

IDENTIFICACIÓN MEDIANTE RMN DE ALGUNOS METABOLITOS SECUNDARIOS DEL CORAL GORGÓNEO *Eunicea* sp.

IDENTIFICATION BY NMR OF SOME NON-POLAR SECONDARY METABOLITES FROM *Eunicea* sp. GORGONIANS SOFT CORALS

GABRIEL ORDAZ¹, HAYDELBA D'ARMAS¹, ÁNGEL CAMACHO², JUAN HERNÁNDEZ³, DAYANIS YAÑEZ²

Universidad de Oriente, ¹ Núcleo de Sucre, Escuela de Ciencias, Departamento de Química, Laboratorio de Productos Naturales y Lípidos, Cumaná, Venezuela. ² Núcleo de Monagas, Unidad de Estudios Básicos, Departamento de Ciencias, Sección de Química, Maturín, Venezuela. ³ Coca-Cola FEMSA, Laboratorio de Análisis de Calidad, Valencia, Venezuela. E-mail: gabrieljordazgonz@yahoo.com

RESUMEN

Del extracto en éter de petróleo de una especie no identificada del género *Eunicea*, se obtuvieron algunas fracciones cromatográficas que presentaron actividad antibacteriana frente a *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas aeruginosa*. De éstas, se lograron aislar, mediante cromatografía en columna y en capa fina preparativa, tres constituyentes lipídicos derivados de ácidos y alcoholes. Los estudios de RMN unidimensional (¹H, ¹³C) y bidimensionales (HMQC y HMBC), sugieren que estos constituyentes se corresponden con el (*E*)-8-eicosenoato de metilo (**1**), el hexadecanol (**2**) y el 1-O-deciliglicerol (**3**).

PALABRAS CLAVE: *Eunicea*, metabolitos secundarios, actividad antibacteriana, alquilglicerol.

ABSTRACT

Some chromatographic fractions of the petroleum-ether-extract of non-reported *Eunicea* specie, showed activity against *B. subtilis* and *P. aeruginosa* bacteria. By continuous column and preparative thin layer chromatography of these fractions, three fats derivate from acids and alcohol were obtained. The 1D (¹H, ¹³C) and 2D (HMQC, HMBC) NMR analyses allowed to propose the structure of: (*E*)-8-eicosenoic acid methyl ester (**1**), hexadecyl alcohol (**2**), and 1-O-decylglycerol (**3**).

KEY WORDS: *Eunicea*, secondary metabolites, antibacterial activity, alkylglycerol.

INTRODUCCIÓN

El interés en los metabolitos secundarios marinos ha crecido en las últimas décadas debido al descubrimiento de compuestos biológicamente activos potencialmente aptos para aplicaciones clínicas (Newman y Cragg 2004, Garateix 2005, Montaser y Luesch 2011, Houssen y Jaspars 2012, Leal *et al.* 2012). Estudios de los octocorales del género *Eunicea* (phylum Coelenterata, clase Anthozoa, subclase Octocorallia, orden Gorgonacea, familia Plexauridae), basados en un acercamiento quimiotaxonómico, han demostrado que este género gorgonio produce una amplia diversidad de metabolitos secundarios con características estructurales únicas, muchos de los cuales con propiedades farmacodinámicas importantes (D'Armas *et al.* 2000, Shi *et al.* 2001, Garzón *et al.* 2004, Wei *et al.* 2004, Cuadrado *et al.* 2010, Reina *et al.* 2011). En tal sentido, se propuso obtener del extracto lipídico de *Eunicea* sp., algunos metabolitos secundarios para caracterizarlos y determinar su posible bioactividad, con la finalidad de realizar un aporte a la quimiotaxonomía de este género en latitudes venezolanas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección

Las muestras del octocoral *Eunicea* sp., fueron obtenidas manualmente con equipo autónomo de buceo, entre 3 y 25 m de profundidad, cerca de la localidad de Punta Arena, en la costa norte del Golfo de Cariaco, estado Sucre, Venezuela (10°30'-10°32' N y 64°12'-64°13' W). Posteriormente, las muestras fueron lavadas y refrigeradas en un contenedor para su posterior traslado y análisis. La identificación de las especies se realizó en la Fundación Pro-desarrollo de las Ciencias del Mar (FUNDEMAR) del Instituto Oceanográfico de Venezuela del Núcleo de Sucre de la Universidad de Oriente.

