

Constituyentes químicos y actividad antibacteriana preliminar de la fracción de acetato de etilo de *Eunicea* sp.

Gabriel Ordaz¹, Haydelba D'Armas^{1*}, Shailili Moreno¹, Ángel Camacho²,
Dayanis Yañez² y Juan Hernández³

¹Laboratorio de Productos Naturales y Lípidos, Departamento de Química, Escuela de Ciencias, Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre. Cumaná, estado Sucre.

²Sección de Química, Departamento de Ciencias, Unidad de Estudios Básicos, Universidad de Oriente, Núcleo de Monagas. Maturín, estado Monagas.

³Laboratorio de Control de Calidad, Coca-Cola FEMSA. Valencia, estado Carabobo.

Recibido: 10-05-2013 Aceptado: 20-03-2014

Resumen

A partir de una fracción en acetato de etilo del extracto metanólico de *Eunicea* sp., se obtuvieron algunas fracciones que inhibieron el crecimiento de las bacterias Gram negativas *Salmonella enteritidis* y *Escherichia coli*, y las Gram positivas *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Citrobacter freundii*, mostrando halos de inhibición bactericidas y bacteriostáticos entre 6 y 16 mm. Luego de una separación por cromatografía en columna y capa fina de las fracciones bioactivas, fueron analizadas mediante CG/EM algunas de las subfracciones, lográndose identificar los constituyentes: 15-norcedran-8-ona, 5-metil-8-metoxibenzo[b]carbazol-6,11(5H)-diona, 2-metil-5-metoxi-4-piridinol, ácido 9β-hidroxi-4,11(13)-eudesmadien-12-oico, 3-hidroxi-2-metil-4H-piran-4-ona, 7-etil-5-metil-6,8-dioxabicyclo[3,2,1]octano, éster etílico del ácido 3,4-dihidro-6-fenil-2H-piran-5-carboxílico, *trans*-cariofileno, 1-((4-hidroxifenil)tioxometil)pirrolidina, 4,5-dihidro-3,5,5-trimetil-1H-pirazol, 7-aza-1-metilbicyclo[4,1,0]heptano, 4-isobutil-2-metilciclopentanona y 3-hidroxi-5-(3-metil-1-butenil)-4,5-dihidro-2(3H)-furanona, por comparación con las bases de datos WILEY138 y WILEY 275.

Palabras clave: *Eunicea*, metabolitos secundarios, actividad antibacteriana, CG/EM.

Chemical constituents and preliminary antibacterial activity of *Eunicea* sp. ethyl acetate fraction

Abstract

Some chromatographic fractions of the ethyl-acetate-fraction from *Eunicea* sp.-MeOH-extract showed activity against *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* and *Citrobacter freundii* bacteria with 6-16 mm of inhibition halos. Subfractions obtained from chromatography of bioactive fractions were analyzed by GC/MS and some constituents were identified through WILEY libraries, such as: 15-norcedran-8-one, 8-methoxy-5-methylbenzo[b]carbazol-6,11(5H)-dione, 5-methoxy-2-methyl-4-pyridinol, 9β-hydroxi-

* Autor para la correspondencia: haydelba@yahoo.com

4,11(13)-eudesmadien-12-oic acid, 3-hydroxy-2-methyl-4H-piran-4-one, 7-ethyl-5-methyl-6,8-dioxabicyclo[3,2,1]octane, 3,4-dihydro-6-phenyl-2H-pyran-5-carboxylic acid ethyl ester, *trans*-caryophyllene, 1-((4-hydroxyphenyl)thioxomethyl)pyrrolidine, 4,5-dihydro-3,5,5-trimethyl-1H-pyrazole, 4-isobutyl-2-methylcyclopentanone and 3-hydroxi-5-(3-methyl-1-butenyl)-4,5-dihydro-2(3H)-furanone.

Keywords: *Eunicea*, secondary metabolites, antibacterial activity, GC/MS.

Introducción

Los organismos marinos se consideran una rica fuente para el descubrimiento de compuestos biológicamente activos de características estructurales y químicas no encontradas en los productos naturales terrestres, los cuales pueden ser potencialmente aptos para aplicaciones clínicas [1-7].

Los octocorales del género *Eunicea* (orden Gorgonacea, familia Plexauridae) son un componente importante de la fauna invertebrada marina y, de acuerdo a estudios quimiotaconómicos, son una fuente valiosa de metabolitos secundarios con características estructurales únicas y con propiedades farmacodinámicas significativas [8-10].

En este estudio, se realizó la identificación de algunos metabolitos presentes en una fracción en acetato de etilo del extracto en metanol de *Eunicea* sp., así como la evaluación antibacteriana preliminar de algunas fracciones cromatográficas, como un aporte a la quimiotaconomía de este género Gorgonio en latitudes venezolanas, verificándose su potencial como fuente de sustancias bioactivas con posible uso farmacológico.

Materiales y métodos

Recolección

Las muestras de *Eunicea* sp. (539,5 g), fueron obtenidas del Golfo de Cariaco, estado Sucre, Venezuela (10°30'-10°32' N y 64°12'-64°13' W) en octubre de 2005. La identificación taxonómica fue realizada en la Fundación Pro-desarrollo de las Ciencias del Mar (FUNDEMAR) del Instituto Oceanográfico de Venezuela de la Universidad de Oriente.

