax* sp.¹² Estos aislamientos fueron identificados preliminarmente mediante la amplificación del gen 16S rRNA y su posterior secuenciación.¹² El bioensayo en mención, puede indicar si los compuestos tienen propiedades antibacterianas frente a bacterias aisladas de una biopelícula natural.

Las bacterias marinas fueron cultivadas en caldo marino (24 h, 24 ± 2 °C). La concentración de los inóculos bacterianos se ajustó al patrón de turbidez N° 0,5 de McFarland. De esta suspensión se tomaron alícuotas de 100 μL para inocular cajas de Petri (10 cm) con agar marino. Sensidiscos de papel (5,2 mm) fueron cargados con 300 μg de extracto o fracción, o con 30 μg de compuesto puro a ensayar. En cada caja de Petri se ensayaron cinco sustancias, un control positivo (óxido cuproso 10 μg), y dos controles negativos (discos sin muestra, y discos con solvente). El procedimiento se hizo por triplicado. Las cajas fueron incubadas a 24 ± 1 °C por 24 h. Posteriormente, se midieron los diámetros de los halos de inhibición alrededor de cada sensidisco. Las lecturas volvieron a hacerse 48 h después de la incubación.

Determinación de la CMI de los compuestos 1, 3-6 por el método de microdilución

Los compuestos puros aislados de *Eunicea laciniata* (compuesto 1, 3, y mezcla de los compuestos 4, 5 y 6) y el óxido cuproso (compuesto activo de muchas pinturas antifouling comerciales) se evaluaron frente a los aislamientos de las bacterias marinas *Oceanobacillus iheyensis*, *Bacillus* sp y *Ochrobactrum pseudogrignonense* (4-4DEP) anteriormente descritas, siguiendo el procedimiento de microdilución en caldo (NCCLS).¹³ Se prepararon inóculos de las bacterias en 5 mL de caldo marino (12 horas, 24±2 °C) y su concentración se ajustó a 2*10⁸ CFU mL⁻¹ (patrón N° 0.5 de McFarland).

Cada uno de los inóculos se diluyó a una proporción (1:10) y se dispuso por duplicado en placas de poliestireno de 96 pozos. Por cada 5 μL de cada una de las diluciones de la bacteria, se adicionaron 50 μL de los compuestos a probar (disueltos en caldo marino-dimetil-sulfóxido) en cinco diluciones seriadas ajustando las concentraciones finales a 100, 50, 25, 10 y 5 mg L⁻¹. Se usaron dos tipos de controles uno de bacterias sin compuestos y el otro en el que se usó el medio de cultivo junto con dimetilsulfóxido que es el solvente en que se disuelven los compuestos. Todos los pozos se ajustaron a un volumen final de 100 μL con caldo marino. Las placas se inocularon a 24 ± 2 °C durante 24 h, y se midió su absorbancia a 595 nm en un lector de placas Biorad 550. Como control del inóculo se tomaron 10 μL del inóculo y se diluyeron en 10 mL de caldo marino, sembrando posteriormente 100 μL en una caja con agar marino que se inoculó bajo las mismas condiciones de la placa para determinar el número de UFC (unidades formadoras de colonia).

Ensayo de inhibición del asentamiento de larvas cypris de cirripedios

Un ensayo que ha resultado muy útil para determinar la actividad antifouling de productos naturales ha sido el ensayo de fijación de larvas cypris de cirripedios. Durante el estadio cypris estas larvas "prueban" la superficie y al encontrar un sustrato adecuado sufren el proceso de metamorfosis a juvenil. En este proceso las larvas secretan carbonato de calcio y se asientan permanentemente al sustrato formando incrustaciones masivas.¹⁴ El ensayo se realizó con el cirripedio cosmopolita *Balanus amphitrite*, especie ampliamente distribuida en el Caribe colombiano, siguiendo los métodos propuestos por varios autores,^{15,16} se formó un stock de reproductores los cuales eran

cirripedios adultos que se recolectaron en los sectores portuarios de Mamonal (Cartagena) y Punta de Betín (Santa Marta) desprendiéndolos suavemente de la superficie. Los cirripedios se mantuvieron en el laboratorio en acuarios con agua de mar artificial y se alimentaron con microalgas y larvas de *Artemia salina*.