Extracción

El material obtenido del octocoral, fue troceado y macerado en metanol puro (99,9%) por espacio de 96 h, con una segunda extracción por aproximadamente 120 h. Los filtrados fueron concentrados a presión reducida (aprox. 11 mbar) en un rotaevaporador marca

Hidolph, obteniéndose el extracto crudo en metanol (EC). Posteriormente, se preparó una suspensión del EC en metanol acuoso al 90% y se realizó una extracción líquido-líquido con éter de petróleo puro (grado analítico) para obtener los componentes menos polares del extracto. La fase de éter fue secada con sulfato de sodio anhidro, filtrada y evaporada a presión reducida para obtener la fracción soluble en este solvente (FE).

Fraccionamiento cromatográfico

La FE (2,96 g), fue particionada mediante cromatografía en columna (CC), en una columna de vidrio de 4 × 65 cm empaquetada con sílica (Si) 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, con mezclas de hexano-acetato de etilo, acetato de etilo-acetona y acetona-metanol en distintas proporciones, recolectándose 94 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 Si 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 16 fracciones (E1-E16; 2,79 g; 99,59%). Con base en el análisis por CCF de las fracciones obtenidas y los rendimientos obtenidos, se seleccionaron E2 (1,54 g; 55,19%) y E6 (0,26 g; 9,32%), para ser fraccionadas sucesivamente mediante CC (Si gel 35-70 mesh) y CCF preparativa (Si gel 10-40 µ, 1 mm de espesor).

Actividad antibacteriana

Para evaluar los principios antibacterianos se emplearon cepas pertenecientes al Centro Venezolano de Colección de Microorganismos de *Bacillus subtilis* (CVC438), *Citrobacter freundii* (CVC924), *Staphylococcus aureus* (CVC48), *Escherichia coli* (CVC39), *Salmonella enteritidis* (CVC497) y *Pseudomonas aeruginosa* (CVC625) inoculadas en agar Müller-Hinton. La acción antibacteriana se evidenció midiendo el diámetro (mm) del halo de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor de los discos (de 5 mm) impregnados con la fracción a probar (40 mg·mL⁻¹) (Bauer *et al.* 1966).

Caracterización

La identificación de algunos de los metabolitos secundarios poco polares de *Eunicea* sp. se realizó mediante estudios de resonancia magnética nuclear (RMN), en

el Laboratorio de RMN del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), registrándose en un equipo marca BRUKER, modelo AVANCE 500 MHz para los análisis de ¹H, DEPT, HMQC y HMBC, y uno modelo AVANCE 300 MHz para el análisis de ¹³C. Para la obtención de estos espectros, las muestras fueron disueltas en un solvente deuterado adecuado (generalmente CDCl₃). La caracterización estructural se estableció por el análisis e interpretación de los desplazamientos químicos (δ) de los espectros 1D y las correlaciones obtenidas en los análisis 2D. Igualmente, se compararon con los espectros de las estructuras propuestas obtenidos en programas de computación (ACD/CNMR c1997, ACD/HNMR c1998) y los reportados teóricamente.

RESULTADOS

Del extracto crudo en metanol (19,8 g; 3,67%) se lograron solubilizar 2,96 g (14,93%) en éter de petróleo (FE). Los ensayos químicos cualitativos para ciertas familias de metabolitos secundarios y algunas propiedades bioactivas de estos extractos han sido informados previamente (Ordaz *et al.* 2010).

Separación cromatográfica y evaluación antimicrobiana

La fracción E2 (1,5417 g), se particionó por CC en mezclas éter de petróleo-diclorometano y diclorometano-acetato de etilo, obteniéndose 14 subfracciones (1,44 g; 93,62%). De éstas, la fracción E2.1 (0,3306 g) mostró inocuidad frente a las bacterias empleadas (Tabla 1), mientras que, E2.4 (0,1241 g) y E2.6 (0,2521 g) inhibieron el crecimiento de *B. subtilis*, observándose halos de inhibición bactericida de 10 y 13 mm, respectivamente. Asimismo, E2.4 mostró halos de inhibición bactericida de 18 mm frente a *P. aeruginosa* (Tabla 1).

Tabla 1. Actividad antibacteriana de algunas fracciones cromatográficas de FE

Microorganismo	Halos de inhibición* (mm)			
	E2.1	E2.4	E2.6	E6
<i>Bacillus subtilis</i>	–	10	13	10
<i>Staphylococcus aureus</i>	–	–	–	–
<i>Escherichia coli</i>	–	–	–	–
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	–	18	–	10
<i>Citrobacter freundii</i>	–	–	–	–

*Medidas sobre discos de 5 mm de diámetro

La CC de E2.1 con mezclas de hexano-diclorometano, permitió obtener 7 subfracciones (0,2955 g, 89,38%), de

las cuales E2.1.2 (0,2013 g) se fraccionó también por CC con mezclas hexano-diclorometano en 7 subfracciones (0,1876 g, 93,19%). La fracción E2.1.2.7 (0,0125 g), un líquido aceitoso (traslúcido), fue purificada mediante CCF sobre una placa preparativa en éter de petróleo-diclorometano (3:2, R_f 0,393).