Extracción

El material obtenido del octocoral, fue lavado con abundante agua destilada, troceado y sometido a extracción con metanol (99,9%) por 96 h y luego por 120 h. El extracto fue concentrado a presión reducida (aprox. 11mbar) en un rotaevaporador marca Hidolph (19,8 g; 3,67%). El extracto crudo se solubilizó en una solución acuosa de metanol al 90% y fue desgrasado con éter de petróleo (grado analítico), luego se sometió a extracción con acetato de etilo. La fracción en acetato de etilo (FA) fue secada con sulfato de sodio anhidro, filtrada y evaporada a presión reducida (3,34 g; 16,89%).

Fraccionamiento cromatográfico

La FA fue particionada mediante cromatografía en columna (CC), en una columna de vidrio de 4 × 65 cm empaquetada con sílica gel 35-70 mesh y hexano a una proporción en masa de 1:30 (extracto:sílica). La fase móvil estuvo constituida por sistemas de solventes de polaridad creciente, iniciándose con hexano y luego, mezclas de éste con acetona y metanol en distintas proporciones en volumen, colectándose 95 eluatos de aproximadamente 50 mL cada uno, los cuales se analizaron por cromatografía de capa fina (CCF), empleándose placas de vidrio (20 × 20 cm) recubiertas con sílica gel 60 mesh, con un espesor de 0,5 mm y, como agente revelador, una solución de molibdato de amonio al 5% en H₂SO₄ al 5%, agrupándose en 20 fracciones (A1 a A20; 3,27 g; 97,99%). Con base en el análisis por CCF de dichas fracciones y sus rendimientos, se seleccionaron A3 (0,3998 g; 11,96%), A5 (0,1723 g; 5,16%) y A15 (0,3282 g; 9,82%) para ser fraccionadas

sucesivamente mediante CC (sílica gel 35-70 mesh) y CCF preparativa (sílica gel 10-40 μ , 1 mm de espesor).

Actividad antibacteriana preliminar

La actividad antibacteriana de algunas fracciones se evaluó mediante el método de difusión en discos de papel [11], impregnándose discos estériles de papel de filtro Whatman Nro. 3 de 5 mm de diámetro con cada fracción (40 mg/mL). Se emplearon cepas de las bacterias *Bacillus subtilis* (CVCM438), *Citrobacter freundii* (CVCM924), *Staphylococcus aureus* (CVCM48), *Escherichia coli* (CVCM39), *Salmonella enteritidis* (CVCM497) y *Pseudomonas aeruginosa* (CVCM625) pertenecientes al Centro Venezolano de Colección de Microorganismos, inoculadas en agar Müller-Hinton a 37°C. Como control negativo se emplearon discos impregnados con el solvente utilizado en cada caso.

Caracterización

La identificación de algunos de los metabolitos secundarios de *Eunicea* sp. se realizó mediante cromatografía de gases/espectrometría de masas (CG/EM). Las muestras fueron disueltas en cloroformo e inyectadas

en un cromatógrafo de gases marca Hewlett-Packard modelo 5890, serie II, con fuente de ionización por impacto electrónico de 70 eV, equipado con una columna de 25 m \times 0,18 D.I \times 0,18 mm de espesor. La temperatura inicial del horno fue de 70°C con una rampa de 10°C por minuto hasta llegar a 300°C. El cromatógrafo está acoplado con un espectrómetro de masas marca Hewlett-Packard modelo 5971 A. La identificación de los componentes se realizó por comparación computarizada con las librerías WILEY 138 L y WILEY 275 L.

Resultados y discusión

Actividad biológica de las fracciones

Como se muestra en la tabla 1, la bacteria Gram negativa *P. aeruginosa* fue el único de los microorganismos utilizados que no resultó sensible frente a las fracciones ensayadas. Las fracciones A3, A5 y A7 mostraron actividad bacteriostática frente al microorganismo Gram negativo *E. coli*, con halos de inhibición de 8, 16 y 15 mm de diámetro, respectivamente, y frente al microorganismo Gram positivo *S. aureus*, con halos respectivos de 11, 12 y 8 mm de diámetro (tabla 1).

Tabla 1
Actividad antibacteriana de algunas fracciones cromatográficas de FA

Bacterias	Diámetro del halo de inhibición* (mm)			
	A3	A5	A7	A15
Gram positivas				
<i>Bacillus subtilis</i>	8 ^a	10 ^a	12 ^a	–
<i>Citrobacter freundii</i>	9 ^a	15 ^a	12 ^a	6 ^a
<i>Staphylococcus aureus</i>	11 ^b	12 ^b	8 ^b	8 ^a
Gram negativas				
<i>Escherichia coli</i>	8 ^b	16 ^b	15 ^b	–
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	–	–	–	–
<i>Salmonella enteritidis</i>	7 ^a	11 ^a	13 ^a	7 ^a

*Incluye el diámetro de los discos, ^aInhibición bactericida, ^bInhibición bacteriostática

El control negativo no mostró efectos sobre las bacterias utilizadas en ninguno de los casos.

