Evaluación de la oferta natural y potencial de producción de (+)-discodermólido y/o análogos de la esponja marina del Caribe colombiano *Discodermia dissoluta*.

Tesis de Maestría:

ANDREA KATHERINE VALDERRAMA PEREIRA

Directores

LEONARDO CASTELLANOS
Profesor asistente del Departamento de Química
SVEN ZEA
Profesor titular del Departamento de Biología

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA, FACULTAD DE CIENCIAS
2009

CONTENIDO

INTRODUCCION

JUSTIFICACION

CAPITULO I. (+)-DISCODERMÓLIDO: ANÁLOGOS, ACTIVIDAD BIOLÓGICA Y FUENTES DE SUMINISTRO

CAPITULO II. VALIDACIÓN Y EVALUACIÓN DE UNA METODOLOGÍA POR HPLC, PARA LA CUANTIFICACIÓN DEL POTENTE ANTIMITÓTICO (+)-DISCODERMÓLIDO EN LA ESPONJA MARINA *Discodermia dissoluta.*

CAPITULO III. POTENCIAL DE UN SISTEMA DE ACUICULTURA *in situ* DE LA ESPONJA DEL CARIBE COLOMBIANO *Discodermia dissoluta*: CRECIMIENTO, SUPERVIVENCIA Y COMPUESTOS BIOACTIVOS.

AGRADECIMIENTO

A Dios…
A mi mamá y a mi papá por todo lo que me han dado para que yo este aquí.
A mis hermanas (Julieth, Taty, Carla, Paula), sobrinos (Lis, Dani, Fabio, **Sofi,** Mariana y Gabi) y cuñados por su apoyo y amor.
A Leonardo Castellanos por todo…por regañarme, enseñarme y retarme, por ayudarme a ser mejor química.
Al profe Sven Zea por su orientación y apoyo.
A los profesores del grupo de PNM por su amistad y ayuda, en especial a la profesora Carmenza Duque quien es un ejemplo a seguir.
Al profe Rodolfo Quevedo por su apoyo a pesar del abandono.
A todos los integrantes del grupo "Estudio y aprovechamiento de productos naturales marinos y frutas de Colombia" - **Bando A y Bando B** (el ganador).
A mis amigos: **Andrea**, Paola, Hebelin, Liseth, Jairo, Dieguito, Javier, Mario, Leonardo, Fercho, Johan, Eduardo, Dianas, Lucho, Silvana, Manuel, Oscar, Freddy. Etc
Y a los que no eran mis amigos también !!!

MUCHAS GRACIAS

INTRODUCCIÓN

En la búsqueda de compuestos químicos con actividad biológica promisoria, que permitan solucionar problemas de la vida cotidiana, los productos naturales se han considerado como una fuente importante de éstos aún desde tiempos inmemorables, en especial los obtenidos a partir de plantas. En los últimos cincuenta años se han venido estudiando los productos naturales de origen marino, debido no sólo a la enorme diversidad biológica presente en el mar, sino que además los invertebrados marinos han mostrado ser una fuente de compuestos con estructura novedosa y potente actividad biológica (Blunt *et al,* 2009 y anteriores). Dentro de los organismos marinos se destacan por su riqueza metabólica los invertebrados sésiles, como las esponjas marinas, los cuales al carecer de movimiento deben poseer sustancias químicas que se encarguen de su defensa, comunicación y reproducción.

En años recientes el enfoque del estudio de los productos naturales ha cambiado, debido a que ya no es suficiente con el aislamiento y elucidación estructural de los compuestos naturales, sino que ahora es necesario encontrarles una aplicación, ya sea farmacológica o industrial, de tal manera que estos compuestos proporcionen una solución a algún problema de la humanidad. Los productos naturales marinos han aportado algunas moléculas con estas características, entre las que se destacan los fármacos con propiedades antivirales (por eje. Ara-A y Ara-C), antitumorales (por ejemplo E-743) y analgésicas (por eje. Conotoxinas), entre otros. Adicionalmente, es importante mencionar que en la actualidad hay un gran número de principios activos en fases clínicas avanzadas, entre estos vale la pena destacar al (+)-discodermólido por su potente actividad antimitótica, que lo convierte en un compuesto promisorio para el tratamiento del cáncer, llegando a superar la fase I de los estudios clínicos. No obstante, y como en casi todos los casos de los productos naturales marinos, el principal problema para la comercialización de estas moléculas es el suministro del compuesto, pues suelen ser moléculas estructuralmente complejas, por lo que su síntesis química no siempre es viable, y además se suelen producir en pequeñas cantidades por parte del invertebrado marino.

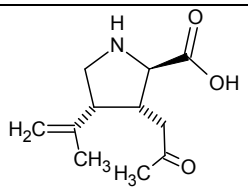
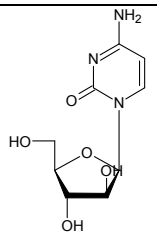
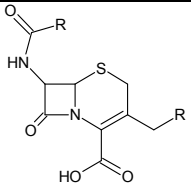
En el marco anterior, este trabajo de maestría pretendía establecer si la esponja marina *Discodermia dissoluta* recolectada en el Caribe colombiano contenía (+)-discodermólido. Así mismo, se quería desarrollar una metodología analítica, útil para cuantificar (+)-discodermólido en fragmentos de esponja, y de esta manera determinar qué factores ambientales podrían afectar la producción de este metabolito. Los resultados obtenidos en este estudio pionero en Colombia, permitieron establecer unas condiciones idóneas para el desarrollo de un cultivo *in situ* de la esponja en el Caribe colombiano, con el fin de aprovechar el hecho de que *D. dissoluta* habita en aguas más someras en Santa Marta que en otras regiones del Caribe. Este cultivo se plantea como un primer paso en la búsqueda de alternativas de suministro de este metabolito, que permitan continuar con los estudios clínicos y para su posible comercialización.

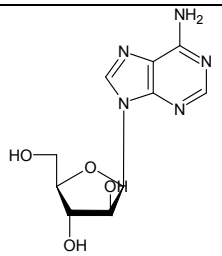
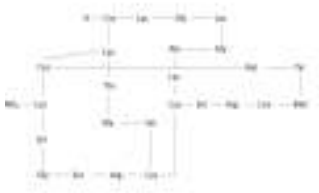
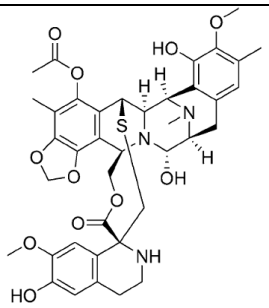
El presente escrito está dividido en tres capítulos autocontenidos: En el primero se hace una revisión bibliográfica sobre el (+)-discodermólido, haciendo énfasis en su actividad biológica. En el segundo, se describe la validación de la metodología analítica para la cuantificación de (+)-discodermólido en la esponja *D. dissoluta*, y se verifica la utilidad del método, determinando la concentración del metabolito en 6 individuos de la esponja recolectados en diferentes áreas del mar Caribe: tres en Santa Marta, una en Bonaire, una en Curazao y otra en Bahamas. En el último capítulo se presenta la evaluación de la concentración de (+)-discodermólido (**1**) en 40 muestras de *D. dissoluta* del Caribe colombiano, pretendiendo establecer la relación entre concentración de **1** con respecto a varios factores medioambientales (profundidad, localidad, presencia de epibiosis, tipo de sustrato y fecha de recolección). Así mismo, se presentan los resultados del diseño y evaluación del un cultivo *in situ* de fragmentos (explantes) de la esponja en Santa Marta, el primero que se intenta en Colombia. Este cultivo podría ser usado para la producción de biomasa de la esponja para posterior extracción y purificación de metabolito, que a su vez podría ser usado para continuar los estudios clínicos.

JUSTIFICACIÓN

En las últimas cinco décadas, el hombre en búsqueda de compuestos químicos útiles para resolver algunos problemas que plantea la vida actual, ha mirado hacia los organismos del mar como fuente de sustancias nuevas con actividades terapéuticas, cosméticas e industriales. De los miles de compuestos aislados de organismos marinos con actividad farmacológica, seis ya se han convertido en medicamentos comerciales (tabla 1) (Pharmamar; Rodríguez, 2003), y un grupo bastante grande ha alcanzado las fases clínicas. Entre estos últimos se destaca el (+)-discodermólido, aislado de la esponja marina *Discodermia dissoluta*, por tener una potente actividad antitumoral, antimicótica e inmunosupresora (Gunasekera *et al.,* 1990; 2002). El mecanismo de acción como antitumoral es similar al paclitaxel (Taxol®) y a la epotilona, y se ha determinado que combinaciones del (+)-discodermólido y el taxol actúan de manera sinérgica potencializando su acción antitumoral, y reduciendo sus efectos tóxicos por usar concentraciones menores.

Tabla 1. Medicamentos comerciales de origen marino (Pharmamar; Rodríguez, 2003).

Nombre genérico	Estructura	Fuente	Actividad	Año de comercialización
Ácido kaínico		Alga Roja *Digenea simplex*	antihelmíntico	1954
Ara-C		Esponja *Cryptotethya crypta*	Leucemia, linfomas no Hodgkimiamos	1972
Cefalosporinas		Hongo marino *Cephaslosporium acremonium*	Antibiótico	1964

Ara-A		Esponja *Cryptotethya crypta*	Antiviral	1969
Conotoxina		Moluscos *Conos magus*	Analgésico	2000
ET-743		Tunicado *Ecteinascidia turbinata*	anticáncer	2007

El (+)-discodermólido (Figura 1) fue patentado por el Harbor Branch Oceanographic Institution - HBOI (Fort Pierce, Florida, EEUU) (Longley *et al,* 1998, Patente US 5840.750) y licenciado por éste a la empresa farmacéutica Novartis Pharma para su desarrollo como medicamento comercial. Durante la Fase I de investigación clínica, desarrollada con pacientes humanos que sufrían de tumores sólidos, éste mostró ser eficiente, pero también presentó cierta pneumotoxicidad secundaria en 3 de 32 pacientes (Mita *et al.,* 2004). Sin embargo, se continúan investigaciones de tipo preclínico (*in vitro* y con animales) tendientes a determinar el farmacóforo de la molécula y la viabilidad de algunos de sus análogos sintéticos o derivados hemisintéticos. No obstante, el problema de suministro sigue siendo una limitante en estos estudios.

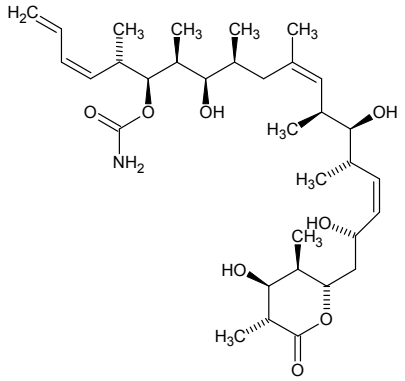


Figura 1 Estructura del (+)-discodermólido.

La baja concentración de este compuesto en la esponja (0,002 % en peso), así como la poca abundancia y la gran profundidad (≥30 m) en la que usualmente se encuentra la esponja, no han permitido un suministro del (+)-discodermólido por cosecha natural. Por ello, las investigaciones clínicas se han llevado a cabo con material obtenido por síntesis total (Florence *et al.,* 2008; Smith y Freeze. 2008), no obstante esta metodología resulta costosa y poco práctica. Así, es importante encontrar alternativas de suministro menos costosas y a mayor escala que la síntesis total, para continuar las investigaciones y asegurar la disponibilidad de material para su posible comercialización. Para lo anterior se puede involucrar el recurso natural, pero siempre evitando impactarlo negativamente, y además teniendo en cuenta que el proceso debe ser económicamente viable.

Algunas alternativas para la obtención de los metabolitos de interés empleando la oferta natural son: la cosecha parcial, cuando las poblaciones son abundantes y el organismos se regenera rápidamente; el cultivo de la esponja, a partir de fragmentos llamados explantes, tanto *in situ* o como en el laboratorio; o el cultivo *in vitro* de las células, o de agregados celulares (llamados *primmorphs*), que producen el metabolito. Estas metodologías vienen siendo probadas en esponjas y otros organismos, y de ser exitosas a mediano plazo podrían ayudar a resolver el problema del suministro. No obstante, en la actualidad hay pocos ejemplos de cultivos exitosos, claro está que en la literatura se hace evidente que no se han llevado a cabo un gran número de esfuerzos en este sentido.

En el marco anterior, resulta de interés que en algunas áreas del Caribe colombiano, especialmente en Santa Marta (Figura 2), habiten individuos de *Discodermia dissoluta* a profundidades relativamente someras, por ejemplo desde los 10 m de profundidad. Lo anterior posiblemente debido a fenómenos de afloramiento de aguas frías en la zona de Santa Marta o la buena oferta de alimento, que posibilitan el desarrollo de varias especies de esponjas a profundidades menores de las que ellas normalmente habitan (Ruiz, 2009). A partir de estas poblaciones de *D. dissoluta*, que si bien no son demasiado abundantes (2-4 individuos por cada 50 m^2), se podrían desarrollar alternativas de oferta (+)-discodermólido a través de cosecha parcial de las esponjas, o cultivos naturales por fragmentación, o cultivo de células productoras. **Lo anterior constituyó la hipótesis de este trabajo de maestría.**

Figura 2. Área de estudio, Santa Marta-Caribe Colombia, los asteriscos representan las localidades donde se recolectaron las muestras de *D. dissoluta.*

Para abordar el problema de investigación, y como objetivos de este trabajo, se pretendió establecer la presencia del (+)-discodermólido en la esponja *Discodermia dissoluta* recolectada en el Caribe colombiano. Luego se buscó determinar cuáles características ambientales producían cambios en la concentración del metabolito, para lo cual se necesitaba desarrollar una metodología analítica que permitiera cuantificar el (+)-discodermólido en muestras de *D. dissoluta*. Finalmente, se buscó, desarrollar un cultivo de explantes de *D. dissoluta,* evaluando si la producción de biomasa y de metabolito era promisoria para la obtención del compuesto de interés a escala

intermedia, y de esta manera contribuir a la solución del problema de suministro que en un futuro permitiría continuar con los estudios clínicos.

Un valor agregado de esta investigación es que la demanda del (+)-discodermólido está establecida, y su existencia en Colombia nos brindaría la oportunidad, mediante inversión propia, de darle valor agregado al conocimiento básico y la formación de recurso humano. Lo que puede generar alternativas de desarrollo industrial; y además de brindar herramientas para una futura negociación tanto a nivel investigativo como comercial.

BIBLIOGRAFIA

Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Munro, H. M.; Northcote, P. T.; Prinsep, M.R. “Marine Natural products” *Nat. Prod. Rep.*, **2009** (cita completa y anteriores).

Florence, G. J.; Gardner, M. N.; Paterson, I. “Development of practical Syntheses of the marine anticancer agents discodermolide and dictyostatin” *Nat. Prod. Rep.,* **2008**, 25, 342–375.

Gunasekera, S. P.; Gunasekera, M.; Longley, R.; Schulte, G. K. “Discodermolide: A New bioactive polyhydroxylated lactone from the marine sponge *Discodermia dissoluta*” *J. Org. Chem.*, **1990**. 55, 4912-4915.

Gunasekera, S. P.; Gopal, K. P.; Longley, R.; Isbrucker, R. A.; Pomponi, S. “Five new discodermolide analogues from the marine sponge *Discodermia* Species”. *J. Nat. Prod.,* **2002**. 65, 1643-1648.

Longley, R.E.; Gunasekera, S.P.; Pomponi, S.A. “Discodermolide compounds”. U.S. Patent 5840.750. 1998.

Mita, A.; Lockhart, C.; Chen, T.-L.; Bochinski, K.; Curtright, J.; Cooper, W.; Hammond, L.; Rothenberg, M.; Rowinsky, E.; Sharma, S. “A phase I pharmacokinetic (PK) trial of XAA296A (Discodermolide) administered every 3 wks to adult patients with advanced solid malignancies” *J. Clin. Oncol.,* **2004** ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition), 22(14S), 2025 (resumen y diapositivas

PharmaMar, Grupo Zelthia. http://www.pharmamar.com/es/pipeline/yondelis.cfm (Consultada el 20 de octubre de 2009).

Rodríguez, J. “Mirando a nuestro entorno: productos naturales de origen marino, una perspectiva en el descubrimiento de nuevos fármacos” *Anales de la real sociedad española de química,* **2003**, 5-13.

Smith III, A. B.; Freeze, S. “(+)-Discodermolide: total synthesis, construction of novel analogues, and biological evaluation” *Tetrahedron*, **2008**, 64, 261–298.

CAPÍTULO I

(+)-DISCODERMÓLIDO: ANÁLOGOS, ACTIVIDAD BIOLÓGICA Y FUENTES DE SUMINISTRO

Andrea Katherine Valderrama Pereira

Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C.

akvalderramap@unal.edu.co

RESUMEN

Los metabolitos secundarios constituyen una rica fuente de compuestos bioactivos, que pueden ser útiles para la solución de algunos problemas de la humanidad. Los productos naturales marinos han mostrado ser importantes para el desarrollo de nuevos fármacos, cosméticos, insecticidas, pinturas anti*fouling*, etc. Entre ellos, se destaca el (+)-discodermólido, aislado de la esponja del Caribe *Discodermia dissoluta,* por ser un metabolito con propiedades antimitóticas, que se encuentra en estudios clínicos, y a que ha mostrando ser promisorio para el tratamiento del cáncer. A pesar de la potente actividad que ha presentado es necesario establecer alternativas de suministro (*supply*), ya que de la fuente natural no se pueden obtener cantidades suficientes de éste para continuar con los estudios clínicos ni para su posible comercialización; adicionalmente la síntesis química no parece viable, al menos por ahora, debido a la complejidad estructural y a la dificultad del escalamiento de las rutas de síntesis propuestas hasta ahora. Otras alternativas viables para solucionar el problema de suministro es empleando el recurso natural, desarrollando cultivos de células o cultivo de fragmentos de la esponja *in situ* o *in vitro* (acuicultura).

En el presente trabajo se presenta un resumen de los metabolitos aislados de las esponjas del genero *Discodermia*, los estudios de actividad biológica del (+)-discodemólido y análogos; y las alternativas de suministro para la producción de metabolitos secundarios de fuentes marinas.

Palabras Claves: acuicultura, *Discodermia dissoluta*, (+)-discodermólido, estabilizador de microtúbulos y metabolito secundarios.

1. INTRODUCCIÓN

Los productos naturales obtenidos a partir de fuentes marinas (PNM) han mostrado tener una diversidad estructural sorprendente, así como una potente actividad biológica. Estos compuestos han sido aislados principalmente de invertebrados tales como esponjas, coelenterados, briozoos, equinodermos, microorganismos y fitoplancton (Faulkner *et al.,* 1983-2002; Blunt *et al.,* 2003-2008). En los últimos años se han publicado revisiones sobre actividad citotóxica, antiviral, antimicrobiana, anti-inflamatoria, anticancerígena, antihelmíntica, anticoagulante, antidiabética y antimalaríca de PNM, lo que ha hecho evidente que estos organismos son una fuente importante de compuestos con potencial biomédico e industrial (da Rocha *et al.,* 2001; Mayer y Hamann, 2005; Gul *et al.,* 2005; Butler, 2008; Moser, 2008; Frederich *et al.,* 2008; Mayer y Gustafson, 2008).

Los organismos productores de estos metabolitos suelen ser sésiles, de cuerpos frágiles, y no cuentan con mecanismos físicos de defensa (caparazones o espinas) razón por la cual han desarrollado mecanismos químicos (metabolitos secundarios) para poder comunicarse, competir por espacio, y defenderse de la depredación y de otros factores que ponen en riesgo su supervivencia (Pawlik, 1993; Paul y Williams, 2008). También es sabido que muchos de los compuestos aislados de los invertebrados son en realidad producidos por los microorganismos asociados a éstos, o incorporados a través de la dieta, y aún hoy en día no es claro quién es el verdadero productor de muchos de los metabolitos bioactivos identificados por los químicos de productos naturales marinos.

Además de lo mencionado anteriormente, se debe tener en cuenta que la producción de los metabolitos en un organismo marino puede verse afectada tanto por agentes externos como internos. Los factores externos que se pueden considerar son la presencia de depredadores, las infecciones por parásitos, la temperatura del agua, la profundidad, la luminosidad y los niveles de nutrientes, entre otros. Entre los factores internos se pueden destacar el estado de desarrollo del organismo o la fase reproductiva del mismo. Por otro lado, también se debe considerar que algunos de los

metabolitos secundarios de muchos organismos han sido adquiridos a través de la dieta, pudiendo ser además posteriormente transformados. Finalmente, la presencia de un simbionte dentro o sobre su tejido también puede ser de gran importancia, ya que el organismo puede tomar intacto ese metabolito o modificarlo para que cumpla su función dentro del invertebrado marino (Faulkner, 1992; Garson, 1989; König y Wright, 1996).

Debido a que muchos de estos factores son cambiantes, el contenido de los metabolitos en las especies marinas puede variar dependiendo de dónde y cuándo se recolecte el organismo marino. **Esto demuestra la importancia de estudiar los invertebrados no solo a nivel de especie sino que también es necesario hacerlo de acuerdo a los diferentes hábitats en que ella se desarrolle**. Un ejemplo muy relevante son las Pseudopterosinas aisladas del coral blando *Pseudoterogorgia elisabetae* recolectados en dos localidades en el Caribe colombiano (San Andrés y Providencia), donde se encontró diferencia en la composición química de los extractos de coral de cada localidad (Puyana *et al*., 2004) otro ejemplo, es el del briozoo *Bugula neritina* que produce la briostatina, un potente anticancerígeno, pero no en todas las poblaciones de este invertebrado, al parecer porque el verdadero productor es un microorganismo asociado que no está presente en todas las poblaciones del briozoo (Davidson *et al.*, 2001).

2. METABOLITOS AISLADOS DE LAS ESPONJAS DEL GÉNERO *Discodermia*

Las esponjas del género *Discodermia* son reconocidas como una fuente muy importante de compuestos con potente actividad biológica, y han sido estudiadas desde principios de la década de los 80, siendo las especies más estudiados en cuanto a su química *D. kiiensis*, del Japón, *D. dissoluta*, de Bahamas, *D. calix*, de Corea del Sur y Japón, *D. polydiscus*, de Bahamas, y algunos especímenes registrados como *Discodermia* sp., recolectados en Bahamas, Antillas y Honduras. Algunos de los compuestos aislados de este género con potente actividad biomédica son: las discoderminas, péptidos con actividad antimicrobiana (Matsunaga *et al.*, 1991; Matsunaga *et al.*, 1985); los discokiólidos, péptidos cíclicos con actividad citotóxica

(Tada *et a.,* 1992); la discodermida, lactama macrocíclica antimicótica (Gunasekera *et al.,* 1991); los discodermindoles, alcaloides indólicos citotóxicos; las theopederinas, alcaloides citotóxicos (Paul *et al.*, 2002); las discobahaminas, péptidos antimicóticos (Gunasekera *et al.,* 1994); las caliculinas, policétidos citotóxicos (Kato *et al.*, 1986; Kato *et al.*, 1988; Wakimoto *et al.*, 2002); y las caliceramidas, ceramidas sulfatadas inhibidoras de la neuraminidasa (Nakao *et al.*, 2001); además se han identificado glicolípidos, furanoterpenos y dímeros de indoles bromados (Sun y Sakemi, 1991).

Dentro de los compuestos bioactivos de *Discodermia* es necesario resaltar la familia de los discodermólidos, pues han despertado gran interés debido a su potente actividad antitumoral, antimicótica e inmunosupresora (Gunasekera *et al.*, 1990; Gunasekera *et al.*, 2002). En este grupo se destaca el (+)-discodermólido (**1**) (Figura 1), cuyo aislamiento fue reportado por primera vez en 1990 por el grupo de Gunasekera en el Harbor Branch Oceanografic Institute (HBOI), aislado de la esponja del Caribe *Discodermia dissoluta*, recolectada a 33 m de profundidad en la isla Grand Bahama. Estudios iníciales demostraron que tiene potente actividad antiproliferativa a muy bajas concentraciones, con detención de la división celular en la fase G2/M (Longley *et al.,* 1993; ter Haar *et al.,* 1996).

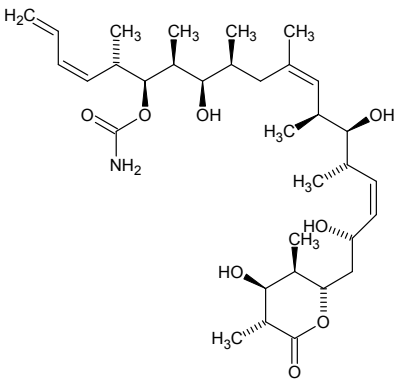
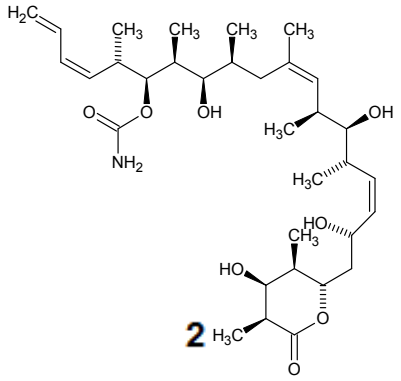


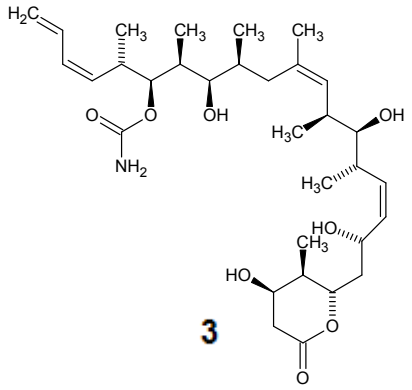
Figura 1. Estructura del (+)-discodermólido (**1**).

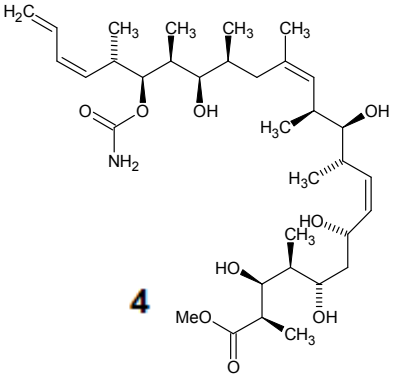
Debido a la potente actividad que presenta el (+)-discodermólido (**1**), se le considera como un compuesto promisorio para su uso en quimioterapia. Desafortunadamente, la cantidad de **1** presente en la esponja es muy baja, se reporta la obtención de 0.002%

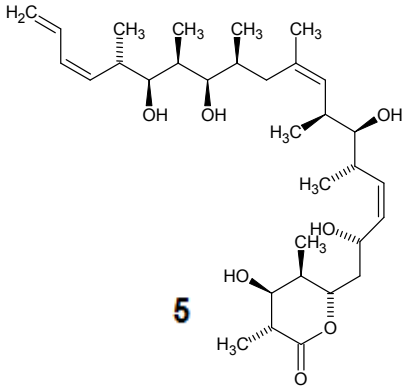
(p/p) de (+)-discodermólido con respecto al peso de la esponja congelada (Gunasekera *et al.,* 1990). Además, la poca abundancia de la esponja y la gran profundidad (≥30 m) en la que ella usualmente se encuentra, no han permitido, hasta ahora, un suministro por cosecha natural. Se han venido haciendo esfuerzos sintéticos (se presentan más adelante) que hasta la fecha tampoco han resuelto el problema del abastecimiento (*supply*).

Otros discodermólidos aislados de la esponja *Discodermia dissoluta* son: 2-*epi*-discodermólido (**2**), 2-*des*-metildiscodermólido (**3**), 5-hidroxidiscodermolato de metilo (**4**), 19-*des*-aminocarbonildiscodermólido (**5**) y el 9(13)-ciclodiscodermólido (**6)**, los cuales exhiben actividad citotóxica frente a células P-388 y A-549 de diferente magnitud. La relación estructura-actividad será presentada más adelante (Gunasekera *et al.,* 2002).









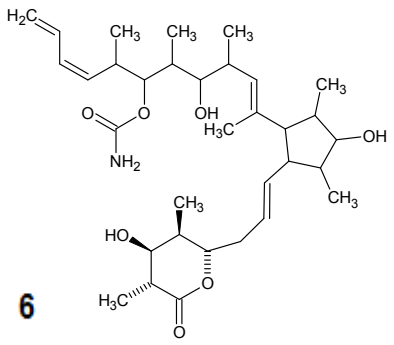


Figura 2. Estructura de los metabolitos análogos del (+)-discodermólido, aislados de la esponja *D. dissoluta*.

3. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL (+)-DISCODERMÓLIDO

La primera vez que se realizó el aislamiento de (+)-discodermólido se determinó que inhibía la proliferación *in vitro* de células de leucemia P-388, e inhibía el crecimiento de *Candida albicans* (Gunasekera *et al.,* 1990). Estudios posteriores confirmaron que el (+)-discodermólido poseía actividad antiproliferativa (Longley *et al.,* 1993), además de ser un potente agente antimitótico (ter Haar *et al.,* 1996).

El mecanismo de acción antitumoral del (+)-discodermólido es similar al de paclitaxel (droga comercial Taxol®. Aislado de *Taxus brevifolia* por Wani *et al.*, 1971), e involucra su unión a la subunidad β-tubulina, estabilizando los microtúbulos y previniendo su dinámica en la formación del huso acromático, deteniendo así la mitosis en la fase G2/M, lo que suprime la división celular llevando a la muerte natural de las células (apoptosis) y a la eliminación natural de los residuos (Honore *et al.*, 2004). El (+)-discodermólido es efectivo en inhibir *in vitro* líneas celulares cancerígenas resistentes al paclitaxel y a la epotilona, y se ha encontrado que actúa de manera sinérgica en combinación con paclitaxel, disminuyendo su dosis efectiva y por ende su toxicidad. Todo lo anterior ha evidenciado que el (+)-discodermólido es promisorio para el tratamiento del cáncer dando resultados favorables superando la fase I de investigación clínica (Mita *et al.*, 2005; Karté, 1996; Martello *et al.*, 2000; Haefner, 2003; Kijjoa y Sawangwong, 2004; Hung *et al.*, 2006).