Por su parte, de la fracción E2.4 se obtuvieron por CC en hexano-diclorometano 7 subfracciones (0,0741 g, 59,71%). De éstas, E2.4.3 (0,0289 g) se particionó por CC (hexano-diclorometano) en 3 subfracciones (0,0255 g, 88,24%). La fracción E2.4.3.2 (0,0079 g) fue purificada mediante CCF sobre una placa preparativa con diclorometano (R_f 0,393) y luego por CC (hexano-diclorometano) recuperándose 0,0038 g de un posible compuesto puro.

De igual forma, se particionó E2.6 por CC en mezclas de hexano-acetato de etilo, obteniéndose 10 subfracciones (0,2145 g, 85,09%). La CC de E2.6.3 en hexano-diclorometano y diclorometano-acetato de etilo, permitió obtener 5 nuevas subfracciones (0,0342, 93,70%), de las cuales E2.6.3.3, se purificó mediante CCF sobre una placa preparativa con hexano-acetato de etilo (4:1, R_f 0,327), recuperándose 0,0053 g de un sólido blanco (forma de cristales).

La fracción E6 (0,2610 g) presentó halos de inhibición bactericida de 10 mm frente a *B. subtilis* y *P. aeruginosa* (Tabla 1). Ésta, se recrystalizó en hexano y luego se particionó por CC (hexano-acetona) en 5 subfracciones (0,0663 g, 77,63%). La fracción E6.2 (0,0303g) se purificó por CCF sobre una placa preparativa en hexano-acetona (3:1, R_f 0,446) y luego por CC (hexano-acetona), separándose un posible compuesto puro (sólido blanco, 0,0047 g).

Identificación de los constituyentes aislados

El análisis por RMN- ^{13}C de la fracción E2.1.2.7 mostró 21 señales a δC 172,55; 130,36; 130,12; 50,75; 34,26; 32,80; 30,64; 30,54; 30,47; 30,42; 30,34; 30,21; 30,17; 30,08; 29,99; 29,93; 27,99; 27,92; 25,67; 23,51; y 14,41 ppm. El análisis DEPT-135° no mostró la señal a δC 172,55 ppm, mientras que las señales a δC 130,36; 130,12; 50,75 y 14,41 ppm aparecieron en la región positiva del espectro, el resto de las señales se mostraron en la región negativa. El espectro de RMN- ^1H , muestra señales δH a 5,35 (m, 2H), 3,57 (s, 3H), 2,22 (t, 2H), 2,05 (m, 4H), 1,63 (m, 2H), 1,33 (m, ~24H) y 0,93 ppm (t, 3H). Como se observa en la Tabla 2, los protones a δH

a 5,35 ppm mostraron interacción en el espectro HMQC con los núcleos de carbono a δC 130,36 y 130,12 ppm y en el espectro HMBC con las señales a δC 27,99 y 27,92 ppm. Los protones a δH 3,57 ppm sólo mostraron interacción directa (HMQC) con la señal a δC 50,75 ppm. La señal a δH 2,22 ppm se correlaciona directamente con los núcleos a δC 34,26 ppm y de manera vecinal con la señal a δC 25,67 ppm. La señal a δH 2,05 ppm presentó interacción HMQC con δC 27,99 y 27,92 ppm y HMBC con δC 130,36 y 130,12 ppm. Los protones a δH a 1,63 ppm mostraron interacción HMQC con δC 25,67 ppm. La señal a δH 1,33 ppm, correspondiente a una señal ancha e intensa, mostró interacción directa y vecinal con las señales observadas entre δC 30,64 ppm y δC 29,93 ppm. Los protones a δH 0,97 ppm mostraron interacción directa con δC 14,41 ppm y vecinal con δC 23,51 ppm.