El efecto de estas fracciones frente a *S. enteritidis*, *B. subtilis* y *C. freundii* fue de tipo bactericida, la A3 mostró halos de inhibición de 7, 8 y 9 mm de diámetro, respectivamente; la fracción A5 mostró halos respectivos de 11, 10 y 15 mm de diámetro y la fracción A7 mostró halos de inhibición de 13, 12 y 12 mm de diámetro respectivamente (tabla 1). La fracción A15 solo presentó actividad antibacteriana bactericida con halos de 7, 8 y 6 mm frente a *S. enteritidis*, *S. aureus* y *C. freundii*, respectivamente (tabla 1).

Como se puede observar las fracciones presentan diferentes mecanismos de acción (bactericida y/o bacteriostático) frente a bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas, lo que indica que los constituyentes presentes en las mismas, bien de manera independiente o por efecto sinérgico, lograron inhibir el crecimiento de la mayoría de los microorganismos.

La actividad frente a una diversidad de microorganismos bacterianos ha sido repor-

tada para los extractos, fracciones y compuestos aislados de octocorales del género *Eunicea* [8, 12-17], confirmando que dichos organismos pueden representar una fuente importante de constituyentes con actividad biológica significativa y como fuente de posibles fármacos.

Análisis de la fracción A3

De la CC de esta fracción, con mezclas diclorometano-acetona, se obtuvieron 9 subfracciones (A3.1 a A3.9, 0,3092 g; 77,34%), de las cuales A3.5 (0,0154 g) fue purificada mediante CCF sobre una placa preparativa en una mezcla éter de petróleo-acetona en proporción 3:1 en volumen, mostrando un R_f de 0,508. Asimismo, la subfracción A3.8 (0,0735 g) fue purificada mediante CC con mezclas de éter de petróleo-acetato de etilo.

El análisis de la subfracción A3.5 refleja en su cromatograma (figura 1) cuatro constituyentes mayoritarios identificados como: **15-norcedran-8-ona** (I; T_r ,

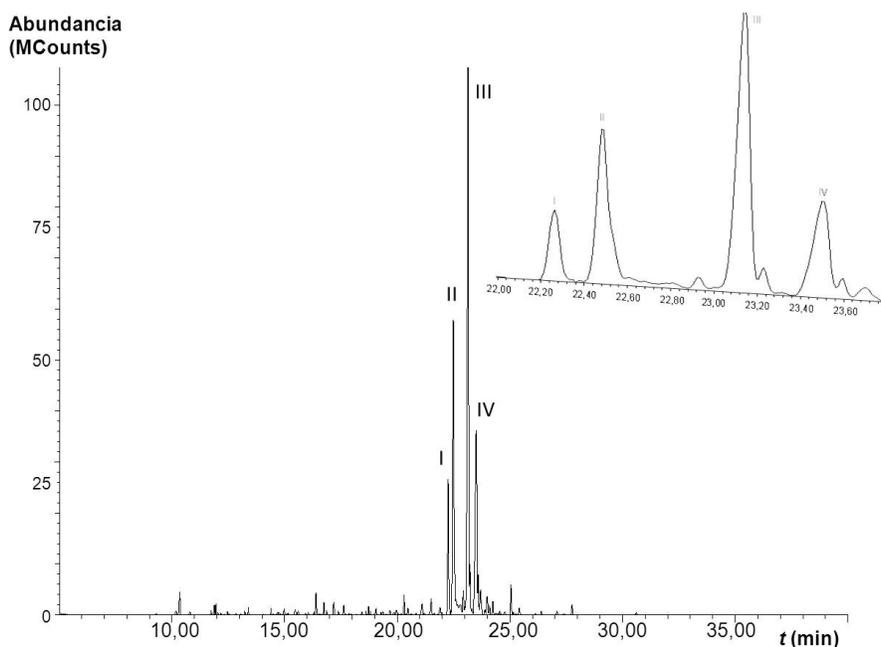


Figura 1. Cromatograma de la subfracción A3.5, indicando los picos correspondientes a los metabolitos mayoritarios identificados. (I: 15-norcedran-8-ona; II: 5-metil-8-metoxibenzo[b]carbazol-6,11(5H)-diona; III: 2-metil-5-metoxi-4-piridinol; IV: ácido 9 β -hidroxi-4,11(13)-eudesmadien-12-oico).