Para la obtención de las larvas, los cirripedios adultos se sometieron a un choque lumínico y suspensión de la aireación. Las larvas fueron transferidas y mantenidas en agua de mar envejecida durante 48 h, la cual fue previamente filtrada y tratada con antibióticos. Estas se alimentaron con microalgas, bajo aireación constante. Una vez las larvas alcanzaron el estadio *cypris* (aprox. 5-6 días posterior a la inducción), se mantuvieron bajo refrigeración con el fin de prevenir su metamorfosis y asentamiento antes de la realización del ensayo.

Para los ensayos de fijación, se usaron cajas de Petri plásticas cuyo interior fue "pintado" con el extracto de *E. laciniata* resuspendido en etanol, a concentraciones de 200 y 20 $\mu\text{g cm}^{-2}$. El extracto se dejó secar, y las cajas se llenaron con agua de mar, realizando recambios frecuentes para eliminar potenciales efectos residuales del etanol. Como control positivo se utilizó óxido cuproso 20 y 200 $\mu\text{g cm}^{-2}$. Como control negativo se usó etanol al 95%. Los controles se aplicaron siguiendo la misma metodología utilizada para los extractos. Una vez las cajas estuvieron listas, se llenaron con agua de mar ultrafiltrada y se añadieron 20 larvas *cypris*. Después de un período de 5 días, el ensayo se detuvo adicionando unas gotas de formaldehído al 40%. Posteriormente se determinó el número de larvas vivas (aquellas en estado *cypris* que no se fijaron ni sufrieron metamorfosis al estado adulto), las larvas muertas (que no se fijaron y que murieron en estado *cypris*) y las larvas que se asentaron, iniciando su metamorfosis al estado adulto.¹⁷

Ensayo de citotoxicidad usando *Artemia salina*

Las larvas del microcrustáceo *Artemia salina* son muy sensibles a sustancias exógenas, por lo cual se consideran como organismos indicadores de toxicidad en un ensayo que es sencillo, rápido y fiable.¹⁸ Para esta prueba se realizaron ensayos de exposición crónica al extracto de *E. laciniata* por 24 h. Para la realización del ensayo, se introdujeron 10 nauplios de *Artemia salina* en viales con 1 mL de agua de mar artificial y se añadió la cantidad requerida de soluciones de extracto en agua-dimetilsulfóxido, de tal manera que al completar a 2 mL, con agua de mar, se ajustara la concentración a 1000, 500, 250, 100 y 10 ppm. Cada concentración se ensayó por triplicado. Como controles negativos se usaron agua de mar artificial y dimetilsulfóxido

al 1% en agua de mar. Como control positivo se usó dicromato de potasio a 100 ppm. Después de 24 h, se contó el número de nauplios sobrevivientes en cada experimento. Los resultados se analizaron mediante el software PC Probit y se calculó el valor de LC_{50} .¹⁹

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El extracto total fue sometido a una partición líquido-líquido con diclorometano-agua (1:1). La fase orgánica mostró actividad en el ensayo contra bacterias marinas involucradas en el *fouling*, inhibiendo 4 de los 6 aislamientos de bacterias ensayadas (Tabla 1). Esta fase fue sometida a CC al vacío sobre sílica gel obteniéndose 12 fracciones (F1-F12) que también se ensayaron frente a los aislamientos de bacterias marinas, detectando la mencionada actividad *antifouling* en las fracciones F1, F2, F8 y F11.

La fracción F8 mostró actividad sobre 3 de los 6 aislamientos bacterianos (Tabla 1). A partir de ésta fracción se aisló, por recristalización en éter, un sólido blanco (compuesto **1**). El espectro de masas de alta resolución HRESI-TOFMS de **1** mostró un ión pseudomolecular m/z 455,2762 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, consistente con una fórmula molecular $\text{C}_{26}\text{H}_{40}\text{O}_5\text{Na}$ (calculado para $\text{C}_{26}\text{H}_{40}\text{O}_5\text{Na}$, 455,2767), indicando una fórmula molecular de $\text{C}_{26}\text{H}_{40}\text{O}_5$. En el espectro de masas por impacto electrónico (EM m/z 70 eV) se observaron iones correspondientes a la pérdida de una pentosa, además de iones característicos de un núcleo ciclopentanoperhidrofenentrenno. En el espectro de RMN ^1H se observaron señales que indican la presencia de un doble enlace monosustituido, y de otro trisustituido. Por otro lado se observaron señales para protones de azúcar (δ 5-3,5), y para dos grupos metilo (singletes en δ 0,61 y 1,02). El espectro RMN ^{13}C y los experimentos DEPT-135, COSY, HSQC y HMBC mostraron que el compuesto **1** corresponde al pregnadienol (pregna-5,20-dien-3-ol) glicosidado con una pentosa en la posición 3. Para la asignación del tipo de pentosa se registró el espectro RMN ^1H del derivado peracetilado **1a**, los valores de las constantes de acoplamiento concuerdan con lo esperado para un (β) arabinofuranósido, y además estos valores y los desplazamientos químicos coinciden con los reportados para algunos pregnanos glicosidados acetilados por Gutiérrez *et al.* en 2006.²⁰ Por lo cual puede asignarse al compuesto **1** una estructura de 3 β -pregna-5,20-dienil- β -arabinopiranosido. Adicionalmente, se encontró que en el año 2003 se reportó el aislamiento de un compuesto natural con la misma estructura pero de rotación óptica de signo opuesto, a partir del Octocoral *Cladiella krempfi* recolectado en la Isla de Weizhou, en China.²¹ En el estudio