Por su parte, en el espectro de RMN- ^{13}C de la fracción E2.4.3.2 se observaron 16 señales a δC 63,11; 32,81; 31,91; 29,68; 29,68; 29,65; 29,64; 29,63; 29,63; 29,61; 29,60; 29,42; 29,35; 25,72; 22,68 y 14,11 ppm. En el experimento DEPT-135°, sólo la señal a δC 14,11 ppm se mostró en la región positiva, visualizándose el resto de las señales en la región negativa. Las señales de los protones en el espectro de RMN- ^1H , se observaron a δH 3,62 (t, 2H), 3,05 (s, 1H), 1,54 (m, 2H), 1,27 (m, ~26H) y 0,86 ppm (t, 3H). Entre las correlaciones ^1H - ^{13}C (Tabla 2), se encuentran la interacción de los protones a δH 3,62 ppm con la señal a δC 63,11 ppm por HMQC y δC 32,81 ppm por HMBC, la interacción HMQC de los protones a δH 1,54 ppm con la señal a δC 32,81 ppm, la interacción de los protones a δH 1,27 ppm con las señales observadas entre δC 31,91 ppm y δC 22,68 ppm, así como la de los protones a δH 0,86 ppm con la señal a δC 14,11 ppm por HMQC y con δC 22,68 ppm por HMBC.

Para la fracción E6.2, se observaron en el análisis por RMN- ^{13}C 13 señales a δC 72,54; 71,84; 70,35; 64,33; 31,92; 29,69; 29,65; 29,60; 29,57; 29,35; 26,07; 22,68 y 14,12 ppm. Los experimentos DEPT-135° mostraron las señales a δC 70,35 y 14,12 ppm en la región positiva y el resto de las señales en la región negativa. El espectro de RMN- ^1H mostró señales a δH 3,84 (m, 1H), 3,70-3,64 (m, 2H), 3,54-3,48 (m, 2H), 3,46-3,42 (m, 2H), 2,56 (s, 1H), 2,11 (s, 1H), 1,55 (m, 2H), 1,23 (m, ~14H) y 0,86 ppm (t, 3H). En la Tabla 2, se muestran algunas de las correlaciones entre los núcleos ^1H y ^{13}C . La señal a δH 3,84 ppm presentó interacción directa (HMQC) con la señal a δC 70,35 ppm, mientras los protones observados a δH 3,70-3,64 ppm se correlacionaron con la señal a δC 64,33 ppm.

Tabla 2. Desplazamientos químicos, asignaciones y correlación de los núcleos ^1H y ^{13}C para las fracciones analizadas.

E2.1.2.7 (1)			E2.4.3.2 (2)			E6.2 (3)		
$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{C, HMQC}}^{\text{b}}$	$\delta_{\text{C, HMBC}}^{\text{b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{c}}$	$\delta_{\text{C, HMQC}}^{\text{d}}$	$\delta_{\text{C, HMBC}}^{\text{d}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{e}}$	$\delta_{\text{C, HMQC}}^{\text{d}}$	$\delta_{\text{C, HMBC}}^{\text{d}}$
1 -	172,55 (C1)		3,62 (t, $-\text{CH}_2\text{OH}$)	63,11 (C1)	32,81 (C2)	3,84 (m, $-\text{CHOH}$)	70,35 (C2)	
2 5,35 (m, $=\text{CH}-$)	130,36; 130,12 (C8, C9)	27,99; 27,92 (C7, C10)	3,05 (s, $-\text{OH}$)	-	-	3,70-3,64 (m, $-\text{CH}_2\text{OH}$)	64,33 (C3)	
3 3,57 (s, $-\text{OCH}_3$)	50,75 (C21)		1,54 (m, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$)	32,81 (C2)		3,54-3,48 (m, $-\text{CH}_2\text{OH}$)	72,54 (C1)	70,35 (C2); 64,33 (C3)
4 2,22 (t, $-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{R}$)	34,26 (C2)	25,67 (C3)	1,27 (m, $-\text{CH}_2-$)	31,91; 29,68; 29,68; 29,65; 29,64; 29,63; 29,63; 29,61; 29,60; 29,42; 29,35; 25,72; 22,68 (C3 a C15)		3,46-3,42 (m, $-\text{CH}_2\text{OH}$)	71,84 (C4)	29,57; 26,07 (C5, C6)
5 2,05 (m, $-\text{CH}_2\text{CH=}$)	27,99; 27,92 (C7, C10)	130,36; 130,12 (C8, C9)	0,86 (t, $-\text{CH}_3$)	14,11 (C16)	22,68 (C15)	2,56 (s, $-\text{OH}$)	-	-
6 1,63 (m, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{R}$)	25,67 (C3)					2,11 (s, $-\text{OH}$)	-	-
	32,80; 30,64; 30,54; 30,47; 30,42; 30,34;							
7 1,33 (m, $-\text{CH}_2-$)	30,21; 30,17; 30,08; 29,99; 29,93; 23,51 (C4 a C6; C11 a C19)					1,55 (m, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$)	29,57 (C5)	71,84; 26,07 (C4, C6)
8 0,93 (t, $-\text{CH}_3$)	14,41 (C20)	23,51 (C19); 32,80 (C18)				1,23 (m, $-\text{CH}_2-$)		
9						0,86 (t, $-\text{CH}_3$)	14,12 (C13)	22,68 (C12); 31,92 (C11)

^a Espectros realizados a 500,13 MHz en solución de $\text{C}_6\text{H}_4\text{D}_8$. ^b Espectros realizados a 125,75 MHz en solución de $\text{C}_6\text{H}_4\text{D}_8$. ^c Espectros realizados a 500,13 MHz en solución de CDCl_3 . ^d Espectros realizados a 125,75 MHz en solución de CDCl_3 . Los desplazamientos químicos están expresados en ppm en relación al TMS.

