

## IDENTIFICACIÓN DE ALGUNOS METABOLITOS SECUNDARIOS DEL EXTRACTO EN ACETATO DE ETILO DE *Muricea* sp.

### IDENTIFICATION OF SOME SECONDARY METABOLITES FROM THE ETHYL- ACETATE-EXTRACT OF THE OCTOCORAL, *Muricea* sp.

ÁNGEL CAMACHO<sup>1</sup>, HAYDELBA D'ARMAS<sup>2</sup>, GABRIEL ORDAZ<sup>2</sup>, SHAILILI MORENO<sup>2</sup>,  
JUAN HERNÁNDEZ<sup>3</sup>, DAYANIS YAÑEZ<sup>1</sup>

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

#### RESUMEN

Del extracto en acetato de etilo de una especie no identificada de octocoral del género *Muricea*, se obtuvieron fracciones cromatográficas que mostraron actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Citrobacter freundii*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*, lo que indica la presencia de constituyentes bioactivos en las mismas. El análisis por CG/EM de algunas fracciones obtenidas mediante separación cromatográfica continua, permitió identificar los constituyentes: (Z)-9-octadecenoato de metilo, octadecanoato de metilo, 4-etoxi-1-metil- $\delta$ (3)-pirrolin-2-ona, endo-1-bourbonanol, dibutilftalato, 4,5-epoxi-1-isopropil-4-metilciclohexeno, 3,6-epoxi-2,2,6-trimetilciclohexanocarboxilato de etilo, (E)-2,6-dimetil-2,6-octadieno, farnesol, colest-5,22-dien-3 $\beta$ -ol, colesterol, (3 $\beta$ ,22E,24S)-ergosta-5,22-dien-3-ol, 3-hidroxi-longifolol, por comparación con las bases de datos WILEY y NIST y el estudio de los patrones de fragmentación de sus espectros de masas.

**PALABRAS CLAVE:** Octocoral, actividad antibacteriana, CG/EM, terpenoides, colestanos.

#### ABSTRACT

Some chromatographic fractions obtained from the ethyl-acetate-extract of the unidentified octocoral species of the genus *Muricea*, showed antibacterial activity against *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Citrobacter freundii*, *Staphylococcus aureus*, and *Bacillus subtilis*, which indicates the presence of bioactive compounds in it. The GC/MS analysis of some fractions obtained by continuous chromatographic separation, allowed identification of metabolites, such that: (Z)-9-octadecenoic acid methyl ester, octadecenoic acid methyl ester, 1-methyl-4-ethoxy- $\delta$ (3)-pyrrolin-2-one, endo-1-bourbonanol, dibutylphtalate, 4,5-epoxy-1-isopropyl-4-methyl-1-cyclohexene, 1,3,3-trimethyl-7-oxabicyclo[2.2.1]heptane-2-carboxylic acid ethyl ester, 2,6-dimethyl-2-trans-6-octadiene, farnesol, 3 $\beta$ -cholesta-5,22-dien-3-ol, cholesterol, (3 $\beta$ ,22E,24S)-ergosta-5,22-dien-3-ol, (3 $\beta$ ,5 $\alpha$ )-2-methylenecholestan-3-ol, 3-hidroxi-longifolol, by comparison with the WILEY and NIST databases and the study of the fragmentation patterns of their mass spectra.

**KEY WORDS:** Soft corals, antibacterial activity, GC/MS, terpenoids, cholestanes.

#### INTRODUCCIÓN

Los octocorales del género *Muricea* (orden Gorgonacea, familia Gorgoniidae), a pesar de ser un componente importante de la fauna invertebrada marina de las Indias occidentales (Romero y Rada 1999, Guzmán *et al.* 2004, Sánchez *et al.* 2011, Abeytia *et al.* 2013), no han sido objeto de un abundante acercamiento quimiotaconómico. Algunas investigaciones, sin embargo, muestran que este género Gorgonio puede ser una fuente de metabolitos secundarios con estructuras únicas y propiedades farmacodinámicas importantes (Rodríguez 1995, Ortega *et al.* 2002, Murillo-Álvarez y Encarnación-Dimayuga 2003, Gutiérrez *et al.* 2006, Lorenzo *et al.* 2006).

El presente trabajo informa sobre algunos metabolitos secundarios identificados mediante CG/EM presentes en el extracto en acetato de etilo del octocoral *Muricea* sp., así como las propiedades antibacterianas de algunas

fracciones, como un aporte a la quimiotaconomía de este género Gorgonio en latitudes venezolanas.

#### MATERIALES Y MÉTODOS

##### Recolección

Las muestras de *Muricea* sp., fueron obtenidas del Golfo de Cariaco, estado Sucre, Venezuela (10°30' -10°32' N y 64°12' -64°13' W). 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

Las muestras del octocoral, fueron lavadas con abundante agua destilada, troceado y sometido a extracción con metanol puro (99,9%) por espacio de 96 h y luego por 120 h. El extracto crudo en metanol se

obtuvo por concentración a presión reducida (aprox. 11 mbar) en un rotaevaporador Hidolph. Una suspensión del extracto en una solución acuosa de metanol al 90% fue desgrasada con éter de petróleo puro (grado analítico) y luego se sometió a extracción con acetato de etilo. La fase en acetato de etilo fue secada con sulfato de sodio anhidro, filtrada y evaporada a presión reducida para obtener la fracción soluble en este solvente (FA).

### Fracionamiento cromatográfico

La FA (8,12 g), fue particionada mediante cromatografía de 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 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. Se recolectaron 95 eluatos de aproximadamente 50 mL cada uno, los cuales fueron analizados 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 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 5%, agrupándose en 18 fracciones identificadas con las letras A hasta la Q (8,06 g; 99,26%). Con base en el análisis por CCF y los rendimientos obtenidos de las fracciones, se seleccionaron A (0,3411 g; 4,20%), C (0,3251 g; 4,00%), E (0,1873 g; 2,31%) y J (0,2937 g; 3,62%) para ser particionadas sucesivamente mediante CC (sílica gel 35-70 mesh) y CCF preparativa (sílica gel 10-40 µ, 1 mm de espesor).