Tabla 1. Niveles de actividad *antifouling* registrados para las fracciones más importantes obtenidas del extracto de *Eunicea laciniata* frente a bacterias marinas

SUSTANCIA	<i>Ochrobactrum pseudogrignonense</i> (4-4DEP) (Gram -)	<i>Ochrobactrum pseudogrignonense</i> (21-6PIN) (Gram -)	<i>Vibrio harveyi</i> (Gram -)	<i>Oceanobacillus iheyensis</i> (Gram +)	<i>Kocuria</i> sp (Gram +)	<i>Alteromonas macleodii</i> (Gram -)	<i>Bacillus</i> sp (Gram +)
Extracto total	+++	+	++	++	-	NE	++
Fase orgánica	++	-	++	+++	+	-	++
Fase acuosa	-	-	-	-	-	-	-
F1	-	-	-	++	-	-	NE
F2	+	-	+	+++	+++	-	NE
F8	-	+	-	+++	++	-	NE
F11	++	-	-	+++	+	-	NE
Compuesto 1	-	-	-	-	-	-	NE
Mezcla de esteroides	+	++	NE	-	+	-	++
Cu_2O (control)	++	++	+++	+++	++	++	++

El nivel de actividad *antifouling* se asignó de acuerdo al diámetro del halo de inhibición: (-) sin actividad (halo inhibición < 5,2 mm); (+) actividad baja (halo de inhibición de 5,2 a 6,9 mm); (++) actividad media (halo de inhibición de 7,0 a 9,9 mm) y (+++) actividad alta (halo de inhibición >10,0 mm), NE: no se ensayó.

antes citado no se determinó la estereoquímica absoluta del compuesto. Los espectros de RMN ^1H y ^{13}C registrados en piridina para nuestro compuesto **1** son idénticos a los reportados por Wen-Jian *et al.* en 2003, mientras la rotación óptica para **1** mostró un valor de -176° ($c = 0,25$; cloroformo/metanol 1:1) en contraste con el valor reportado para el compuesto aislado de *Cladiella krempfi* que fue de $+217,6^\circ$ ($c = 0,34$; metanol). Con el fin de determinar la estereoquímica absoluta de **1** se registró la curva de dicroísmo de su derivado perbenzoilado **1b**, mostrando un efecto Cotton positivo a 221,8 nm, y un efecto Cotton negativo a 240 nm, a partir de lo cual se determinó que la configuración del azúcar del compuesto **1** corresponde a la β -D-arabinopiranosida, lo anterior por la comparación con los mismos datos reportados para el 2',3',4'-tri-*O*-benzoil-3 β -pregna-5,20-dienil- β -D-arabinopiranosido.²⁰ Adicionalmente, el valor experimental de la rotación óptica para el compuesto **1a** es de -144° , que coincide en magnitud y signo con el reportado para éste mismo compuesto en el trabajo antes citado.²⁰ De esta manera, se estableció que el compuesto **1** corresponde al (-)-3 β -pregna-5,20-dienil- β -D-arabinopiranosido ((3*S*,8*S*,9*S*,10*R*,13*R*,14*S*,17*R*)-pregna-5*Z*,20-dienil-(1'*S*,2'*S*,3'*S*,4'*R*)-arabinopiranosido) (Figura 1) y es la primera vez que se reporta en la naturaleza determinando su estereoquímica absoluta, sin embargo ya había sido obtenido por hidrólisis de un compuesto natural aislado del Octocoral *Muricea austera*.²⁰