4. ESTRATEGIAS PARA LA OBTENCIÓN DE (+)-DISCODERMÓLIDO A GRAN ESCALA

Como ya se ha ilustrado algunos de los metabolitos aislados de organismos marinos, han mostrado poseer una muy potente actividad, en muchos casos superior a la encontrada para moléculas de origen terrestre (Newman y Cragg, 2007); no obstante, la principal dificultad por la que éstos no se encuentren como medicamentos en el mercado, es que los invertebrados marinos tan solo producen unos poco miligramos de los compuestos de interés, lo que no es suficiente ni para los ensayos clínicos ni mucho menos para su comercialización. Para solucionar el problema de suministro (*supply*) se ha recurrido básicamente a cuatro métodos: el cultivo del invertebrado en el mar (acuicultura *in situ*), el cultivo del organismo en condiciones artificiales (acuicultura *in vitro*), el cultivo de células y la síntesis química. A continuación se discutirán cada uno de estas alternativas.

4.1 *.Cultivo de organismos (in situ e in vitro): una alternativa de suministro de de compuestos bioactivos?*

Los organismos marinos se pueden cultivar en condiciones artificiales (acuicultura *in vitro*) o directamente en el mar (acuicultura *in situ*), en ambos casos se aprovechan las poblaciones naturales de invertebrados. En la primera, fragmentos de las esponjas (explantes) se ponen a crecer en sistemas cerrados perfectamente controlados (en laboratorio); no obstante, el crecimiento de estos fragmentos ha mostrado ser muy dependiente de la especie cultivada, así como de la dieta (calidad y cantidad) y las condiciones ambientales (luz, oxígeno, silicatos, calidad de agua, etc.). Se han observado resultados desde crecimiento negativo o nulo hasta más de 1000 % de incremento en peso (Osinga *et al.*, 1999; 1999b; 1999c; Duckworth *et al.*, 2003; Ferrati *et al.*, 2006a; Hausman *et al.*, 2006; Sidri *et al.*, 2006). Hasta la fecha esta metodología no parece ser económicamente viable para llevarla a escala industrial (Mendola, 2003; Sipkema *et al.*, 2006). Hasta nuestro conocimiento esta metodología no se ha ensayado con *D. dissoluta*.

Los cultivos hechos directamente en el mar (acuicultura *in vivo*) se hacen mediante la recolección de explantes, a los que se les permite curarse en campo, y luego se fijan al sustrato para que allí se desarrollen. Éstos deben ser ubicados en sitios con buena disponibilidad de alimento donde puedan crecer hasta tamaños apropiados para su cosecha (Müller *et al.*, 1999). En general esta metodología aprovecha las condiciones naturales del *hábitat* en las que el invertebrado se desarrolla aprovechando así la oferta natural de alimento para que se regeneren y crezcan, y hasta ahora parece ser el método más efectivo en términos de costo y eficiencia, especialmente porque con frecuencia la manipulación de los explantes induce una mayor biosíntesis de los metabolitos de interés (Zea *et al.*, 1999; Hadas *et al.*, 2005), aunque todavía falta mucha investigación que permita conocer cómo hacer una correcta manipulación del organismo para maximizar la producción del metabolito de interés (Osinga *et al.*, 1999; Duckworth *et al.*, 1999). No obstante las ventajas del cultivo en campo, éste puede ser afectado por las condiciones ambientales cambiantes, que pueden en ciertos momentos afectar negativamente las esponjas (por ejemplo tormentas, enfermedades, problemas de *fouling*, etc).

Los factores que se deben tener en cuenta para el desarrollo de un cultivo son: la ubicación del cultivo, que debe ser preferiblemente en un área poco expuesta para evitar el arrastre por corrientes; la profundidad; la epibiosis (*fouling*), que deteriora las estructuras y puede afectar el crecimiento de la esponja; la estructura que se utilice de soporte para los explantes; la forma en que se sujetan los explantes a las estructuras; la cantidad de pinacodermo que se deja en los explantes y el número de cortes (Duckwort *et al.,* 1997; Duckworth y Battershill, 2003). Lo ideal es que el método de recolecta, corte y postura, y el sitio deben promover un alto crecimiento e, idealmente, una alta producción de metabolito (Duckworth *et al.*, 1999).

Se han hecho estudios pilotos de acuicultura *in situ* en cerca de una docena de especies de esponjas, entre ellas se pueden mencionar los cultivos de *Axinella corrugata,* para obtener stevensina, metabolito con propiedades antitumorales*, Negombata magnifica, para obtener* latrunculina B*,* metabolito con potente actividad

citotoxica*,* y *Callyspongia (Euplacella) biru,* para obtener anfitoxina, metabolito con potente actividad antialimentaria (Battershil y Page, 1996; Duckworth *et al.*, 1997; 1999; 2004; Müller *et al.*, 1999b; Mendola, 2003; Duckworth y Battershill, 2003a; 2003b; Hadas *et al.*, 2005; Page *et al.*, 2005; Adams *et. al.,* 2006; Ferrati *et al.*, 2006b; Wolff *et al.*, 2006; Voogd, 2007). En estos estudios se buscaron las condiciones ambientales y de cultivo que maximizaban el crecimiento de la esponja y la biosíntesis del metabolito de interés, teniendo en cuenta que se debían escoger condiciones económicamente viables, que permitieran un escalamiento posterior. Los resultados han sido disimiles, con crecimientos desde negativos hasta cerca del 1000 % del peso húmedo por año, dependiendo en primera instancia de la especie, de la forma de crecimiento y la capacidad de regeneración, y en segunda instancia de los métodos de amarre, la ubicación de los explantes y las condiciones ambientales. En general, los mejores resultados se han obtenido al ubicar las estructuras en ambientes con buena circulación de agua, poniendo los explantes por encima del sustrato, para maximizar la obtención de alimento y minimizar los efectos del sustrato, y manteniéndolos en bolsas de malla ancha o atravesándolos con nylon. Hasta nuestro conocimiento no se han llevado esfuerzos de maricultura con *D. dissoluta.*

Solamente se ha definido el protocolo de eficiencia de costos para un sistema de cultivo que combina tanques en tierra y estructuras en el mar (California, EEUU) para la producción de los compuestos antitumorales briostatina 1 (del briozoo *Bugula neritina*), y de ecteinascidina 743 (del tunicado *Ecteinascidia turbinata*). Aunque en la actualidad este último se produce por transformación química de un derivado avanzado que se obtiene por fermentación de *Pseudomonas fluorescens* (Cuevas y Francesch., 2009).

4.2. *Cultivo de Células: una alternativa de suministro de compuestos bioactivos?*

Una alternativa biotecnológica para obtener compuestos químicos bioactivos es cultivar *in vitro*, en condiciones controladas, las células responsables de la producción de las proteínas que permiten la biosíntesis del metabolito. A partir de estos cultivos también se pueden aislar los grupos de genes responsables de la producción del metabolito, y mediante técnicas de ingeniería genética introducirlos en microorganismos que puedan

ser puestos a crecer y producirlos a escala industrial en cámaras de fermentación (Colwell, 2002).

Un punto importante que se debe resolver cuando se pretende hacer un cultivo de células de esponjas, es establecer si es el invertebrado el productor del compuesto, o si es alguno de los microorganismos asociados, el verdadero productor. Entonces, para el caso de las esponjas es importante lograr identificar si son las células de la esponja, o alguno de los muchos microorganismos asociados, los responsables de la producción del metabolito; para poder lograr un cultivo enriquecido de las células u organismo productor (Kobayashi y Ishibashi, 1993; Proksh y Ebel, 2002; Piel, 2004; Newman y Hill, 2006).

Para obtener las células del organismo, éste se debe disociar. Los métodos convencionales para lograr esto pueden ser mecánicos (por ejemplo, apretando o picando la esponja para liberar las células), o químicos (por ejemplo, agua de mar libre de calcio y magnesio o EDTA) y enzimáticos (por ejemplo, tripsina). Posteriormente la separación de las células, según sus tipos, se hace mediante centrifugación en gradientes de densidad (por ejemplo percoll o ficoll). La identificación de las células de interés se hace mediante la detección de una producción continuada del metabolito activo (Pomponi, 2006), posteriormente estas células deben ser identificadas mediante técnicas moleculares (isoenzimas, huellas digitales de ADN o secuencia de genes específicos). Después de tener separadas e identificadas las células productoras, se deben diseñar y probar superficies de adhesión (células normales deben estar adheridas a un sustrato) y medios de cultivo, que permitan la producción del metabolito de interés (Pomponi, 2006; Sun *et al.*, 2006). Hasta el momento se ha logrado mantener con vida varias líneas celulares de esponjas, pero no se ha logrado la producción sostenida de un metabolito bioactivo a partir de ellas (Rinkevich, 2005, Caralt *et al.,* 2007).

Lo anterior plantea un reto muy importante, pues con frecuencia las bacterias simbióticas no son fácilmente cultivables. Una forma de abordar el problema y lograr una producción del compuesto de interés es tener una combinación de los principales

tipos de células que constituyen el holobionte de la esponja, y no pretender cultivar las células individuales antes descritas. De esta manera se aprovecha la plasticidad tisular de las esponjas. Así, se ha venido experimentando el cultivo de agregados celulares esféricos (logrados mediante disociación de células y posterior reagregación en agitación suave) llamados "*primmorphs*" que pueden crecer y producir los metabolitos (Müller *et al.*, 1999a; 2000; 2004; Pomponi, 2006). Aunque estos sistemas de cultivo han sido muy útiles para estudiar diversas propiedades fisiológicas de las células, todavía no se ha logrado escalar la producción de un cultivo mediante estas técnicas.

4.3. *Síntesis: Una alternativa para el suministro de* (+)-*discodermólido?*

En los últimos años se ha venido consolidado la síntesis orgánica como una alternativa viable para solucionar el problema de abastecimiento de metabolitos secundarios. Se han hecho esfuerzos tanto desde el punto de vista de la síntesis total como de la hemisíntesis (Florence *et al.,* 2008; Smith y Freeze. 2008). Revisiones completas de estos trabajos en productos naturales marinos se pueden consultar en la serie de Natural Producs Reports (Morris y Phillips, 2009 y anteriores).

Las moléculas bioactivas suelen ser complejas estructuralmente, por lo que su síntesis requiere un gran número de pasos lo que incrementa los costos de su producción, y reduce el rendimiento total de la misma. En el caso particular del (+)-discodermólido, se tiene una δ-lactona polihidroxilada que posee 13 centros quirales contiene 4 dobles enlaces, de los cuales uno es terminal, otro es trisustituido, otro disusituido, y dos de ellos son conjugados; adicionalmente, presenta cinco grupos hidroxilo y un grupo carbamato. Todo lo anterior muestra que su síntesis total ha sido un gran reto para los grupos de química orgánica.

A continuación se presenta un resumen de las rutas sintéticas propuestas por los grupos de Scheiber, Smith y Paterson que han hecho los aportes más importantes en la optimización de la síntesis de (+)-discodermólido. Lo anterior también ha provisto material para llevar a cabo estudios de estructura-actividad.

La primera síntesis total del discodermólido fue realizada por el grupo de Schreiber, en la Universidad de Harvard, obteniendo el enantiómero (-)-discodermólido (**7**) (Nerenberg *et al.* 1993), lo que permitió asignar la configuración absoluta del producto natural. En el análisis retrosintético llevado a cabo por ellos se reconocieron tres fragmentos principales, C1-C7, C8-C15 y C16-C24, que pueden obtenerse a partir de los alcoholes homoalilicos **11** y **12** (Figura 4). La estrategia sintética se fundamenta en la condensación de los fragmentos de C7–C8 y C15–C16, mediante un acoplamiento de Nozaki–Kishi, y alquilación del enolato obtenido. La síntesis total involucra 24 pasos con un rendimiento total del 3.6%.

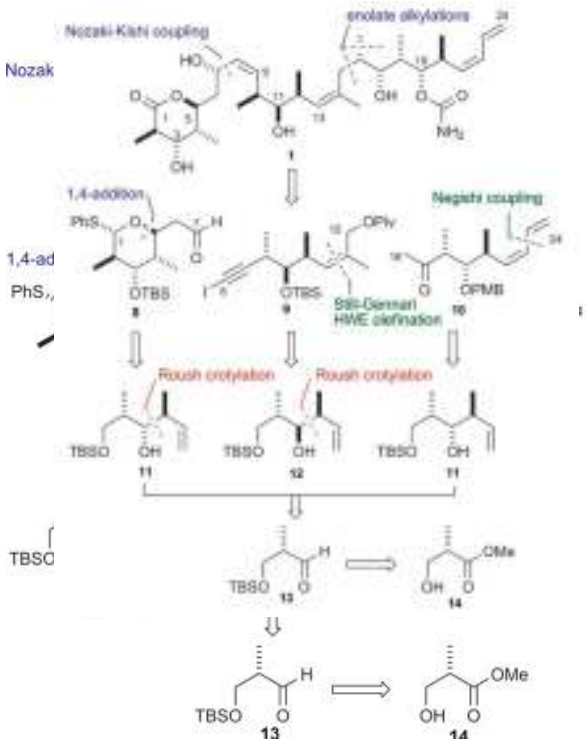
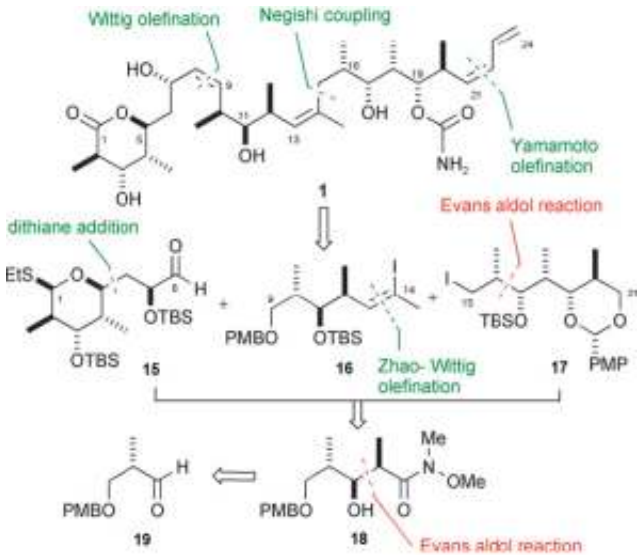


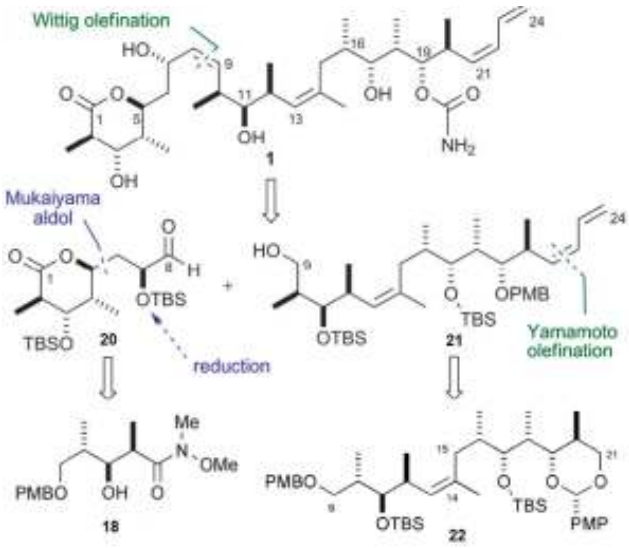
Figura 4. Análisis retrosintético de síntesis de Screiber (tomado de Florence *et al.,* 2008)

La segunda síntesis reportada para el (-)-discodermólido fue publicada en 1995 por el grupo de Smith, de la universidad de Pensilvania (Smith *et al.,* 1995). La ruta de síntesis propuesta por este grupo ha sufrido variaciones a través del tiempo por lo que se conocen cuatro generaciones (Figura 5). En todas las generaciones se identifica la existencia de tres fragmentos principales (C1-C8, C9-C14 y C15-C21). La síntesis de primera generación (Smith *et al.,* 1995) se caracteriza por tener un precursor aldehído

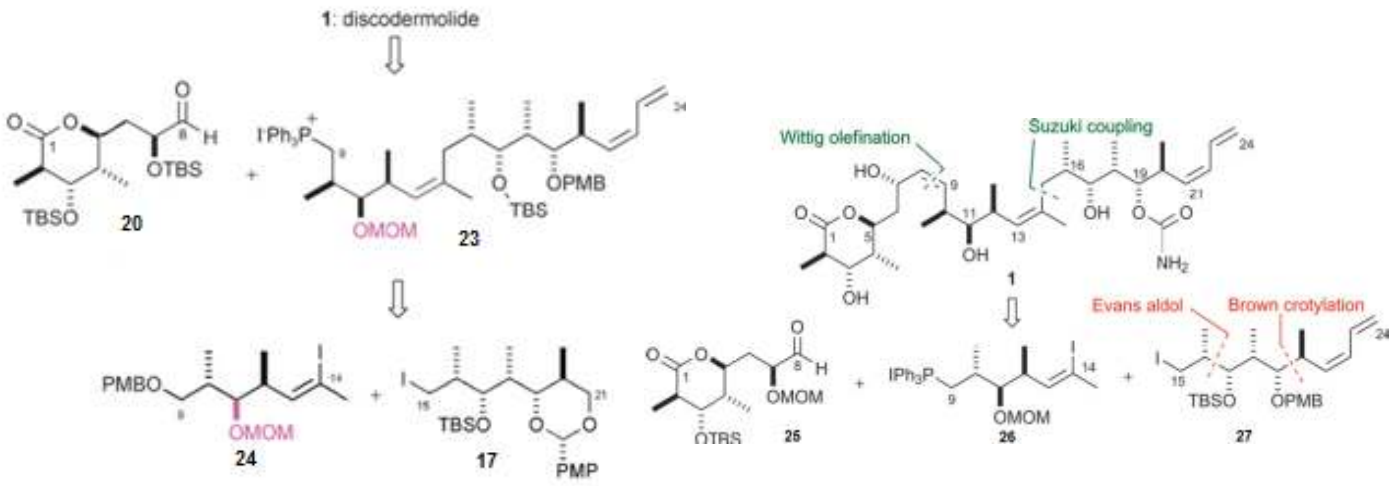
(**19**) común, que se obtiene de manera eficiente a través de una secuencia de cinco pasos a partir de 5-hidroxi-2-metilpropionato, que es un reactivo comercial. La síntesis continúa con la conversión del precursor **19** en los tres fragmentos principales, y posteriormente éstos se acoplan entre sí. Ésta síntesis total involucra 28 pasos y tiene un rendimiento del 2.2%. La síntesis de segunda generación de Smith, también conocida como la síntesis a gran escala (Smith *et al.,* 1999), permitió sintetizar 1,04g de (+)-discodermólido a partir de un precursor común **18,** que a su vez se obtiene fácilmente a partir de **19**. Esta segunda generación de la síntesis logró mejorar el rendimiento total (6%), y permitió obtener mayores cantidades de los intermediarios en cada paso de la síntesis. La tercera generación (Smith *et al.,* 2003) se enfoca en la resolución de algunos de los problemas presentados en la segunda generación, por ejemplo el uso de altas presiones para la obtención de la sal de wittig **23**; aunque el rendimiento de esta síntesis es menor (1,9%) que el de la generación anterior, la metodología es más compatible con una proceso a gran escala, pues no exige altas presiones como lo hace la segunda generación. En la cuarta generación (Smith *et al.,* 2005), el grupo de Smith tuvo en cuenta los estudios hechos por Marshall (Marshall *et al.,* 1998) y Novartis; así se buscó una doble funcionalización de la sal de witting **26** para realizar la unión de los tres fragmentos de manera bidireccional. Estos cambios permitieron obtener un rendimiento mayor en un menor número de pasos. Lo que indica que los cambios implementados a la síntesis han dado resultados favorables.



a



b



c d

Figura 5. Análisis retrosintético de síntesis de Smith (a) primera generación, (b) segunda generación, (c) tercera generación, (d) cuarta generación (tomada de Florence *et al.,* 2008)

Por otro lado el grupo de Paterson reportó la síntesis del (+)-discodermólido en tres oportunidades (Figura 6). La primera fue reportada en 2000 (Paterson *et al.,* 2000), la segunda en el 2003 (Paterson *et al.,* 2003) y la tercera en el 2005 (Paterson *et al.,* 2005). Todas las rutas de síntesis propuestas por este grupo tienen rendimientos más altos que los reportados por otros grupos de investigación (primera generación: 23 pasos R= 10,3%, segunda generación: 24 pasos R=7,8% y tercera generación: 21 pasos R= 11,1%). La principal diferencia de las rutas de Paterson con respecto a las planteadas por el grupo de Smith es que el primero no contempla la obtención de los tres fragmentos principales a partir de un mismo intermediario común. Uno de los aportes más importantes es el uso de intermediarios de boro en reacciones *anti*-aldol para la transformación estereoselectiva que permiten obtener cada subunidad (por ejemplo compuestos **28**, **29** y **33**).

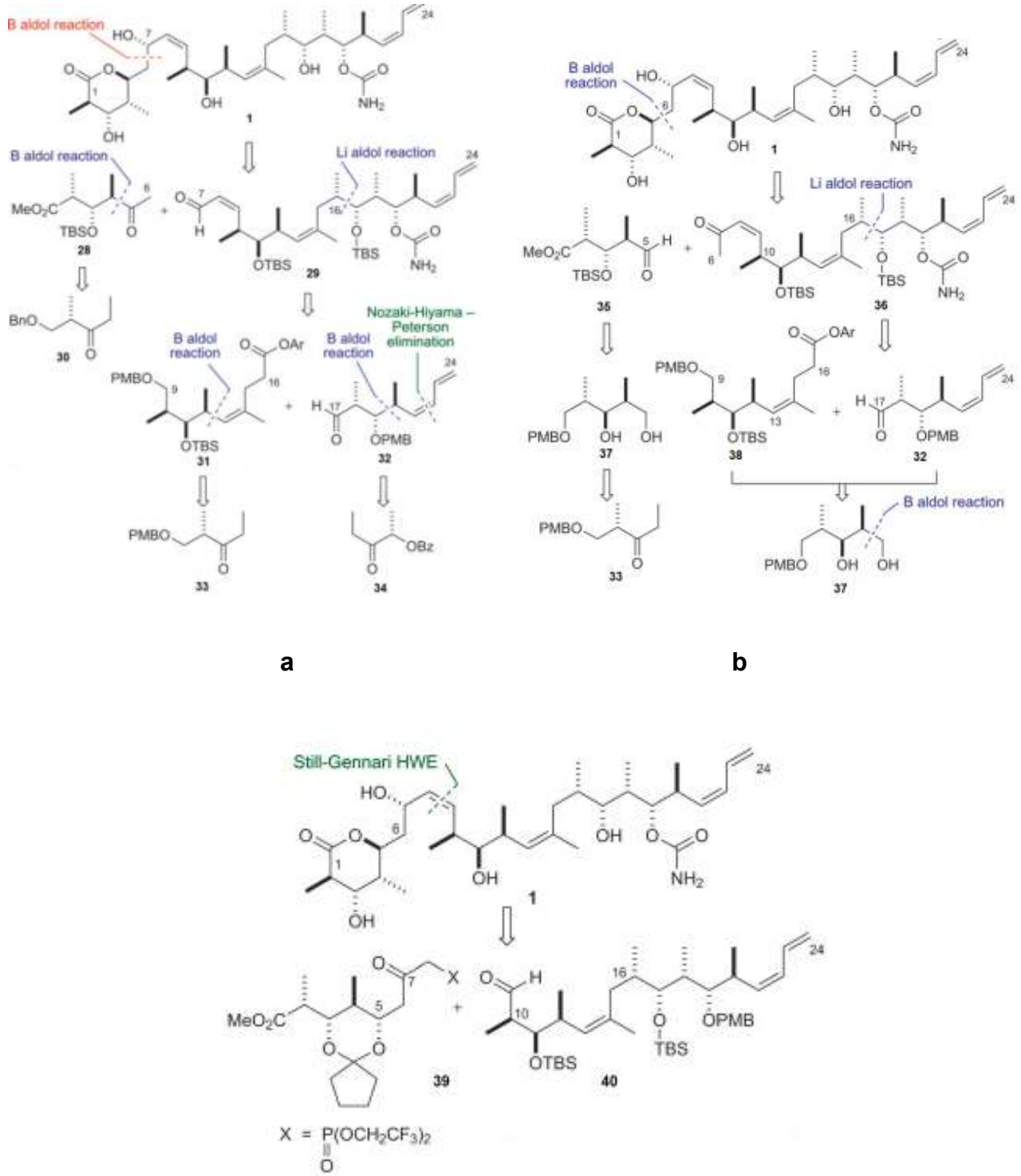


Figura 6. Análisis retrosintético de síntesis de Paterson (a) primera generación, (b) segunda generación, (c) tercera generación (tomada de Florence *et al.,* 2008)

En el 2004 el grupo farmacéutico Novartis realizó la síntesis del (+)-discodermólido a gran escala. Este esfuerzo se basó tanto en sus propios trabajos, como en la síntesis a gran escala (segunda generación) de Smith (Smith *et al.,* 1999) y la primera generación de Paterson (Paterson *et al.,* 2000). Esta síntesis permitió obtener 60 g de **1**, los cuales se utilizaron para hacer los ensayos clínicos de fase I y evaluaciones *in vivo* (Mickel *et al.,* 2004).

5. ESTUDIOS ESTRUCTURA-ACTIVIDAD

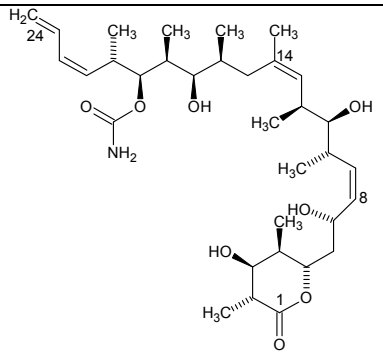
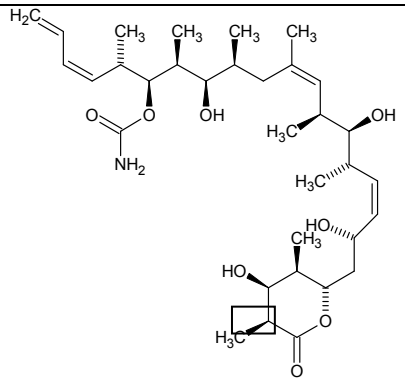
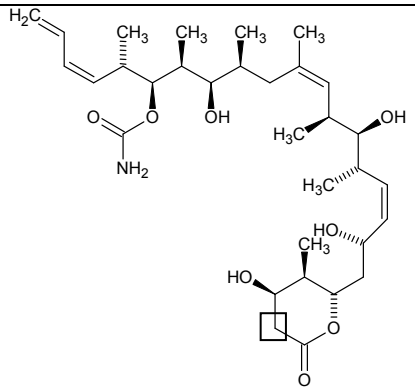
En el proceso de desarrollo de la síntesis del (+)-discodermólido se han obtenido gran variedad de compuestos análogos (Martello *et al.,* 2001; Choy *et al.,* 2003; Smith *et al.,* 2005; Smith *et al.,* 2005b). La familia de compuestos así obtenidos, junto con los análogos naturales, han permitido estudiar la relación estructura-actividad en búsqueda del farmacóforo de la molécula. Lo anterior busca identificar una subestructura menos compleja pero igualmente activa, que permita reducir los costos y tiempos de síntesis, facilitando así la posible salida de una molécula comercial que pueda ser usada como medicamento para el tratamiento del cáncer.

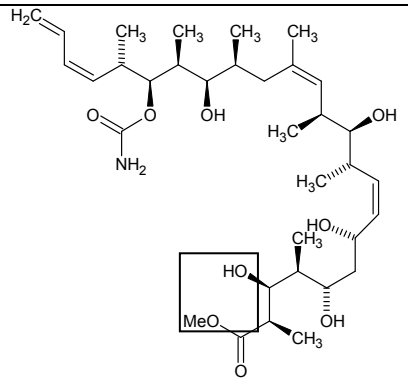
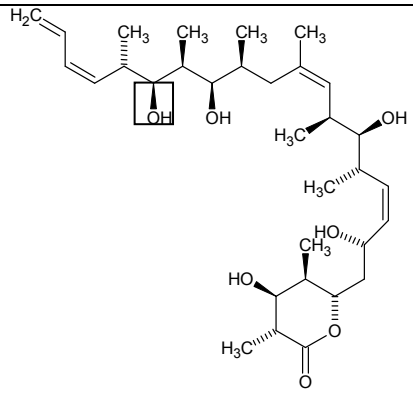
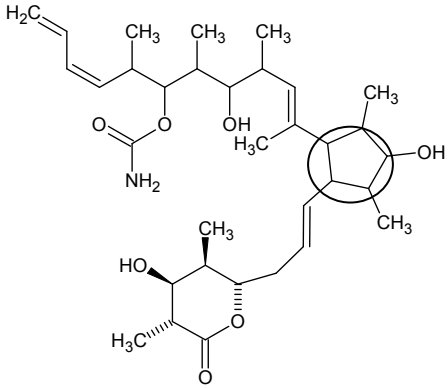
El primer acercamiento al estudio estructura actividad fue realizado por el grupo de Schreiber cuando evaluaron la actividad de los dos enantiómeros del discodermólido, encontrando que ambos inhiben la proliferación celular pero en etapas diferentes del ciclo celular. El estudio se realizó por vía análisis de flujo citométrico encontrando que el (+)-discodermólido inhibe la proliferación celular, con un IC_{50} de 6nM, en la fase G2/M, mientras el (-)-discodermólido lo inhibe en la fase S, con IC_{50} de 72nM (Hung *et al.,* 1994). Lo que indica que el cambio de todos los centros quirales presentes en esta molécula modifican el mecanismo de acción. Ambos enantiómeros son prometedoramente activos, a juzgar por su IC_{50}, por lo que pueden usarse como cabezas de serie para la obtención de análogos útiles en el tratamiento del cáncer.