### Actividad antibacteriana

Los principios antibacterianos se detectaron utilizando cepas pertenecientes al Centro Venezolano de Colección de Microorganismos de *Bacillus subtilis* (CVCM438), *Citrobacter freundii* (CVCM924), *Staphylococcus aureus* (CVCM48), *Escherichia coli* (CVCM39), *Salmonella enteritidis* (CVCM497) y *Pseudomonas aeruginosa* (CVCM625) sembradas en agar Müller-Hinton a 37°C con hisopo estéril a partir de suspensiones microbianas de concentración conocida (10<sup>8</sup> células·mL<sup>-1</sup>). La acción antibacteriana se evidenció midiendo el diámetro (mm) del halo de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor de los discos impregnados con la fracción a probar (40 mg·mL<sup>-1</sup>) (Bauer *et al.* 1966).

### Caracterización

Las fracciones obtenidas de *Muricea* sp.,

previamente disueltas en cloroformo, se inyectaron en un cromatógrafo de gases marca Hewlett-Packard modelo 5890, serie II, con inyector de tipo *Split-Splitless*, el cual estaba acoplado con un espectrómetro de masas de la misma marca modelo 5971 A, con fuente de ionización por impacto electrónico de 70 eV. La temperatura del inyector fue de 280°C. Se utilizó una columna de metil-silicona de 25 m × 0,18 D.I × 0,18 mm de espesor y helio como gas de arrastre. La temperatura inicial del horno fue de 70°C con una rampa de 10°C/min hasta llegar a 300°C. La identificación de los metabolitos secundarios se realizó por comparación computarizada con las librerías WILEY y NIST.

## RESULTADOS

En la partición inicial del extracto crudo en metanol (25,6 g), se lograron solubilizar 8,12 g (32,98%) en acetato de etilo (FA). Los resultados de algunos ensayos químicos y de bioactividad realizado a estos extractos han sido informados previamente (Ordaz *et al.* 2010).

### Actividad antibacteriana de las fracciones

Las fracciones C y J, mostraron actividad bactericida leve contra todos los microorganismos empleados, presentando halos de inhibición entre 7 y 10 mm de diámetro (Tabla 1). La bacteria *C. freundii*, fue el único microorganismo sensible a todas las fracciones ensayadas (A, C, E, y J), las cuales mostraron halos de inhibición bactericida leve entre 9 y 11 mm de diámetro (Tabla 1). La fracción A también mostró inhibición bactericida frente a *B. subtilis* (7 mm), mientras que la fracción E también inhibió el crecimiento de *E. coli* (6 mm) (Tabla 1).

Tabla 1. Actividad antibacteriana mostrada por algunas fracciones cromatográficas del extracto soluble en acetato de etilo de *Muricea* sp.

Bacterias	Diámetro del halo de inhibición <sup>a,b</sup> (mm)			
	A	C	E	J
<i>Staphylococcus aureus</i>	(-)	7	(-)	9
<i>Escherichia coli</i>	(-)	8	6	8
<i>Bacillus subtilis</i>	7	8	(-)	8
<i>Citrobacter freundii</i>	9	10	11	10
<i>Salmonella enteritidis</i>	(-)	9	(-)	9

<sup>a</sup>Medido sobre discos de 5 mm de diámetro; <sup>b</sup>Bactericida; (-): Inactivo

### Análisis de la fracción A

La fracción A (0,3411 g) fue particionada mediante CC con mezclas de hexano-cloroformo, obteniéndose 9 fracciones (A1 a A9; 99,91%), de las cuales A1 (0,0336 g) fue fraccionada por CC con mezclas de hexano-diclorometano en 8 nuevas fracciones (A1.1 a A1.8; 95,10%). La fracción A1.1 (0,0213 g, sólido blanco) fue purificada en una placa preparativa en una mezcla hexano-cloroformo (8:2), recuperándose 0,0081 g de un posible compuesto puro ( $R_f$  0,63). Sin embargo, el análisis por CG/EM reveló que se trataba de una mezcla de compuestos estructuralmente semejantes. La Figura 1, muestra el cromatograma para esta fracción con dos señales que se corresponden con los compuestos (**Z**)-9-octadecenoato de metilo ( $T_r = 20,949$  min;  $m/z = 269$  [M]<sup>+</sup>, 264 [M-CH<sub>4</sub>O]<sup>+</sup>, 253 [M-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>]<sup>+</sup>, 235

[M-C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O]<sup>+</sup>, 222 [M-C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 207 [M-C<sub>5</sub>H<sub>13</sub>O]<sup>+</sup>, 194 [M-C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 180 [M-C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 169 [M-C<sub>9</sub>H<sub>19</sub>]<sup>+</sup>, 166 [M-C<sub>7</sub>H<sub>14</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 152 [M-C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 137 [M-C<sub>9</sub>H<sub>19</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 123 [M-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 115 [M-C<sub>13</sub>H<sub>25</sub>]<sup>+</sup>, 110 [M-C<sub>11</sub>H<sub>22</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 97 [M-C<sub>12</sub>H<sub>23</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 87 [M-C<sub>15</sub>H<sub>29</sub>]<sup>+</sup>, 83 [M-C<sub>13</sub>H<sub>25</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 69 [M-C<sub>14</sub>H<sub>27</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 57 [M-C<sub>15</sub>H<sub>27</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 55 [M-C<sub>15</sub>H<sub>29</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup> (PB), 41 [M-C<sub>16</sub>H<sub>31</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>) y **octadecanoato de metilo** ( $T_r = 21,176$  min;  $m/z = 298$  [M]<sup>+</sup>, 267 [M-CH<sub>3</sub>O]<sup>+</sup>, 255 [M-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>]<sup>+</sup>, 241 [M-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>]<sup>+</sup>, 227 [M-C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>]<sup>+</sup>, 224 [M-C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 213 [M-C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>]<sup>+</sup>, 199 [M-C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>]<sup>+</sup>, 185 [M-C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>]<sup>+</sup>, 171 [M-C<sub>9</sub>H<sub>19</sub>]<sup>+</sup>, 167 [M-C<sub>8</sub>H<sub>19</sub>O]<sup>+</sup>, 157 [M-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>]<sup>+</sup>, 143 [M-C<sub>11</sub>H<sub>23</sub>]<sup>+</sup>, 139 [M-C<sub>10</sub>H<sub>23</sub>O]<sup>+</sup>, 129 [M-C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>]<sup>+</sup>, 115 [M-C<sub>13</sub>H<sub>27</sub>]<sup>+</sup>, 111 [M-C<sub>12</sub>H<sub>27</sub>O]<sup>+</sup>, 97 [M-C<sub>13</sub>H<sub>29</sub>O]<sup>+</sup>, 87 [M-C<sub>15</sub>H<sub>31</sub>]<sup>+</sup>, 83 [M-C<sub>14</sub>H<sub>31</sub>O]<sup>+</sup>, 74 [M-C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>]<sup>+</sup> (PB), 57 [M-C<sub>15</sub>H<sub>29</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 55 [M-C<sub>16</sub>H<sub>35</sub>O]<sup>+</sup>, 43 [M-C<sub>16</sub>H<sub>31</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>).