= 22,274 min; m/z = 206 [M]⁺, 188 [M-H₂O]⁺, 175 [M-C₂H₇]⁺, 159 [M-C₂H₇O]⁺, 147 [M-C₃H₇O]⁺, 126 [M-C₆H₈]⁺, 107 [M-C₅H₁₁O]⁺, 93 [M-C₆H₁₃O]⁺, 69 [M-C₉H₁₃O]⁺, 55 [M-C₁₀H₁₅O]⁺, 43 [M-C₁₁H₁₅O]⁺ (pico base)), **5-metil-8-metoxibenzo[b]carbazol-6,11(5H)-diona** (II, T_r = 22,491 min; m/z = 291 [M]⁺ (pico base), 273 [M-H₂O]⁺, 262 [M-CHO]⁺, 246 [M-C₂H₅O]⁺, 233 [M-C₃H₆O]⁺, 221 [M-C₄H₆O]⁺, 207 [M-C₅H₈O]⁺, 188 [M-C₄H₇O₃]⁺, 177 [M-C₅H₆O₃]⁺, 165 [M-C₆H₆O₃]⁺, 159 [M-C₈H₄O₂]⁺, 139 [M-C₈H₈O₃]⁺, 126 [M-C₉H₉O₃]⁺, 109 [M-C₁₁H₄NO₂]⁺, 99 [M-C₁₀H₁₁O₃]⁺, 81 [M-C₁₃H₁₀O₂]⁺, 69 [M-C₁₅H₁₂NO]⁺, 55 [M-C₁₅H₉NO₂]⁺, 43 [M-C₁₆H₁₀NO₂]⁺), **2-metil-5-metoxi-4-piridinol** (III; T_r = 23,153 min; m/z = 139 [M]⁺ (pico base), 126 [M-CH]⁺, 99 [M-C₃H₄]⁺, 96 [M-C₂H₃O]⁺, 69 [M-C₃H₄NO]⁺, 55 [M-C₄H₆NO]⁺, 43 [M-C₅H₆NO]⁺.) y ácido **9β-hidroxi-4,11(13)-eudesmadien-12-oico** (IV; T_r = 23,510 min; m/z = 250 [M]⁺, 232 [M-H₂O]⁺, 217 [M-CH₅O]⁺, 203 [M-C₂H₇O]⁺, 177 [M-C₄H₉O]⁺, 159 [M-C₃H₇O₃]⁺, 143 [M-C₄H₁₁O₃]⁺, 133 [M-C₅H₉O₃]⁺, 119 [M-C₆H₁₁O₃]⁺, 105 [M-C₇H₁₃O₃]⁺, 93 [M-C₈H₁₃O₃]⁺, 69 [M-C₁₀H₁₃O₃]⁺, 55 [M-C₁₁H₁₅O₃]⁺, 43 [M-C₁₃H₁₉O₂]⁺ (pico base)).

En los respectivos espectros de masas, los compuestos I (22,27 min), II (22,49 min), III (23,15 min) y IV (23,51 min) desplegaron iones moleculares a valores m/z de 206,291, 139 y 250. Estos valores se correlacionan con las fórmulas moleculares C₁₄H₂₂O (calculado 206,324 g·mol⁻¹), C₁₈H₁₃NO₃ (calculado 291,301 g·mol⁻¹), C₇H₉NO₂ (calculado 139,152 g·mol⁻¹) y C₁₅H₂₂O₃ (calculado 250,333 g·mol⁻¹), respectivamente. La abundancia relativamente alta de los iones moleculares (picos bases) de los compuestos II y III en los respectivos espectros de masas, posiblemente se deba a la estabilidad relativa de los sistemas conjugados/aromáticos de sus estructuras.

El compuesto I, una cetona sesquiterpenoide identificada como 15-norcedran-8-ona, puede ser sintetizado estereoselectivamente como producto mayoritario en reacciones

de ciclación radical de *N*-Aziridinilaminas [18]. El 5-metil-8-metoxibenzo[*b*]carbazol-6,11(5*H*)-diona (II) es un derivado oxigenado de los benzocarbazoles, una familia de compuestos nitrogenados estudiados principalmente en el petróleo [19-21], mientras el 2-metil-5-metoxi-4-piridinol (III) también ha sido identificado en un grupo de compuestos heterocíclicos de nitrógeno en cianobacterias [22].

El compuesto IV, identificado como ácido 9β-hidroxi-4,11(13)-eudesmadien-12-oico, es un derivado oxigenado sesquiterpenoide de estructura bicíclica. Algunos ácidos sesquiterpénicos, tipo eudesmanos, han sido aislados de *Nectandra cissiflora*, cuyas estructuras fueron establecidas en base a estudios de RMN en una y dos dimensiones [23]. Otros constituyentes sesquiterpenoides han sido aislados de especies no identificadas del género *Eunicea*, algunos de los cuales han exhibido actividad antiplasmódica significativa [24].

El cromatograma de la subfracción A3.8 (figura 2) muestra dos constituyentes mayoritarios a tiempos de retención de 24,112 y 26,073 min, identificados como **3-hidroxi-2-metil-4H-piran-4-ona** (maltol, V; m/z = 127 [M+1]⁺, 126 [M]⁺ (pico base), 109 [M-HO]⁺, 97 [M-CHO]⁺, 85 [M-C₂HO]⁺, 69 [M-C₂HO₂]⁺, 55 [M-C₃H₃O₂]⁺, 43 [M-C₄H₃O₂]⁺.) y **7-etil-5-metil-6,8-dioxabicyclo[3,2,1]octano** (*exo*-brevicomín, VI; m/z = 156 [M]⁺, 123 [M-CHO]⁺, 117 [M-C₃H₃]⁺, 97 [M-C₂H₃O₂]⁺, 85 [M-C₄H₇O]⁺, 71 [M-C₅H₉O]⁺, 57 [M-C₆H₁₁O]⁺, 55 [M-C₅H₉O₂]⁺, 43 [M-C₇H₁₃O]⁺ (pico base)).

El espectro de masas del compuesto VI (24,11 min), mostró un ion molecular a m/z 126, el cual corresponde a la fórmula molecular C₆H₆O₃ (calculado 126,110 g·mol⁻¹), mientras el compuesto V (26,07 min), desplegó un ion molecular a m/z 156, el cual se corresponde con la fórmula molecular C₉H₁₆O₂ (calculado 156,222 g·mol⁻¹).