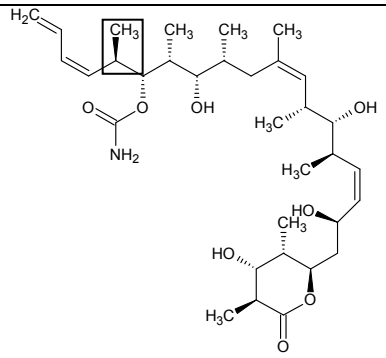
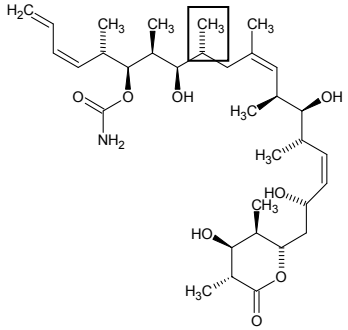
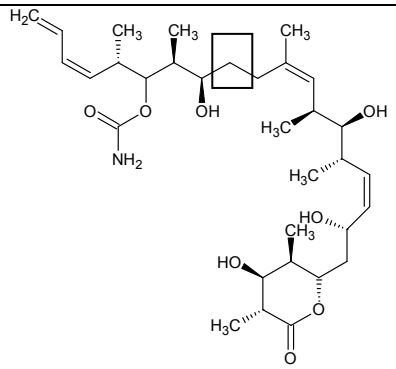
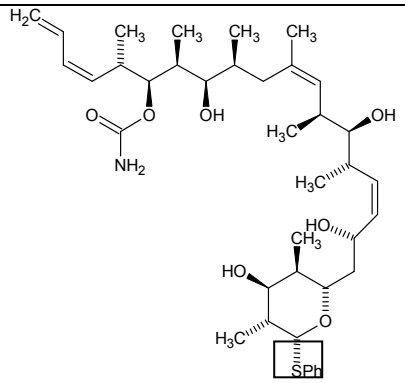
En la tabla 1 se presentan algunos de los análogos del (+)-discodermólido, y su actividad biológica frente a varias líneas celulares. De los estudios realizados es posible establecer que el fragmento más importante para la conservación de la actividad es la

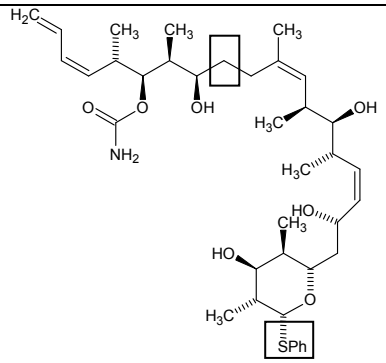
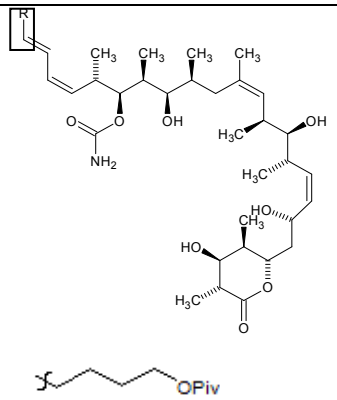
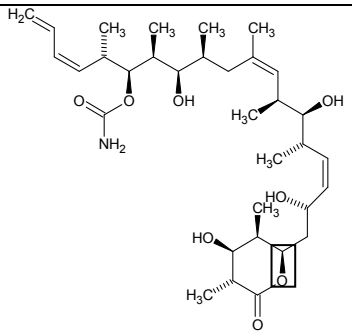
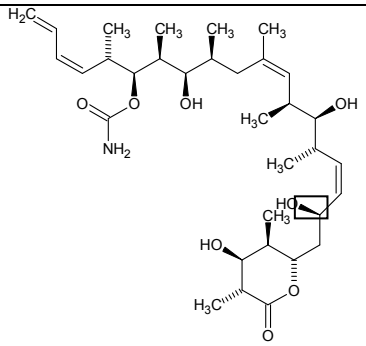
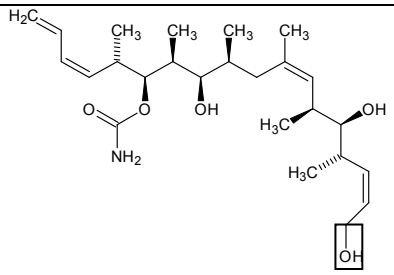
cadena lineal media C-8 a C-14, pues modificaciones en ésta dan la pérdida total de la actividad, por el contrario, modificaciones en la lactona, el dieno terminal y la estereoquímica de los otros centros quirales (no pertenecientes a la cadena media) no producen cambios significativos en la actividad frente a las líneas celulares estudiadas.

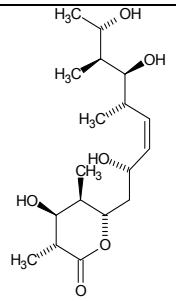
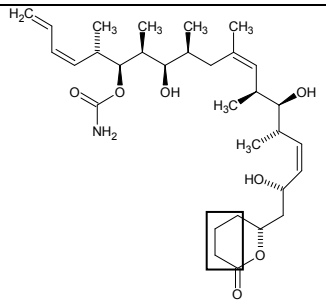
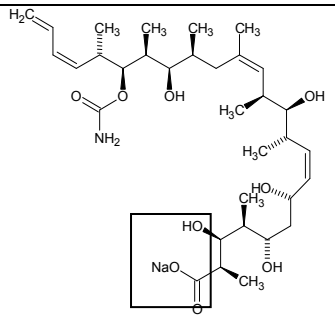
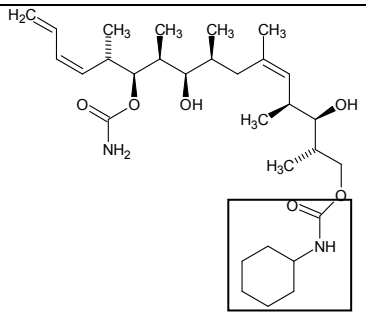
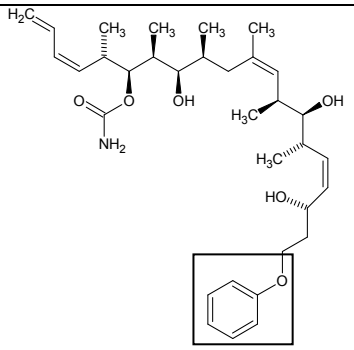
Tabla 1. Estructura de algunos compuestos análogos al (+)-discodermólido y valor de IC_{50} frente a diferentes líneas celulares. Los análogos naturales con 2 a 6 y los análogos sintéticos: 41-58. En un recuadro se destacan las diferencias estructurales con respecto al (+)-discodermólido.

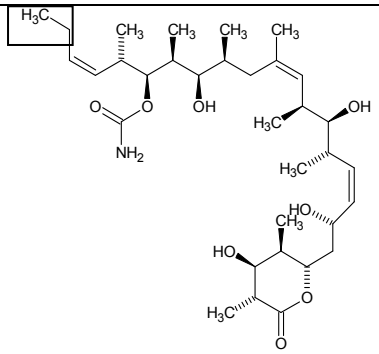
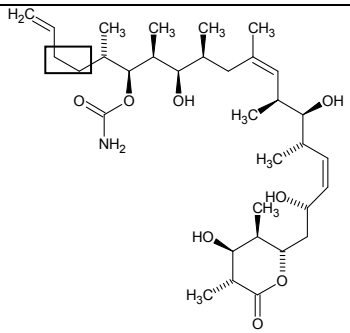
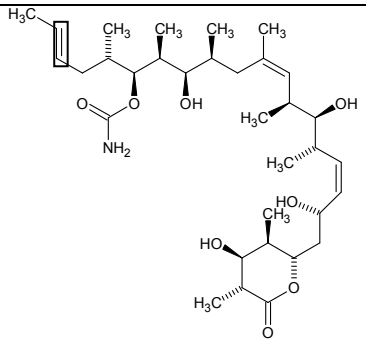
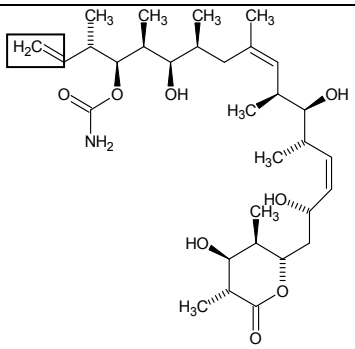
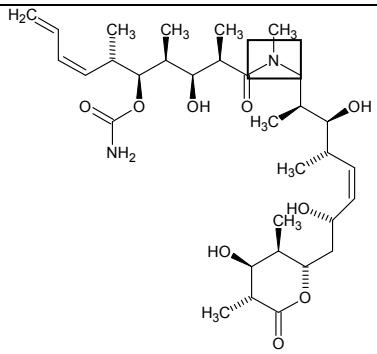
Número	Estructura	IC_{50}	Autor
1		(MG63) 6nM (A549) 25nM (HCT116) 7nM	(Gunasekera et, al. 1991)
2		(A549) 30nM	(Gunasekera *et al.,* 2002)
3		(A549) 60nM	(Gunasekera *et al.,* 2002)

4		(A549) 60nM	(Gunasekera *et al.,* 2002)
5		(A549) 5nM	(Gunasekera *et al.,* 2002)
6		(A549) 4487nM	(Gunasekera *et al.,* 2002)

7		(MG63) 72nM	(Hung *et al.,* 1994)
41		(MG63) 300nM	(Hung *et al.,* 1996)
42		(MG63) 10nM	(Hung *et al.,* 1996)
43		(MG63) 6nM	(Hung *et al.,* 1996)

44		(MG63) 4nM	(Hung *et al.,* 1996)
45		(MG63) 70nM	(Paterson *et al.,* 1996; Paterson at el. 2001)
46		(A549) 150nM	(Paterson *et al.,* 1996; Paterson at el. 2001)
47		(A549) 500nM	(Paterson *et al.,* 1996; Paterson at el. 2001)
48		(A549) 130nM	(Paterson *et al.,* 1996; Paterson at el. 2001)

49		(A549) 8700nM	(Paterson *et al.,* 1996; Paterson at el. 2001)
50		(HCT116) 7nM	(Kinder, 2002; 2003)
51		(HCT116) 50nM	(Kinder, 2002; 2003)
52		(HCT116) 400nM	(Kinder, 2002; 2003)
53		(HCT116) 200nM	(Kinder, 2002; 2003)

54		(HCT116) 4nM	(Kinder, 2002; 2003)
55		(HCT116) 2nM	(Kinder, 2002; 2003)
56		(HCT116) 1nM	(Kinder, 2002; 2003)
57		(HCT116) 40nM	(Kinder, 2002; 2003)
58		(HCT116) 13000 nM	(Kinder, 2002; 2003)

Con lo anterior queda claro que el (+) discodermólido es una de las moléculas más prometedoras para el tratamiento del cáncer, razón por la cual se han hecho ingentes esfuerzos sintéticos para lograr su producción, lo anterior ha permitido avanzar en los estudios clínicos y en el entendimiento de la relación estructura actividad y sus mecanismos de acción. No obstante, el problema del suministro sigue siendo una barrera importante en el avance del desarrollo del (+)-discodermólido y análogos semisintéticos como medicamento.

En este marco, el presente trabajo de maestría surge como una alternativa para contribuir a la solución del problema del suministro (*supply*), evaluando las poblaciones naturales de *D. dissoluta* de Santa Marta, y desarrollando un cultivo *in situ* de fragmentos de la esponja, para la producción sostenible de biomasa con miras a mantener una oferta continúa de este metabolito. Estos aspectos se abordarán en los capítulos II y III del presente escrito.

BIBLIOGRAFIA

Adams, C.; Stevely, J; Sweat, D. “An evaluation of the financial feasibility of small-scale commercial sponge culture in Pohnpei, Federate States of Micronesia” *Abstracts, 7th Int. Sponge Symp.*, Río de Janeiro, 7-13 mayo **2006**.

Al-Ogily, S. M.; Knight-Jones, E. W. “Anti-fouling role of antibiotic produced by marine algae and bryozoans” *Nature*, **1979**, 265, 728.

Avila, C.; Ikenb, K.; Fontana, a.; Cimino, G. “Chemical ecology of the Antarctic nudibranch *Bathydoris hodgsoni* Eliot, 1907: defensive role and origin of its natural Products” *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **2000**, 252, 27 –44.

Battershill, C.N.; Page, M.J. “Sponge aquaculture for drug production” *Aquat. Update,***1996**, 5-6.

Butler, M. S. “Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials”*,* **2008,** 25, 475-516.

Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Munro, H. M.; Northcote, P. T.; Prinsep, M.R. “Marine Natural products” *Nat. Prod. Rep.*, **2003-2008**.

Choy, N.; Shin, Y.; Nguyen, P. Q.; Curran, D. P.; Balachandran, R.; Madiraju, C.; Day, B. W. “Simplified Discodermolide Analogues: Synthesis and Biological Evaluation of 4-*epi*-7-Dehydroxy-14,16-didemethyl-(+)-discodermolides as Microtubule-Stabilizing Agents” *J. Med. Chem.* **2003**, 46(14)*,* 2846-2864.

Coll, J.C.; Bowden, B. F.; Tapiolas, D. M.; Willis, R. H. “Studies of Australian soft corals-XXXV The terpenoid chemistry of soft corals and its implications” *Tetrahedron*, **1985**, 41, 1085-1092.

Colwell, R. R. “Fulfilling the promise of biotechnology” *Biotechnology Advances*, **2002**, 20, 215–228.

Cuevas, C y Francesch, A. “Development of Yondelis (trabectedin, ET-743). A semisynthetic process solves the supply problem” *Nat. Prod. Rep*., **2009**, 26, 322–337.

Da Rocha, A. B.; Lopes, R.M.; Schwartsmann, G. “Natural products in anticancer therapy” *Current Opinion in Pharmacology*, **2001**, 1(4), 364-369.

Davidson, S. K.; Allen, S. W.; Lim, G. E.; Anderson, C. M.; Haygood, M. G. “Evidence for the biosynthesis of briostatins by the bacterial symbiont Candidatus “Endobugula sertula” of the bryozoan Bugula neritina” *Appl. Environ. Microbiol*., **2001**, 67, 4531-4537

Duckworth, A.R.; Battershill, C.N.; Schiel. D, R.“Effects of depth and water flow on growth, survival and bioactivity of two temperate sponges cultured in different seasons" *Aquaculture*, **2004**, 242, 237-250.

Duckworth, A.R., Battershill, C.N. “Developing farming structures for production of biologically active sponge metabolites” *Aquaculture*, **2003a**, 217, 139-156.

Duckworth, A.R., Battershill, C.N. “Sponge aquaculture for the production of biologically active metabolits: the influence of farming protocols and environment” *Aquaculture,* **2003b**, 221, 311-329.

Duckworth, A.R.; Battershill, C.N.; Schiel, D.R.; Bergquist, P.R. “Farming sponges for the production of bioactive metabolites” *Mem. Qld. Mus.*, **1999**, 44, 155-159.

Duckworth, A.R., Battershill, C.N. Bergquist, P.R. “Influence of explant procedureres and environmental factors on culture of three sponges” *Aquaculture*, **1997**, 156, 251-260.

Faulkner, D. J. “Marine natural products” *Nat. Prod. Rep.,* **1983-2002**, 9, 323-364.

Faulkner, D. J.; Ghiselin, M. T. *Mar. Ecol. Prog. Ser*. **1983**, 13, 295.

Ferrati, C.; Pizzorno, M.; Pronzato, R.; Manconi, R.; Duckworth, A.R. “In vitro sponge culture: morphological changes in the aquiferous system of the Mediterranean sponge species *Agelas oroides*” *Abstracts, 7th Int. Sponge Symp.*, Río de Janeiro, 7-13 mayo **2006a**.

Ferrati, C.; Vacca. S.; Pronzato, R.; Manconi, R.; Duckworth, A.R. “Sponge culture in a small harbour: the case study of the demosponges *Agelas oroides* (Agelasida) and *Petrosia ficiformis* (Haplosclerida) in the W-Mediterranean” *Abstracts, 7th Int. Sponge Symp*., Río de Janeiro, 7-13 mayo **2006b**.

Florence, G. J.; Gardner, M. N.; Paterson, I. “Development of practical Syntheses of the marine anticancer agents discodermolide and dictyostatin” *Nat. Prod. Rep.,* **2008**, 25, 342–375.

Frederich, M.; Tits, M.; Angenot. L. “Potential antimalarial activity of indole alkaloids” *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **2008**, 102, 11—19.

Garson, M.L. “Biosynthetic studies on marine natural products” *Nat. Prod. Rep*., **1989**, 6, 143-170.

Gul, W.; Hamann, M. T. “Indole alkaloid marine natural products: An established source of cancer drug leads with considerable promise for the control of parasitic, neurological and other diseases” *Life Sciences,* **2005**, 78, 442 – 453.

Gunasekera, S. P.; Gopal, K. P.; Longley, R.; Isbrucker, R. A.; Pomponi, S. “Five new discodermolide analogues from the marine sponge *Discodermia* Species”. *J. Nat. Prod.,* **2002**. 65, 1643-1648.

Gunasekera, S. P.; Gunasekera, M.; McCarthy, P. J. “Discobahamins A and B, new peptides from the Bahamian deep water marine sponge *Discodermia sp*.” *J. Nat. Pro.,* **1994**, 57(1), 79-83.

Gunasekera, S. P.; Gunasekera, M.; McCarthy, P. J. “Discodermide: A New macrocyclic from the marine sponge *Discodermia dissoluta*” *J. Org. Chem.,* **1991**, 55, 4830-4833.

Gunasekera, S. P.; Gunasekera, M.; Longley, R.; Schulte, G. K. “Discodermolide: A New bioactive polyhydroxylated lactone from the marine sponge *Discodermia dissoluta*” *J. Org. Chem*., **1990**. 55, 4912-4915.

Hadas, E.; Shpigel, M.; Ilan, M. “Sea ranching of the marine sponge *Negombata magnifica* (Demospongiae, Latrunculiidae) as a first step for latrunculin B mass production” *Aquaculture*, **2005**, 244, 159-169.

Haefner, B. “Drugs form the deep: marine natural products as candidates” *Drug Discovery Today*, **2003**, 8, 536-544.

Haslem, E. “Secundary metabolism-fact and fiction” *Nat. Prod. Rep.,* **1986**, 3, 217-249.

Hausmann, R.; Vitello, M.P.; Leitermann, F.; Syldatk, S. “Advances in the production of sponge biomass. *Aplysina aerophoba*. A model sponge for ex situ sponge biomass production” *J. Biotechnol.*, **2006**, 124, 117-127.

Honore, S.; Kamath, K.; Braguer, D.; Horwitz, S.B.; Wilson, L.; Briand, C.; Jordan, M.A. “Synergistic supression of microtuble dynamics by discodermolide and paclitaxel in non-small cell lung carcinoma” *Cancer Res*, **2004**, 64, 4957-4964.

Hung, G.S.; Lopez-Barcons, L.; Perez-Soler, R.; Freeze, S.; Smith III, A.B.; Goldberg, G.L.S.; Horowitz, B.; McDaid, H. “Potentiation of Taxol efficacy by Discodermolide in ovarian carcinoma xenograft-bearing mice” *Clin. Cancer Res.,* **2006**, 12, 298-304.

Hung, D. T.; Nerenberg, J. B.; Schreiber, S. L. “Syntheses of Discodermolides Useful for Investigating Microtubule Binding and Stabilization”, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 11054–11080.

Hung, D.T., Nerenberg, J.B., and Screiber, S.L. “Distinct binding and cellular properties of synthetic (+)- and (−)-discodermolides” *Chem. Biol.*, **1994**,1, 67-71.

Ilan, M.; Contini, H.; Carmeli, S.; Rinkevich, B. “Progress towards cell cultures from marine sponges that produce bioactive compounds” *J. Mar. Biotechnol.*, **1996**, 4, 145-149.

Karté, B. K. “Biomedical potential of marine natural products” *BioScience*, **1996**, 46, 271-286.

Kato.Y.; Fusetani, N.; Matsunaga, S.; Hashimoto, K.; Koseki, K. “Isolation and structure elucidation of calyculins B, C, and D, novel antitumor metabolites, from the marine sponge *Discodermia calyx*” *J. Org. Chem.,* **1988**, 53, 3930-3932.

Kato.Y.; Fusetani, N.; Matsunaga, S.; Hashimoto, K.; Fujita, S.; Furuya, T. “Calyculin A, a novel antitumor metabolite from the marine sponge *Discodermia calyx*” J*. Am. Chem. Soc*.,**1986**, 108, 2780-2781.

Kijjoa, A.; Sawangwong, P. “Drugs and cosmetics from the sea” *Mar. Drugs,* **2004**, 2, 73-82.

Kinder, F. R., Jr.; Kapa, P. K.; Loeser, E. M. WO 2,002,098,843, **2002.**

Kinder, F. R., Jr.; Bair, K. W.; Ramsey, T. M.; Sabio, M. L. WO 2,003,014,102, **2003**.

Klautau, M.; Custodio, M.R.; Borojevic, R. “In vitro culture of primary cell lines from marine sponges”. En: Soest, R.W.M. van; van Kempen, T.M.G. (Eds.). “Sponges in space and time”. Ed. A.A. Balkema, Rotterdam, **1994**, p 401-406.

König, G. M.; Wright, A. D. “Marine natural products research: current direction and future potencial” *Planta Med.*, **1996**, 62, 193-210.

Longley, R. E.; Gunasekera, S. P.; Faherty D.; McLane,J.; Dumont, F. “Immunosuppression by discodermolide” *Ann. N. Y. Acad. Sci.,* **1993***,* 696**,** 94–107.

Marshall, J. M.; Johns, B. A. “Total synthesis of (+)-Discodermolide” *J. Org. Chem.*, **1998**, 63, 7885-7892.

Martello, L. A.; LaMarche, M. J.; He, L.; Beauchamp, T. J.; Smith, A. B., III; Horwitz, S. B. “The relationship between Taxol and (+)-discodermolide: synthetic analogs and modeling studies” *Chem. Biol*. **2001**, 8, 843–855.

Martello, L.A.; McDaid, H.M., Regl, D.L.; Yang, C.-P- H.; Meng, D.; Pettus, T.R.R.; Kaufman, M.D.; Arimoto, H.; Danishefsky, S.J.; Smith III, A.B.; Horwitz, S.B. “Taxol and discodermolide represent synergistic drug combination in human carcinoma cell lines” *Clin. Cancer Res*., **2000**, 6, 1978-1987.

Matsunaga, S.; Fujiki, H.; Sakata, D. Fusetani, N. “Calyculins E, F, G, and H, additional inhibitors of protein phosphatases 1 and 2a, from the marine sponge *Discodermia calyx*” *Tetrahedron*, **1991**, 47(18-19), 2999-3006.

Matsunaga, S. ; Fusetani, N.; Konosu, S. “Discodermins F-H, cytotoxic and antimicrobial tetradecapeptides from the marine sponge *Discodermia kiiensis*: Structure revision of discodermins A-D” *J. Nat. Prod.,* **1985**, 48, 236.

Mayer, M.S.; Hamann, M. T. “Marine pharmacology in 2001–2002: Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action” *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, **2005**, 140(3-4), 265 – 286.

Mayer, M. S.; Gustafson, K. R. “Marine pharmacology in 2005–2006: Antitumour and cytotoxic compounds” *European journal of cancer,* **2008**, 44, 2357-2387.

Mendola, D. “Aquaculture of three phyla of marine invertebrates to yield bioactive metabolites: process developments and economics” *Biomol. Eng.,* **2003**, 20, 441-458.

Mickel, J. S.; Niederer, D.; Daeffler, R.; Osmani, A.; Kuesters, E.; Schmid, E.; Schaer, K.; Gamboni. R.“ Large-Scale Synthesis of the Anti-Cancer Marine Natural Product (+)-Discodermolide. Part 5: Linkage of Fragments C_{1-6} and C_{7-24} and Finale” Organic Process Research & Development, **2004**, 8, 122-130.

Mita, A.; Lockhart, C.; Chen, T.-L.; Bochinski, K.; Curtright, J.; Cooper, W.; Hammond, L.; Rothenberg, M.; Rowinsky, E.; Sharma, S. "A phase I pharmacokinetic (PK) trial of XAA296A (Discodermolide) administered every 3 wks to adult patients with advanced solid malignancies" *J. Clin. Oncol.,* **2004** ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition), 22(14S), 2025 (resumen y diapositivas).

Moser, B.R. "Review of cytotoxic cephalostatins and ritterazines: isolation and synthesis" J. Nat. Prod., 2008, 71, 487-491.

Müller, W.E.G.; Grebenjuk, V.A.; Le Pennec, G.; Schröder, H.-C.; Brümmer, F.; Hentchel, U.; Müller, I.M.; Breter, H.-J. "Sustainable production of bioactive compounds by sponges-Cell culture and gene cluster approach: a review" Mar*. Biotechnol*., **2004**, 6(2), 105-117.

Müller, W.E.G.; Böhm, M.; Batel, R.; De Rosa, S.; Tommonaro, G.; Müller, I.; Schröder, H.C. "Application of cell culture for the production of bioactive compounds from sponges: synthesis of avarol by primmorphs from *Dysidea avara*" *J. Nat. Prod.*, **2000**, 63, 1077-1081.

Müller, W.E.G.; Wiens, M.; Batel, R.; Steffen, R.; Schröder, H.C.; Borojevic, R.; Custodio, M.R. "Establishment of a primary cell culture from a sponge: primmorphs from *Suberites domuncula*" *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **1999**, 178, 205-219.

Müller, W.E.G.; Wimmer, W.; Schatton, W.; Böhm, M.; Batel, R.; Filic, Z. "Initiation of an aquaculture of sponges for the sustainable production of bioactive metabolites in open systems: example*, Geodia cydonium*" *Mar. Biotechnol.,* **1999b**, 1, 569-579.

Nakao, Y., Takada, K.; Matsunaha, S.; Fusetani, N. "Calyceramides A-C: neuraminidase inhibitory sulfated ceramides from the marine sponge *Discodermia calyx*. *Tetrahedron*, **2001**, 57: 3013 -3017.

Nerenberg, J. B.; Hung, D. T.; Somers, P. K.; Schreiber, S. L. "Total synthesis of the immunosuppressive agent (-)-Discodermolide" *J. Am. Chem. Soc*. **1993**, 115, 12621-12622.

Newman, D. J.; Cragg, G. M. "Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years" *J. Nat. Prod,* **2007**, *70*(3), 461-477.

Osinga, R.; de Beukelaer, P.B.; Meijer, E.M.; Tramper, J.; Wijffels, R.H. "Growth of the sponge Pseudosuberites (aff.) andrewsi in a closed system" *J. Biotechnol*., **1999a**, 70, 155-161.

Osinga, R.; Redeker, D.; De Beukelaer, P.B.; Wijffels, R.H. "Measurement of sponge growth by the projected body area and the underwater weight" *Mem Qld. Mus.,* **1999b**, 44, 155-159.

Osinga, R.; Tramper, J.; Wijffels, R.H. “Cultivation of marine sponges” *Mar. Biotechnol.*, **1999c**, 1, 509-532.

Page, M.J.; Northcote, P.T.; Webb, V.L.; Mackey, S.; Handley, S.J. “Aquaculture trials for the production of biologically active metabolites in the New Zealand sponge Mycale hentscheli (Demospongiae: Poecilosclerida)” *Aquaculture*, **2005**, 250, 256-269.

Paterson, I.; Delgado, O.; Florence, G. J.; Lyothier, I.; O’Brien, M.; Scott, J. P.; Sereinig, N. “A Second-Generation Total Synthesis of (+)-Discodermolide: The Development of a Practical Route Using Solely Substrate-Based Stereocontrol” *J. Org. Chem.*, **2005**, 70, 150–160.

Paterson, I.; Florence, G. “The development of a practical total synthesis of discodermolide, a promising microtubule-stabilizing anticancer agent” *Eur. J. Org. Chem.*, **2003**, 12, 2193-2208.

Paterson, I.; Florence, G. J.; Gerlach, K.; Scott, J. P.; Sereinig, N. “A Practical Synthesis of (+)-Discodermolide and Analogues: Fragment Union by Complex Aldol Reactions” *J. Am. Chem. Soc.,* **2001**, 123, 9535–9544.

Paterson, I.; Florence, G. J.; Gerlach, K.; Scott, J. P. “Total synthesis of the antimicrotubule agent (+)-discodermolide using boron-mediated aldol reactions of chiral ketones” *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 377-380.

Paterson, I.; Gibson, K. R.; Oballa, R. M. *Tetrahedron Lett*. **1996**, 37, 8585–8588.

Paul, G. K.; Gunasekera, S. P.; Longley, R. E. ; Pomponi S. A. “Theopederins K and L. Highly potent cytotoxic metabolites from a marine sponge Discodermia species” *J. Nat. Prod.,* **2002,** 65(1), 59-61.

Paul, V. J.;Puglisi, M. P. “Chemical mediation of interactions among marine organisms” *Nat. Prod. Rep.,* **2004**, 21, 189-209.

Pawlik, J.R. “Marine Invertebrate Chemical Defenses” *Chemical Reviews*, **1993**, 93, 1911-1922.

Pomponi, S.A. “Biology of the Porifera: cell culture” *Can. J. Zool*., **2006**, 84, 167-174.

Rinkevich, B.; Ilan, M.; Blisko, R. “Further steps in the initiation of cell cultures from embryos and adult sponge colonies. In Vitro Cell” *Dev. Biol. – Animal*, **1998**, 34, 753-756.