Asimismo, la señal a δH 3,54-3,48 ppm presentó interacción HMQC con la señal a δC 72,54 ppm y HMBC con las señales a δC 70,35 y 64,33 ppm, mientras los protones a δH 3,46-3,42 ppm se correlacionaron directamente con la señal a δC 71,84 ppm y a distancia con las señales entre δC 29,69 ppm y δC 29,35 ppm. La señal a δH 1,55 ppm presentó correlación directa con el núcleo a δC 29,57 ppm y vecinal con las señales a δC 71,84 y 26,07 ppm. Igualmente, se observaron

interacciones entre la señal a δH 1,23 ppm y las señales observadas entre δC 31,92 ppm y δC 22,68 ppm, mientras los protones a δH 0,86 ppm mostraron correlación HMQC con la señal a δC 14,12 ppm y HMBC con las señales a δC 22,68 y 31,92 ppm.

La Figura 1 muestra las estructuras propuestas de los constituyentes aislados, de acuerdo a los análisis de RMN 1D y 2D.

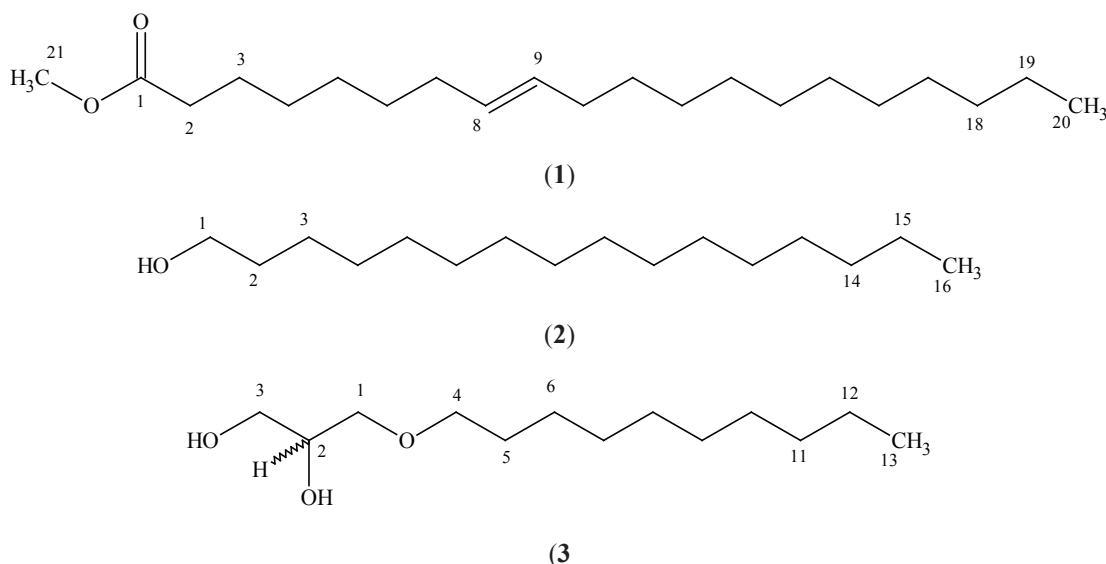


Figura 1. Constituyentes identificados en el extracto graso de *Eunicea* sp.: (1) (*E*)-8-eicosenoato de metilo, (2) 1-hexadecanol, (3) 1-O-deciliglicerol.

DISCUSIÓN

De los cinco microorganismos empleados en las pruebas de actividad antibacteriana de las fracciones E2.1, E2.4, E2.6 y E6 (Tabla 1), solo la bacteria Gram (+) *B. subtilis* y la Gram (-) *P. aeruginosa* mostraron ser sensibles a sus constituyentes. Aunque estos resultados no pueden ser interpretados como selectividad antimicrobiana, debido al número reducido de bacterias utilizadas, queda evidencia del posible potencial antibacteriano de los constituyentes poco polares. La inhibición del crecimiento bacteriano por los componentes activos presentes en estas fracciones cromatográficas pudo ocurrir por mecanismos conocidos: inhibición de la síntesis de la pared celular y activación de enzimas que destruyen esa pared, aumento de la permeabilidad de la membrana celular, interferencia con la síntesis de proteínas y alteración del metabolismo de los ácidos nucleicos, entre otros (Beers y Berkow 1999). La actividad antibacteriana presentada por otras fracciones poco polares ha sido informada previamente en la literatura (Ordaz *et al.* 2009).