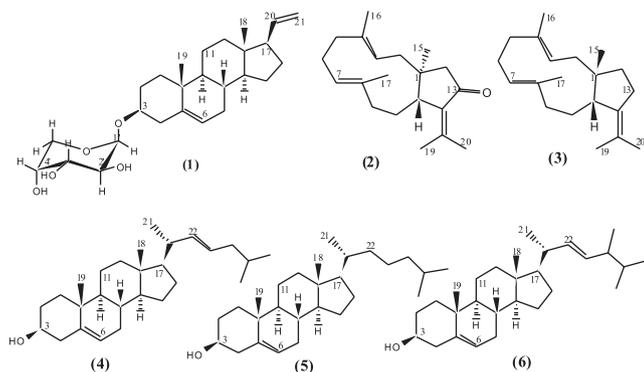


Figura 1. Estructuras de los compuestos aislados a partir de *Eunicea laciniata*: (-)-3 β -pregna-5,20-dienil- β -D-arabinopiranosido, dolabelanos y esteroides

La fracción menos polar F1, mostró actividad antifouling débil contra 1 de los 6 aislamientos de bacterias ensayados (Tabla 1). Esta fracción fue separada por CC sobre sílica gel, obteniéndose los compuestos **2** y **3**. El compuesto **3**, resultó ser el compuesto mayoritario en el extracto y fue identificado como 13-ceto-1(*S*),11(*R*)-dolabela-3(*E*),7(*E*)12(18)-trieno¹⁰ y el compuesto **2** fue identificado como 1(*S**),11(*R**)-dolabela-3(*E*),7(*E*)12(18)-trieno⁷ (Figura 1).

La fracción F2 mostró actividad frente a 4 de los 6 aislamientos de bacterias ensayados (Tabla 1). A partir de esta fracción se aisló una mezcla de esteroides con núcleo Δ^5 (compuestos **4** a **6**), los cuales fueron analizados por CGAR-EM. Los esteroides fueron identificados como colest-5,22-dien-3 β -ol (**4**), colesterol (**5**) y brassicasterol (**6**) (Figura 1), de acuerdo a su espectro de masas y a su tiempo de retención relativo al colesterol en CG-EM.¹¹

Resultados de la evaluación de la actividad antifouling

El gorgonáceo *Eunicea laciniata* en su ambiente natural se encuentra libre de epibiontes adheridos a su superficie, lo cual lo convierte en un buen candidato para su estudio químico en búsqueda de compuestos con actividad antifouling. En este trabajo, el extracto crudo fue sometido a la evaluación de dicha actividad por medio de

dos modelos uno de ellos utiliza larvas cypris de cirripedios (*macrofouling*) y el otro utiliza bacterias (*microfouling*).

En el ensayo de *macrofouling* se evaluó la inhibición del asentamiento de larvas cypris del cirripedio *Balanus amphitrite*. Encontrando que a una concentración de $20 \mu\text{g cm}^{-2}$ el asentamiento de larvas fue inferior al 50% (Figura 2), no obstante también se observó un gran número de larvas muertas, lo cual sugiere que la disuasión del asentamiento pudo deberse en parte a algún efecto tóxico del extracto, esto no es deseable para compuestos antifoulants ambientalmente amigables. Con el fin de comprobar la toxicidad de este extracto se utilizó el ensayo con el crustáceo *Artemia salina*, obteniendo un LC_{50} de 229 ppm lo cual indica que el extracto es poco tóxico ante este organismo que es altamente sensible.

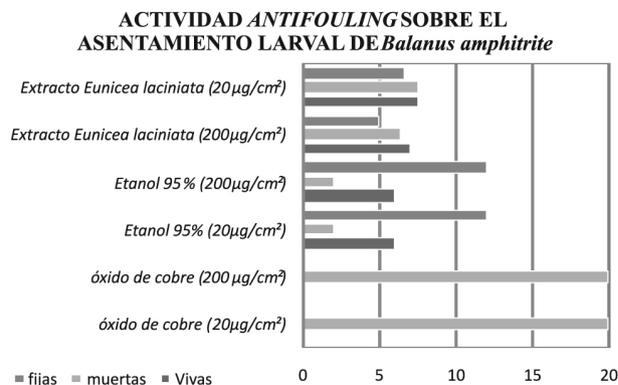


Figura 2. Resultados del ensayo de asentamiento larval de *Balanus amphitrite*

Dado que el *fouling* se da como un proceso en el cual el acondicionamiento bacteriano de la superficie es un paso importante,⁴ se considera que en la medida que se evite o retarde la llegada del *microfouling* (bacterias y otros microorganismos), se puede disminuir o eliminar el asentamiento de *macrofouling*. De esta manera, la evaluación de la actividad antibacteriana de extractos, fracciones o compuestos frente a bacterias aisladas de superficies marinas e involucradas en el proceso de colonización, puede indicar su actividad antifouling. Por tal motivo el ensayo antibacteriano usando la técnica de difusión en agar con sensidiscos permitió, a través de la medida del halo de inhibición, estimar la actividad antifouling de diversas sustancias aisladas a partir de *Eunicea laciniata* y llevar a cabo un fraccionamiento bioguiado, estos resultados se presentan de manera cualitativa en la Tabla 1.