Sidri, M.; Mendola, D.; Wijffels, R.H.; Osinga, R. “Development of closed-systems for high density culture of the Mediterranean sponge *Dysidea avara* (Demospongiae) for its pharmaceutically-important metabolite, Avarol” *Abstracts, 7th Int. Sponge Symp*., Río de Janeiro, 7-13 mayo **2006**.

Sipkema, D., Blanch, H.W.; Wijffels, R.H. “Large-scale production of pharmaceuticals by marine sponges: sea, cells or synthesis?” *Abstracts, 7th Int. Sponge Symp.*, Río de Janeiro, 7-13 mayo **2006**.

Smith III, A. B.; Xian, M. “Design, synthesis, and biological evaluation of simplified analogues of (+)-Discodermolide Additional insights on the importance of the diene, the C(7) hydroxyl, and the lactone” *Org. Lett.*, **2005**, 7(23), 5229-5232.

Smith III, A. B.; Freeze, S.; Xian,M.; Hirose, T. “Total Synthesis of (+)-Discodermolide: A Highly Convergent Fourth-Generation Approach" *Org. Lett*. **2005b**, 7, 1825-1828.

Smith III, A. B.; Freeze, B. S.; Brouard, I.; Hirose, T. “A Practical Improvement, Enhancing the Large-Scale Synthesis of (+)-Discodermolide: A Third-Generation Approach” *Org. Lett*., **2003**, 5, 4405-4408.

Smith III, A. B.; Kaufman, M. D.; Beauchamp, T. J.; LaMarche, M. J.; Arimoto, H. “Gram-Scale Synthesis of (+)-Discodermolide” *Org. Lett.*, **1999**, 1, 1823-1826.

Smith III, A. B.; Qiu, Y.; Jones, D. R.; Kobayashi, K. “Total synthesis of (-)-Discodermolide” *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117: 12011-12012.

Sun, L.; Song, Y.; Qu, Y.; Yu, X.; Zhang, W. “Purification and in vitro cultivatoin of archeocytes (stem cells) of the marine sponge *Hymeniacidon pervele* (Demospongiae)” *Cell Tissue Res.*, **2006**, 328, 223-237.

Sun, H. H.; Sakemi, S. “A brominated (Aminoimindazolinyl) indole from the sponge *Discodermia polydiscus*” *J. Org. Chem.,* **1991**, 5, 4307-4308.

Tada, H. Tozyo, T. ; Terui, Y. ; Hayashi, F. “Discokiolides. Cytotoxic Cyclic Depsipeptides from the Marine Sponge *Discodermia kiiensis*” *Chem. Lett.*, **1992**, 431.

ter Haar, E.; Kowalski, R. J. ; Hamel, E.; Lin C. M.; Longley, R. E.; Gunasekera, S. P.; Rosenkranz, H. S.; Day, B. W. “Discodermolide, a cytotoxic marine agent that stabilizes microtubules more potently than Taxol” *Biochemistry*, **1996**, 35, 243–250.

Wakimoto, F.; Matsunaga, S.; Takai, A.; Fusetani, N. “Insight into binding of calyculin A to protein phosphatase 1: isolation of hemicalyculin A and chemical transformation of calyculin A” *Chem. Biol*., **2002**, 9, 309-319.

Wani, M.C.; Taylor, H,L.; Wall, M,E.; Coggin, P.; McPhail, A.T. “Plant antitumor agents: VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*” *J. Amer. Chem. Soc.,* **1971**, 93, 2325-2327.

Wolff, C.; Duckworth, A.R., Evans-Illidge, E.; Battershill, C.N. “Growth and recovery in two wild donor sponge candidates for indigenous in situ dyctioceratid bath sponge aquaculture in the Palm Island group, North Queensland, Australia” *Abstracts, 7th Int. Sponge Symp*., Río de Janeiro, 7-13 mayo **2006**.

Zea, S. y W.H. De Weerdt. *Haliclona* (Haliclona) *epiphytica* n. sp. (Porifera, Demospongiae, Haplosclerida), a seaweed-dwelling sponge from the Colombian Caribbean. Beaufortia, **1999**, 49, 171-176.

CAPÍTULO II

VALIDACIÓN Y EVALUACIÓN DE UNA METODOLOGÍA POR HPLC, PARA LA CUANTIFICACIÓN DEL POTENTE ANTIMITÓTICO (+)-DISCODERMÓLIDO EN LA ESPONJA MARINA *Discodermia dissoluta.*

Andrea Katherine Valderrama Pereira

Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C.

akvalderramap@unal.edu.co

RESUMEN

La esponja marina *Discodermia dissoluta* es fuente del potente antimitótico (+)-discodermólido. Al encontrarse en Santa Marta, Colombia, poblaciones a profundidades menores que en otras áreas del Caribe, se iniciaron estudios tendientes a evaluar opciones de suministro de este metabolito a partir de estas poblaciones naturales. En este trabajo se validó una metodología analítica para la cuantificación de (+)-discodermólido usando HPLC-UV en fase reversa. El protocolo involucró liofilización, extracción exhaustiva con metanol, partición en agua:diclorometano, limpieza de la fracción orgánica en cartuchos de RP-18, de donde se obtiene la fracción metanol:agua (80:20 v/v) con todo el (+) discodermólido presente. Esta fracción se inyectó en el HPLC usando columna RP-18 Xterra y detección a 235nm. La curva de calibración fue lineal en el rango de concentración estudiado, pudiéndose calcular los límites de detección (0.646 µg/mL) y cuantificación (1.96 µg/mL). La precisión intra e inter días presentó desviaciones estándar relativas menores al 5 % y la exactitud determinada como porcentaje de recuperación fue de 99,4 %. Para determinar su utilidad se analizaron seis muestras de esponja del Caribe, tres recolectadas en Santa Marta (Colombia), una en Bahamas, una en Bonaire y otra en Curazao, obteniéndose concentraciones de (+)-discodermólido entre 5.3 y 27.2 µg/g esponja húmeda. Los valores de concentración obtenidos para individuos recolectados en Santa Marta son similares a las de las otras áreas del Caribe, lo que permite, junto con un acceso más fácil al recurso natural, que en esta zona de nuestro país se puedan desarrollar ensayos (por ejemplo maricultura) para resolver el problema de suministro. La metodología de análisis es rápida, sencilla y

permite la cuantificación del (+)-discodermólido en *D. dissoluta* procedente de medios naturales o de cultivos *in situ*.

Palabras clave: *Discodermia dissoluta,* (+)-discodermólido, HPLC-UV, maricultura.

1. INTRODUCCIÓN

El (+)-discodermólido (Figura 1), corresponde a una lactona polihidroxilada aislada por primera vez en 1990 por Gunasekera y colaboradores en el HBOI (*Harbor Branch Oceanographic Institution)* de la esponja del Caribe *Discodermia dissoluta.* Se determinó que este compuesto inhibía la proliferación *in vitro* de células de leucemia P-388 e inhibía el crecimiento de *Candida albicans* (Gunasekera *et al*., 1990). Estudios posteriores confirmaron que el (+)-discodermólido poseía actividad antiproliferativa (Longley *et al.,* 1993; Ter Haar *et al.,* 1996), además de ser un potente agente antimitótico. En 2004 se determinó que el mecanismo de acción antitumoral es similar al de paclitaxel (droga comercial Taxol®), e involucra su unión a la subunidad β-tubulina, estabilizando los microtúbulos y previniendo su dinámica en la formación del huso acromático, lo que trae como consecuencia la detención de la mitosis en la fase G2/M, y suprime la división celular llevando a la muerte natural de las células (apoptosis) y a la eliminación natural de los residuos (Honore *et al.,* 2004). También, se determinó que el (+)-discodermólido es efectivo en inhibir *in vitro* líneas celulares cancerígenas resistentes al paclitaxel y a la epotilona, y se ha encontrado que actúa de manera sinérgica en combinación con paclitaxel, disminuyendo la dosis efectiva y por ende su toxicidad. Todo lo anterior ha evidenciado que el (+)-discodermólido es promisorio para el tratamiento del cáncer, completando la fase I de los estudios de clínicos (Karté 1996; Martello *et al.,* 2000; Haefner 2003; Kijjoa y Sawangwong 2004, Hung *et al.,* 2006).

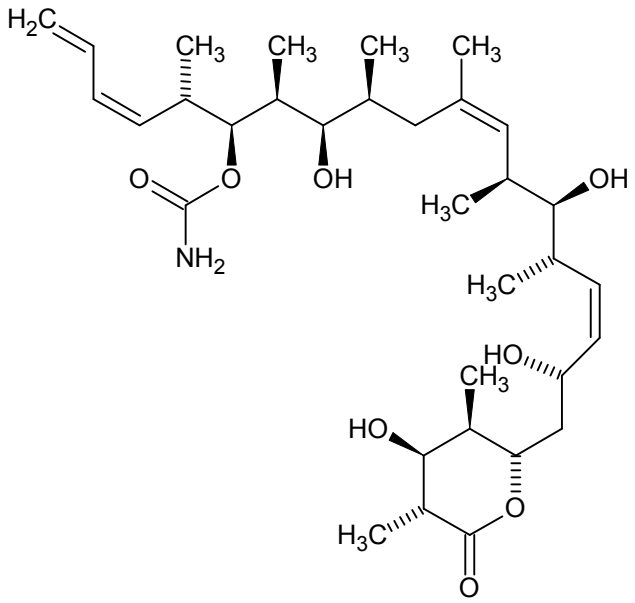


Figura 1. Estructura de (+)-discodermólido

A pesar de estar demostrado que el (+)-discodermólido puede ser útil para el tratamiento del cáncer, su estudio con humanos se detuvo porque se detectó algo de pneutoxicidad (Mita *et al.,* 2004). Estudios médicos complementarios o alternativos se encuentran retrasados por el problema de suministro del compuesto, tanto por el costo de la síntesis, como porque la esponja sólo produce naturalmente unos poco miligramos, y las poblaciones originalmente estudiadas en el Mar Caribe son dispersas y en general se encuentran a profundidades mayores a 30 m (Borges *et al.,* 1994), lo que hace que el acceso a ellas sea costoso y complicado. Su cosecha natural no sería suficiente para continuar con la investigación médica y tampoco sería una fuente sustentable para su comercialización. Adicionalmente, a pesar de los múltiples esfuerzos de síntesis, no se ha logrado una ruta que pueda ser utilizada para la producción a nivel industrial (Smith y Freeze 2008; Florence *et al.,* 2008). Una alternativa viable para solucionar el problema de suministro (*supply*) es recurrir al cultivo de organismos en el mar (maricultura), o generar alternativas biotecnológicas de cultivo *in vitro* de tejidos, lo que permitiría obtener cantidades suficientes de biomasa del organismo, y por métodos de extracción convencionales obtener mayores cantidades del metabolito (Hadas *et al.,* 2000; Page *et al.,* 2005; Admas *et al.,* 2006; Ferrati *et al.,* 2006). Afortunadamente, recientemente se determinó que en el área de Santa Marta,

en el Caribe colombiano, existe una población de *D. dissoluta* a menor profundidad (desde 12-15 m) y en densidades intermedias comparadas con las poblaciones de otras áreas exploradas en el mar Caribe (Ruiz 2009; Ruiz y Zea 2009), que aunque no sostendrían una explotación comercial, permitirían adelantar ensayos de cultivo y otros ensayos biotecnológicos.

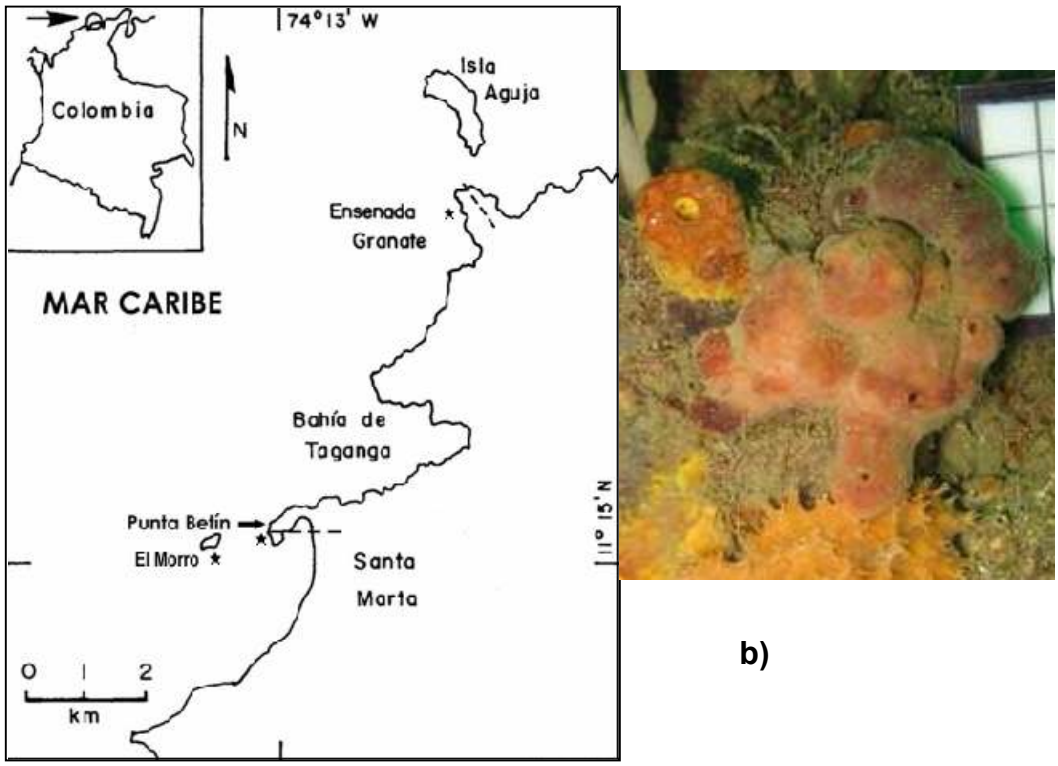
Para evaluar las concentraciones naturales, sus fuentes de variación, y la eficiencia de cultivos *in situ* e *in vitro*, en este trabajo se desarrolló por primera vez una metodología analítica que permite la cuantificación del (+)-discodermólido presente en las esponjas *Discodermia dissoluta* tanto de poblaciones naturales como de individuos obtenidos por cultivo.

2. Materiales y métodos

2.1. *Material animal*

Las muestras de la esponja *Discodermia dissoluta* fueron recolectadas mediante buceo autónomo por el Dr Sven Zea, en el Morro y Granate en el área de Santa Marta en el Caribe colombiano (Figura 2), entre octubre y noviembre de 2008, a profundidades entre 18 y 21 m. Un ejemplar de referencia de la esponja se encuentra depositado en el Instituto de Ciencias Naturales - Museo de Historia Natural, colección Porifera, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia (ICN-MHN (po) 0158).

Los especímenes obtenidos en aguas de Bahamas, Bonaire y Curazao fueron recolectadas por personal del Harbor Branch Oceanographic Institution, entre mayo de 2000 y abril de 2005, a profundidades entre 23 y 36 m.



a) b)

Figura 2. a) Área de estudio, Santa Marta-Caribe Colombia. Los asteriscos representan las localidades donde se recolectaron las esponjas *D. dissoluta*. b) imagen de *D. dissoluta* tomada en campo.

2.2. *Materiales y reactivos*

El metanol utilizado para al proceso cromatográfico fue grado HPLC (Mallinckrodt). El agua utilizada se purificó con un sistema Milli Q (Millipore). Todas las soluciones preparadas para ser inyectadas en el HPLC fueron filtradas a través de membranas de PVDF de 0.45 µm (National Scientific Company) antes de ser usadas. Los demás solventes utilizados fueron grado R.A (Mallinckrodt). Para el fraccionamiento del extracto de diclorometano se utilizó sílica gel (SiO_2, 0.063-0.200 mm, Merck). La limpieza de los extractos se realizó en cartuchos RP-18 (LiChrolut RP-18 40-63 µm, 500mg, Merck)

2.3. *Condiciones cromatográficas*

La cuantificación del (+)-discodermólido se realizó en un equipo de HPLC Merck-Hitachi, con bomba Merck-Hitachi L-6000A, detector de longitud de onda fija Merck-Hitachi L-4250 y un automuestreador Merck-Hitachi 8108350-02, empleando un software Merck-Hitachi Model D-7000.

La columna cromatográfica seleccionada fue Xterra 250 mm x 4.6 mm, 5 µm. La composición de la fase móvil utilizada fue una mezcla MeOH:H_2O (50:50, v/v), ésta se desgasificó utilizando ultrasonido (15 minutos) y posteriormente se filtró a través de membranas de 0.47 µm (Millipore). El flujo de la fase móvil fue de 1.0 mL/min, y se inyectaron 50 µL de cada solución. El tiempo de análisis fue de 30 minutos, la longitud de onda de detección 235 nm. Todas las medidas se realizaron a temperatura ambiente (22±2°C) y por triplicado.

2.4. *Extracción y Purificación del* (+)-*discodermólido*

El primer paso fue determinar la presencia de (+)-discodermólido en especímenes de *D. dissoluta* recolectados en Colombia. Para lo anterior una muestra de 1.1 Kg de *D. dissoluta* recolectada en Santa Marta se limpió, se cortó en trozos de aproximadamente 1 cm^3, se liofilizó, y se extrajo mediante maceración exhaustiva con metanol. El extracto obtenido se filtró y concentró a presión reducida a una temperatura de 40ºC.

El siguiente paso fue fraccionar el extracto obtenido, monitoreando por CCD y emplendo como patrón una muestra de (+)-discodermólido suministrada por HBOI. Así, el extracto crudo se sometió a partición líquido-líquido con agua-diclorometano; la fracción orgánica (2,48 g) que contenía el compuesto de interés se fraccionó sobre sílica gel empleando cromatografía en columna (CC) al vacío, para ello se usó un gradiente discontinuo de solventes (hexano, hexano-benceno, benceno, benceno-acetato de etilo, acetato de etilo, acetato de etilo-metanol y metanol). La fracción eluída con acetato de etilo:metanol 50:50 v/v. Se purificó por HPLC preparativo hasta obtener 5.9 mg de un sólido blanco con el mismo tiempo de retención del patrón de (+)-

discodermólido. Para completar la identificación del compuesto éste se analizó por espectrometría de masas de alta resolución, ^{1}H RMN, y $[\alpha]_D^{20}$.

2.5. *Caracterización de* (+)-*discodermólido.*

El espectro de RMN ^{1}H fue registrado a 750 MHz (Espectrómetro Varian Inova 750 campo magnético de 17.61 T). La muestra se disolvió en $CDCl_3$ y se utilizo TMS como estándar interno. Se determinaron los desplazamientos químicos (δ) en ppm y las constantes de acoplamiento (*J*) en Hz. El espectro de masas de alta resolución fue registrado en un espectrómetro Bruker Microtof ESI – TOF. La rotación óptica fue registrada en un polarímetro Polartronic E, Schmidt+Haensch. La concentración se expreso como g/100 mL y el disolvente usado fue metanol.
El compuesto obtenido y caracterizado de la manera anterior se empleó como patrón para el proceso de cuantificación que se describe.

2.6. *Soluciones patrón y curva de calibración*

El (+)-Discodermólido no se consigue comercialmente, por lo cual se empleó el obtenido de la fuente natural como patrón para construir la curva de calibración. Así, con el (+)-discodermólido aislado y purificado, se preparó una solución stock en metanol (118 µg/mL), la cual se guardó a 4°C. Las soluciones estándar de trabajo se prepararon diariamente, por una dilución apropiada de la solución stock en fase móvil. Para hacer la curva de calibración se tomaron los volúmenes necesarios para obtener soluciones de concentración 118, 59.0, 32.6, 29.5, 23.6, 11.8, 5.90, 2.96 y 1.44 µg/mL. Cada solución fue inyectada por triplicado.

2.7. *Limpieza de extractos de esponjas para cuantificación.*

Cada especímen de *D. dissoluta*, al que se le quería determinar la concentración de (+)-discodermólido, se pesó en húmedo, se le midió su volumen, por desplazamiento en una probeta, se liofilizó, se pesó en seco, y posteriormente se extrajo tres veces con metanol a temperatura ambiente, el residuo se calcinó a 500 °C, y se peso. Los extractos metanolicos obtenidos se mezclaron, y se concentraron a 40°C en un

rotavapor, luego se pesaron. El extracto total así obtenido se sometió a partición líquido-líquido entre agua y diclorometano; la fracción acuosa se liofilizó y guardó; la fracción orgánica se concentró a 40°C y se pesó. Una porción de la fracción orgánica se pesó (20 mg aprox) y luego se pasó a través de un cartucho RP-18 (500 mg) para retirar las grasas y otras impurezas que pueden interferir en el análisis por RP-HPLC. Los solventes utilizados para eluir los compuestos de los cartuchos fueron metanol:agua (80:20 v/v), metanol y acetonitrilo:acetona (50:50 v/v). La fracción de metanol:agua, que contiene todo el (+)-discodermólido, se inyectó en el HPLC-UV para su posterior cuantificación.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo por primera vez se validó una metodología eficiente y selectiva para la cuantificación de (+)-discodermólido en muestras de *D. dissoluta*. Hay pocos estudios de cuantificación de metabolitos para muestras donde la matriz es una esponja (Kalifa *et al.,* 2006), este tipo de validaciones es más común en muestras de otro origen biológico (Zhou *et al.,* 2008; Samanidou *et al.,* 2009), en industria de alimentos (Deng *et al.,* 2009), e incluso en metabolitos de plantas (Lyra *et al.,* 2007), entre otros. En este caso en particular, no se posee información de una metodología para la limpieza de los extractos de las muestras de esponja por lo tanto es necesario además de validar la metodología, hacer el diseño del proceso de aislamiento y limpieza de los extractos. A continuación se discuten cada una de las partes del procedimiento y los resultados obtenidos

3.1. *Extracción e identificación de (+)-discodermólido*

El primer objetivo de este trabajo era determinar la presencia del (+)-discodermólido en la esponja *D. dissoluta* del Caribe Colombiano. Para esto fue necesario realizar la extracción y purificación del (+)-discodermólido, iniciando con una extracción con metanol, seguida de una partición líquido-líquido entre diclorometano y agua, y posterior fraccionamiento de la fracción de diclorometano sobre silica gel. Mediante monitoreo por CCD y RMN ^{13}C se determinó cual fracción contenía el (+)-discodermólido, y por último ésta se purificó mediante HPLC en fase reversa. Después de tener el compuesto

puro, éste se caracterizó por RMN ^{1}H, $[\alpha]_D^{20}$ y espectrometría de masas de alta resolución (Anexo 1). Los valores de desplazamiento químico de los protones en ^{1}H-RMN, el signo y la magnitud de la rotación óptica, y el valor obtenido para ión pseudomolecular $[M+Na]^+$ en ESI de alta resolución permitieron confirmar que el metabolito aislado efectivamente corresponde al (+)-discodermólido. Lo anterior porque mediante su comparación con los valores publicados por Paterson y Lyothier en 2004 (Paterson y Lyothier 2004), se encontró que estos se correspondían exactamente. A continuación se presentan los datos.

(+)-Discodermólido aislado como un sólido blanco con un ^{1}H NMR (750 MHz, $CDCl_3$) δ=H: 6.62 (1H, ddd, *J* = 16.8, 10.5, 10.5 Hz), 6.04 (1H, dd, *J* = 11.1, 11.1 Hz), 5.53 (1H, dd, *J*= 11.0, 8.0 Hz), 5.43 (1H, dd, *J* = 10.6, 10.5 Hz), 5.36 (1H, dd, *J* = 10.5, 10.4 Hz), 5.22(1H, d, *J* = 16.8Hz), 5.17 (1H, d, *J* = 9.9 Hz), 5.13 (1H, d, *J* = 10.2 Hz), 4.75 (1H, ddd, *J*= 7.3, 7.3, 2.1 Hz), 4.71 (1H, dd, *J* = 7.1, 4.1 Hz), 4.63 (1H, ddd, *J* = 10.0, 9.8, 1.7 Hz),4.61 (2H, m), 3.75 (1H, m), 3.29 (1H, dd, *J* = 4.9, 4.7 Hz), 3.20 (1H,dd, *J* = 6.0, 4.4 Hz), 3.00 (1H, m), 2.80 (1H, m), 2.68 (1H, dq, *J* = 7.1, 4.5 Hz), 2.63 - 2.57 (1H, m), 1.71(1H, m), 1.65 (3H, s), 1.32 (3H, d, *J* = 7.4 Hz), 1.08 (3H, d, *J* = 6.9 Hz), 1.02 (3H, d, *J* =6.7 Hz), 1.00 (3H, d, *J* = 7.1 Hz), 0.99 (3H, d, *J* = 7.4 Hz), 0.95 (3H, d, *J* = 6.8 Hz), 0.83(3H, d, *J* = 5.8 Hz).

Masas (+)HRESI: $[M+Na]^+$ experimental 616.3795, $[M+Na]^+$ calculada 616.3819.
$[M+Na]^+$=$C_{33}H_{55}NO_8Na$.
$[\alpha]_D^{20}$: +16.6 (c: 1.22 ,CH_3OH)

3.2. *Extracción, Limpieza y cuantificación*

Un paso importante en la cuantificación de un compuesto presente en una matriz compleja, como es el caso del (+)-discodermólido en el extracto de la esponja *D. dissoluta*, es el diseño de de una metodología rápida y selectiva para extraer el metabolito de interés, muchas veces también es necesario incluir un proceso de limpieza de la muestra. A continuación se discute el proceso que mejores resultados proporcionó, no obstante es importante aclarar que se emplearon varios métodos con

diferentes tipos de extracción (líquido-líquido), y se ensayaron otros eluentes y fases estacionarias. La extracción se realizó de manera exhaustiva empleando metanol a temperatura ambiente y sin agitación, el proceso de extracción se repitió tres veces (24 horas cada extracción) usando dos veces el volumen de solvente con respecto a la esponja que quiere ser extraída. Mediante HPLC se estableció que después de la tercera extracción no hay metabolito en la esponja lo que garantiza que el proceso es exhaustivo. Luego, el extracto metanólico se sometió a partición líquido-líquido entre diclorometano y agua; se determinó, mediante HPLC, que el (+)-discodermólido sólo estaba presente en la fracción orgánica. Para la limpieza de los extractos orgánicos, se emplearon aproximadamente 20 mg de extracto por vez, se usaron cartuchos RP-18 (500 mg), previamente tratados con metanol:agua (80:20 v/v) y se utilizaron 6 mL de cada uno de los sistemas de elución: metanol:agua (80:20 v/v), metanol, y acetonitrilo:acetona (50:50 v/v). Se estableció, mediante HPLC que en la fracción eluída con metanol:agua 80:20 v/v se encontraba el (+)-discodermólido y se comprobó que éste solo estaba en esta fracción y no había presencia del compuesto en las otras fracciones (anexo 2).

Después de determinar la metodología de limpieza, la fracción que contiene el metabolito se cuantificó mediante HPLC. El sistema utilizado fue una columna RP-18 con elución isocrática metanol:agua (50:50 v/v). En la figura 3 se muestra un cromatograma típico de la fracción que contiene el (+)-discodermólido. Se puede observar que el pico del analito es simétrico y tiene resolución mayor a 1.5, la cual adecuada para una correcta cuantificación.

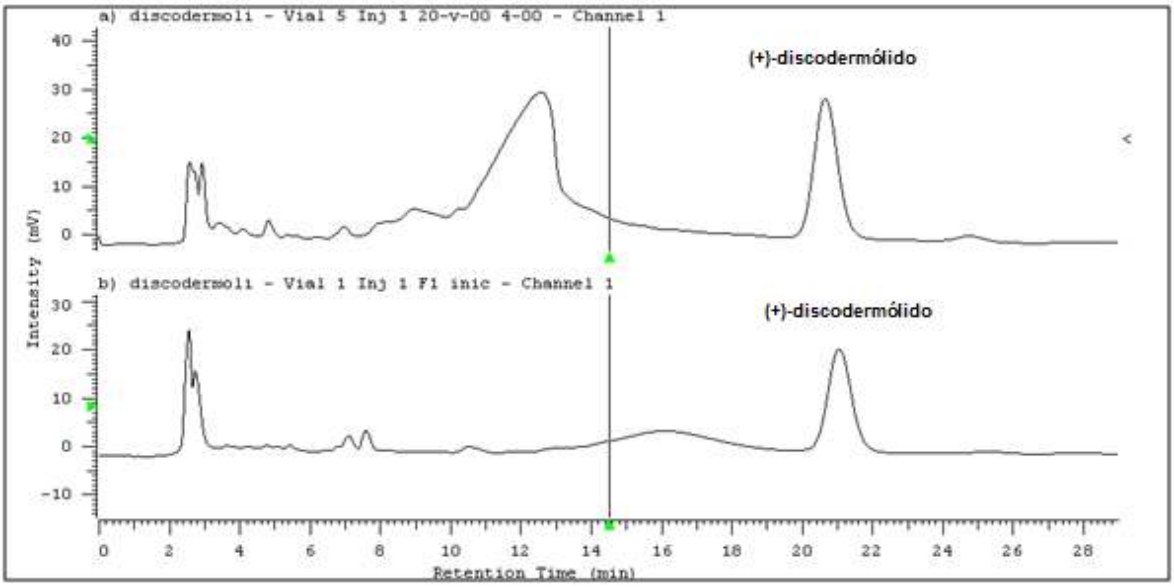


Figura 3. Cromatograma de la fracción del extracto orgánico de *D. dissoluta* eluída con metanol:agua (80:20). Condiciones cromatográficas: columna Xterra 250 mm x 4,6 mm, 5 µm, Composición de la fase móvil MeOH:H_2O (50:50, v/v) a 1mL/min. Longitud de onda de detección λ=235nm, (a) Cromatograma para *D. dissoluta* recolectada en Bahamas (b) Cromatograma para *D. dissoluta* recolectada en Santa Marta.