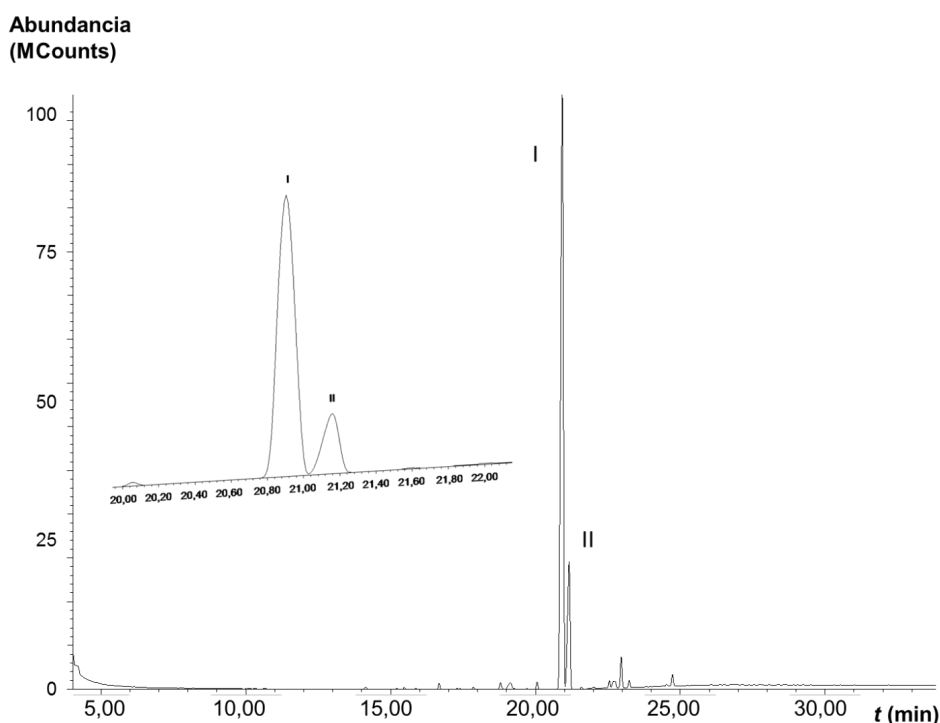


Figura 1. Cromatograma de la fracción A1.1, indicando los picos correspondientes a los metabolitos mayoritarios identificados (I: (**Z**)-9-octadecenoato de metilo; II: octadecanoato de metilo).

### Análisis de la fracción C

La fracción C (0,3251 g) fue particionada mediante CC con mezclas de hexano-acetato de etilo, obteniéndose 13 fracciones (C1 a C13; 97,72%), de las cuales C4 (0,1060 g) fue fraccionada por CC con mezclas de hexano-acetato de etilo en 8 nuevas fracciones (C4.1 a C4.8; 95,10%). De estas, la fracción C4.3 (0,0759 g) se fraccionó mediante CC con mezclas de hexano-

cloroformo en 10 nuevas fracciones (C4.3.1 a C4.3.10; 98,16%). De acuerdo a la separación observada en el análisis por CCF, se seleccionó C4.3.6 (0,0038 g, sólido blanco) para el análisis por CG/EM.

El cromatograma obtenido para esta fracción (Fig. 2), muestra 5 constituyentes identificados como: **4-etoxi-1-metil-δ(3)-pirrolin-2-ona** ( $T_r = 13,941$  min;  $m/z =$

141 [M]<sup>+</sup> (PB), 127 [M-CH<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 125 [M-CH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>, 112 [M-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>]<sup>+</sup>, 109 [M-CH<sub>3</sub>O]<sup>+</sup>, 97 [M-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O]<sup>+</sup>, 83 [M-C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>N]<sup>+</sup>, 81 [M-C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O]<sup>+</sup>, 67 [M-C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>NO]<sup>+</sup>, 65 [M-C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 59 [M-C<sub>5</sub>H<sub>6</sub>O]<sup>+</sup>, 54 [M-C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 50 [M-C<sub>3</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 41 [M-C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>NO]<sup>+</sup>, 39 [M-C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>NO<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, **endo-1-bourbonanol** ( $T_r = 18,179$  min;  $m/z = 222$  [M]<sup>+</sup>, 206 [M-CH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>, 191 [M-CH<sub>3</sub>O]<sup>+</sup>, 177 [M-C<sub>3</sub>H<sub>9</sub>]<sup>+</sup>, 166 [M-C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>]<sup>+</sup>, 161 [M-C<sub>3</sub>H<sub>9</sub>O]<sup>+</sup>, 153 [M-C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>]<sup>+</sup>, 145 [M-C<sub>4</sub>H<sub>13</sub>O]<sup>+</sup>, 137 [M-C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>]<sup>+</sup>, 133 [M-C<sub>5</sub>H<sub>13</sub>O]<sup>+</sup>, 123 [M-C<sub>7</sub>H<sub>11</sub>O]<sup>+</sup>, 121 [M-C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>O]<sup>+</sup>, 109 [M-C<sub>7</sub>H<sub>13</sub>O]<sup>+</sup>, 107 [M-C<sub>6</sub>H<sub>15</sub>O]<sup>+</sup>, 95 [M-C<sub>8</sub>H<sub>15</sub>O]<sup>+</sup>, 93 [M-C<sub>8</sub>H<sub>19</sub>O]<sup>+</sup>, 81 [M-C<sub>9</sub>H<sub>15</sub>O]<sup>+</sup> (PB), 79 [M-C<sub>9</sub>H<sub>19</sub>O]<sup>+</sup>, 67 [M-C<sub>10</sub>H<sub>19</sub>O]<sup>+</sup>, 63 [M-C<sub>10</sub>H<sub>23</sub>O]<sup>+</sup>, 55 [M-C<sub>11</sub>H<sub>19</sub>O]<sup>+</sup>, 50 [M-C<sub>11</sub>H<sub>24</sub>O]<sup>+</sup>, 41 [M-C<sub>12</sub>H<sub>21</sub>O]<sup>+</sup>), **dibutilftalato** ( $T_r = 19,540$  min;  $m/z = 278$  [M]<sup>+</sup>, 235 [M-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>]<sup>+</sup>, 223 [M-C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>]<sup>+</sup>, 205 [M-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>O]<sup>+</sup>, 193 [M-C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>]<sup>+</sup>, 177 [M-C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 167 [M-C<sub>7</sub>H<sub>11</sub>O]<sup>+</sup>, 151 [M-C<sub>7</sub>H<sub>11</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 149 [M-C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>O]<sup>+</sup>