De las 12 fracciones obtenidas de la fase orgánica del extracto de *Eunicea laciniata*, la fracción que mostró mayor actividad en el ensayo con los aislamientos de bacterias marinas fue la fracción F2 la cual inhibió 4 de los 6 aislamientos ensayados que incluyen bacterias tanto Gram-negativas como Gram-positivas. De ésta fracción se aisló una mezcla de esteroides (4-6) que también inhibió 4 aislamientos bacterianos con actividad significativa. Las otras fracciones que también resultaron activas en el ensayo de difusión en agar con sensidiscos fueron F1, F8 y F11, siendo importante destacar la fracción F1, enriquecida en el compuesto **3**, la cual mostró una actividad selectiva sobre un aislamiento Gram-positivo *Oceanobacillus iheyensis*. De la fracción F8 se aisló el compuesto **1**, el cual no mostró actividad antifouling con esta técnica.

Para determinar la concentración mínima inhibitoria de los compuestos aislados, se usó el método de microdilución en placa. Como resultado del ensayo se observó que el compuesto **3** y la mezcla de esteroides tuvieron una marcada actividad inhibitoria frente a los aislamientos Gram-positivos *Oceanobacillus iheyensis* y *Bacillus* sp, a concentraciones de $15,5$ y $93,7 \mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente (Tabla

Tabla 2. Concentración mínima inhibitoria (en $\mu\text{g mL}^{-1}$) de los compuestos puros aislados de *Eunicea laciniata* frente a bacterias marinas

COMPUESTO	<i>Oceanobacillus theyensis</i> (Gram +)	<i>Bacillus</i> sp (Gram +)	<i>Ochrobactrum pseudogrignonense</i> (4-4DEP) (Gram -)
1	>100	>100	>100
3	15,5	>100	>100
Mezcla de 4, 5 y 6	>100	93,7	>100
Óxido cuproso	>100	>100	>100

2). El compuesto **1** inhibió las bacterias pero no alcanzó el 80% de inhibición dentro de las concentraciones probadas, al igual que el control positivo (óxido cuproso). Es de notar que el compuesto **1** en el ensayo de difusión en disco no presentó actividad mientras que en el ensayo de microdilución fue activo. Esto pudo deberse a problemas de difusión de las sustancias ensayadas en el medio sólido, los cuales no se presentan en el caldo.

Finalmente, las bacterias aquí estudiadas no resultaron sensibles al sulfato de cobre a una concentración de 1 ppm, que es la concentración normalmente usada en ensayos *antifouling* con bacterias,²² por esta razón se debió emplear óxido cuproso a una elevada concentración como control positivo para obtener una respuesta por parte de los aislamientos de bacterias utilizadas por nosotros en el bioensayo,¹² estos hechos los interpretamos como una baja respuesta de los aislamientos bacterianos aquí empleados frente a estos compuestos de cobre, ampliamente utilizados en los ensayos *antifouling in-vitro*, y en pinturas de uso industrial. Si bien, en este ensayo los dolabelanos (**2-3**) encontrados no resultan particularmente activos frente a las bacterias por nosotros ensayadas, se ha encontrado en estudios recientes que compuestos con núcleo dolabelano inhiben la formación del *biofilm* bacteriano que es la etapa inicial del *fouling*.²³

CONCLUSIONES

En este trabajo se aisló por primera vez el compuesto (-)-3 β -pregna-5,20-dien-11 β -D-arabinopiranosido (**1**) cuya estereoquímica se determinó por difracción circular, adicionalmente se aislaron compuestos de estructura tipo dolabelano (**2** y **3**) y una mezcla de esteroides ya conocidos (colest-5,22-dien-3 β -ol (**4**), colesterol (**5**) y brassicasterol (**6**)). Estos últimos resultaron activos en el bioensayo *antifouling* frente a aislamientos de bacterias marinas, hasta el momento no se conocen otros reportes sobre la actividad *antifouling* del Octocoral *E. laciniata*. En la actualidad, estamos realizando ensayos *antifouling* en campo del extracto de éste gorgonáceo, junto con otros extractos de origen natural, para evaluar su potencial en recubrimientos *antifouling*.