De acuerdo con los estudios de RMN de la fracción E2.1.2.7, el compuesto presenta como características estructurales una cadena hidrocarbonada lineal, una insaturación carbono-carbono y la unión química hacia heteroátomos, que sugieren un éster metílico de un ácido graso insaturado. El grupo éster se evidencia con la señal a δC 172,55 ppm, correspondiente al carbono carboxílico del éster (C1), mientras que la señal a δC 50,75 ppm, se atribuye a un carbono primario unido al oxígeno (C21), cuyos protones asociados (correlación HMQC) se observaron un poco apantallados a δH 3,57 ppm, en una señal singlete con integración para 3 protones. El carbono α al carbonilo (δC 34,26 ppm, C2), se corresponde con un carbono secundario (metileno, CH_2) cuyos protones se exhiben a δH 2,22 ppm y se correlacionan en el HMBC con el carbono β al carbonilo (C3) a δC 25,67 ppm, igualmente identificado como un carbono metilénico, cuyos protones se observaron a δH 1,63 ppm. El carbono terminal de la cadena hidrocarbonada corresponde a la señal δC 14,41 ppm (C20), identificado como un carbono primario cuyos tres protones se exhibieron como una señal

triplete a δH 0,93 ppm y se correlacionan en el HMBC con los carbonos metilénicos a δC 23,51 (C19) y 32,80 (C18) ppm. Dado que los experimentos bidimensionales no relacionan al doble enlace carbono-carbono próximo al extremo terminal alquílico ni al grupo funcional éster, se propone en una posición intermedia de la cadena carbonada (ω -12). Esta insaturación es atribuida a los núcleos a δC 130,36 y 130,12 ppm (C8, C9), carbonos metínicos (CH , sp^2) asociados a los protones a δH a 5,35 ppm. La interacción HMBC sugiere que estos protones olefínicos se encuentran adyacentes a los núcleos metilénicos observados a δC 27,99 y 27,92 ppm (C7, C10) cuyos protones se observan a δH 2,05 ppm. Con base en estas interpretaciones espectroscópicas se propone como estructura molecular del constituyente en la fracción E2.1.2.7 al 8-eicosenoato de metilo (**1**), posiblemente en una configuración *E* de acuerdo a las comparaciones con los espectros obtenidos en ACD/CNMR y ACD/HNMR. Ácidos grasos saturados e insaturados han sido encontrados en forma libre, como ésteres metílicos, ceras y constituyendo fosfolípidos en algunas especies del género *Eunicea* (Carballeira *et al.* 1997, Ordaz *et al.* 2009) y algunos extractos de otros organismos marinos (Abou-Elela *et al.* 2009, Hernández *et al.* 2010, Camacho *et al.* 2011), lo cual indica que son componentes importantes en la ecología química del ambiente marino.

Los datos espectroscópicos de RMN de la fracción E2.4.3.2, se relacionan con una estructura hidrocarbonada lineal con unión a un heteroátomo, atribuyéndose a un alcohol graso. El protón del grupo hidroxilo del alcohol se observó a δH 3,05 ppm, mientras el carbono α a este grupo funcional (C1), observado a δC 63,11 ppm, se corresponde con un carbono secundario (metileno, CH_2), cuyos protones asociados se observaron a δH 3,62 ppm. La correlación HMBC muestra que el carbono adyacente (C2), también metilénico, se corresponde con el observado a δC 32,81 ppm, asociado a los protones observados a δH 1,54 ppm. Las señales entre δC 31,91 ppm y δC 25,72 ppm, todos del tipo metilénico, se corresponden con los núcleos intermedios de la cadena hidrocarbonada lineal (C3 a C14), relacionados con los protones a δH 1,27 ppm. La señal a δC 14,11 ppm (C16), se atribuye al metilo terminal, cuyos protones asociados (δH 0,86 ppm) se correlacionan en el HMBC con un carbono metilénico a δC 22,68 ppm (C15). Con base en estos datos, consistentes con un alcohol primario, y las comparaciones con los espectros obtenidos en ACD/CNMR y ACD/HNMR, se propone al 1-hexadecanol (**2**) como el constituyente aislado en esta fracción cromatográfica. Este alcohol, conocido también como

alcohol cetílico o palmitílico es una materia básica para la fabricación de alcoholes grasos sulfonados, tiene propiedades estabilizantes y activadoras de la emulsión, muy adecuado para cremas, ungüentos y emulsiones líquidas farmacéuticas, así como para preparados en forma de barra empleados en cosmética decorativa (CORQUIVEN 2007).