(PB), 135 [M-C<sub>8</sub>H<sub>15</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 132 [M-C<sub>8</sub>H<sub>18</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 121 [M-C<sub>9</sub>H<sub>17</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 107 [M-C<sub>10</sub>H<sub>19</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 104 [M-C<sub>9</sub>H<sub>18</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, 93 [M-C<sub>10</sub>H<sub>17</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, 83 [M-C<sub>12</sub>H<sub>19</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 76 [M-C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>O<sub>4</sub>]<sup>+</sup>, 65 [M-C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>O<sub>4</sub>]<sup>+</sup>, 57 [M-C<sub>12</sub>H<sub>13</sub>O<sub>4</sub>]<sup>+</sup>, 50 [M-C<sub>12</sub>H<sub>20</sub>O<sub>4</sub>]<sup>+</sup>, 41 [M-C<sub>14</sub>H<sub>21</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup>), **4,5-epoxi-1-isopropil-4-metilciclohexeno** ( $T_r = 22,974$  min;  $m/z = 152$  [M]<sup>+</sup>, 137 [M-CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, 121 [M-CH<sub>3</sub>O]<sup>+</sup>, 119 [M-CH<sub>5</sub>O]<sup>+</sup>, 109 [M-C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O]<sup>+</sup> (PB), 93 [M-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>O]<sup>+</sup>, 81 [M-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>O]<sup>+</sup>, 79 [M-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>O]<sup>+</sup>, 69 [M-C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>O]<sup>+</sup>, 55 [M-C<sub>6</sub>H<sub>9</sub>O]<sup>+</sup>, 43 [M-C<sub>7</sub>H<sub>9</sub>O]<sup>+</sup>, 39 [M-C<sub>7</sub>H<sub>13</sub>O]<sup>+</sup>) y **3,6-epoxi-2,2,6-trimetilciclohexanocarboxilato de etilo** ( $T_r = 23,274$  min;  $m/z = 211$  [M-1]<sup>+</sup>, 197 [M-CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, 183 [M-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>]<sup>+</sup>, 167 [M-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>O]<sup>+</sup>, 153 [M-C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>]<sup>+</sup>, 137 [M-C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>O]<sup>+</sup>, 123 [M-C<sub>3</sub>H<sub>3</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, 110 [M-C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 97 [M-C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 95 [M-C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, 83 [M-C<sub>7</sub>H<sub>14</sub>O]<sup>+</sup>, 69 [M-C<sub>8</sub>H<sub>15</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 67 [M-C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 55 [M-C<sub>8</sub>H<sub>13</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (PB), 43 [M-C<sub>10</sub>H<sub>17</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>).

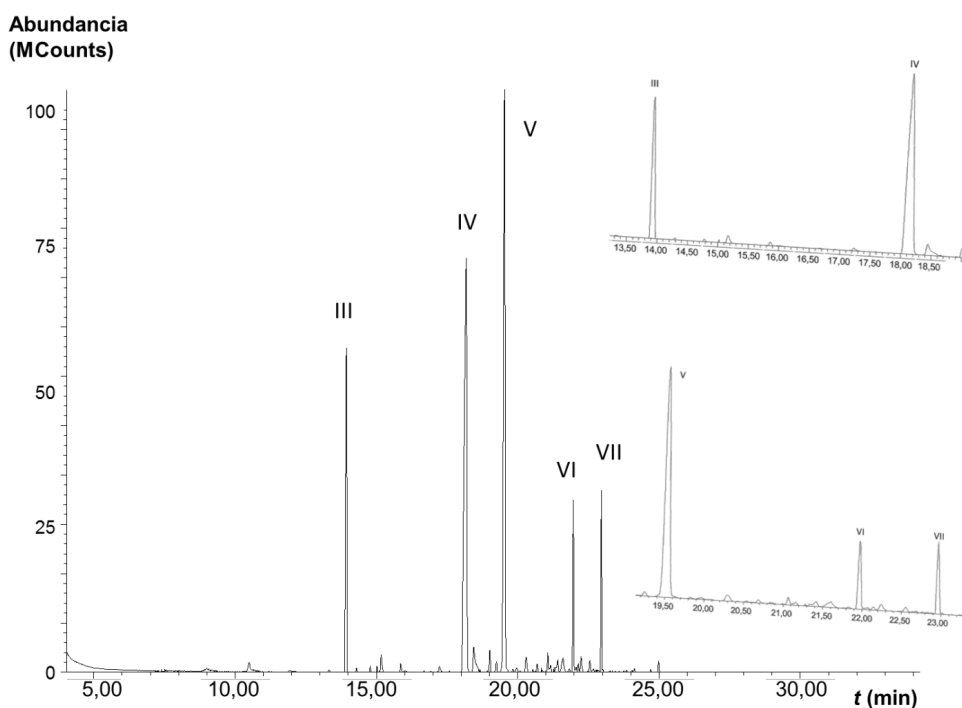


Figura 2. Cromatograma de la fracción C4.3.6, indicando los picos correspondientes a los metabolitos mayoritarios identificados (III: 4-etoxi-1-metil- $\delta$ (3)-pirrolin-2-ona; IV: endo-1-bourbonanol; V: dibutilftalato; VI: 4,5-epoxi-1-isopropil-4-metilciclohexeno; VII: 3,6-epoxi-2,2,6-trimetilciclohexanocarboxilato de etilo).