Algunas de las señales observadas en el espectro de masas del compuesto V, coinci-

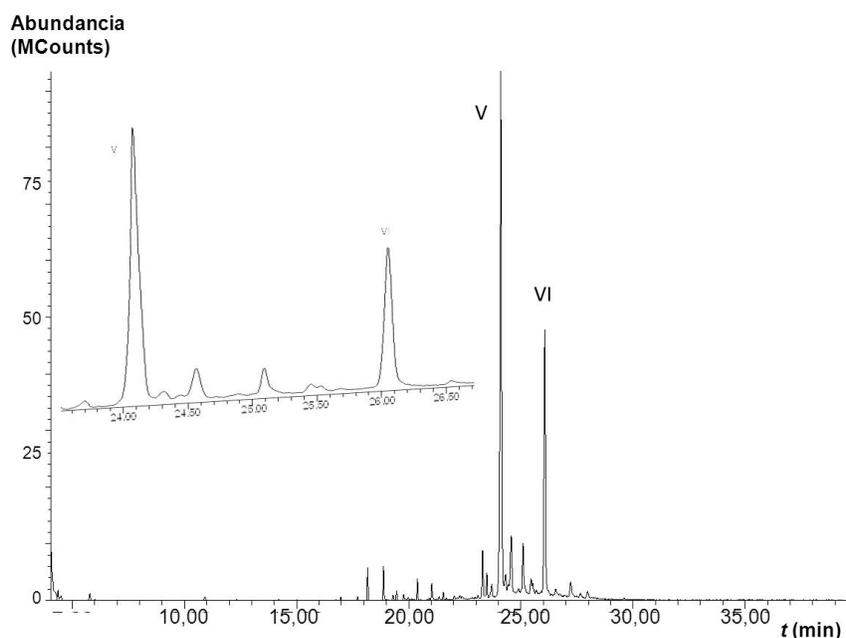


Figura 2. Cromatograma de la subfracción A3.8, indicando los picos correspondientes a los metabolitos mayoritarios identificados. (V: maltol; VI: 7-etil-5-metil-6,8-dioxabicyclo[3,2,1]octano).

den con las reportadas para el maltol aislado de la planta *Abies pindrow* [25]. Este constituyente se emplea fundamentalmente como potenciador del sabor en la industria alimentaria y como un reforzador de aromas y fragancias que proporcionan sabor dulce [25].

Del compuesto *exo*-brevicomín (VI) se ha reportado el efecto en interacciones ecológicas [26, 27], así como la síntesis de algunos constituyentes de estructura similar [28]. La detección de esta feromona, encontrada principalmente en diversas especies de escarabajos, indica que los octocorales posiblemente biosintetizan y emplean estas sustancias para interacciones ecológicas similares.

Análisis de la fracción A5

La CC de esta fracción en sistemas de éter de petróleo-acetato de etilo, permitió obtener tres subfracciones (A5.1 a A5.3; 0,1259 g; 73,07%). La subfracción A5.2 (0,0819 g) fue sometida a CC con mezclas de éter de petróleo-acetona, recuperándose 0,0723 g (88,28 %) en tres nuevas subfracciones (A5.2.1 a A5.2.3), de las cuales A5.2.3

(0,0123 g) fue purificada mediante CCF sobre una placa preparativa en una mezcla éter de petróleo-acetona (3:1), mostrando un R_f de 0,311.

La subfracción A5.2.3 mostró en su cromatograma (figura 3) tres constituyentes mayoritarios, identificados como éster etílico del ácido 3,4-dihidro-6-fenil-2H-piran-5-carboxílico (VII; $T_r = 22,736$ min; $m/z = 232$ [M]⁺ (pico base), 217 [M-CH₃]⁺, 204 [M-C₂H₄]⁺, 203 [M-C₂H₅]⁺, 191 [M-C₃H₅]⁺, 177 [M-C₄H₇]⁺, 165 [M-C₅H₇]⁺, 159 [M-C₃H₅O₂]⁺, 143 [M-C₇H₅]⁺, 133 [M-C₅H₇O₂]⁺, 123 [M-C₇H₉O]⁺, 121 [M-C₆H₇O₂]⁺, 107 [M-C₇H₉O₂]⁺, 93 [M-C₉H₁₅O]⁺, 91 [M-C₈H₁₃O₂]⁺, 79 [M-C₉H₁₃O₂]⁺, 67 [M-C₁₀H₁₃O₂]⁺, 55 [M-C₁₁H₁₃O₂]⁺, 43 [M-C₁₂H₁₃O₂]⁺, 41 [M-C₁₂H₁₅O₂]⁺), **trans**-**cariofileno** (VIII; $T_r = 23,165$ min; $m/z = 204$ [M]⁺, 203 [M-1]⁺, 192 [M-C]⁺, 177 [M-C₂H₃]⁺, 166 [M-C₃H₂]⁺, 159 [M-C₃H₉]⁺, 147 [M-C₄H₉]⁺, 133 [M-C₅H₁₁]⁺, 119 [M-C₆H₁₃]⁺, 109 [M-C₇H₁₁]⁺, 105 [M-C₇H₁₅]⁺, 93 [M-C₈H₁₅]⁺, 79 [M-C₉H₁₇]⁺, 69 [M-C₁₀H₁₅]⁺, 55 [M-C₁₁H₁₇]⁺, 43 [M-C₁₂H₁₇]⁺ (pico base), 41 [M-C₁₂H₁₉]⁺) y **1-((4-hidroxifenil)tioxo-**