Los análisis por RMN de la fracción E6.2, indicaron como características estructurales la unión química a heteroátomos y un fragmento hidrocarbonado lineal, atribuyéndose a un derivado alquílico del glicerol. Los protones de los grupos hidroxilos se observaron a δH 2,56 y 2,11 ppm. El carbono del fragmento glicerol que se une mediante un puente oxígeno (éter) a la cadena hidrocarbonada (C1) fue atribuido a la señal δC 72,54 ppm, correspondiente a un núcleo metilénico, cuyos protones asociados se observaron a δH 3,54-3,48 ppm.

Estos protones presentaron interacción en el espectro HMBC con las señales a δC 70,35 y 64,33 ppm. La primera de ellas se mostró como una señal metínica correlacionada con los protones a δH 3,84 ppm, por lo que se asignó al carbono intermedio del glicerol (C2) y la segunda se observó como una señal metilénica (C3), correlacionada con los protones a δH 3,70-3,64 ppm. El carbono de la cadena hidrocarbonada en unión éter con el glicerol (C4), se atribuye al núcleo observado a δC 71,84 ppm, que se correlacionó con los protones a δH 3,46-3,42 ppm. El carbono adyacente (C5), se atribuye a núcleo a δC 29,57 ppm, el cual presentó interacción directa con los protones a δH 1,55 ppm, mientras estos últimos se correlacionaban a distancia con las señales a δC 71,84 (C4) y 26,07 ppm (C6). La terminación alquílica (C13) se corresponde con la señal metílica observada a δC 14,12 ppm, cuyos protones asociados (δH 0,86 ppm) presentaron interacción a distancia con las señales metilénicas a δC 22,68 (C12) y 31,92 ppm (C11). El resto de las señales, observadas como núcleos metilénicos, presentaron interacción con la señal a δH 1,23 ppm y se atribuye a la región central de la cadena hidrocarbonada. Con base en estas interpretaciones y la comparación con los espectros obtenidos en ACD/CNMR y ACD/HNMR, se plantea al 1-O-deciliglicerol (**3**) como constituyente aislado en esta fracción cromatográfica. Sin embargo, la configuración estereoquímica de C2 no pudo ser establecida. Los 1-O-alquilglicerol presentan en su estructura una función éter alquilo en la posición 1 del glicerol que caracteriza a los glicerofosfolípidos, y a cuya presencia se le atribuyen los efectos biológicos que posee esta familia de éteres lipídicos, como inhibición de la falciformación de los eritrocitos SS de los 1-O-alquilglicerol de C10

y C12, atribuido a la interacción de los mismos con la membrana de los eritrocitos (Torres-Domínguez *et al.* 2005). Asimismo, se ha determinado los efectos citotóxicos de algunos alquilgliceroles sintéticos que dependen de la concentración del compuesto y la densidad celular del carcinoma humano de mama MCF-7, con un comportamiento diferencial en función de la longitud de cadena alquímica (Pérez *et al.* 2006). Esto permite inferir que la biosis bacteriana mostrada por la fracción E6 pudo deberse, en parte, por la acción de este constituyente.

CONCLUSIONES

Las fracciones E2.4 y E6 mostraron antibiosis frente a *B. subtilis* y *P. aeruginosa*, mientras E2.6 solo frente a *B. subtilis*. Con base en los análisis de RMN en una y dos dimensiones, se proponen como constituyentes aislados el (E)-8-eicosenoato de metilo (fracción E2.1.2.7), 1-hexadecanol (fracción E2.4.3.2) y 1-O-deciliglicerol (fracción E6.2), este último posiblemente responsable de la actividad antibacteriana de E6.