3.3. *Validación de la metodología*

La validación de la metodología analítica para la cuantificación de (+)-discodermólido se realizó teniendo en cuenta las recomendaciones dadas por ICH en el 2005 para cuantificación (Normas ICH). Los parámetros evaluados fueron linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, precisión intra-día (repetibilidad), precisión entre-días (precisión intermedia) y exactitud (recuperación).

3.3.1. *Linealidad*

La linealidad fue evaluada construyendo una curva de calibración que relacionó la concentración de nueve soluciones estándar de (+)-discodermólido, en el rango de 1.44 a 118 µg/mL, con el área del pico en HPLC. El rango de concentraciones para construir la curva fue seleccionado teniendo en cuenta la cantidad de (+)-discodermólido aislado por Gunasekera y colaboradores en 2002. Se generó el modelo lineal simple de la forma Área= concentración*b +a (siendo a el intercepto y b la pendiente), mediante regresión (mínimos cuadrados), el ajuste de los datos al modelo se evaluó utilizando el

coeficiente de determinación r^2. El valor de r^2 (99.9567) y la significancia estadística de la pendiente (p=0.0001) indican la existencia de una relación lineal entre la variable dependiente y la independiente. Adicionalmente, el valor de la pendiente indica que el método tiene una sensibilidad adecuada (b=17012.3) La ecuación de la curva de calibración se presenta en la Tabla 1(Anexo electrónico 1).

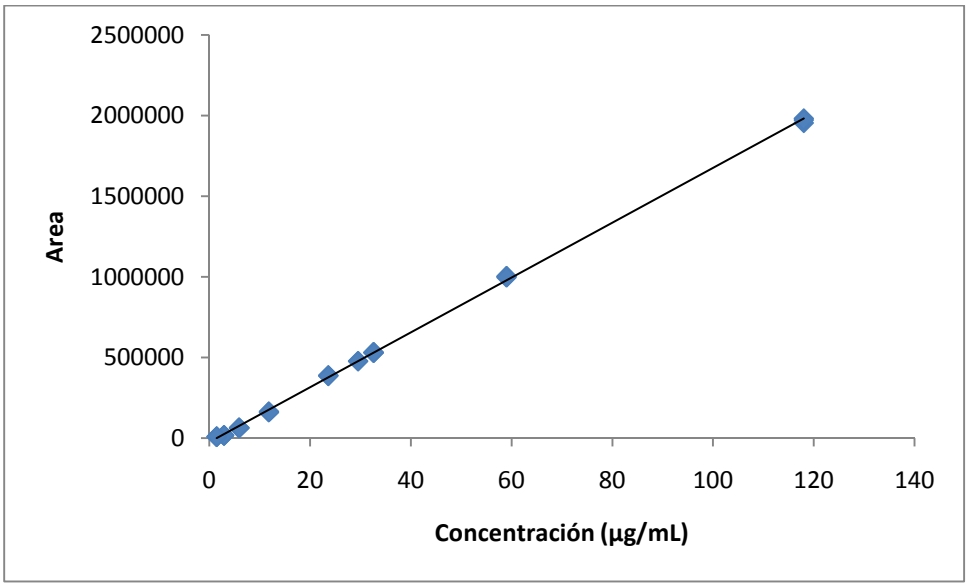


Figura 4. Curva de Calibración del (+)-discodermólido. Área vs. Concentración. Cada punto corresponde al promedio de (n=3).

3.3.2. *Límite de detección y límite de cuantificación*

El límite de detección (LD) es la mínima cantidad de analito que puede ser detectada con un nivel aceptable de confianza, pero no la necesaria para ser cuantificable. El límite de cuantificación (LC), es la cantidad mínima de analito que puede ser cuantificada con un nivel aceptable de precisión y exactitud. Estos parámetros se determinaron utilizando información proporcionada por la ecuación de la curva de calibración (*vide infra*) y se calcularon mediantes las siguientes ecuaciones.

$$LD=3.3\times Sa/b \qquad LC=10\times Sa/b$$

Donde b es la pendiente y Sa es la desviación estándar del intercepto. Datos que se obtienen al realizar el análisis estadístico de la regresión (Long y Winefordner

1983).Estos datos se presentan en la Tabla 1 y fueron calculados con ayuda del programa STATGRAPHICS 5.1.

Tabla 1. Parámetros de linealidad, Límite de detección y límite de cuantificación (n=3).

Parámetro	Valor
Ecuación de regresión	y= 17012.3x – 25999.7
Coeficiente de determinación	99.9567
Significancia de la pendiente (b)	p=0.0001
Desviación estándar del intercepto (Sa)	3331.4
Coeficiente de correlación (r)	0.9998
Límite de Detección	0.646 µg/mL
Límite de Cuantificación	1.96 µg/mL

3.3.3. *Precisión y exactitud*

La precisión fue determinada como precisión intra-día (repetibilidad) y precisión entre-días (precisión intermedia). Las tres concentraciones seleccionadas para estos análisis se eligieron con el fin de evaluar todo el rango de concentraciones de la curva de calibración. Así, la repetibilidad fue evaluada con la inyección de 3 soluciones estándar de distinta concentración, en un mismo día. Cada solución se inyectó por triplicado y se evalúo la desviación estándar relativa (%Cv, o RSD =Desviación estándar*100/promedio) de la respuesta del equipo (valores de área). Los resultados obtenidos (Tabla 2) permiten establecer que la metodología analítica tiene una buena repetibilidad ya que en todos los casos se obtienen RSD < 5%, sin importar la concentración empleada [27]. La precisión intermedia se determinó por el análisis de tres soluciones estándar de distinta concentración, inyectadas por triplicado en tres días distintos. Los valores de RSD son también menores al 5% en todos los casos (Tabla 2), lo que indica que la metodología cuanta con buena precisión entre-días, en todo el rango de concentración estudiado.

Tabla 2. Evaluación de la precisión intra-día (repetibilidad) (n=3) e inter días (precisión intermedia) (n=9).

Concentración (µg/mL)	Repetibilidad (RSD*)			Precisión intermedia (RSD*)
	día 1	día 2	día 3	
5.90	2.79	3.51	0.61	3.40
29.5	0.82	0.98	0.25	2.31
59.0	0.37	0.38	0.55	2.72

* Desviación estándar*100/promedio

Para determinar el efecto de la matriz en el método de cuantificación se preparó un extracto de *D. dissoluta*, siguiendo el protocolo de extracción y limpieza antes descrito (*vide infra*). Se tomaron 300 µL de la fracción eluída con MeOH:$H_2$0 (80:20), obtenida después de la limpieza del extracto, y se inyectaron por triplicado en el HPLC-UV. Luego se tomaron otros 300 µL de la fracción eluída con MeOH:$H_2$0 (80:20), y se mezclaron con 300 µL de solución stock de 118 µg/mL, y se inyectaron por triplicado. Finalmente, se inyectó por triplicado la solución stock de 118 µg/mL. EL porcentaje de recuperación se determinó suponiendo que el 100% de recuperación corresponde al área dada por la siguiente ecuación:

Área mezcla=área solución stock/2 + área del extracto/2

El área de la mezcla solución stock y extracto de *D. dissoluta* (1316796) se relacionó con el área teórica expresada como el promedio del área de la solución stock (19694378) y el área del extracto de *D. dissoluta* (679864). El porcentaje de recuperación hallado es de 99,4%, esto indica que el método cuenta con buena exactitud, y que no existe un efecto significativo de la matriz en la cuantificación del (+)-discodermólido en las muestras de extractos de *D. dissoluta* (Anexo 2).

3.4. *Concentración de* (+)-*discodermólido en muestras de D. dissoluta.*

Después de validar la metodología analítica para la cuantificación del (+)-discodermólido, y encontrar que ésta es precisa, exacta y reproducible, se procedió a

retarla evaluando la concentración de este metabolito en tres muestras de *D. dissoluta* recolectadas en la bahía de Santa Marta (Caribe colombiano), más una muestra recolectada en Bahamas, otra recolectada en Bonaire y una final recolectada en Curazao. En la Tabla 3 se presentan los resultados de esa cuantificación en función del peso húmedo de la esponja y del peso liofilizado (o peso seco); además se proporciona la fecha, el lugar, y la profundidad de la recolección. Lo anterior permitió verificar que el método es útil para la cuantificación de este metabolito en muestras de *D. dissoluta* obtenidas de ambientes naturales. De otro lado esta metodología nos permitía evaluar la variación en la concentración del metabolito en función de la localidad donde se recolecta la esponja y explorar la existencia, o no, de diferentes quimiotipos de *D. dissoluta* en el mar Caribe (*vide ultra*).

En 2002 cuando se estableció por primera vez la concentración de (+)-discodermólido en *D. dissoluta*, se hizo en un material recolectado en Bahamas, encontrándose una concentración de 10.3 µg/g de peso húmedo; no obstante el estudio en mención no buscaba cuantificarlo, por lo que no se hizo con los procedimientos que requiere una medida cuantitativa. En nuestro estudio se encontró que la concentración del material de Bahamas fue de 17.8 µg/g, lo cual es superior al encontrado previamente. Esta diferencia se puede entender como la combinación de dos factores, la posible variabilidad natural de *D. dissoluta* (p.ej., en Santa Marta la concentración de los tres individuos medidos varió entre 5.3 y 27.2 µg/g), y a que los métodos de cuantificación son diferentes entre este trabajo y el original. Al comparar los datos de concentración de (+)-discodermólido en *D. dissoluta* para los tres individuos recolectados en el Caribe norte (Bahamas, Curazao y Bonaire) con las 40 muestras de *D. dissoluta* recolectadas en el Caribe colombiano (Capítulo III) se concluyó que la concentración entre ellas es similar (Tabla 3, anexo electrónico 2). De lo anterior, la conclusión más relevante es que la población de *D. dissoluta* de Santa Marta en el Caribe colombiano, al tener concentraciones similares a las de otras áreas, se presta para realizar intentos de cultivo marino o de desarrollo biotecnológico, pues su disponibilidad es mayor por habitar a profundidades menores. Es más, su presencia en aguas más someras se constituye en una ventaja comparativa con Bahamas, Bonaire y Curazao, en donde las

esponjas deben ser recolectadas mediante buceo especializado o sumergibles, aumentado la complejidad y el costo del estudio.

Preliminarmente, con respecto a la variación en la composición química de las esponjas analizadas, encontramos que el perfil cromatografico por HPLC no es igual entre las esponjas de Colombia y las otras muestras estudiadas, lo que nos da un primer indicio de presencia de quimiotipos distintos en estas regiones. No obstante debe profundizarse más en este estudio.

Tabla 3. Concentración de (+)-discodermólido en muestras de *D. dissoluta* del Caribe[1].

Muestra	Fecha de recolección	Localidad	Profundidad (m)	µg/g esponja húmeda	µg/g esponja seca
1	12-XI-08	Morro-Colombia	20.4	5.3	19.5
2	5-X-08	Granate-Colombia	18.0	19.8	90.9
3	13-XI-08	Morro-Colombia	20.7	27.2	157.0
4	10-IV-05	Bahamas	24.4	17.8	124.4
5	16-V-00	Bonaire	35.8	22.6	131.6
6	20-V-00	Curazao	23.8	22.7	134.8

4. CONCLUSIONES

Se ha desarrollado una metodología para la cuantificación de (+)-discodermólido, utilizando cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa, que es precisa, exacta y sensible. Esta metodología puede ser utilizada para la cuantificación de (+)-discodermólido en esponjas procedentes de ambientes naturales, y de cultivos *in situ*, y permite determinar de manera rápida y sencilla la concentración del metabolito en muestras individuales.

La concentración de (+)-discodermólido en muestras de *D. dissoluta* recolectadas en Santa Marta, en el Caribe colombiano, es de magnitud similar a la hallada para poblaciones de otras áreas del Caribe. La poca profundidad en la que habitan las poblaciones en Santa Marta permite que éstas se presten para realizar aproximaciones

[1] Los datos se reportan como µg/g esponja húmeda o µg/g esponja seca debido a que no fue posible calcinar las muestras de Bahamas, Bonaire y Curazao y por lo tanto los datos no se pueden expresar como µg/g esponja seca libre de ceniza, como se hace con los datos del capítulo III.

experimentales que permitan, a un futuro mediano, desarrollar una fuente sustentable de (+)-discodermólido, como por ejemplo la acuicultura *in situ* de *D. dissoluta*.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresamos nuestros agradecimientos a la Universidad Nacional de Colombia (proyecto DIB 10763), a COLCIENCIAS por la financiación del proyecto (1101-405-20180), a la universidad de Santiago de Compostela (España), por el registro del espectro RMN ^{1}H y por el espectro de masas de alta resolución; y al profesor Flavio Reginatto (Universidad Federal de Santa catalina) por su orientación para realizar este trabajo.

5. BIBLIOGRAFIA

Adams, C.; Stevely, J; Sweat, D. “An evaluation of the financial feasibility of small-scale commercial sponge culture in Pohnpei, Federate States of Micronesia” *Abstracts, 7th Int. Sponge Symp.*, Río de Janeiro, 7-13 mayo **2006**.

Borges, K., Robinson, E. V., Gunasekera, S. P., Gunasekera, M., Gulavita, N. K., Pomponi. S. A. *Biochem. Syst. Ecol,.* “Species differentiation in the marine sponge genus *Discodermia* (Demospongiae, Lithistida): the utility of ethanol extract profiles as species-specific chemotaxonomic markers” 1994, 22 (4), 353-365.

Deng, S.; West, B. J.; Jensen, C. J.; Basar, S.; Westendorf. “Development and alidation of an RP-HPLC method for the analysis of anthraquinones in noni fruits and leaves” *J. Food Chem.*, **2009**,116, 505–508.

Ferrati, C.; Pizzorno, M.; Pronzato, R.; Manconi, R.; Duckworth, A.R. “In vitro sponge culture: morphological changes in the aquiferous system of the Mediterranean sponge species *Agelas oroides*” *Abstracts, 7th Int. Sponge Symp.*, Río de Janeiro, 7-13 mayo **2006**.

Gunasekera, S. P.; Gunasekera, M.; Longley, R.; Schulte, G. K. “Discodermolide: A New bioactive polyhydroxylated lactone from the marine sponge *Discodermia dissoluta*” *J. Org. Chem.*, **1990**. 55, 4912-4915.

Hadas, E.; Shpigel, M.; Ilan, M. “Sea ranching of the marine sponge *Negombata magnifica* (Demospongiae, Latrunculiidae) as a first step for latrunculin B mass production” *Aquaculture*, **2005**, 244, 159-169.

Haefner, B. “Drugs form the deep: marine natural products as candidates” *Drug Discovery Today*, **2003**, 8, 536-544.

Honore, S.; Kamath, K.; Braguer, D.; Horwitz, S.B.; Wilson, L.; Briand, C.; Jordan, M.A. “Synergistic supression of microtuble dynamics by discodermolide and paclitaxel in non-small cell lung carcinoma” *Cancer Res*, **2004**, 64, 4957-4964.

Hung, G.S.; Lopez-Barcons, L.; Perez-Soler, R.; Freeze, S.; Smith III, A.B.; Goldberg, G.L.S.; Horowitz, B.; McDaid, H. “Potentiation of Taxol efficacy by Discodermolide in ovarian carcinoma xenograft-bearing mice” *Clin. Cancer Res.,* **2006**, 12, 298-304.

ICH - International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (1996) “*Validation of Analytical Procedure: Methodology*”. Ed. ICH, London, pags.1-10.

Karté, B. K. “Biomedical potential of marine natural products” *BioScience*, **1996**, 46, 271-286.

Khalifa, S.; Ahmed, S.; Mesbah, M.; Youssef, D.; Hamann, M. “Quantitative determination of latrunculins A and B in the Red Sea sponge *Negombata magnifica* by high performance liquid chromatography” *J. Chromatogr. B,* **2006**, 832, 47–51.

Kijjoa, A.; Sawangwong, P. “Drugs and cosmetics from the sea” *Mar. Drugs,* **2004**, 2, 73-82.

Long, G. L., Winefordner, J. D. *Anal. Chem., “*Limit of detection: a closer look at the IUPAC definition” 1983, 55, 713A.

Longley, R. E.; Gunasekera, S. P.; Faherty D.; McLane,J.; Dumont, F. “Immunosuppression by discodermolide” *Ann. N. Y. Acad. Sci.,* **1993***,* 696**,** 94–107.

Lyra, D. P.; Lira, A. A.; Aquino, T. M.; Soares, L. A.; Santana, D. P.; “Development and Validation of a Chromatographic Method for the Determination of Biflorin obtained from *Capraria biflora* Roots” *Lat. Am. J. Pharm.* **2007**, 26 (1), 125-129.

Martello, L.A.; McDaid, H.M., Regl, D.L.; Yang, C.-P- H.; Meng, D.; Pettus, T.R.R.; Kaufman, M.D.; Arimoto, H.; Danishefsky, S.J.; Smith III, A.B.; Horwitz, S.B. “Taxol and discodermolide represent synergistic drug combination in human carcinoma cell lines” *Clin. Cancer Res*., **2000**, 6, 1978-1987.

Mickel, J. S.; Niederer, D.; Daeffler, R.; Osmani, A.; Kuesters, E.; Schmid, E.; Schaer, K.; Gamboni. R.“ Large-Scale Synthesis of the Anti-Cancer Marine Natural Product (+)-Discodermolide. Part 5: Linkage of Fragments C_{1-6} and C_{7-24} and Finale” Organic Process Research & Development, **2004**, 8, 122-130.

Mita, A.; Lockhart, C.; Chen, T.-L.; Bochinski, K.; Curtright, J.; Cooper, W.; Hammond, L.; Rothenberg, M.; Rowinsky, E.; Sharma, S. “A phase I pharmacokinetic (PK) trial of XAA296A (Discodermolide) administered every 3 wks to adult patients with advanced solid malignancies” *J. Clin. Oncol.,* **2004** ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition), 22(14S), 2025 (resumen y diapositivas).

Page, M.J.; Northcote, P.T.; Webb, V.L.; Mackey, S.; Handley, S.J. “Aquaculture trials for the production of biologically active metabolites in the New Zealand sponge Mycale hentscheli (Demospongiae: Poecilosclerida)” *Aquaculture*, **2005**, 250, 256-269.

Paterson, I.; Lyothier, I. “Total Synthesis of (+)-Discodermolide: An Improved Endgame Exploiting a Still-Gennari-Type Olefination with a C1-C8 β-Ketophosphonate Fragment” *Org. Lett*., **2004**, 6 (26), 4933-4936.

Ruiz, C.A. 2009. Aspectos ecológicos de la población de Discodermia dissoluta (Porifera: Demospongiae: Lithistida) en Santa Marta, Caribe colombiano. Tesis profesional (Biología Marina), Univ. Jorge Tadeo Lozano, Santa Marta, 42 págs.

Ruiz, C.A., Zea. S. *Bol. Inv. Mar. Cost.,* "Historia natural de la esponja *discodermia dissoluta* (porifera: demospongiae: lithistida) en santa marta, caribe colombiano" Sometido

Samanidou, V. F.; Giannakis, D. E.; Papadaki, A. "Development and validation of an HPLC method for the determination of seven penicillin antibiotics in veterinary drugs and bovine blood plasma"*J. Sep. Sci*., **2009**, 32, 1302 – 1311.

ter Haar, E.; Kowalski, R. J. ; Hamel, E.; Lin C. M.; Longley, R. E.; Gunasekera, S. P.; Rosenkranz, H. S.; Day, B. W. "Discodermolide, a cytotoxic marine agent that stabilizes microtubules more potently than Taxol" *Biochemistry*, **1996**, 35, 243–250.

Zhou, W.; Li, J.; Li, X.; Yan, Q.; Zhou, P. "Development and validation of a reversed-phase HPLC method for quantitative determination of ginsenosides Rb1, Rd, F2, and compound K during the process of biotransformation of ginsenoside Rb1" *J. Sep. Sci.,* **2008**, 31, 921 – 925.

CAPÍTULO III

POTENCIAL DE UN SISTEMA DE ACUICULTURA *in situ* DE LA ESPONJA DEL CARIBE COLOMBIANO *Discodermia dissoluta*: CRECIMIENTO, SUPERVIVENCIA Y COMPUESTOS BIOACTIVOS

Andrea Katherine Valderrama Pereira

Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C.

akvalderramap@unal.edu.co

RESUMEN

Los productos naturales marinos son una rica fuente de metabolitos secundarios útiles en la industria farmacológica, cosmética y a nivel industrial. El mayor problema que se presenta en su aplicación industrial es la baja concentración en la que usualmente se encuentran en los organismos, y lo poco abundante de sus poblaciones (problema de suministro o "*supply problem*"). Como alternativas de suministro se puede llevar a cabo la acuicultura del organismo productor, la síntesis química, la fermentación del microorganismo productor para producir el compuesto o intermediarios avanzados, etc. La esponja marina del Caribe *Discodermia dissoluta* produce el (+)-discodermólido, un potente antimitótico potencialmente útil para el tratamiento de cáncer. Para evaluar opciones suministro de esta molécula para investigación y desarrollo, en este trabajo se evaluaron las concentraciones naturales en la población local del área de Santa Marta, Caribe colombiano, y se realizaron pruebas para cultivar la esponja *in situ* a partir de fragmentos. Usando un protocolo de cuantificación previamente desarrollado, se determinó cómo varía la producción natural del (+)-discodermólido con las condiciones ambientales naturales en las que vive cada individuo como profundidad, época de recolección, presencia de epibiosis, tipo de sustrato y localidad. Se encontró que las concentraciones naturales son en general bajas (53.0 μg/g y 722 μg/g esponja libre de ceniza), siendo mayores más cerca de las fuentes de descarga continental, y mayor en los individuos sin epibiosis que en aquellos colonizados por otros organismos. Para el cultivo, tres grupos de fragmentos se ubicaron *in situ* en bolsas de malla plástica (3 cm de ojo) que se colgaron de cuerdas 0.5-1 m sobre el fondo marino. Luego de seis

meses, la supervivencia general de los explantes fue del 93.2 %, el crecimiento fue en promedio del 16.8 ± 3.5 % en volumen y hubo un aumento promedio de 42.4 ± 21.9 % en la concentración de (+)-discodemólido. Empero, eliminando un grupo que sufrió una caída accidental de la estructura, el crecimiento en los otros dos grupos fue 19.8 ± 2.9 y el 38.6 ± 6.8 % en volumen, y la concentración de (+)-discodermólido aumentó en 21.0 ± 16.2 y 80.3 ± 42.8 %, respectivamente. Se demostró así la viabilidad de cultivo por fragmentos, aunque es necesario probar alternativas *in situ* o *in vitro* que aumenten la producción de biomasa y de metabolito.

Palabras claves: acuicultura, explantes, *D. dissoluta* y (+)-discodermólido.

1. Introducción

Los productos naturales marinos constituyen una rica fuente de compuestos bioactivos. A pesar de que algunos de ellos han mostrado una actividad farmacológica muy prometedora, en general no se cuenta con una fuente sustentable de éstos, lo que hace difícil proporcionar las cantidades necesarias de compuesto para realizar los bioensayos tanto *in vitro* como *in vivo* (Day *et al.,* 2009). El problema es aún más crítico si se pretende suplir el mercado en caso de producirse de manera comercial (Cuevas y Francesch, 2009).

Para resolver el problema suministro ("s*upply problem"* en inglés) se ha recurrido a varias metodologías: la síntesis total y la hemisíntesis, el cultivo de las células productoras, y el cultivo del organismo productor. Esta última se conoce como acuicultura, y puede desarrollarse o en sistemas cerrados (*in vitro*) o directamente en el mar (*in situ*), que también es conocida como maricultura.

La maricultura (acuicultura *in situ*) se hace mediante la recolección de explantes (fragmentos cortados de individuos grandes), a los que se les permite curarse en campo, y luego se fijan al sustrato para que allí se desarrollen. Éstos deben ser ubicados en sitios con buena disponibilidad de alimento, donde puedan crecer hasta tamaños apropiados para su cosecha (Müller *et al.*, 1999). En general esta metodología

aprovecha las condiciones naturales del *hábitat* en las que el invertebrado se desarrolla, aprovechando así la oferta natural de alimento para que se regeneren y crezcan. Hasta ahora parece ser el método más efectivo en términos de costo y eficiencia, especialmente porque con frecuencia la manipulación de los explantes induce una mayor biosíntesis de los metabolitos de interés (Zea *et al.*, 1999; Hadas *et al.*, 2005). No obstante las ventajas del cultivo en campo, éste puede ser afectado por las condiciones ambientales cambiantes, que pueden en ciertos momentos afectar negativamente las esponjas (por ejemplo tormentas, enfermedades, problemas de *fouling*, etc).

Los factores que se deben tener en cuenta para el desarrollo de un cultivo son: la ubicación del cultivo, que debe ser preferiblemente en un área poco expuesta para evitar el arrastre por corrientes; la profundidad; la epibiosis (*fouling*), que deteriora las estructuras y puede afectar el crecimiento de la esponja; la estructura que se utilice de soporte para los explantes; la forma en que se sujetan los explantes a las estructuras; la cantidad de piel (pinacodermo) que se deja en los explantes y el número de cortes que se realicen para obtenerlos (Duckwort *et al.,* 1997; Duckwort y Battershill, 2003). Lo ideal es que el método de recolecta, corte y postura, y el sitio de cultivo promuevan un alto crecimiento e, idealmente, una alta producción de metabolito (Duckworth *et al.*, 1999).

Se han hecho estudios pilotos de maricultura en alrededor de una docena de especies de esponjas. En general se han establecido al menos tres criterios para la evaluación de la eficiencia de estos cultivos: la supervivencia, el crecimiento, y la concentración del metabolito bioactivo. Los resultados hasta el momento no han mostrado tendencias generales, ya que el éxito depende de factores como la especie, la localidad, el tamaño del explante, la estación, la profundidad y la epibiosis, entre otros. Se han encontrado porcentajes de supervivencia desde 23% (Duckworth y Battershill, 2003a) hasta 100% (Voogd, 2007), y porcentajes de crecimiento que indican desde pérdidas de peso (Duckworth *et al.*, 1997) hasta crecimientos del 960% (Duckworth y Battershill, 2003a). Si se tiene en cuenta la producción de los metabolitos bioactivos se encuentran estudios donde la manipulación del organismos aumenta la concentración del metabolito de interés (Hadas *et al.*, 2005), y estudios donde la concentración del

metabolito no cambia significativamente con respecto a la concentración de las esponjas en ambientes naturales (Voogd, 2007), e incluso algunos donde el metabolito o no se produjo o la concentración disminuyó significativamente (Voogd, 2007). Así, algunos pocos cultivos de esponjas han mostrado ser promisorios para la obtención de biomasa y producción de metabolitos, no obstante a la fecha no han sido escalados para la producción industrial.

En este trabajo se presenta por primera vez el diseño de un cultivo *in situ* de la esponja *Discodermia dissoluta* en el Caribe colombiano (Santa Marta). El cultivo de esta esponja se realizó debido a que ésta contiene (+)-discodermólido (Figura 1), una lactona polihidroxilada que posee actividad antiproliferativa (Longley *et al.* 1993), y es efectiva en inhibir *in vitro* líneas celulares cancerígenas resistentes al paclitaxel y a la epotilona, y se ha encontrado que actúa de manera sinérgica, en combinación con paclitaxel, disminuyendo la dosis efectiva y por ende su toxicidad. Todo lo anterior ha evidenciado que el (+)-discodermólido es promisorio para el tratamiento del cáncer. Las investigaciones clínicas llegaron hasta la fase I en humanos con tumores sólidos (Karté, 1996; Martello *et al.*, 2000; Haefner, 2003; Kijjoa y Sawangwong, 2004; Hung *et al.*, 2006). Sin embargo, los estudios clínicos de este metabolito se han detenido debido en parte a su pneumotoxicidad (Mita *et al.,* 2004), y sobre todo por el problema de suministro, ya que sólo se producen cerca de 10 mg de (+)-discodermólido por cada kg de esponja húmeda. En años reciente se han hecho esfuerzos sintéticos (Florence *et al.,* 2008; Smith y Freeze. 2008) que aún no logran satisfacer la demanda para continuar con los estudios clínicos, ni tampoco para una posible producción a escala industrial.

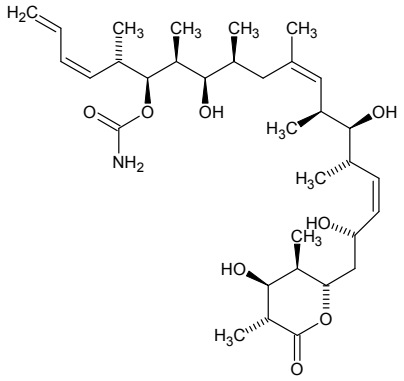


Figura 1 Estructura del (+)-discodermólido.

En un estudio paralelo (Ruiz y Zea, sometido), se estableció que en el área de Santa Marta hay poblaciones de *D. dissoluta* a profundidades de buceo, al contrario de otras áreas del Caribe en donde la esponja vive debajo de los 30 m de profundidad. Por todo lo anterior, y aprovechando la disponibilidad de material vivo en cantidades moderadas en esta área, este trabajo se centró en establecer las condiciones de maricultura más adecuadas para cultivar la *D. dissoluta*, y obtener (+)-discodermólido para continuar los ensayos clínicos o el desarrollo de derivados semisintéticos que permitan potencializar su actividad y disminuir su toxicidad.

2. Materiales y Métodos

2. 1 Descripción del sitio

El Caribe colombiano se localiza en el extremo noroccidental de Suramérica; se extiende desde la frontera Panamá-Colombia, en el Caribe sur-oriental, hasta la frontera Colombia-Venezuela, en el Caribe Nor-Oriental. El área de estudio del presente trabajo abarca desde la parte norte de la bahía de Santa Marta (El Morro y Punta Betín), hasta la parte norte de la ensenada de Granate (Punta Aguja) (Figura 2). La base de trabajo de campo y laboratorio fue el Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras – INVEMAR, en su sede principal de Punta de Betín, en la Bahía de Santa Marta. El trabajo de cuantificación del (+)-discodermólido se desarrolló en Bogotá, en el Laboratorio de Productos Naturales Marinos del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia.