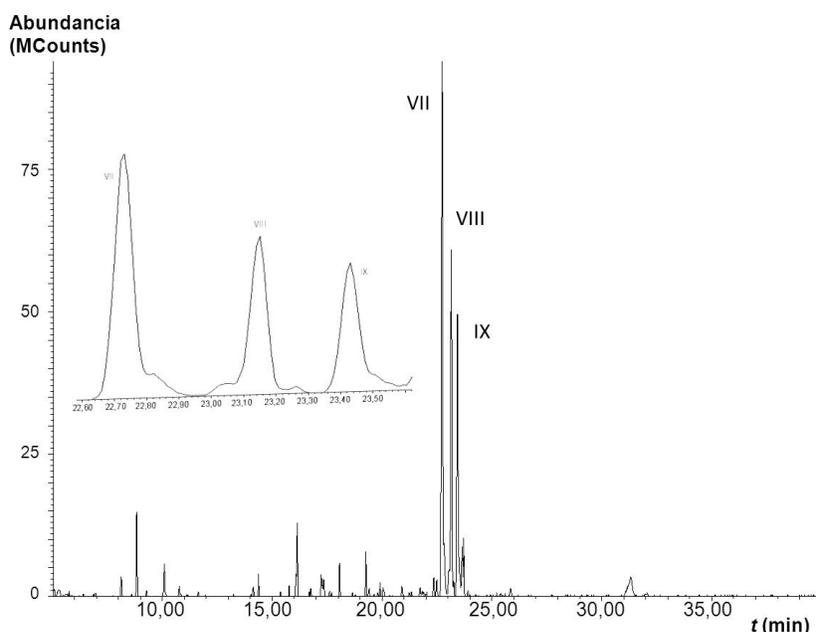


Figura 3. Cromatograma de la subfracción A5.2.3, indicando los picos correspondientes a los metabolitos mayoritarios identificados. (VII: 3,4-dihidro-6-fenil-2*H*-piran-5-carboxilato de etilo; VIII: *trans*-cariofileno; IX: 1-((4-hidroxifenil)tioxometil)pirrolidina).

metil)pirrolidina (IX; $T_r = 23,444$ min; $m/z = 207$ [M] $^{+}$ (pico base), 193 [M-CH₂] $^{+}$, 177 [M-CH₂O] $^{+}$, 161 [M-CH₂S] $^{+}$, 151 [M-C₃H₄O] $^{+}$, 147 [M-C₂H₄S] $^{+}$, 135 [M-C₄H₈O] $^{+}$, 121 [M-C₁₁H₁₃NOS] $^{+}$, 119 [M-C₁₁H₁₃NOS] $^{+}$, 105 [M-C₁₁H₁₃NOS] $^{+}$, 95 [M-C₁₁H₁₃NOS] $^{+}$, 93 [M-C₅H₈NS] $^{+}$, 79 [M-C₆H₁₀NS] $^{+}$, 69 [M-C₈H₁₂NO] $^{+}$, 65 [M-C₆H₈NOS] $^{+}$, 55 [M-C₇H₅NOS] $^{+}$, 43 [M-C₈H₆NOS] $^{+}$), respectivamente.

Los respectivos espectros de masas de los compuestos VII (22,74 min), VIII (23,16 min) y IX (23,44 min), mostraron iones moleculares a m/z 232, 204 y 207, en correlación con las fórmulas moleculares C₁₄H₁₆O₃ (calculado 232,275 g·mol⁻¹), C₁₅H₂₄ (calculado 204,351 g·mol⁻¹) y C₁₁H₁₃NOS (calculado 207,293 g·mol⁻¹). Los compuestos VII y IX, también muestran una elevada abundancia relativa de iones moleculares, asociados a la estabilidad estructural de los compuestos. El compuesto VIII, es un sesquiterpenoide muy común en la composición de aceites esenciales, del cual se ha reportado actividad antimicrobiana significativa [29].

Análisis de la fracción A15

Su fraccionamiento mediante CC en mezclas de éter de petróleo, acetona y metanol permitió obtener 4 subfracciones (A15.1 a A15.4; 0,2360 g; 71,91%). La subfracción A15.2 (0,0512 g) se purificó mediante CC en mezclas de diclorometano-metanol.

El análisis de la subfracción A15.2 refleja en su cromatograma (figura 4) cuatro constituyentes identificados como: **4,5-dihidro-3,5,5-trimetil-1*H*-pirazol** (X; $T_r = 17,512$ min; $m/z = 112$ [M] $^{+}$, 97 [M-CH₃] $^{+}$, 86 [M-C₂H₂] $^{+}$, 83 [M-HN₂] $^{+}$, 72 [M-C₂H₂N] $^{+}$, 59 [M-C₄H₅] $^{+}$ (pico base), 57 [M-C₃H₅N] $^{+}$, 55 [M-C₃H₇N] $^{+}$, 43 [M-C₅H₉] $^{+}$, 41 [M-C₄H₉N₂] $^{+}$), **1-metil-7-azabicyclo[4,1,0]heptano** (XI; $T_r = 18,098$ min; $m/z = 111$ [M] $^{+}$, 109 [M-2] $^{+}$, 96 [M-CH₃] $^{+}$, 82 [M-C₂H₅] $^{+}$, 81 [M-CH₄N] $^{+}$, 71 [M-C₃H₄] $^{+}$, 69 [M-C₂H₄N] $^{+}$, 57 [M-C₄H₆] $^{+}$, 55 [M-C₃H₆N] $^{+}$, 44 [M-C₃H₇] $^{+}$, 43 [M-C₅H₈] $^{+}$ (pico base), 41 [M-C₄H₈N] $^{+}$), **4-isobutil-2-metilciclopentanona** (XII; $T_r = 18,801$ min; $m/z = 154$ [M] $^{+}$, 124 [M-C₂H₆] $^{+}$, 111 [M-C₃H₇] $^{+}$, 97 [M-C₄H₉] $^{+}$, 91 [M-