AGRADECIMIENTOS

El proyecto fue financiado por Colciencias (Proyecto COL-20101007015), la Fundación para la Promoción de la Investigación y la Tecnología del Banco de la República, la Universidad Nacional de Colombia y la Universidad Jorge Tadeo Lozano. Los autores agradecen al Profesor Sven Zea de la Universidad Nacional de Colombia por recolectar el material animal, al Dr. Carlos Jiménez de la Universidad de Coruña, España por el registro de los espectros de masas de alta resolución y a la Dra. Magnolia Vanegas de la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia por el registro de las curvas de Difracción Circular. Los ensayos de fijación de cirripedios se realizaron en el laboratorio de Bioprospección del Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras INVEMAR en Santa Marta.

REFERENCIAS Y NOTAS

1. Yebra, D. M.; Kiil, S.; Dam-Johansen, K.; *Prog. Org. Coat.* **2004**, *50*, 75.
2. Fusetani, N.; Clare, A. S.; *Antifouling compounds*, Springer: Berlin, 2006.
3. Omae, I.; *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 3431.
4. Rittschof, D. En *Natural product antifoulants and coatings development*; McClintock, J. B.; Baker, B. J., eds.; Marine Chemical Ecology, CRC Press: Boca Raton, 2001.
5. Nogata, Y.; Kitano, Y.; *Prog. Mol. Subcell. Biol.* **2006**, *42*, 87.
6. Keifer, P. A.; Rinehart, K. L.; Hooper, I. R.; *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 4450.
7. Shin, J.; Fenical, W.; *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 3392.
8. Marville, K. I.; Reynolds, W. F.; Sealy, R. L.; Tino, W. F.; *Heterocycles* **2004**, *63*, 107.
9. D'Armas, H. T.; Mootoo, B. S.; Reynolds, W. F.; *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1669.
10. Look, S. A.; Fenical, W.; *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 4129.
11. Castellanos, L.; Zea, S.; Osorno, O.; Duque, C.; *Biochem. Sys. Ecol.* **2003**, *31*, 1163.
12. Mora, J. A.; Arévalo-Ferro, C.; Ramos, F. A.; Tello, E.; Duque, C.; Antifouling activities of extracts of marine invertebrates collected at the Colombian Caribbean Sea against marine surface colonizer bacteria. Trabajo sin publicar.
13. NCCLS; *Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically*; approved standard. NCCLS, 23(2), 2003.
14. Rittschof, D.; Clare, A. S.; Gerhart, D. J.; Avelin, S. M.; Bonaventura, J.; *Biofouling* **1992**, *6*, 115.
15. Qian, P. Y.; Rittschof, D.; Sreefhar, B.; *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **2000**, *207*, 109.
16. Head, R. M.; Overbeke, K.; Klijstra, J.; Biersteker, R.; Thomason, J. C.; *Biofouling* **2003**, *19*, 269.
17. Castellanos, S.; Puyana, M.; Zea, S.; Osorno, O.; Duque, C.; *XIII Seminario de ciencia y tecnología del mar. Libro de resúmenes*, San Andrés, 2008.
18. McLaughlin, J. L.; Rogers M. S.; Anderson, J. E.; *Drug Inf. J.* **1998**, *32*, 513.
19. Stephan, C. En *Aquatic toxicology and hazard evaluation. ASTM STP 534*; Hamelink, F. L., ed.; American Society for Testing and Materials (ASTM): Philadelphia, 1977.
20. Gutiérrez, M.; Capson, T. L.; Guzmán, H. M.; González, J.; Ortega-Barría, E.; Quiñoá, E.; Riguera, R.; *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 1379.
21. Wen-Jian, L.; Cui-Wu, L.; Jing-Yu, Z.; Long-Mei, Z.; *Chem. J. Chin. Univ.* **2003**, *24*, 2019.
22. Hellio, C.; De La Broise, D.; Dufossé, L.; Le Gal, Y.; Bourgougnon, N.; *Mar. Env. Res.* **2001**, *52*, 231.
23. Viano, Y.; Bonhomme, D.; Camps, M.; Briand, J. F.; Ortalo-Magné, A.; Blache, Y.; Piovetti, L.; Culioli, G.; *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 1299.