### Análisis de la fracción E

La fracción E (0,1823 g) fue particionada mediante CC con mezclas de hexano-acetato de etilo y acetato de etilo-acetona, obteniéndose 8 fracciones (E1 a E8; 99,29%), de las cuales E5 (0,0588 g) se fraccionó mediante CC con mezclas de hexano-acetato de etilo en 8 nuevas fracciones (E5.1 a E5.8; 92,52%). De éstas,

se seleccionó E5.4 para el análisis por CG/EM, cuyo cromatograma (Fig. 3) muestra cinco constituyentes mayoritarios identificados como (**E**)-2,6-dimetil-2,6-octadieno ( $T_r = 24,039$ min;  $m/z = 139$  [M+1]<sup>+</sup>, 123 [M-CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, 97 [M-C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>]<sup>+</sup>, 83 [M-C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>]<sup>+</sup>, 69 [M-C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>]<sup>+</sup>, 55 [M-C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>]<sup>+</sup>, 41 [M-C<sub>7</sub>H<sub>13</sub>]<sup>+</sup>), **farnesol** ( $T_r = 24,169$ min;  $m/z = 222$  [M]<sup>+</sup>, 207 [M-CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, 189 [M-CH<sub>5</sub>O]<sup>+</sup>, 175 [M-C<sub>2</sub>H<sub>7</sub>O]<sup>+</sup>, 161 [M-C<sub>3</sub>H<sub>9</sub>O]<sup>+</sup>, 139 [M-C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>]<sup>+</sup>, 135

$[M-C_4H_8O]^+$ , 123  $[M-C_6H_{10}O]^+$ , 97  $[M-C_8H_{13}O]^+$ , 83  $[M-C_9H_{15}O]^+$ , 69  $[M-C_{10}H_{17}O]^+$  (PB), 55  $[M-C_{11}H_{19}O]^+$ , 41  $[M-C_{12}H_{21}O]^+$ , **3 $\beta$ -colesta-5,22-dien-3-ol** ( $T_r = 32,739\text{min}$ ;  $m/z = 384 [M]^+$ , 351  $[M-CH_5O]^+$ , 300  $[M-C_5H_8O]^+$ , 281  $[M-C_5H_{12}O]^+$ , 271  $[M-C_7H_{13}O]^+$ , 255  $[M-C_8H_{17}O]^+$ , 213  $[M-C_{11}H_{23}O]^+$ , 207  $[M-C_{12}H_{17}O]^+$ , 199  $[M-C_{12}H_{25}O]^+$ , 173  $[M-C_{14}H_{27}O]^+$ , 159  $[M-C_{15}H_{29}O]^+$ , 145  $[M-C_{16}H_{31}O]^+$ , 133  $[M-C_{17}H_{33}O]^+$ , 119  $[M-C_{18}H_{35}O]^+$ , 111  $[M-C_{19}H_{39}O]^+$ , 95  $[M-C_{20}H_{33}O]^+$ , 81  $[M-C_{21}H_{35}O]^+$ , 69  $[M-C_{23}H_{39}O]^+$ , 55  $[M-C_{23}H_{37}O]^+$  (PB), 43  $[M-C_{24}H_{37}O]^+$ , 41  $[M-C_{24}H_{39}O]^+$ ), **colesterol** ( $T_r = 33,688\text{min}$ ;  $m/z = 386 [M]^+$ , 368  $[M-H_2O]^+$ , 353  $[M-CH_5O]^+$ , 326  $[M-C_3H_8O]^+$ , 301  $[M-C_6H_{13}]^+$ , 275  $[M-C_7H_{11}O]^+$ , 273  $[M-C_8H_{17}O]^+$ , 255  $[M-C_8H_{19}O]^+$ , 247  $[M-C_9H_{15}O]^+$ , 231  $[M-C_{11}H_{23}]^+$ , 213  $[M-C_{11}H_{25}O]^+$ , 207

$[M-C_{12}H_{19}O]^+$ , 199  $[M-C_{12}H_{27}O]^+$ , 178  $[M-C_{14}H_{24}O]^+$ , 163  $[M-C_{15}H_{27}O]^+$ , 159  $[M-C_{15}H_{31}O]^+$ , 145  $[M-C_{16}H_{33}O]^+$ , 133  $[M-C_{17}H_{33}O]^+$ , 119  $[M-C_{18}H_{35}O]^+$ , 107  $[M-C_{19}H_{35}O]^+$ , 95  $[M-C_{20}H_{35}O]^+$ , 81  $[M-C_{21}H_{37}O]^+$ , 69  $[M-C_{22}H_{37}O]^+$ , 55  $[M-C_{23}H_{39}O]^+$ , 43  $[M-C_{24}H_{39}O]^+$  (PB), 39  $[M-C_{24}H_{43}O]^+$ ), **24(S)-methylcholesta-5,22(E)-dien-3 $\beta$ -ol** ( $T_r = 34,658\text{min}$ ;  $m/z = 398 [M]^+$ , 337  $[M-C_3H_9O]^+$ , 300  $[M-C_7H_{14}]^+$ , 285  $[M-C_7H_{13}O]^+$ , 271  $[M-C_8H_{15}O]^+$ , 267  $[M-C_8H_{19}O]^+$ , 255  $[M-C_9H_{19}O]^+$ , 229  $[M-C_{11}H_{21}O]^+$ , 207  $[M-C_{13}H_{19}O]^+$ , 199  $[M-C_{13}H_{27}O]^+$ , 187  $[M-C_{14}H_{27}O]^+$ , 173  $[M-C_{15}H_{29}O]^+$ , 159  $[M-C_{16}H_{31}O]^+$ , 145  $[M-C_{17}H_{33}O]^+$ , 133  $[M-C_{18}H_{33}O]^+$ , 119  $[M-C_{19}H_{35}O]^+$ , 109  $[M-C_{20}H_{33}O]^+$ , 95  $[M-C_{21}H_{35}O]^+$ , 81  $[M-C_{22}H_{37}O]^+$ , 69  $[M-C_{23}H_{37}O]^+$  (PB), 55  $[M-C_{24}H_{39}O]^+$ , 43  $[M-C_{25}H_{39}O]^+$ , 41  $[M-C_{25}H_{41}O]^+$ ).