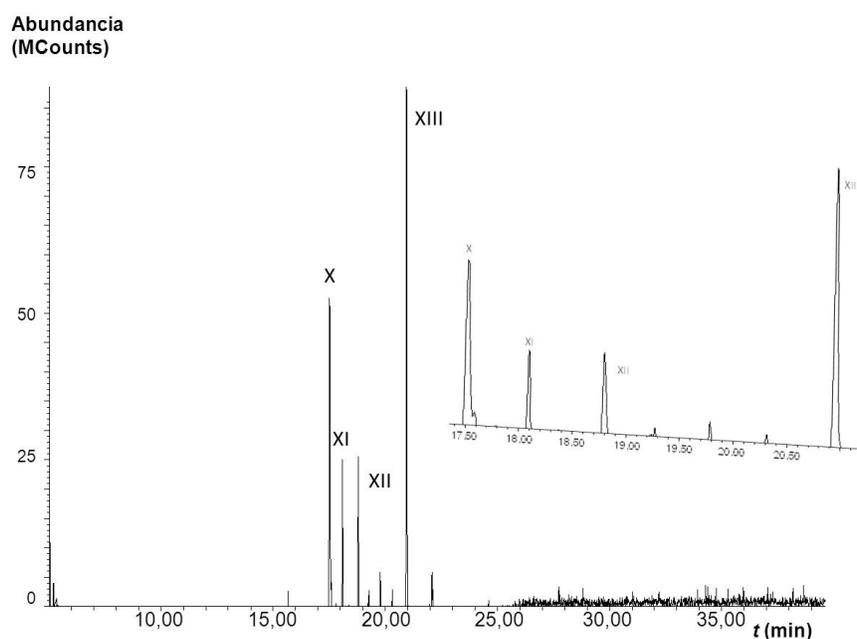


Figura 4. Cromatograma de la subfracción A15.2, indicando los picos correspondientes a los metabolitos mayoritarios identificados. (X: 4,5-dihidro-3,5,5-trimetil-1H-pirazol; XI: 7-aza-1-metilbicyclo[4,1,0]heptano; XII: 4-isobutil-2-metilciclopentanona; XIII: 3-hidroxi-5-(3-metil-1-butenil)-4,5-dihidro-2(3H)-furanona).

$C_3H_{11}O]^+$, 84 $[M-C_5H_{10}]^+$, 81 $[M-C_4H_9O]^+$, 71 $[M-C_6H_{11}]^+$, 69 $[M-C_6H_{13}O]^+$, 55 $[M-C_7H_{15}]^+$, 43 $[M-C_7H_{11}O]^+$ (pico base), 41 $[M-C_8H_{17}]^+$ y **3-hidroxi-5-(3-metil-1-butenil)-4,5-dihidro-2(3H)-furanona** (XIII: $m/z = 170[M]^+$, 125 $[M-CHO_2]^+$, 111 $[M-C_2H_3O_2]^+$, 109 $[M-CHO_3]^+$, 96 $[M-C_2H_2O_3]^+$, 82 $[M-C_3H_4O_3]^+$, 81 $[M-C_3H_5O_3]^+$, 71 $[M-C_6H_{10}O]^+$, 69 $[M-C_4H_5O_3]^+$, 57 $[M-C_7H_{13}O]^+$, 55 $[M-C_6H_{11}O_2]^+$, 44 $[M-C_7H_{10}O_2]^+$, 43 $[M-C_6H_7O_3]^+$ (pico base), 41 $[M-C_7H_{13}O_2]^+$).

Los respectivos espectros de masas de los compuestos X (17,52 min) y XI (18,10 min) desplegaron iones moleculares a m/z 112 y 111, correspondientes a las fórmulas moleculares $C_6H_{12}N_2$ (calculado 112,173 $g \cdot mol^{-1}$) y $C_7H_{13}N$ (calculado 111,185 $g \cdot mol^{-1}$). La identificación de compuestos nitrogenados puede ser indicio de que estos organismos pueden ser fuente de metabolitos tipo alcaloidales, grupo de compuestos que han sido obtenidos de algunos octocorales [30, 31].

En los espectros de masas de los compuestos XII (18,80 min) y XIII (20,95 min), se observaron iones moleculares a m/z 154 y 170, respectivamente. Estos valores se corresponden con las respectivas fórmulas moleculares $C_{10}H_{18}O$ (calculado 154,249 $g \cdot mol^{-1}$) y $C_9H_{14}O_3$ (calculado 170,206 $g \cdot mol^{-1}$).