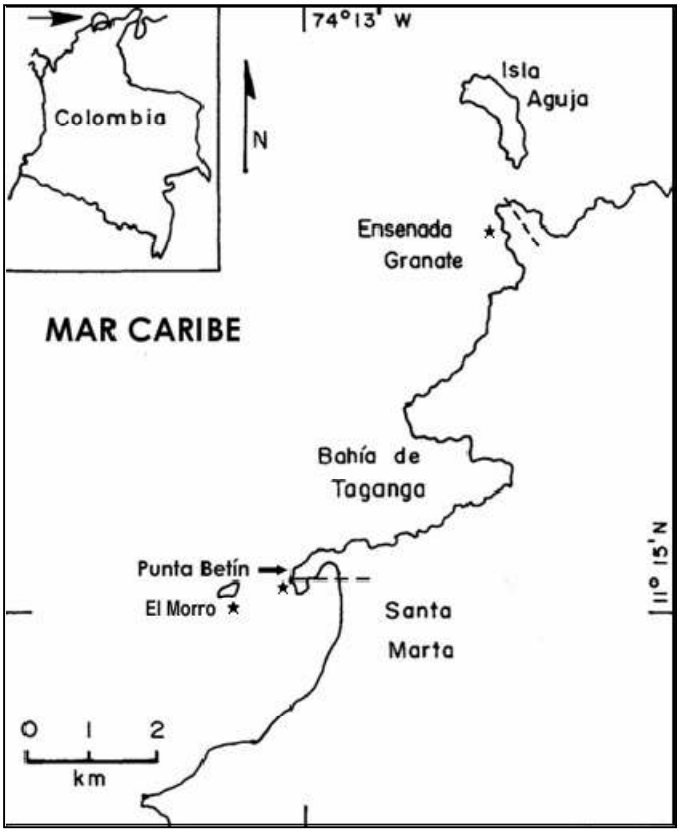


Figura 2. Área de estudio (modificado de Zea, 1993). Los asteriscos marcan los sitios donde se recolectaron las esponjas y la flecha (→) donde se realizó el cultivo.

2.2 ***Concentración Natural*** [2]

Se recolectaron 38 individuos de *D. dissoluta* en las localidades de Morro y Ensenada Granate, a profundidades entre 14 y 24 metros, entre julio de 2008 y junio de 2009. Durante la recolección se anotaron los siguientes factores ambientales: presencia de epibiosis, sustrato donde crece la esponja, época de recolección y localidad. Un ejemplar de referencia de la esponja se encuentra depositado en el Instituto de Ciencias Naturales - Museo de Historia Natural, colección Porifera, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia (ICN-MHN (Po) 0158).

Un factor adicional que quisimos evaluar fue la distribución de (+)-discodermólido al interior de la esponja, comparando la concentración del compuesto de interés en la

[2] La recolección de las muestras, los datos de variables ambientales y fotografías fueron realizadas por el profesor Sven Zea y el estudiante de Biología Marina Cesar Ruiz.

parte inferior con la encontrada en la parte superior. Para esto se recolectaron 6 individuos de *D. dissoluta,* de los cuales fueron separadas, con un escalpelo, la parte superior y la inferior. La parte superior es un tejido blando con pocas espículas, mientras que la parte inferior es un tejido más firme, y constituido mayoritariamente por el esqueleto reticulado de espículas.

La cuantificación de (+)-discodermólido se hizo por HPLC-UV usando el método descrito en el capítulo II.

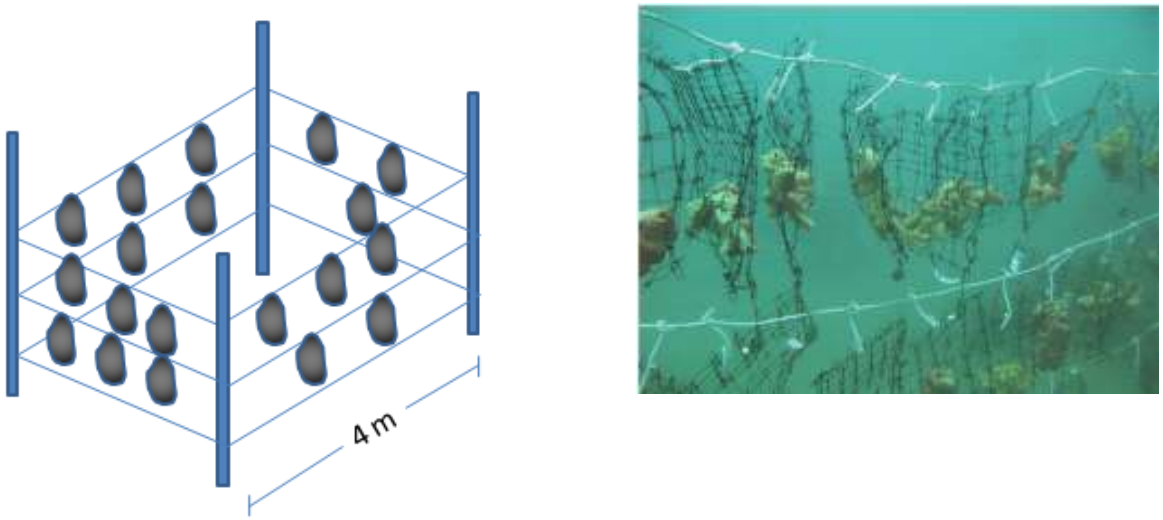
2.3 Cultivo[3]

Se recolectaron fragmentos (denominados como explantes) de 11 individuos medianos a grandes (hasta aprox. 2 L de volumen) de *D. dissoluta* en las localidades de Granate y El Morro. Los explantes se obtuvieron cortándolos directamente de las esponjas donantes usando un cuchillo afilado, dejando siempre una porción de la esponja en su lugar de origen para permitir su regeneración. Los fragmentos se transportaron en bolsas ziploc a Punta de Betín, en la Bahía de Santa Marta, empleando una lancha, en donde fueron ubicados en una canasta rectangular de 150 cm de largo, 50 cm de ancho y 50 cm de alto, localizada en la base del litoral a 18 m de profundidad. Durante algunos días se les permitió curarse y adaptarse. Al cabo de este tiempo se recogieron y llevaron al laboratorio en INVEMAR, cuidando siempre que estuviesen sumergidos en agua de mar, en donde se les midió el volumen inicial por desplazamiento (volumen promedio de 42,6 mL), empleando una probeta de 250 mL adosada a una caja rectangular con tapa hermética diseñada por Ruiz y Zea (sometido), que permitía introducir los explantes enteros y medir su volumen con una precisión de ±2 mL, sin necesidad de sacarlos del agua ni maltratarlos. Un fragmento de cada individuo donante se congeló para ser enviado a Bogotá, y medir en ellos la concentración inicial de (+)-discodermólido. Los demás fragmentos se pusieron en unos bolsillos de malla de nylon de 3 cm de ojo, marcados individualmente con etiquetas plásticas. Posteriormente, se llevaron de nuevo al mar en sus bolsillos y se colgaron en un

[3] La recolección, medida de volumen y cultivo fueron realizados por el profesor Sven Zea y Cesar Ruiz. Mi contribución en este aspecto fue la cuantificación de (+)-discodermólido en las muestras.

cuadrilátero de unos 4 metros de lado, conteniendo cada lado tres líneas de cuerda (Figura 3).

El lugar de cultivo seleccionado fue Punta Betín, en un arenal poco expuesto lejano al tráfico de barcos y pescadores, a 18 metros de profundidad, y en una zona de fácil acceso a los buzos miembros del grupo de investigación desde los cercanos laboratorios de INVEMAR.



a **b**

Figura 3. a. Esquema del cultivo *in situ* de *D. dissoluta* en Punta de Betín. b. Foto de un grupo de fragmentos en el momento de la postura (nótese que están limpios de sedimento y epibiosis).

Se cultivaron tres grupos de explantes (cultivos 1,2 y 3). El primero fue obtenido a partir de tres esponjas donantes, generándose 40 explantes que se sembraron el 21 de octubre de 2008, y se recolectaron el 22 de Abril de 2009. El segundo grupo también fue obtenido a partir de tres esponjas donantes con 40 explantes, sembrado el 15 de diciembre de 2008, y recolectado el 18 de junio de 2009. El tercer grupo fue obtenido a partir de cinco esponjas donantes con 39 explantes, sembrado el 5 de marzo de 2009, y recolectado el 7 de septiembre de 2009[4].

[4] En los anexos se encuentran identificados los explantes según la esponja donante. Así para el cultivo 1, las tres esponjas donantes fueron 27, 09 y CR04, y consta de 40 explantes denominados 27 1-12, 09 1-14 y CR04 1-14. Para el cultivo 2 las esponjas donantes fueron SZ43, SZ57 y 72, y consta de 40 explantes denominados: SZ43 1-14, SZ57 1-12 y 72 1-14. Para el cultivo 3 las esponjas donantes fueron F1, F2, F3, F4, F5, y consta de 39 explantes denominados F1 1-7, F2 1-6, F3 1-13, F4 1-6, F5 1-7.

Luego de seis meses de cada cultivo se recolectaron todos los explantes, y se llevaron al laboratorio para medirles el volumen final. Se seleccionaron al azar tres explantes provenientes de cada esponja donante, que se congelaron y se enviaron a Bogotá para la cuantificación de (+)-discodermólido (*vide ultra*).

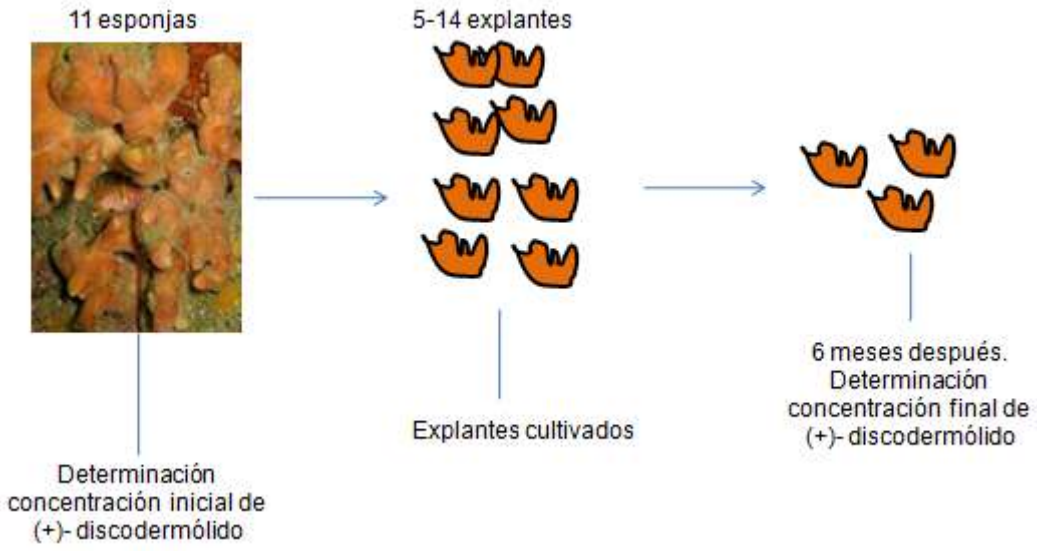


Figura 3. Esquema del proceso, once esponjas donantes de las que se obtuvieron de 5 a 14 explantes, estos explantes se dejaron 6 meses en cultivo. Luego se seleccionaron al azar tres para la cuantificación de (+)-discodermólido.

2.4 Evaluación del cultivo[5]

La evaluación del cultivo se realizó teniendo en cuenta tres factores básicos: la supervivencia, el crecimiento y la concentración de (+)-discodermólido.

a. Para la determinación de la supervivencia de los explantes se estableció el número de explantes muertos, y éstos se restaron del número de explantes que estaban en

[5] Las medidas de crecimiento y supervivencia fueron realizadas por Sven Zea y Cesar Ruiz. La determinación de la concentración de (+)-discodermólido fue realizada como parte integral de este trabajo. El análisis de los datos de crecimiento, supervivencia y cuantificación fueron realizados como parte integral de esta maestría.

el cultivo pasados los seis meses. La superviviencia se expresó en porcentaje como se indica a continuación:

(%) Supervivencia = 100 * (explantes finales-explantes muertos)/explantes finales.

b. El crecimiento de los explantes se determinó como porcentaje del volumen ganado (o perdido) por la esponja durante el tiempo de cultivo. El crecimiento se expresa en porcentaje como se indica a continuación

(%) Crecimiento= 100 * (volumen final-volumen inicial)/volumen inicial

Como medida de crecimiento de la esponja se utilizó el volumen, ya que no todas las esponjas tienen la misma cantidad de agua retenida, y por lo tanto usar la medida de peso húmedo sería inexacta.

c. Concentración de (+)-discodermólido. La concentración de (+)-discodermólido se determinó por HPLC-UV como se indicó en el capítulo II. Para determinar la concentración inicial de (+)-discodermólido se tomó un fragmento de la esponja donante (uno de los explantes dejados sanar que no se incorporó al cultivo). Para determinar la concentración final se tomaron, a los seis meses de cultivo, tres explantes al azar de cada esponja donante.

Adicionalmente, se determinó para cada caso (esponja donante o explante) el peso húmedo, volumen por desplazamiento, peso seco (después de liofilizar), peso del residuo de la esponja calcinada, peso de extracto metanólico, peso de extracto de diclorometano y peso de cada una de las fracciones obtenidas en los cartuchos RP-18 (Estos datos se encuentran en el anexo electrónico 3).

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos fueron realizados con el software Statgraphics 5.1. Las pruebas usadas fueron ANOVA a una, dos y tres vías, prueba t pareada y regresión lineal simple.

Para determinar si las pruebas cumplían con los requisitos de homogeneidad de varianzas entre grupos de muestras, y normalidad de los residuos del modelo, se utilizaron respectivamente la prueba de Cochran y la prueba Chi cuadrado. En caso de no cumplirlos, los datos fueron transformados a logaritmos, $Y= Log_{10}(X+100)$, donde X es la variable analizada y Y el valor transformado.

Para determinar la variación natural en la concentración de (+)-discodermólido se usaron muestras de individuos que fueron recolectados en diferentes situaciones de profundidad, localidad (Morro o Granate) y fecha (clasificados según la época de recolección en Seca o Lluviosa). Adicionalmente, a cada individuo recolectado se le anotó el sustrato (duro vs. arena-cascajo), y si tenía o no epibiontes. Esta no fue una recolección sistemática, en la que había muestras para todos los intervalos de profundidad, en las dos localidades, para las dos épocas, los dos tipos de sustratos y con o sin epibiontes. Sin embargo, para intentar explicar si alguna de estas variables determina en algún grado la variación natural en concentración de (+)-discodermólido, se plantearon análisis estadísticos tomando una o más de ellas, comparando la concentración entre individuos encontrados en las diferentes situaciones para las que hubiera más de un individuo, siendo cada individuo una réplica.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se hará la presentación y discusión de resultados mostrando en primer lugar las variaciones en la concentración natural de (+)-discodermólido teniendo en cuenta los factores ambientales como profundidad, tipo de sustrato, localidad, época de recolección y presencia de epibiosis. Los resultados obtenidos en este primer análisis permitieron establecer las condiciones más adecuadas para el desarrollo de un cultivo

in situ de la esponja *D. dissoluta* en el Caribe colombiano, que permitieron potencializar la producción de este metabolito. Finalmente, se discuten los resultados obtenidos para el cultivo piloto desarrollado en la bahía de Santa Marta.

3.1. Variables naturales y su influencia en la producción de (+)-discodermólido.

Las variables ambientales seleccionadas para este estudio, se eligieron teniendo en cuenta investigaciones previamente realizadas para el desarrollo de sistemas de acuicultura. En la literatura se encuentran ejemplos de estudios de los efectos de algunos factores que afectan el crecimiento, supervivencia y producción de metabolitos secundarios en las esponjas. Algunos ejemplos de estudios de cultivos de esponjas han tenido en cuenta la profundidad, época de siembra, diferentes localidades (expuestas y protegidas), flujo del agua (turbulencia), presencia de epibiosis y tipo de sustrato (artificial y natural) (Hadas *et al.,* 2005; Duckworth *et al.,* 2004; Duckworth *et al.,* 1997; Duckworth *et al.,* 2003; Voogd, 2007). Estos estudios están mayormente enfocados en la obtención de sistemas de acuicultura que tengan altos índices de supervivencia y crecimiento, sin tener muy en cuenta cuál es el efecto del tratamiento propio del cultivo sobre la concentración de los metabolitos secundarios. En la bibliografía se encuentran reportes desde aumento en la concentración del metabolito hasta producción nula de éste (Munro *et al.,* 1999; Page *et al.,* 2005).

A pesar de ser necesario que los explantes crezcan y sobrevivan, debe tenerse en cuenta la variación en la concentración de los metabolitos secundarios ya que el cultivo se implementa con la idea de solucionar el problema de suministro. Por lo anterior, en este trabajo se tuvieron en cuenta los factores profundidad, localidad, tipo de sustrato, presencia de epibiosis y época de recolección, para establecer si estas variables ambientales, además de afectar el crecimiento y la supervivencia de las esponjas, pueden afectar la concentración de (+)-discodermólido.

Para valorar lo anterior se tomaron 38 muestra de *D. dissoluta* en las localidades de Granate y Morro, en Santa Marta. Al recolectar las muestras se registraron las variables ambientales para cada individuo tales como: época de recolección,

profundidad, localidad, tipo de sustrato y presencia de epibiosis. La influencia de estas variables se determinó teniendo en cuenta la variación en la concentración de (+)-discodermólido en cada una de las muestras. En general, la concentración se encuentra en un rango muy amplio, con un mínimo de 53.0 μg/g (peso seco libre de cenizas) y un máximo de 722 μg/g. Por ello, se intentó encontrar los factores que incidieran en las mayores concentraciones, con el fin de recolectar individuos que cumpliesen con las características encontradas y en los lugares más apropiados.

A continuación se presentan los resultados para cada una de las variables usando los estadísticos que permiten obtener la mayor información del sistema de estudio. Inicialmente, se planteó hacer un ANOVA a cinco vías que permitiera correlacionar todas las variables, pero esto no fue posible debido a que no se cuenta con el número de replicas necesarios en cada grupo de datos, lo anterior debido a que estábamos sujetos a las poblaciones naturales. Entonces se realizó el análisis del efecto de la profundidad en la concentración de (+)-discodermólido, utilizando una regresión lineal. Para el análisis de los datos de época de recolección se hizo un ANOVA a una vía con los datos del Morro ya que no se cuenta con datos de época seca para Granate, y se realizó un ANOVA a tres vías con los datos de localidad, tipo de sustrato y presencia de epibiosis (Anexo electrónico 4).

La concentración de (+)-discodermólido puede ser expresada en función del volumen de la esponja (mL), del peso húmedo (g), del peso seco liofilizado (g) y del peso libre de cenizas. Este último es el más adecuado en el caso de *D. dissoluta* ya que permite eliminar el error debido a la estructura propia de la esponja, que tiene más esqueleto en la parte inferior que en la parte superior.

3.1.1. Profundidad

La primera variable analizada fue la profundidad a la cual se recolectaron las muestras. Para este análisis se realizó una regresión lineal entre la concentración y la profundidad (Figura 4). Debido a la poca correlación que existe entre estas dos variables (r^2=0,0011), se puede asegurar que la profundidad, al menos en el rango estudiado, no

afecta de manera significativa la concentración de (+)-discodermólido en las esponjas *D. dissoluta* del Caribe colombiano. Esto nos permite establecer que el cultivo de *D. dissoluta* se puede realizar en cualquiera de las profundidades en las que se recolectó la esponja en los ambientes naturales, es decir entre 14 y 24 m, y ésta no afecta la concentración de (+)-discodermólido.

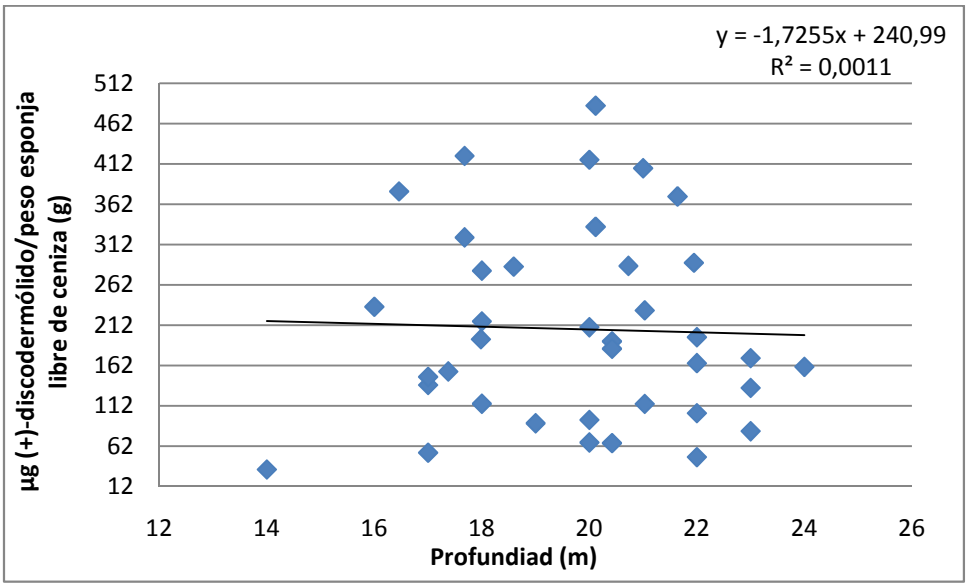


Figura 4. Gráfico de concentración de (+)-discodermólido en función de la profundidad a la cual se recolectaron las esponjas *D. dissoluta* en el Caribe colombiano.

3.1.2. *Época de recolección*

Posteriormente se realizó el análisis de la relación que existe entre la concentración de (+)-discodermólido y la época de recolección (seca: diciembre - abril y lluviosa: mayo - noviembre). Este análisis sólo se pudo realizar con las muestras recolectadas en el Morro debido a que para las muestras recolectadas en Granate sólo se tienen datos para la época lluviosa.

Para este análisis se utilizó un ANOVA a una vía, encontrando que no existe diferencia significativa entre la concentración de (+)-discodermólido en las esponjas recolectadas en las dos épocas aquí estudiadas (Tabla 1; Figura 5). No hay diferencia en la

concentración de (+)-discodermólido recolectado en la época seca (279.5±36.2 µg/g) en comparación con las recolectadas en época lluviosa (219.5±45.4 µg/g).

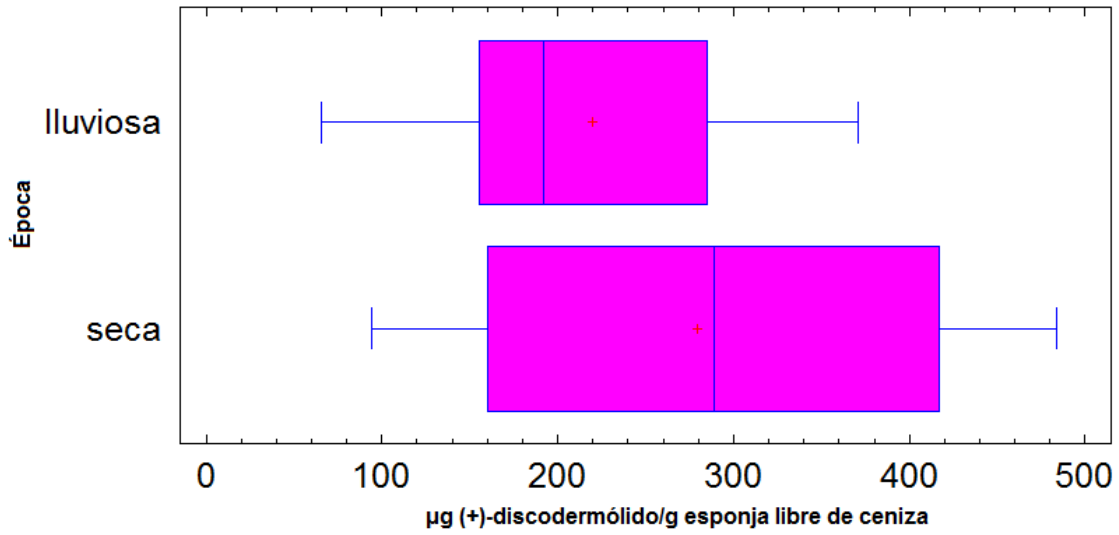


Figura 5. Box plot de la concentración de (+)-discodermólido en esponjas recolectadas en época seca y lluviosa de la localidad del Morro.

Tabla 1. ANOVA a una vía para la concentración de (+)-discodermólido en esponjas recolectadas en el Morro en época seca y lluviosa. Nivel de significancia α = 0,05.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Relación F	Valor P
Entre grupos	15378.0	1	15378.0	1.07	0.3169
Dentro de los grupos	230537.0	16	14408.5		
Total	245915.0	17			

Con este análisis se pretendía estudiar el efecto de la época de recolección sobre la concentración de (+)-discodermólido. Aquí se debe tener en cuenta que se determina es el efecto acumulado de la época anterior a la fecha de recolección. Debido a que no existe variación en la concentración del metabolito con la fecha de recolección, se pudo

inferir que la producción del metabolito probablemente es constante durante todo el año. Por lo tanto, en un sistema de acuicultura *in situ* se puede recolectar la esponja *D. dissoluta* sin importar la época del año, y sólo sería necesario que esta tuviera la cantidad de biomasa necesaria para ser recolectada.

3.1.3. *Sustrato, epibiosis y localidad*

Se realizó un ANOVA a tres vías (tabla 2) para determinar cómo afectan el tipo de sustrato, la epibiosis y la localidad a la concentración de (+)-discodermólido en las esponjas recolectadas. En cuanto a la localidad se encontró que hay mayor concentración de (+)-discodermólido para las esponjas recolectadas en el Morro (315.2±30.6 µg/g) que para las recolectadas en Granate (159.7±24.5 µg/g) (Tabla 2). Esto se puede deber a que en las dos localidades no existan las mismas condiciones ambientales, como por ejemplo disponibilidad de alimento en suspensión (El Morro se encuentra más cerca de Santa Marta, en donde se concentran las descargas continentales en el área, ver Zea, 1994), las comunidades microbianas, temperatura, luz, etc, y por lo tanto la cantidad de (+)-discodermólido producido para la adaptación de la esponja es diferente en cada localidad. Se evidenció entonces que es mejor realizar el cultivo en el Morro, o en una localidad próxima, ya que de esta forma se puede potencializar la producción del metabolito por parte de la esponjas. Con este argumento, y otros de sentido puramente práctico por la cercanía a INVEMAR, se eligió Punta Betín para realizar el cultivo *in situ* de la esponja *D. dissoluta* (Figura 2).

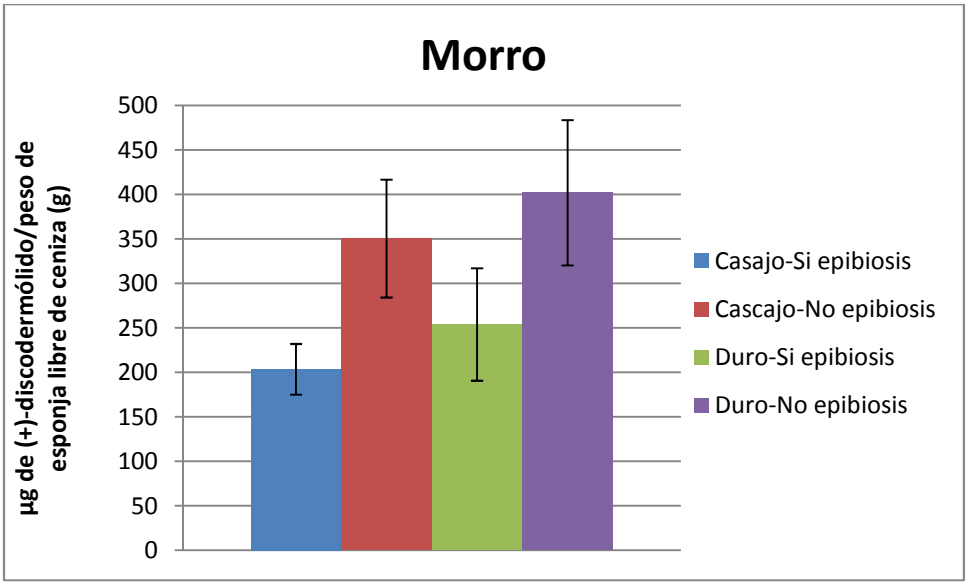
Por otro lado, al evaluar el efecto de la epibiosis los análisis muestran que siempre hay mayor concentración de (+)-discodermólido en las esponjas que no presentan epibiosis (277.5±29.6 µg/g) que en las que sí presentan epibiosis (197.5±25.9 µg/g) (Figura 6). Sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa, pero si es posible establecer esta tendencia en los datos, ya que estuvo cerca de serlo (P=0.052). Esta diferencia se puede deber a que la esponja este liberando o almacenando este metabolito en la superficie para evitar que los microorganismos puedan asentarse en ella (*vide ultra*).

El análisis de la variación en la concentración de (+)-discodermólido por el tipo de sustrato mostró que éste no afecta la concentración del metabolito (sustrato duro: 271.0±29.1 µg/g y sustrato cascajo: 203.9±24.8 µg/g). Por lo tanto, el sustrato no es una variable importante a tener en cuenta en el diseño del cultivo. En este caso se seleccionaron mallas de nylon para el cultivo debido a que en otros trabajos se ha encontrado que estas son baratas y resistentes, y son menos colonizadas por epibiota. Otra posibilidad para poner los explantes en el cultivo es atravesarlos con cuerdas para maximizar la posibilidad de alimentarse; no obstante, esta herida adicional causa mayor índice mortalidad, y de pérdida de explantes por el deterioro de dicha cuerda. Una posibilidad adicional es el uso de soportes metálicos en forma de caja, que si bien hace que los explantes estén menos expuestos, resultan muy costosos y se hace necesario la limpieza continúa para evitar el daño causado por el *fouling*.