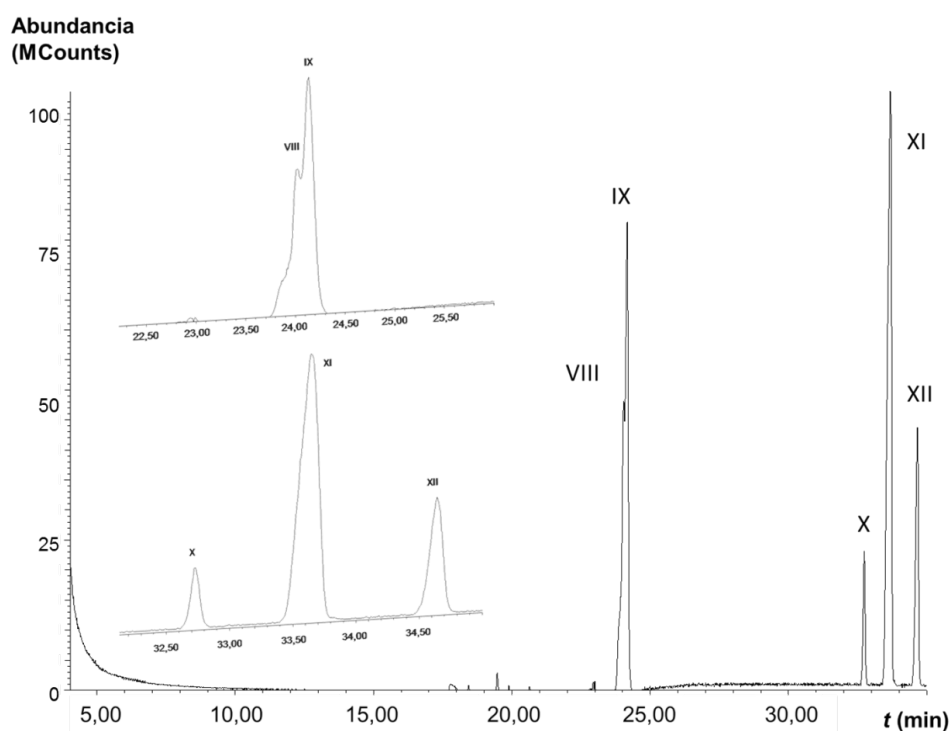


Figura 3. Cromatograma de la fracción E5.4, indicando los picos correspondientes a los metabolitos mayoritarios identificados. (VIII: (E)-2,6-dimetil-2,6-octadieno; IX: farnesol; X: 3 $\beta$ -colesta-5,22-dien-3-ol; XI: colesterol; XII: 24(S)-metilcholesta-5,22(E)-dien-3 $\beta$ -ol).

### Análisis de la fracción J

La fracción J (0,2937 g) fue particionada mediante CC con mezclas de hexano-acetona, obteniéndose 10 fracciones (J1 a J10; 99,24%). La fracción J3 (0,0591 g) fue fraccionada por CC con mezclas de hexano-acetona en 4 nuevas fracciones (J3.1 a J3.4; 99,15%), de la cuales J3.2 (0,0468 g), fue purificada en una placa preparativa en una mezcla hexano-acetona (1:1), recuperándose 0,0260 g de un sólido blanco posiblemente puro ( $R_f$ , 0,79). Sin embargo, el análisis por CG/EM para esta fracción, reveló

que se trataba de una mezcla de dos compuestos como se muestra en el cromatograma de la Figura 4, cuyos picos se identificaron como: **(3 $\beta$ , 5 $\alpha$ )-2-metilcolestan-3-ol** ( $T_r = 18,788\text{ min}$ ;  $m/z = 400 [M]^+$ , 107  $[M-C_{20}H_{37}O]^+$ , 95  $[M-C_{21}H_{37}O]^+$ , 83  $[M-C_{22}H_{37}O]^+$ , 69  $[M-C_{23}H_{39}O]^+$ , 55  $[M-C_{24}H_{41}O]^+$ , 43  $[M-C_{25}H_{41}O]^+$  (PB), 41  $[M-C_{25}H_{43}O]^+$ ) y **3-hidroxi-longifolol** ( $T_r = 24,045\text{ min}$ ;  $m/z = 238 [M]^+$ , 207  $[M-CH_3O]^+$ , 133  $[M-C_5H_{13}O_2]^+$ , 117  $[M-C_6H_{17}O_2]^+$ , 107  $[M-C_7H_{15}O_2]^+$ , 91  $[M-C_8H_{19}O_2]^+$ , 83  $[M-C_9H_{15}O_2]^+$ , 73  $[M-C_{12}H_{21}]^+$ , 69  $[M-C_{10}H_{17}O_2]^+$ , 55  $[M-C_{11}H_{19}O_2]^+$  (PB), 43  $[M-C_{13}H_{23}O]^+$ ).

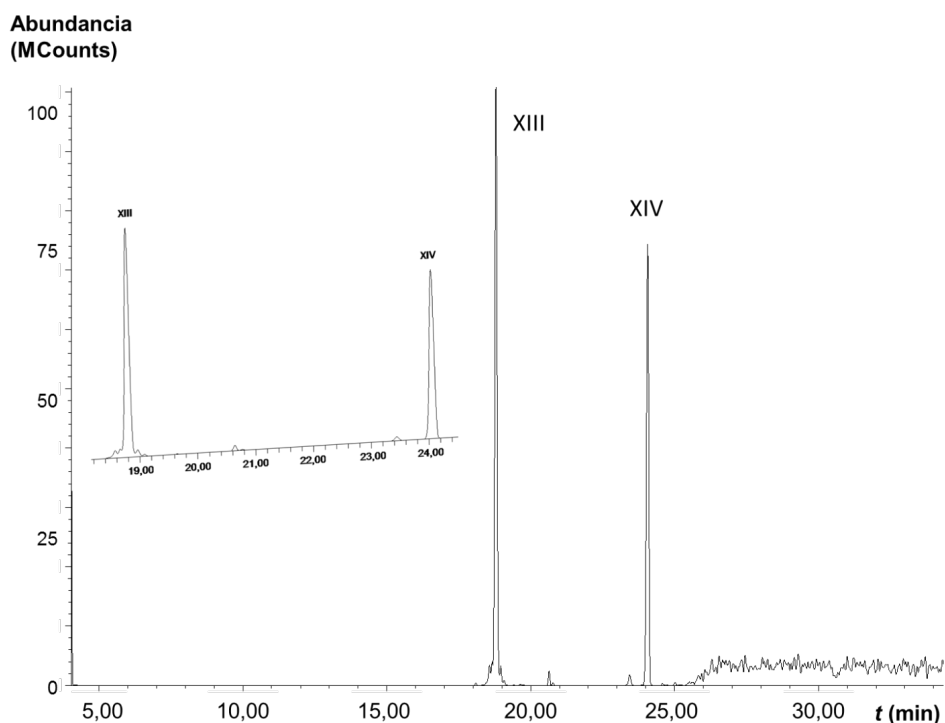


Figura 4. Cromatograma de la fracción J3.2, indicando los picos correspondientes a los metabolitos mayoritarios identificados. (XIII: (3 $\beta$ , 5 $\alpha$ )-2-metilencolestan-3-ol; XIV: 3-hidroxi-longifolol).