Conclusiones

Los metabolitos secundarios mayoritarios identificados mediante CG/EM en las subfracciones A3.5, A3.8, A5.2.3 y A15.2, son principalmente constituyentes de tipo nitrogenado, así como derivados oxigenados y terpenoides, familias de compuestos relacionadas con actividades biológicas importantes. Algunos de estos compuestos pudieran ser los responsables de la antibiosis observada frente al crecimiento bacteriano por las fracciones A3, A5 y A15.

Agradecimientos

Al Departamento de Química y Rectorado de la Universidad de Oriente por el financiamiento parcial de esta investigación y al Laboratorio de Espectrometría de Masas de la Universidad Simón Bolívar (USB) por su colaboración con los análisis de CG/EM.

Referencias bibliográficas

- TAN L. *Phytochemistry* 68(7): 954-979. 2007.
- DIERS J., IVEY K., EL-ALFY A., SHAIKH J., WANG J., KOCHANOWSKA A., STOKER J., HAMANN M., MATSUMOTO R. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 89(1): 46-53. 2008.
- ABOU-ELELA G., ABD-ELNABY H., IBRAHIM H., OKBAH A. *World Appl Sci J* 7(7): 872-880. 2009.
- ERWIN P., LÓPEZ-LEGENTIL S., SCHUH-MANN P. *Ecological Economics* 70(2): 445-451. 2010.
- MONTASER R., LUESCH H. *Future Med Chem* 3(12): 1475-489. 2011.
- LEAL M., PUGA J., SERÓDIO J., GOMES N., CALADO R. *PLoS One* 7(1): e30580. 2012.
- PERDICARIS S., VLACHOGIANNI T., VALAVANIDIS A. *Natural Products Chemistry & Research* 1(3): 1-8. 2013.
- CUADRADO C., CASTELLANOS L., OSORNO O., RAMOS F., DUQUE C., PUYANA M. *Quim Nova* 33(3), 656-661. 2010.
- REINA E., PUENTES C., ROJAS J., GARCÍA J., RAMOS F., CASTELLANOS L., ARAGÓN M., OSPINA L. *Bioorg Med Chem Lett* 21(19): 5888-5891. 2011.
- WEI X., NIEVES K., RODRÍGUEZ A. *Pure & Applied Chemistry* 84(9): 1847-1855. 2012
- BAUER A., KIRBY A., SHERRIS J., TURK M. *Am J Clin Pathol* 45(4): 493-496. 1966.
- TELLO E., CASTELLANOS L., AREVALO-FERRO C., DUQUE C. *J Nat Prod* 72(9): 1595-1602. 2009.
- ORDAZ G., D'ARMAS H., HERNÁNDEZ J., CAMACHO A. *Ciencia* 17(3):245-254.2009.
- ORDAZ G., D'ARMAS H., YAÑEZ D., HERNÁNDEZ J., CAMACHO A. *Rev Biol Trop* 58(2): 677-688. 2010.
- DOSHI G., AGGARWAL G., MARTIS E., SHANBHAG P. *INTER J Pharm Sc Nanotech* 5(3): 1446-1461. 2011.
- HUNT L., SMITH S., DOWNUM K., MYDLARZ L. *Marine drugs* 10(6): 1225-1243. 2012.
- MARCHBANK D., BERRUE F., KERR R.G. *J Nat Prod* 75(7): 1289-1293. 2012
- ZARD S. *Advances in Free Radical Chemistry*. Volume 2. Elsevier. 217p. 1999.
- BENNETT B., LAGER A., RUSSELL C., LOVE G., LARTER S. *Org Geochem* 35: 1427-1439. 2004.
- OLIVEIRA E., VAZ M., ALVES M., FLORES V., SOARES M., RODRIGUES M., ALCARAZ C., BAS-TOS E. *J Chromatogr A* 1105: 186-190. 2006.
- BAKR M. *Earth Sci* 20(2): 127-159. 2009.
- DEMBITSKY V., SHKROB I., LEV O. *J Chem Ecol* 26(6): 1359-1366. 2000.
- GARCEZ F., GARCEZ.W, HAMERSKI L., MIRANDA A. *Quim Nova* 33(8): 1739-1742. 2010.
- GARZÓN S., RODRÍGUEZ A., SÁNCHEZ J., ORTEGA-BARRIA E. *J Nat Prod* 68(9): 1354-1359.2005.
- SAMEJO M., NDUKWE G., BURDI D., BHANGER M., KHAN K. *J Med Plant Res* 3(2): 055-060. 2009.
- HOFSTETTER R., CHEN Z., GAYLORD M., MCMILLIN J., WAGNER M. *J Appl Entomol* 132: 387-397. 2008.
- PURESWARAN D., HOFSTETTER R., SULLIVAN B. *Environ Entomol* 37(1): 70-78. 2008.
- LIST B., SHABAT D., BARBAS C., LERNER R. *Chem Eur J* 4(5): 881-885.1998.
- JULIANI JR H., BIURRUN F., KOROCH A., OLIVA M., DEMO M., TRIPPI V., ZYGADLO J. *Planta med* 68(08), 762-764. 2002.
- CHAI X., TANG L. LEI H., BAI C. SUN J., LI Y., LIU Y. *J Chin M Med* 37(5): 667-685. 2012.
- GAO C., YI X., HUANG R., YAN F., HE B., CHEN B. *Chemistry & biodiversity* 10(8): 1435-1447. 2013.