AGRADECIMIENTOS

Al Departamento de Química y al Rectorado de la Universidad de Oriente por haber financiado parcialmente esta investigación y al Laboratorio de RMN del Instituto Venezolano de Investigación Científica (IVIC).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOU-ELELA G, ABD-ELNABY H, IBRAHIM H, OKBAH A. 2009. Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents. *World Appl. Sci. J.* 7(7):872-880.
- ACD/CNMR. c1997. Versión 2.51. Toronto: Advanced Chemistry Development Inc.
- ACD/HNMR. c1998. Versión 3.50. Toronto: Advanced Chemistry Development Inc.
- BAUER A, KIRBY A, SHERRIS J, TURK M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45(4):493-496.
- BEERS M, BERKOW R. 1999. El manual MERCK de diagnóstico y tratamiento. Edición electrónica en CD-ROM. Harcourt, Madrid, España.
- CAMACHO A, D'ARMAS H, ORDAZ G, HERNÁNDEZ J. 2011. Constituyentes químicos de algunas fracciones bioactivas del extracto apolar del octocoral caribeño *Muricea* sp. identificados mediante CG/EM. *Ciencia.* 19(4):285-292.
- CARBALLEIRA N, SOSTRE A, RODRÍGUEZ A. 1997. Phospholipid fatty acid composition of gorgonians of the genus *Eunicea*: Further identification of tetracosapolyenoic acids. *Comp. Biochem. Physiol. B Comp. Biochem.* 118(2):257-260.
- CORQUIVEN. 2007. MSDS: Alcohol cetílico. Hoja de seguridad. 4 p.
- CUADRADO C, CASTELLANOS L, OSORNO O, RAMOS F, DUQUE C. 2010. Estudio químico y evaluación de la actividad *antifouling* del octocoral caribeño *Eunicea laciniata*. *Quim. Nova.* 33(3):656-661.
- GARATEIX A. 2005. El mar: fuente de nuevos fármacos. *Elementos.* 58(12):39-47.
- GARZÓN S, RODRÍGUEZ A, SÁNCHEZ J, ORTEGA-BARRIA E. 2005. Sesquiterpenoid metabolites with antiparasitic activity from a Caribbean Gorgonian coral, *Eunicea* sp. *J. Nat. Prod.* 68:1354-1359.
- HERNÁNDEZ J, D'ARMAS H, ORDAZ G, CAMACHO A. 2010. Identificación de algunos constituyentes químicos del extracto soluble en éter de petróleo del octocoral *Pseudopterogorgia acerosa* mediante CG/EM y su posible actividad biológica. *Ciencia.* 18(1):26-33.
- HOUSSEN W, JASPARS M. 2012. Isolation of marine natural products. *Methods Mol. Biol.* 864:367-92.
- LEAL M, PUGA J, SERÓDIO J, GOMES N, CALADO R. 2012. Trends in the discovery of new marine natural products from invertebrates over the last two decades – Where and what are we bioprospecting? *PLoS ONE.* 7(1):e30580.doi:10.1371/journal.pone.0030580.
- MONTASER R, LUESCH H. 2011. Marine natural products: a new wave of drugs? *Future Med. Chem.* 3(12):1475-489.
- NEWMAN D, CRAGG G. 2004. Marine natural products and related compounds in clinical and advanced preclinical trials *J. Nat. Prod.* 67(8):1216-1238.

- ORDAZ G, D'ARMAS H, HERNÁNDEZ J, CAMACHO A. 2009. Identificación mediante CG/EM de algunos constituyentes con actividad biológica del extracto apolar del celenterado *Eunicea* sp. *Ciencia*. 17(3):245-254.
- ORDAZ G, D'ARMAS H, YAÑEZ D, HERNÁNDEZ J, CAMACHO A. 2010. Metabolitos secundarios, letalidad y actividad antimicrobiana de los extractos de tres corales y tres moluscos marinos de Sucre, Venezuela. *Rev. Biol. Trop.* 58(2):677-688.
- PÉREZ H, KASEM M, NAVARRO V, GARCÍA J, ÁLVAREZ J, GONZÁLEZ F, RODRÍGUEZ Y. 2006. Citotoxicidad de 1-O-decilglicerol y 1-O-dedecilglicerol sintéticos sobre carcinoma humano de mama MCF-7. *Acta Farm. Bonaerense*. 25(3):339-343.
- REINA E, PUENTES C, ROJAS J, GARCÍA J, RAMOS F, CASTELLANOS L, ARAGÓN M, OSPINA L. 2011. Fuscocide E: a strong anti-inflammatory diterpene from Caribbean octocoral *Eunicea fusca*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21(19):5888-5891.
- TORRES-DOMÍNGUEZ A, TORO-GARCÍA G, VALDÉS-RODRÍGUEZ Y, LEÓN J, MERCHÁN F. 2005. Efecto *in vitro* de los 1-O-alkilgliceroles sintéticos en la falciformación y en la hemólisis de los eritrocitos SS. *Bioquímica*. 30(4):101-109.
- WEI X, RODRÍGUEZ A, BARAN P, RAPTIS R, SÁNCHEZ J, ORTEGA-BARRIA E, GONZÁLEZ J. 2004. Antiplasmodial cembradiene diterpenoids from a Southwestern Caribbean gorgonian octocoral of the genus *Eunicea*. *Tetrahedron*. 60(51):11813-11819.