Tabla 2. ANOVA para la concentración de (+)-discodermólido en función de los factores localidad, epibiosis y sustrato. Nivel de significancia α= 0,05.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Relación de F	Valor de P
A: Localidad	166774.0	1	166774.0	15.84	0.0004*
B: Epibiosis	43532.8	1	43532.8	4.14	0.0516
C: Sustrato	34584.6	1	34584.6	3.29	0.0806
A*B	12742.6	1	12742.6	1.21	0.2806
A*C	891.623	1	891.623	0.08	0.7732
B*C	2832.82	1	2832.82	0.27	0.6080
Error	294759.0	28	10527.1		
Total	500006.0	34			

*diferencia estadísticamente significativa



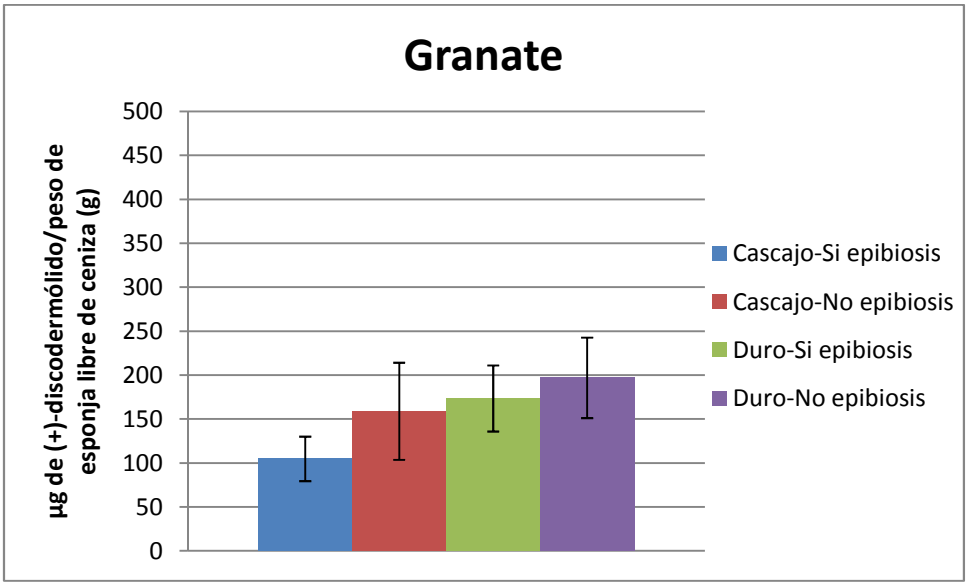


Figura 6. Variación en la concentración de (+)-discodermólido teniendo en cuenta la localidad, la presencia de epibiosis y el tipo de sustrato.

3.1.4. *Parte de la esponja*

Teniendo en cuenta la estructura de la esponja, la cual en la parte superior es carnosa y en la parte inferior está constituida mayoritariamente por espículas, se realizó la determinación de la concentración de (+)-discodermólido en 6 esponjas recolectadas de ambientes naturales, las cuales fueron separadas en parte superior y parte inferior y

luego se analizó la variación de la concentración en función de la parte de la esponja. Para esto se realizó una prueba t-pareada (Anexo electrónico 5); ya que cada individuo tiene el dato superior e inferior pareados. Esta prueba nos permitió establecer que no hay diferencias estadísticamente significativas (nivel de significancia de 0.05) entre la concentración de (+)-discodermólido en la parte superior de la esponja y la parte inferior ($P=0.069$, $t=2.32$). El valor de P está muy cerca al límite de confianza para aceptar la hipótesis de que la diferencia entre la concentración superior e inferior es diferente de cero. Un análisis más detallado de los datos nos muestra que existe una tendencia de que la concentración en la parte superior de la esponja siempre es mayor que la concentración en la parte inferior. Una representación gráfica de lo anterior se encuentra en la Figura 7, donde se observa que la concentración puede ser desde aproximadamente 1.5 veces mayor en la parte superior hasta casi 10 veces mayor con respecto a la concentración en la parte inferior. Esta dispersión en los datos junto con la elección del valor de α, no permitan hacer evidente esta diferencia; sin embargo si se usa un valor de α de 0.1 se aceptaría que la concentración es diferente entre las partes.

La diferencia en la concentración del metabolito según la parte de la esponja, puede ser aprovechada en el cultivo, recolectando la parte superior del explante (podando), garantizando que se tiene un fragmento con la mayor concentración de (+)-discodermólido posible, y el explante que queda en el cultivo regenerará su parte superior que posteriormente puede volver a ser cosechada.

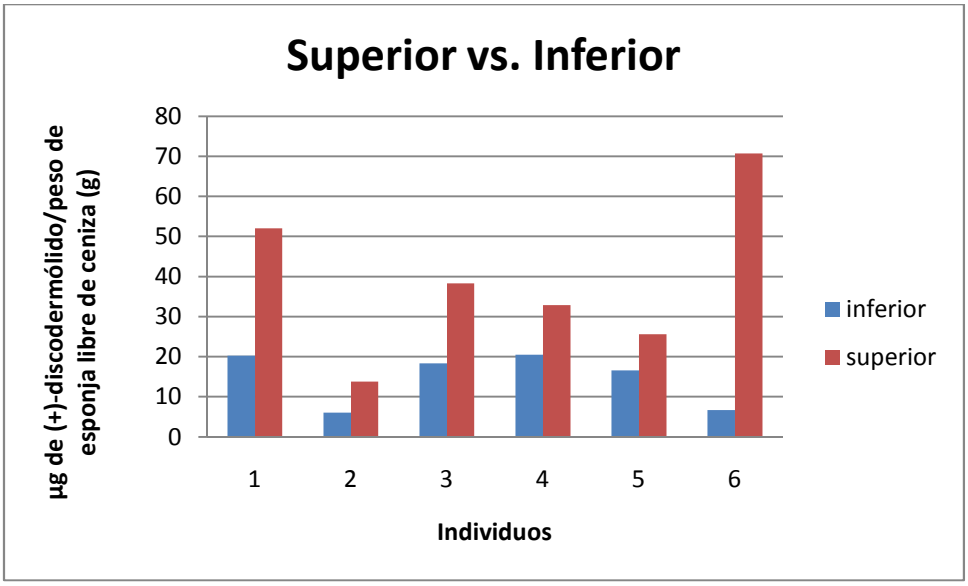


Figura 7. Variación en la concentración de (+)-discodermólido teniendo en cuenta la parte de la esponja.

Las muestras analizadas presentan mayor concentración de (+)-discodermólido en la parte superior de la esponja, lo cual es consecuente con un posible rol biológico del (+)-discodermólido, como disuasor de organismos, que puedan asociarse a la superficie de la esponja. Los primeros estudios de actividad biológica de esta molécula se realizaron frente a *Candida albicans* (Gunasekera *et al.,* 1990), encontrándose que el (+)-discodermólido es capaz de inhibir su crecimiento, mostrando su capacidad antimicótica, por lo cual la esponja podría usarlo para regular las poblaciones que se asocian a su superficie. Otra posible función ecológica es la de actuar como *antifeedant* (antidepredatorio) puesto que en campo se observa que la esponja es poco depredada (Ruiz y Zea, sometido). Sin embargo, para comprobar estas afirmaciones es necesario realizar ensayos en campo en condiciones ecológicamente relevantes. Además, es necesario realizar la separación de las partes de la esponja de manera más precisa, de tal manera que se pueda evaluar donde hay una mayor concentración de las células productoras del metabolito, y de esta manera usar esta porción para técnicas de cultivos celulares.

3.2 . *Evaluación del cultivo de D. dissoluta en Santa Marta-Colombia*[6]

[6] Los datos de crecimiento y supervivencia fueron obtenidos por Sven Zea y Cesar Ruiz.

A partir de los datos de concentración de (+)-discodermólido obtenidos para las esponjas en ambientes naturales, se pudo establecer que ésta no se ve afectada por la profundidad, al menos en el rango estudiado, ni por la época del año en la cual se recolecta la esponja, por lo tanto, estos dos factores no son relevantes a la hora de hacer un cultivo *in situ* de la esponja *D. dissoluta*. Al analizar el efecto de la localidad, presencia de epibiosis y tipo de sustrato, se estableció que el factor que afecta la concentración del metabolito es la localidad, seguido de la presencia de epibiosis, y no se presenta ningún efecto por el tipo de sustrato. Por lo anterior se estableció que el cultivo debe realizarse en la localidad de Morro, o en sus cercanías. Debido a que el tipo de sustrato no afecta la concentración se eligieron mallas de nylon para sostener las esponjas, ya que en estudios previos es el sistema más efectivo para la supervivencia de las esponjas ya que no las maltrata.

Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente se realizó el cultivo en Punta Betín, a 18 metros de profundidad, debido a que la localidad es cercana al Morro y se encuentra protegida del oleaje y del daño por pescadores y embarcaciones, y está en el intervalo de profundidad considerado. Este cultivo fue realizado por los investigadores Sven Zea y Cesar Ruiz. Por facilidades logísticas se seleccionó una disposición de cuadrilátero de tres líneas para el sistema que sostiene los explantes, que asegura un correcto intercambio de nutrientes y oxígeno en el agua circundante. Los parámetros usados para evaluar el cultivo fueron: La supervivencia, el crecimiento y la concentración de (+)-discodermólido. El análisis de estos factores es ampliado más adelante.

Se sembraron 119 explantes en Punta Betín a 18 m de profundidad, obtenidos a partir de 11 esponjas donantes. Después de que los explantes estuvieron 6 meses en el cultivo, se evaluó la supervivencia y el crecimiento. Para determinar la variación en la concentración de (+)-discodermólido se recolectaron tres explantes de cada una de las esponjas donantes y se comparó con el valor de concentración inicial de (+)-discodermólido. Sólo se seleccionaron tres explantes de cada esponja donante debido a que esto permite evaluar el cultivo sin necesidad de hacer el análisis en todas las muestras, lo que aumentaría los costos y en caso de ser extrapolado a un cultivo a gran

escala no sería práctico tomar todas las muestras para evaluar el comportamiento del cultivo. Además, este número de réplicas le da la confiabilidad estadística requerida a los datos.

3.2.1. *Supervivencia*

La supervivencia fue juzgada visualmente teniendo en cuenta el color de los explantes, debido a que las esponjas vivas presentan un color intenso (rojo-marrón) mientras que las esponjas muertas sólo presentan el esqueleto recubierto de algas, esponjas y otros invertebrados y sedimentos. Como ejemplo se presentan las fotografías de una esponja viva y una muerta (Figura 8). En la figura 9, se presentan los porcentajes de supervivencia para los tres cultivos realizados, y el porcentaje general de supervivencia teniendo en cuenta todos los explantes puestos en cultivo. El valor de porcentaje general de supervivencia del 93.2 % nos permite establecer que la esponja *D. dissoluta* es promisoria para un cultivo *In situ*. La afirmación anterior se hace teniendo en cuenta porcentajes de crecimiento obtenidos en otros estudios realizados, que pueden variar entre 17% y 84% (Hadas *et al.,* 2005).

a b

Figura 8. Esponjas de *D. dissoluta* en cultivo. a) esponja viva b) esponja muerta

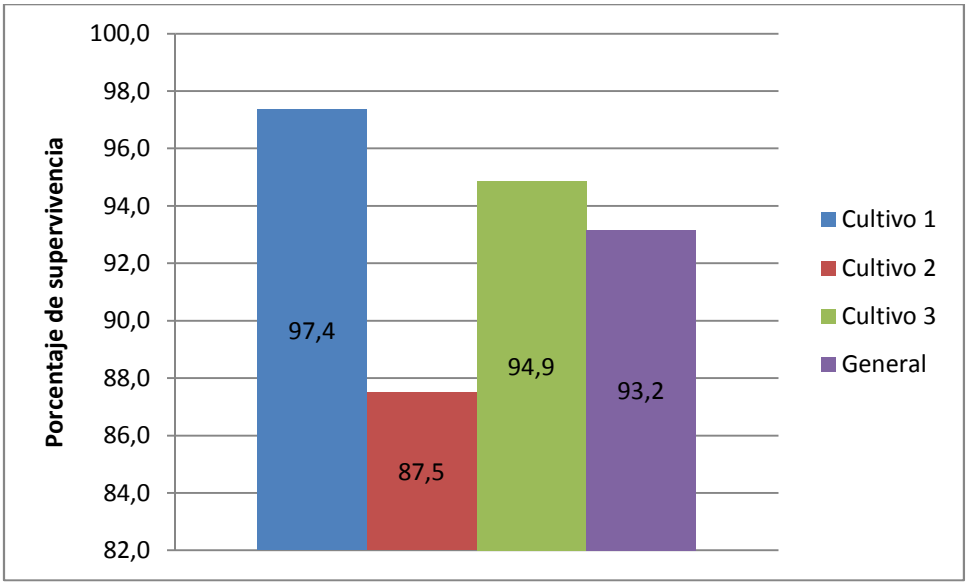


Figura 9. Supervivencia de los explantes en los tres cultivos realizados.

3.2.2. *Crecimiento*

El crecimiento se evaluó con el porcentaje de variación entre el volumen inicial y final de cada explante. Los datos fueron analizados usando un ANOVA anidado (Anexo electrónico 6), puesto que las esponjas son réplicas de las cosecha y los explantes son réplicas de cada esponja. En la tabla 3 se presentan los datos de ANOVA, que nos permiten determinar si el crecimiento es significativamente diferente de cero (P gran promedio), y si hay variación en el crecimiento entre cosechas y entre esponjas.

Tabla 3. Análisis por ANOVA anidado para el crecimiento de los explantes por cultivo. α = 0.05. Transformada $Y=\log_{10}(X+100)$, donde Y es la transformada y X son los datos de % de crecimiento.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Relación de F	Valor de P
Gran promedio	49704.9	1	456.00819	36002.8	0.0000*
Cosecha	0.70592	2	0.35296	27.87	0.0000*
Esponja(cosecha)	0.306059	8	0.0382574	3.02	0.0045*
Error	1.24126	98	0.0126659		
Total	2.29844	108			

*diferencia estadísticamente significativa

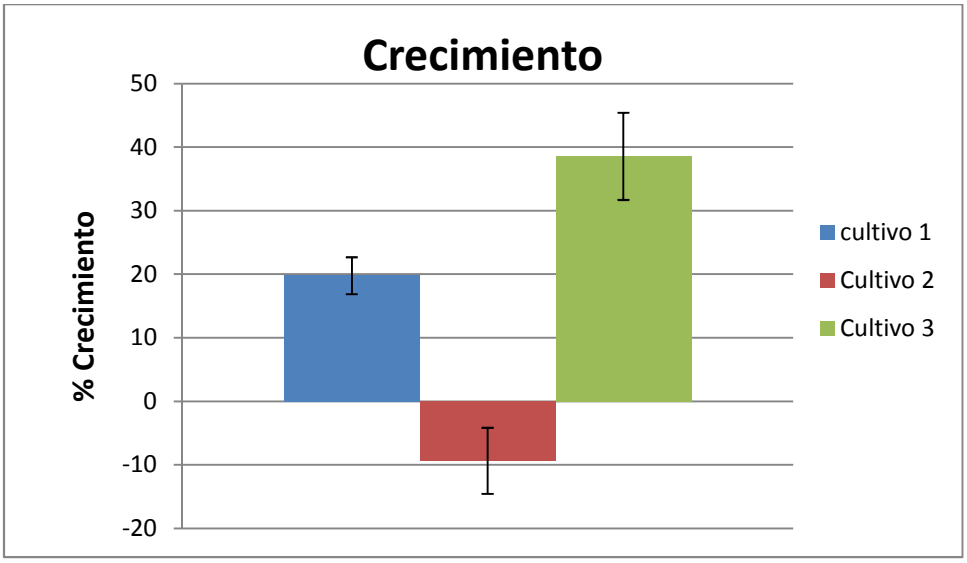


Figura 10. Crecimiento promedio de los explantes en los tres cultivos realizados después de 6 meses en el cultivo.

Como se puede observar en la Figura 10, para los cultivos 1 y 3 se presenta un porcentaje de crecimiento mayor al 15% (19.8 ± 2.9 % para el cultivo 1 y 38.6 ± 6.8 % para el cultivo 3). Por el contrario el cultivo 2 presenta una pérdida de volumen de 9.32 ± 5.2 %. Esto se debió a que durante este segundo cultivo accidentalmente se cayó una de las esquinas que sostenía la estructura, y varios de los explantes estuvieron varios días recostados sobre la arena. Esto disminuyó su crecimiento y, a pesar de que sobrevivieron, parte del explante murió. Empero, la tendencia general de los datos (gran promedio) nos indican que hay un crecimiento estadísticamente significativo mayor que cero, por lo tanto se puede inferir que la esponja después de ser recolectada de su ambiente natural y sometida al tratamiento necesario para llevar los explantes al cultivo, se recupera y crece satisfactoriamente en el sistema de acuicultura. Adicionalmente, las diferencias de crecimiento entre los cultivos 1 y 3 podrían deberse a la época climática. El cultivo 1 (fines de octubre a mediados de abril) cubrió principalmente la época seca (diciembre a abril), con aguas más transparentes y frías, mientras que el cultivo 3 (principios de mayo a principios de septiembre) cubrió principalmente la época lluviosa (mayo a noviembre), con aguas más turbias (alimento en suspensión) y calientes.

Los porcentajes de crecimiento, sin tener en cuenta el cultivo 2 por el accidente antes mencionado, indican que la esponja es promisoria para el cultivo *in situ*, ya que en

estudios previos hay muchos ejemplos donde las esponjas no crecen o incluso pierden peso (Duckworth *et al.,* 1997) y otros ejemplos exitosos donde se presentan crecimientos alrededor del 20 % (Hadas *et al.,* 2005).

3.2.3. *Variación en la concentración de (+)-discodermólido en cultivo*

La variación del cambio en la concentración de (+)-discodermólido durante los seis meses de cultivo (final menos inicial para tres fragmentos por esponja) se analizó utilizando el mismo tipo de ANOVA anidado que se usó para el cambio en volumen, comparando entre los tres cultivos y las diferentes esponjas de cada uno. La prueba permite identificar diferencias entre los cultivos (usando las esponjas de cada uno), y entre esponjas de cada cultivo (usando los fragmentos de cada esponja). Adicionalmente, para determinar si hubo aumento estadísticamente significativo en la concentración de (+)-discodermólido después del cultivo, se hizo la prueba de F en el ANOVA para el gran promedio. Esto prueba si el cambio de concentración fue estadísticamente diferente a cero. En la tabla 4 se presenta el análisis de ANOVA anidado para los datos de porcentaje de producción de (+)-discodermólido. El valor (P=0.000) del gran promedio nos permitió establecer que la concentración de (+)-discodermólido aumentó de manera significativa en los explantes después del cultivo, con respecto al valor inicial. En general, el promedio de aumento de (+)-discodermólido fue del 42.4 ± 21.9 %. Se determinó además que hay una tendencia a que los cultivos sean diferentes en la producción adicional de (+)-discodermólido, pero no fue significativa (P=0.0519). Como en el caso del volumen de crecimiento de las esponjas, en el cultivo 2 no hubo un aumento significativo de la concentración de (+)-discodermólido (0.661% ± 24.8), mientras que para los otros dos cultivos el incremento fue de 21.0 ± 16.2 % (cultivo 1) y 80.3 ± 42.8 % (cultivo 3) (Figura 11). El mayor valor para el cultivo 3 en relación con el cultivo 1 (el cultivo 2 no es comparable) podría estar relacionado, al igual como se dijo arriba para el volumen, con la época climática en que se realizó. Empero, mayores producciones de (+)-discodermólido en cultivo durante esta época contrastan con valores naturales menores, según se presentó arriba (Figura 5).

De cualquier manera, con independencia del momento en que se realice la siembra siempre se obtendrá mayor concentración del metabolito en los explantes después de seis meses en cultivo.

También hubo diferencias significativas en la producción de (+)-discodermólido entre las esponjas de un mismo cultivo (P=0.010), indicando que cada esponja individual responde de manera particular a las condiciones de cultivo, aparte de la respuesta general común.

Tabla 4. Análisis ANOVA anidado entre concentración, y cultivo y esponja. α = 0,05. Transformada $Y=\log_{10}(X+100)$, donde Y es la transformada y X son los datos de porcentaje de producción de (+)-discodermólido.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Relación de F	Valor de P
Gran promedio	4508.60	1	136.62	2826.3	0.0000*
Cosecha	0.328265	2	0.164132	3.40	0.0519
Esponja(cosecha)	2.01265	8	0.251582	5.20	0.0010*
Error	1.06349	22	0.0483406		
Total	3.40441	32			

*diferencia estadísticamente significativa

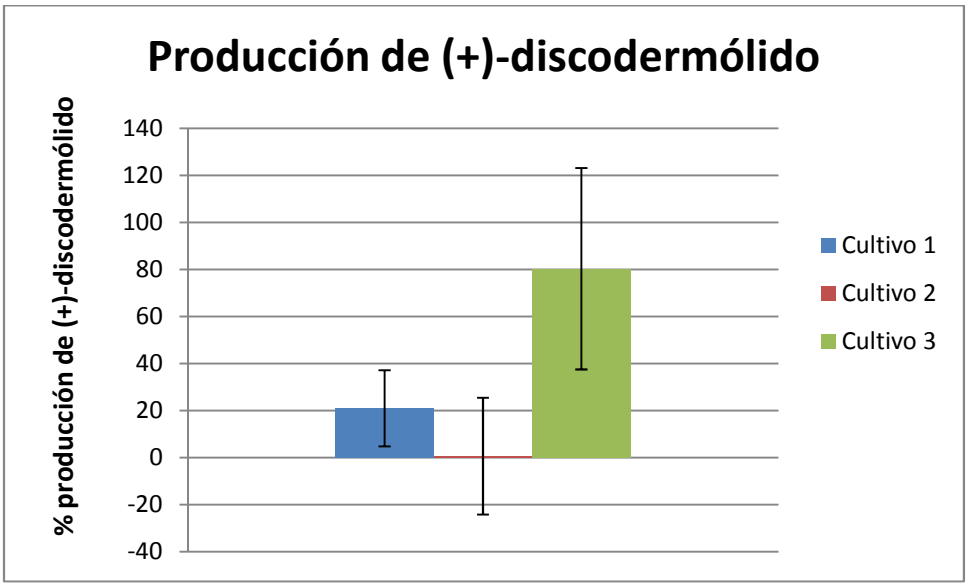


Figura 11. Producción de (+)-discodermólido por explantes de *D. dissoluta* después de 6 meses en el cultivo.

El hecho de que haya un aumento en la concentración de metabolito, no sólo permite notar que éste se sigue produciendo después de que la esponja se retira de su ambiente natural, sino que además aumenta su concentración. Esto es importante para la implementación del cultivo ya que la manipulación de los explantes potencializa la producción del metabolito; desde el punto de vista biológico la esponja incrementa la producción del metabolito en estas condiciones de estrés, lo que reafirma un posible papel ecológico de defensa de este compuesto en la esponja.

El porcentaje de producción de (+)-discodermólido a pesar de no ser muy alto (42.4±21.9), es bueno si se compara con estudios donde no se da la producción del metabolito o ésta no varía (Voogd, 2007). Sin embargo, hay estudios donde la concentración se ha triplicado (Hadas *et al*., 2005). Por lo anterior, es importante tener un conocimiento de la ecología de la esponja para lograr potencializar la producción del metabolito mediante la manipulación de las condiciones ecológicas.

3.3. *Proyección de producción de (+)-discodermólido.*

La presente proyección de producción de (+)-discodermólido se realiza como un ejercicio que permite visualizar la viabilidad a largo plazo del cultivo**.** En promedio las esponjas después de seis meses en cultivo producen 203 µg de (+)-discodermólido/g de esponja libre de ceniza[7]; por lo tanto, para obtener 1g de (+)-discodermólido cada seis meses se necesitan en promedio 41715 mL de esponja. Suponiendo que se dé un crecimiento máximo del 38.6 % (porcentaje máximo de crecimiento de los tres cultivos) y esto sea lo único que se recolecta del total de lo sembrado, se necesita tener en cultivo 108070 mL de esponja. Teniendo en cuenta que los explantes tienen un tamaño promedio de 42.6 mL, se deben sembrar 253629 explantes. Si en la estructura armada para el ensayo de cultivo caben unas 120 esponjas, se necesitaría el equivalente a unas 21 estructuras. Es claro que hay que mejorar las condiciones de cultivo tanto en crecimiento como en incremento del discodermólido. También es necesario evaluar si el aumento del discodermólido es inicial (por la manipulación), o continúa con el tiempo.

[7] El explante usado para este cálculo fue F3-13 que tiene un volumen de 28 mL y un peso libre de ceniza de 2.97. Se tomó este explante por que tiene una concentración de 226 µg de (+)-discodermólido/g esponja libre de ceniza.

CONCLUSIONES

El cultivo de esponjas como fuente de metabolitos secundarios farmacológicamente relevantes aún se encuentra en sus inicios a nivel mundial y en Colombia no se habían realizado estudios en este campo. En este trabajo se realizó el estudio de la variación de la concentración natural de (+)-discodermólido en la esponja de *D. dissoluta* del Caribe colombiano, para establecer unas condiciones adecuadas para el desarrollo del primer sistema de acuicultura realizado en Colombia. Los parámetros ambientales analizados fueron: Profundidad a la cual se recolectan las esponjas, encontrándose que no existe relación entre la profundidad y la concentración de (+)-discodermólido (r^2=0,0011). La época de recolección de las esponjas, encontrándose que no hay diferencia significativa en la concentración de (+)-discodermólido al recolectar en época seca (279.5 ± 36.2 μg/g) o en época lluviosa (219.5 ± 45.4 μg/g). Se determinó el efecto del sustrato, la presencia de epibiosis y localidad en la concentración de (+)-discodermólido encontrándose que el factor que más la afecta es la localidad (Morro =315.2 ± 30.6 μg/g y Granate =159.7 ± 24.5 μg/g). Se estableció que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la concentración de (+)-discodermólido si se tiene en cuenta la parte de la esponja; pero es necesario tener en cuenta que si existe en los datos la tendencia de ser siempre mayor la concentración en la parte superior de la esponja que la concentración en la parte inferior, lo anterior nos permite tener el primer indicio de un rol ecológico del (+)-discodermólido en la esponja *D. dissoluta*, como posible disuasor de organismos que pueden dañarla o depredarla.

Con el estudio realizado de las esponjas en ambientes naturales, se desarrolló un sistema de cultivo, el cual se realizó en la localidad de Punta Betín en Santa Marta a 18 m de profundidad, en un cuadrilátero de tres líneas. El porcentaje de supervivencia general fue del 93.2%, con un crecimiento promedio de 16.8 ± 3.5 % y un aumento en la concentración de (+)-discodermólido de 42.4 ± 21.9 %. De acuerdo con lo anterior, se puede establecer que es posible realizar un cultivo de *D. dissoluta* en el Caribe colombiano para la producción de (+)-discodermólido, que contribuya a la solución del problema de suministro, y además que permita darle valor agregado a los recursos naturales con los que actualmente contamos en el país. Sin embargo, las condiciones

de eficiencia deben ser mejoradas, pues se requeriría de mucho esfuerzo para la producción de cantidades significativas de (+)-discodermólido.

RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS

Este estudio es el primer paso en el diseño de un sistema de acuicultura *in situ* para la producción de (+)-discodermólido, y nos muestra que es promisorio, pero que es necesario continuar con estudios que permitan llevar este proyecto a escala industrial.
Los pasos a seguir con el estudio de *D. dissoluta* son:

a. Continuar con el estudio del sistema de acuicultura aquí propuesto para obtener mayor información, mejorarlo hasta optimizarlo y de ser posible llevarlo a mayor escala.
b. Realizar ensayos en condiciones ecológicamente relevantes para determinar el rol ecológico del (+)-discodermólido en la esponja *D. dissoluta*, para aprovechar estas condiciones de estrés para potencializar la producción del metabolito.
c. Optimizar la separación de las células de *D. dissoluta* y diseñar el cultivo celular, enriquecido con células productoras de (+)-discodermólido, como alternativa biotecnológica para solucionar el problema de suministro.

Este primer paso en el diseño de sistemas de acuicultura *in situ* nos muestra que en Colombia se cuentan con los recursos científicos y tecnológicos para el cultivo de otras especies marinas que tengan metabolitos secundarios con potencial biomédico, o alto valor comercial, y que pueden ser aprovechados a nivel investigativo e industrial.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresamos nuestros agradecimientos a la Universidad Nacional de Colombia (proyecto DIB 10763), a COLCIENCIAS por la financiación del proyecto (1101-405-20180) , a Cesar Ruiz por el trabajo en campo realizado para obtener las muestras y realizar el cultivo de la esponja *D. dissoluta*, al profesor Ramón Giraldo del departamento de estadística de la Universidad Nacional de Colombia, por su

colaboración para el análisis estadístico de los datos obtenidos en este trabajo y a INVEMAR por permitirnos usar sus instalaciones para el desarrollo de parte de este trabajo.

BIBLIOGRAFIA

Cuevas, C., Francesch, A. “Development of Yondelis_ (trabectedin, ET-743). A semisynthetic process solves the supply problem” *Nat. Prod. Rep.*, **2009**, 26, 322–337.

Duckworth, A.R., Battershill, C.N. “Developing farming structures for production of biologically active sponge metabolites” *Aquaculture*, **2003**, 217, 139-156.

Duckworth, A.R., Battershill, C.N. “Sponge aquaculture for the production of biologically active metabolits: the influence of farming protocols and environment” *Aquaculture,* **2003a**, 221, 311-329.