## DISCUSIÓN

Los resultados de los ensayos antibacterianos realizados a las fracciones A, C, E y J (Tabla 1), muestran que el octocoral *Muricea* sp., puede ser una fuente importante de metabolitos secundarios con propiedades bioactivas. La actividad antibacteriana leve mostrada frente a los organismos empleados, que no superó diámetros de 11 mm, puede estar relacionada con bajas concentraciones de los constituyentes fisiológicamente activos en estas fracciones. La actividad de algunas fracciones del extracto lipídico de este género *Gorgonia* ha sido informada previamente (Camacho *et al.* 2011).

De los metabolitos identificados mediante CG/EM, los compuestos I (20,95 min) y II (21,18 min) registrados en el cromatograma de la fracción A1.1 (Fig. 1), desplegaron iones moleculares a  $m/z$  296 y 298 en sus respectivos espectros de masa, los cuales se correlacionan con las fórmulas  $C_{19}H_{36}O_2$  (calculado 296,49 g·mol<sup>-1</sup>) y  $C_{19}H_{38}O_2$  (calculado 298,51 g·mol<sup>-1</sup>) de los ésteres metílicos del ácido (*Z*)-9-octadecenoico y del ácido octadecanoico, respectivamente. Las demás señales observadas en cada caso se corresponden con la desintegración de estos ésteres metílicos de cadena lineal. Algunos ácidos y ésteres metílicos de cadena lineal han sido informados también en fracciones del

extracto poco polar de *Eunicea* sp. (Ordaz *et al.* 2009, Ordaz *et al.* 2013), por lo que dichos constituyentes lipídicos pueden cumplir una función importante en los procesos bioquímicos y ecológicos de los octocorales y otros organismos marinos.

El compuesto III (13,94 min), señalado en el cromatograma de la fracción C4.3.6 (Fig. 2), desplegó un ion molecular a  $m/z$  141 en su espectro de masas, que se correlaciona con la fórmula  $C_7H_{11}NO_2$  (calculado 141,17 g·mol<sup>-1</sup>) del 4-etoxi-1-metil- $\delta$ (3)-pirrolin-2-ona, un derivado nitrogenado de estructura molecular relativamente estable debido a que el ion molecular y el pico base corresponden a la misma señal  $m/z$ . El compuesto IV (18,18 min), mostró en su espectro de masas un ion molecular a  $m/z$  222, el cual se corresponde con la fórmula molecular  $C_{15}H_{26}O$  (calculado 222,37 g·mol<sup>-1</sup>) del derivado sesquiterpenoide endo-1-bourbanol. El espectro de masas del compuesto V (19,54 min), reveló un ion molecular a  $m/z$  278, correlacionado con la fórmula  $C_{16}H_{22}O_4$  (calculado 278,35 g·mol<sup>-1</sup>) del dibutilftalato. Los compuestos VI (22,97 min) y VII (23,27 min), desplegaron en sus respectivos espectros de masa iones moleculares a  $m/z$  152 y 211, los cuales se corresponden con las fórmulas  $C_{10}H_{16}O$  (calculado 152,24g·mol<sup>-1</sup>) y  $C_{12}H_{20}O_3$  (calculado 212,29g·mol<sup>-1</sup>) de los derivados oxigenados de monoterpenos 4,5-epoxi-

1-isopropil-4-metilciclohexeno y 3,6-epoxi-2,2,6-trimetilciclohexanocarboxilato de etilo, respectivamente. La presencia de derivados nitrogenados sugiere que este organismo puede biosintetizar compuestos alcaloidales como los informados para *Muricea austera* (Gutiérrez *et al.* 2006). La biosíntesis de constituyentes de tipo mono y sesquiterpenoides es muy común en octocorales (Rodríguez 1995, Changyun *et al.* 2008, Lu *et al.* 2011), mucho de los cuales presentan propiedades farmacodinámicas importantes. La identificación del dibutilftalato y otros alquilftalatos como metabolitos secundarios no es muy aceptada, atribuyéndose al proceso de extracción y purificación (Bhakuni y Rawat 2005), sin embargo, algunos autores sugieren que sí pueden ser biosintetizados (Namikoshi *et al.* 2006).

Del cromatograma de la fracción E5.4, los constituyentes VIII (24,04 min) y IX (24,17 min), corresponden a derivados isoprenoides C10 y C15 que desplegaron iones moleculares a  $m/z$  139 y 222 en sus respectivos espectros de masas, los cuales se correlacionan con las fórmulas  $C_{10}H_{18}$  (calculado 138,25  $g \cdot mol^{-1}$ ) y  $C_{15}H_{26}O$  (calculado 222,37  $g \cdot mol^{-1}$ ) de (*E*)-2,6-dimetil-2,6-octadieno y farnesol (3,7,11-trimetil-2,6,10-dodecatrien-1-ol), respectivamente. Los constituyentes X (32,74 min), XI (33,69 min) y XII (34,66 min), identificados también en esta fracción, corresponden a estructuras esteroidales tipo colestano y ergostano que mostraron iones moleculares a  $m/z$  384, 386 y 398 en sus respectivos espectros de masas, correlacionados con las fórmulas  $C_{27}H_{44}O$  (calculado 384,64  $g \cdot mol^{-1}$ ),  $C_{27}H_{46}O$  (calculado 386,66  $g \cdot mol^{-1}$ ) y  $C_{28}H_{46}O$  (calculado 398,67  $g \cdot mol^{-1}$ ) del 3 $\beta$ -colesta-5,22-dien-3-ol, colesterol (3 $\beta$ -colest-5-en-3-ol) y (3 $\beta$ ,22*E*,24*S*)-ergosta-5,22-dien-3-ol (o 24(*S*)-metilcolesta-5,22(*E*)-dien-3 $\beta$ -ol), respectivamente. Estos tres esteroides de núcleo  $\Delta^5$ , también han sido identificados en una fracción de *Eunicea laciniata* que resultó activa frente a algunas bacterias marinas (Cuadrado *et al.* 2010), mientras que otros terpenoides esteroidales han sido informados en una variedad de octocorales (Lorenzo *et al.* 2006, D'Armas *et al.* 2008, Ordaz *et al.* 2009, Sarma *et al.* 2009), lo cual indica que estos constituyentes pueden ser útiles para estos organismos marinos en funciones como defensa, comunicación y procesos biológicos propios.