Duckworth, A.R., Battershill, C.N. Bergquist, P.R. “Influence of explant procedureres and environmental factors on culture of three sponges” *Aquaculture*, **1997**, 156, 251-260.

Duckworth, A.R.; Battershill, C.N.; Schiel, D.R.; Bergquist, P.R. “Farming sponges for the production of bioactive metabolites” *Mem. Qld. Mus.*, **1999**, 44, 155-159.

Duckworth, A.R.; Battershill, C.N.; Schiel. “Effects of depth and water flow on growth, survival and bioactivity of two temperate sponges cultured in different seasons" *Aquaculture*, **2004**, 242, 237-250.

Florence, G. J.; Gardner, M. N.; Paterson, I. “Development of practical Syntheses of the marine anticancer agents discodermolide and dictyostatin” *Nat. Prod. Rep.,* **2008**, 25, 342–375.

Gunasekera, S. P.; Gunasekera, M.; Longley, R.; Schulte, G. K. “Discodermolide: A New bioactive polyhydroxylated lactone from the marine sponge *Discodermia dissoluta*” *J. Org. Chem.*, **1990**. 55, 4912-4915.

Hadas, E.; Shpigel, M.; Ilan, M. “Sea ranching of the marine sponge *Negombata magnifica* (Demospongiae, Latrunculiidae) as a first step for latrunculin B mass production” *Aquaculture*, **2005**, 244, 159-169.

Haefner, B. “Drugs form the deep: marine natural products as candidates” *Drug Discovery Today*, **2003**, 8, 536-544.

Hung, G.S.; Lopez-Barcons, L.; Perez-Soler, R.; Freeze, S.; Smith III, A.B.; Goldberg, G.L.S.; Horowitz, B.; McDaid, H. “Potentiation of Taxol efficacy by Discodermolide in ovarian carcinoma xenograft-bearing mice” *Clin. Cancer Res.,* **2006**, 12, 298-304.

Karté, B. K. “Biomedical potential of marine natural products” *BioScience*, **1996**, 46, 271-286.

Kijjoa, A.; Sawangwong, P. “Drugs and cosmetics from the sea” *Mar. Drugs,* **2004**, 2, 73-82.

Longley, R. E.; Gunasekera, S. P.; Faherty D.; McLane,J.; Dumont, F. “Immunosuppression by discodermolide” *Ann. N. Y. Acad. Sci.,* **1993***,* 696**,** 94–107.

Martello, L.A.; McDaid, H.M., Regl, D.L.; Yang, C.-P- H.; Meng, D.; Pettus, T.R.R.; Kaufman, M.D.; Arimoto, H.; Danishefsky, S.J.; Smith III, A.B.; Horwitz, S.B. “Taxol and discodermolide represent synergistic drug combination in human carcinoma cell lines” *Clin. Cancer Res*., **2000**, 6, 1978-1987.

Mita, A.; Lockhart, C.; Chen, T.-L.; Bochinski, K.; Curtright, J.; Cooper, W.; Hammond, L.; Rothenberg, M.; Rowinsky, E.; Sharma, S. “A phase I pharmacokinetic (PK) trial of XAA296A (Discodermolide) administered every 3 wks to adult patients with advanced solid malignancies” *J. Clin. Oncol.,* **2004** ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition), 22(14S), 2025 (resumen y diapositivas).

Müller, W.E.G.; Wimmer, W.; Schatton, W.; Böhm, M.; Batel, R.; Filic, Z. “Initiation of an aquaculture of sponges for the sustainable production of bioactive metabolites in open systems: example*, Geodia cydonium*” *Mar. Biotechnol.,* **1999**, 1, 569-579.

Munro, M.H.G.; Blunt, J.W.; Dumdei, E.J.; Hickford, S.J.H.; Lill, R.E.; Li, S.; Battershill, C.N.,;Duckworth, A.R., “The discovery and development of marine compounds with pharmaceutical potential” *J. Biotechnol*., **1999**, 70, 15–25.

Page, M.J.; Northcote, P.T.; Webb, V.L.; Mackey, S.; Handley, S.J. “Aquaculture trials for the production of biologically active metabolites in the New Zealand sponge Mycale hentscheli (Demospongiae: Poecilosclerida)” *Aquaculture*, **2005**, 250, 256-269.

Ruiz, C.A. y Zea. S. Historia natural de la esponja *Discodermia dissoluta* (Porifera: Demospongiae: Lithistida) en Santa Marta, Caribe colombiano. Sometido a Bol. Inv. Mar. Cost.

Smith III, A. B.; Freeze, S. “(+)-Discodermolide: total synthesis, construction of novel analogues, and biological evaluation” *Tetrahedron*, **2008**, 64, 261–298

Voogd, N.J. “The mariculture potential of the Indonesian reef-dwelling sponge Callyspongia (Euplacella) biru: Growth, survival and bioactive compounds” *Aquaculture*, **2007**, 262, 54–64.

Zea, S. Patterns of coral and sponge abundance in stressed coral reefs at Santa Marta, Colombian Caribbean. En: Soest, R.W.M. van, T.M.G. van Kempen y J.-C. Braekman (eds.). Sponges in Time and Space. Ed. Balkema, Rotterdam, 1994, 257-264.

Zea, S. y W.H. De Weerdt. *Haliclona* (Haliclona) *epiphytica* n. sp. (Porifera, Demospongiae, Haplosclerida), a seaweed-dwelling sponge from the Colombian Caribbean. Beaufortia, **1999**, 49, 171-176.

PRODUCCIÓN CIENTIFICA

Artículos

- Andrea K. Valderrama, Leonardo Castellanos and Sven Zea. Validation and Evaluation of an HPLC Methodology, for the Quantification of the Potent Antimitotic (+)-discodermolide in the *Discodermia dissoluta* Sponge. Journal Separation Science. Sometido.
- Andrea K. Valderrama, Leonardo Castellano, Sven Zea y Cesar Ruiz. Potencial De Un Sistema de Acuicultura *In Situ* de la Esponja Del Caribe Colombiano D*iscodermia dissoluta*: Crecimiento, Supervivencia Y Compuestos Bioactivos. En preparación.

Congresos

- Andrea K. Valderrama, Leonardo Castellanos, Sven Zea, Cesar Ruiz y Shirley A. Pomponi. Validación Y Evaluación de una Metodología Analítica Útil Para La Cuantificación De (+)-Discodermólido En La Esponja *Discodermia dissoluta* Del Caribe Colombiano (Santa Marta). ColacMarCuba´2009. 26-30 de octubre de 2009. Ponente.
- Sven Zea, Leonardo Castellano, Cesar Ruiz, Andrea K. Valderrama, Carlos Puentes, Javier Gómez-León y Shirly Pomponi. Suministro Natural y Potencial de producción de Metabolitos Bioactivos en la Esponja Marina *Discodermia dissoluta*. Publicado en las memorias del II Congreso Nacional de estudiantes de Biología. 28 de septiembre 2 de octubre de 2009.

ANEXO 1

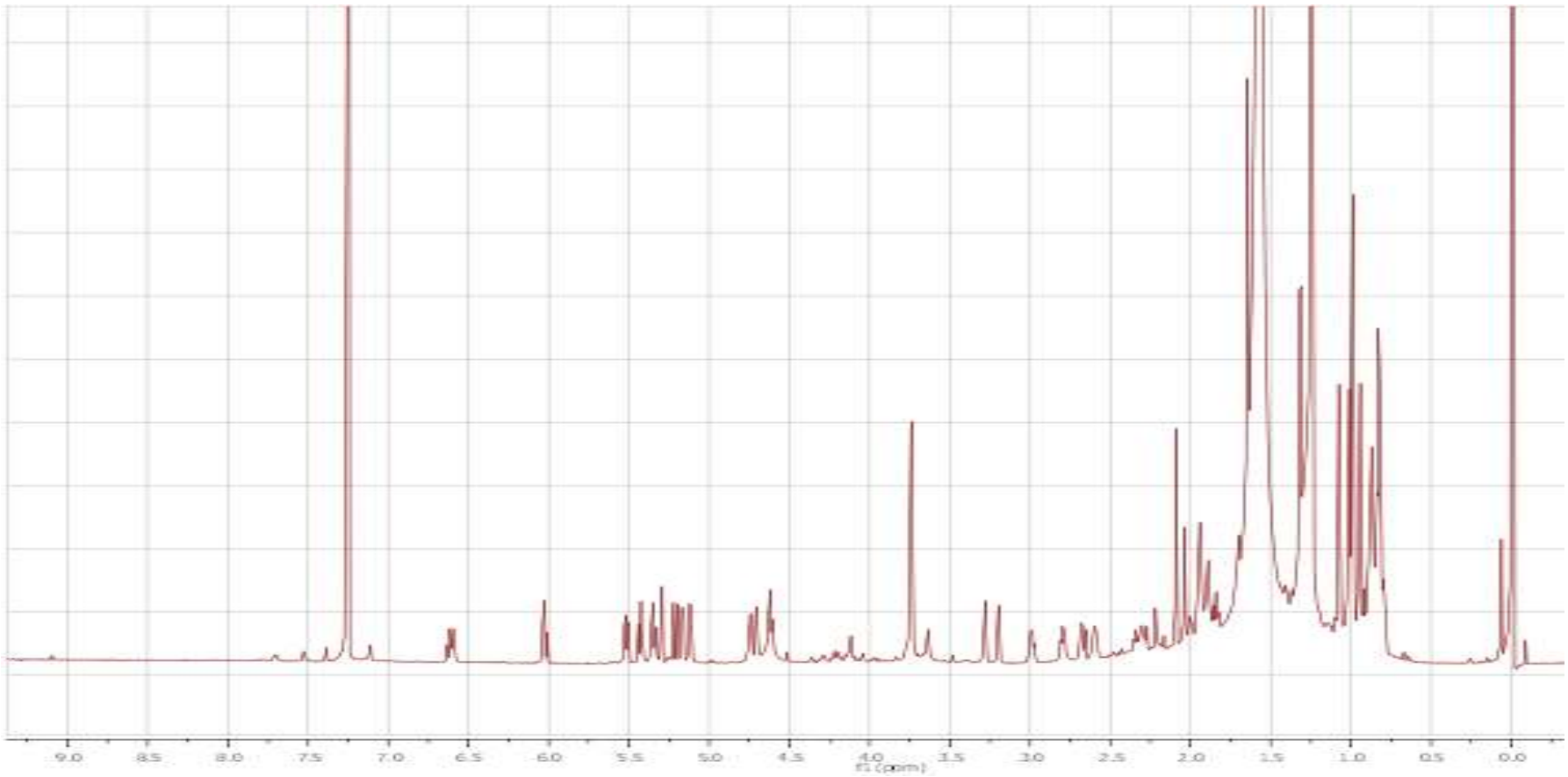


Figura 1. Espectro de RMN 1H del (+)-discodermólido aislado de la esponja *D. dissoluta*. (750 MHz, $CDCl_3$).

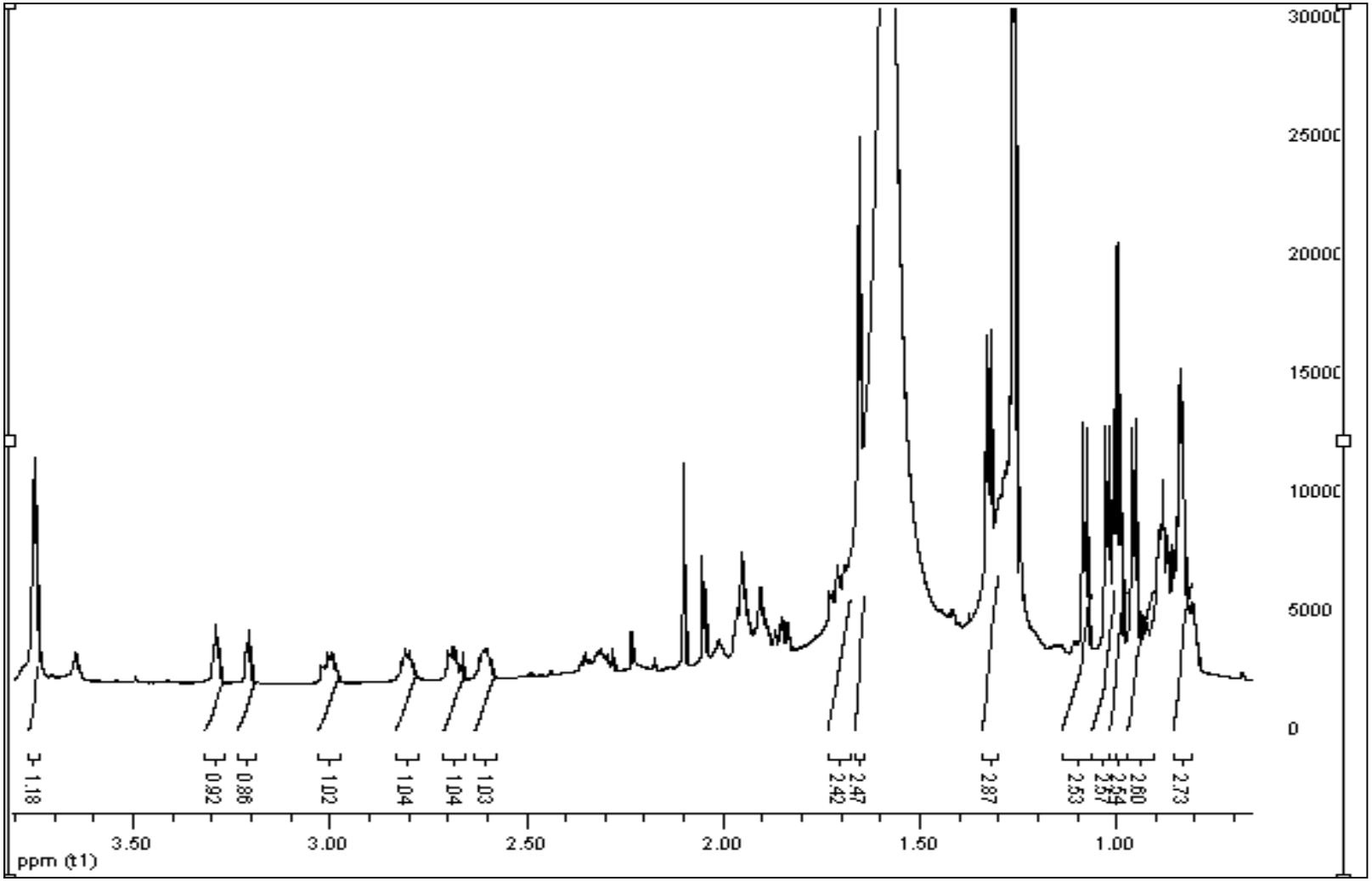


Figura 2. Ampliación (0.5 – 4.0 ppm) del espectro de RMN 1H del (+)-discodermólido aislado de la esponja *D. dissoluta*. (750 MHz, $CDCl_3$)

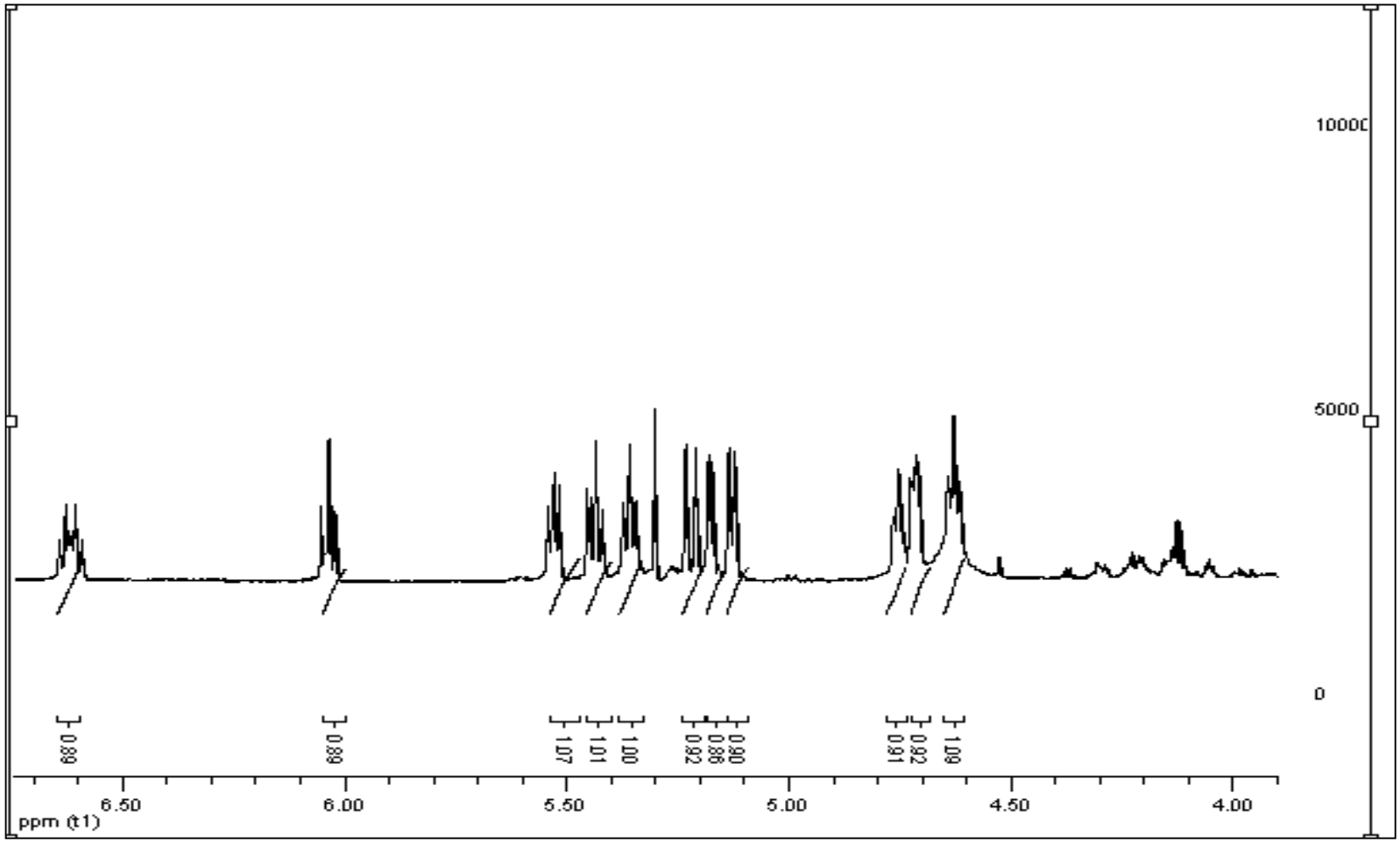


Figura3. Ampliación (4.0 – 6.7 ppm) del espectro de RMN 1H del (+)-discodermólido aislado de la esponja *D. dissoluta*. (750 MHz, $CDCl_3$)

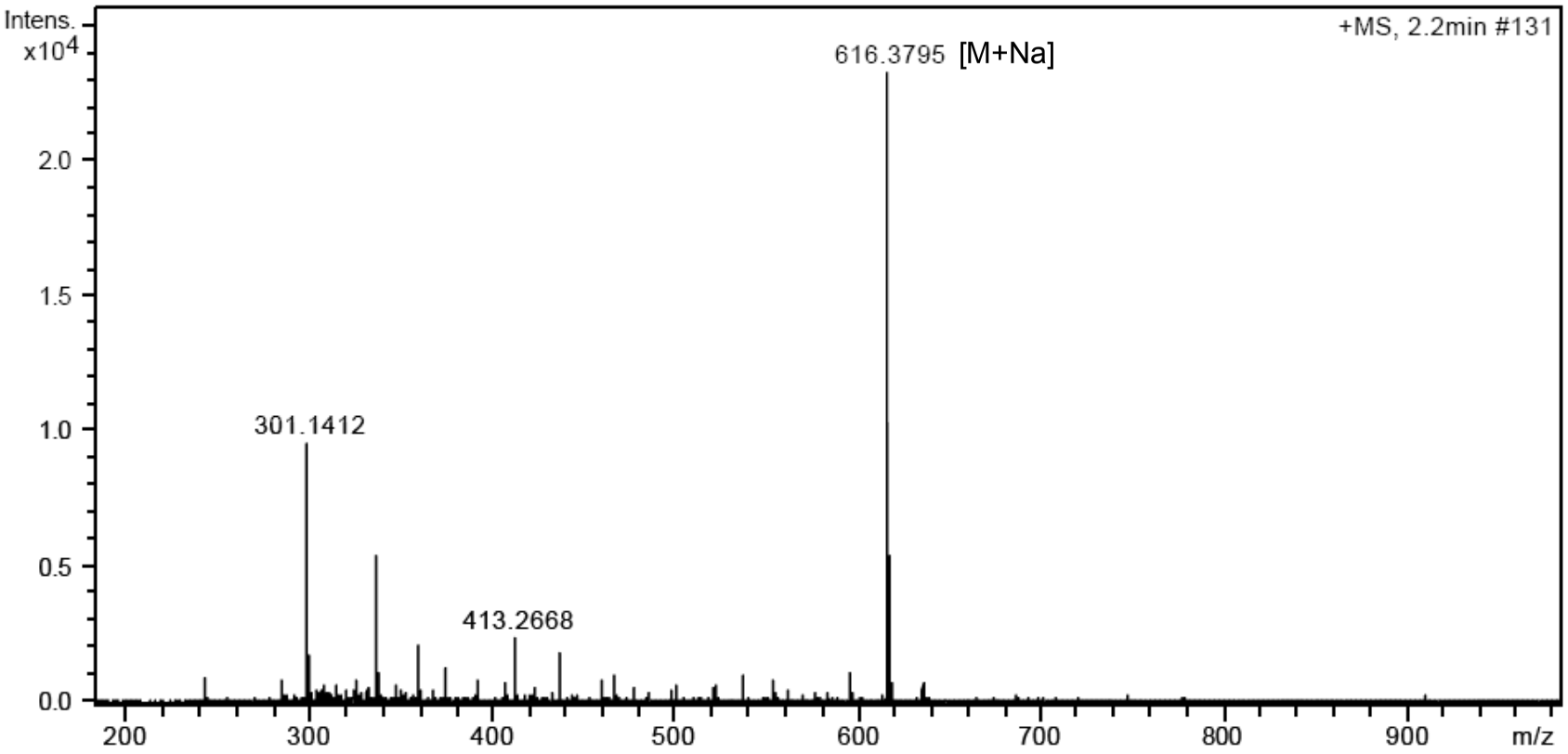


Figura 4. Espectro de masas de alta resolución, ESI-TOF, del (+)-discodermólido, aislado de la esponja D*. dissoluta*. La masa corresponde al aducto (+)-discodermólido + sodio.

ANEXO 2

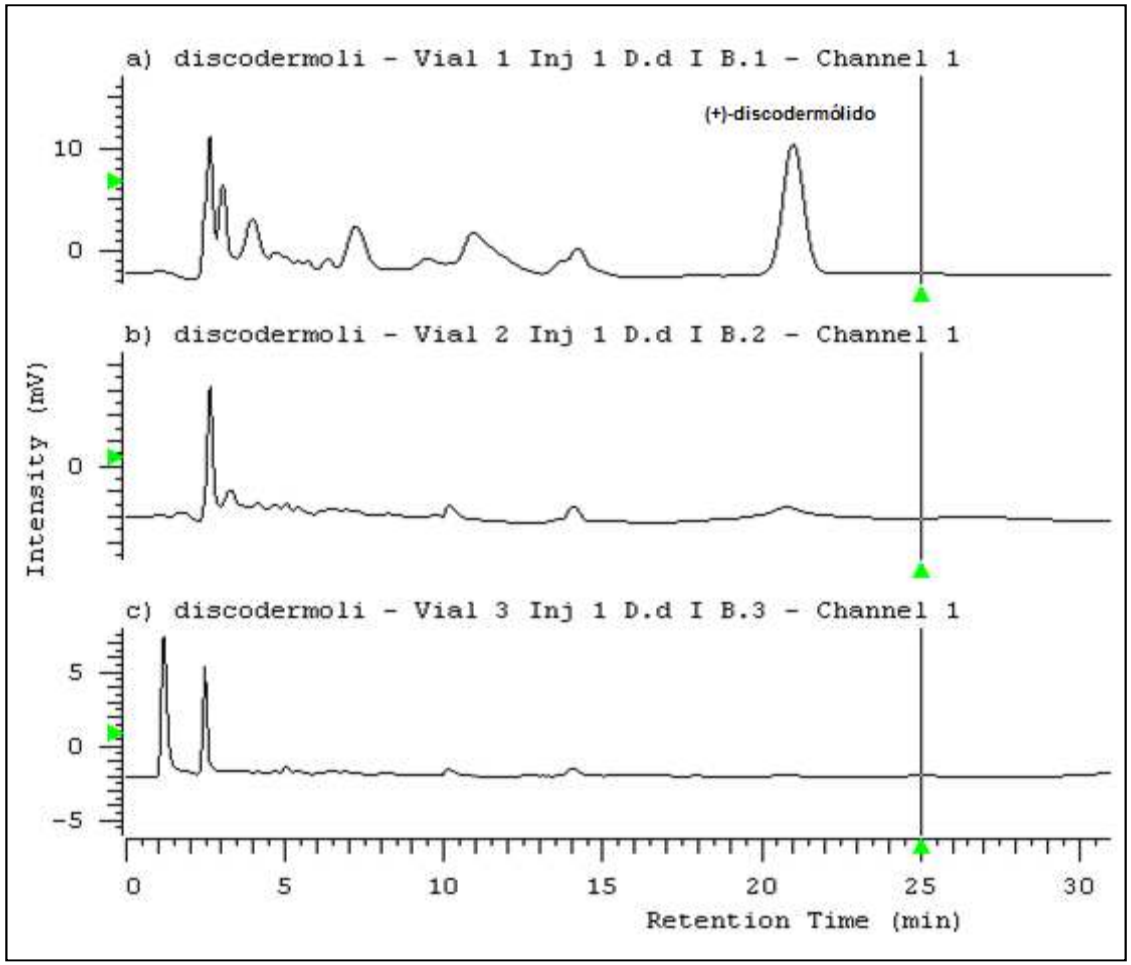


Figura 1. Cromatogramas de las fracciones obtenidas al hacer la limpieza en los cartuchos RP-18. (a) Primera fracción eluída con mezclas metanol:agua (80:20 v/v), (b) Segunda fracción eluída con metanol y (c) Tercer fracción eluída con Acetonitrilo:acetona(50:50).

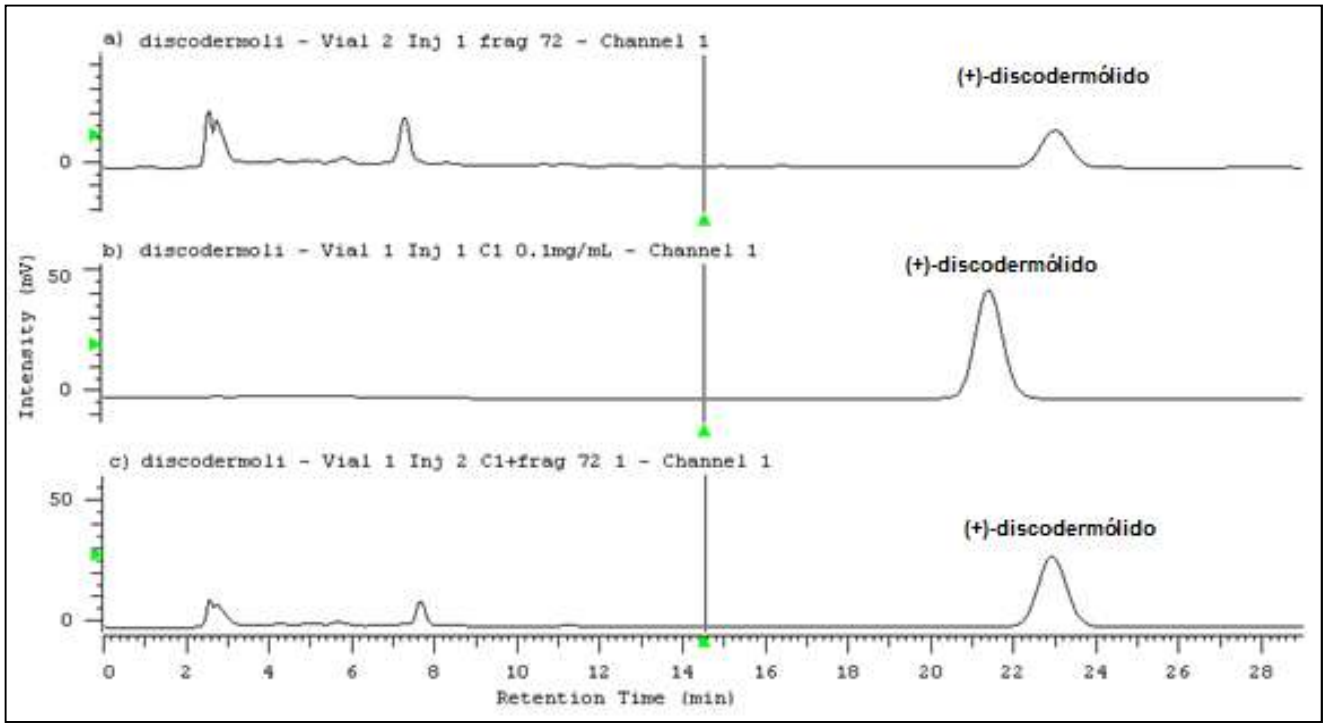


Figura 2. Cromatogramas obtenidos para determinar el porcentaje de recuperación a) Cromatograma fracción eluida con metanol: agua (80:20 v/v) de un extracto de *D. dissoluta*, b) (+)-discodermólido puro y c) mezcla 1:1 de los dos anteriores. El compuesto que eluye en torno de 23 min corresponde al (+)-discodermólido