El constituyente XIII (18,79 min), registrado en el cromatograma de la fracción J3.2 (Fig. 4), mostró en su espectro de masas un ion molecular a  $m/z$  400, que se correlaciona con la fórmula molecular  $C_{28}H_{48}O$  (calculado 400,69  $g \cdot mol^{-1}$ ) del (3 $\beta$ , 5 $\alpha$ )-2-metilcolestano-3-ol, otro derivado esteroideal tipo colestano. El espectro de

masas del compuesto XIV (24,04 min), desplegó un ion molecular a  $m/z$  238, correspondiente a la fórmula  $C_{15}H_{26}O_2$  (calculado 238,37  $g \cdot mol^{-1}$ ) del derivado oxigenado sesquiterpenoide 3-hidroxi-longifolol (decahidro-4,8,8-trimetil-1,4-etanoazuleno-9,10-diol).

## CONCLUSIONES

La antibiosis mostrada por las fracciones A, C, E y J frente a las bacterias *S. aureus*, *B. subtilis*, *C. freundii* y *S. enteritidis* pudo ser causada, en parte, por alguno de estos constituyentes de tipo colestano y mono- y sesquiterpenoidales, identificados en las fracciones analizadas mediante CG/EM, lo que indica que la biosíntesis de este tipo de compuestos pueden ser importantes para la interacción ecológica de este género Gorgonio.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEYTHIA R, GUZMÁN H, BREEDY O. 2013. Composición de especies y distribución batimétrica de gorgonios (Anthozoa: Octocorallia) en la costa sur del Pacífico mexicano. *Rev. Biol. Trop.* 61(3):1157-1166.
- 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.
- BHAKUNI D, RAWAT D. 2005. Bioactive marine natural products. Anamaya/Springer, India, pp. 396.
- 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.
- CHANGYUN W, HAIYAN L, CHANGLUN S, YANAN W, LIANG L, HUASHI G. 2008. Chemical defensive substances of soft corals and gorgonians. *Acta Ecol. Sin.* 28(5):2320-2328.
- 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.
- D'ARMAS H, BERMÚDEZ D, MÉNDEZ, B. 2008. Aislamiento y caracterización estructural de un nuevo triterpeno del octocoral *Plexaura flexuosa* Lamoroux. *Interciencia.* 33(9):680-686.

- GUTIÉRREZ M, CAPSON T, GUZMÁN H, GONZÁLEZ J, ORTEGA-BARRÍA E, QUINOÁ E, RIGUERA R. 2006. Antiplasmodial metabolites isolated from the marine octocoral *Muricea austera*. *J. Nat. Prod.* 69(10):1379-1383.
- GUZMÁN H, GUEVARA C, BREEDY O. 2004. Distribution, diversity, and conservation of coral reefs and coral communities in the largest marine protected area of Pacific Panama (Coiba Island). *Environ. Conserv.* 31(2):111-121.
- LORENZO M, CUETO M, D'CROZ L, MATÉ J, SAN-MARTÍN A, DARIAS J. 2006. Muriceanol, a 24(28)-epoxide sterol link in the carbon flux toward side-chain dealkylation of sterols. *Eur. J. Org. Chem.* 2006(3):582-585.
- LU Y, LI P, HUNG W, SU J, WEN Z, HSU C, SHEU J. 2011. Nardosinane sesquiterpenoids from the Formosan Soft Coral *Lemnalia flava*. *J. Nat. Prod.* 74(2):169-174.
- MURILLO-ÁLVAREZ J, ENCARNACIÓN-DIMAYUGA R. 2003. New bioactive pregnadiene-derived glycosides from the Gulf of California gorgonian *Muricea cf. austera*. *Pharm. Biol.* 41(7):531-535.
- NAMIKOSHI M, FUJIWARA T, NISHIKAWA T, UKAI K. 2006. Natural abundance <sup>14</sup>C content of dibutyl phthalate (DBP) from three marine algae. *Mar. Drugs* 4(1):290-297.
- 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.
- ORDAZ G, D'ARMAS H, CAMACHO A, HERNÁNDEZ J, YAÑEZ D. 2013. Identificación mediante RMN de algunos metabolitos secundarios del coral Gorgonio *Eunicea* sp. *Saber.* 25(3):309-316.
- ORTEGA M, ZUBIA E, RODRÍGUEZ S, CARBALLO J, SALVA J. 2002. Muricenones A and B: new degraded pregnanes from a gorgonian of the genus *Muricea*. *Eur. J. Org. Chem.* 2002(19):3250-3253.
- RODRÍGUEZ A. 1995. The natural products chemistry of West Indian gorgonian octocorals. *Tetrahedron.* 51(16):4571-4618.
- ROMERO N, RADA M. 1999. Octocorales de las aguas costeras de la Isla de Margarita, estado Nueva Esparta, Venezuela. *Mem. Soc. Cienc. Nat.* 151(49):95-115.
- SÁNCHEZ J, GÓMEZ C, ESCOBAR D, DUEÑAS L. 2011. Diversidad, abundancia y amenazas de los octocorales de la isla Malpelo, Pacífico Oriental Tropical, Colombia. *Bol. Invest. Mar. Cost.* 40(Supl. Esp.):139-154.
- SARMA N, KRISHNA M, PASHA S, RAO T, VENKATESWARLU Y, PARAMESWARAN P. 2009. Marine Metabolites: The Sterols of Soft Coral. *Chem. Rev.* 109(6):2803-2828.