

METABOLITOS SECUNDARIOS BIOACTIVOS DE ORGANISMOS MARINOS PERTENECIENTES AL PHYLUM ECHINODERMATA

Marta S. Maier

*Departamento de Química Orgánica y UMYMFOR (CONICET - FCEN), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, (1428) Pabellón 2, Ciudad Universitaria, Buenos Aires, Argentina
E-mail: maier@qo.fcen.uba.ar*

RESUMEN

La búsqueda de nuevos metabolitos bioactivos a partir de organismos marinos es una estrategia promisorio para encontrar estructuras químicas novedosas muy distintas a las halladas en productos naturales terrestres. El estudio de metabolitos secundarios aislados de organismos marinos del phylum Echinodermata nos permitió caracterizar una serie de compuestos con actividad antifúngica y antiviral e identificar líderes para desarrollar nuevos análogos sintéticos.

Los organismos marinos constituyen una fuente de metabolitos secundarios de una enorme diversidad química ya que sus estructuras son muy distintas a las encontradas en el ámbito terrestre. La investigación sistemática de especies marinas y el interés en el rol biológico y ecológico de sus metabolitos secundarios han conducido al descubrimiento de moléculas novedosas y con actividades biológicas prometedoras [1]. En nuestro país son muy pocas las especies marinas que han sido estudiadas desde el punto de vista químico y por lo tanto el Mar Argentino constituye una fuente poco explorada y explotada al día de hoy de nuevos compuestos bioactivos.

En los últimos 10 años hemos estudiado los metabolitos secundarios de una serie de organismos marinos pertenecientes al phylum Echinodermata (del griego echinos, espinoso y derma, piel), el cual comprende alrededor de 7.000 especies vivientes ampliamente distribuidas en todos los océanos y a distintas profundidades. El phylum se divide en 5 clases: Holoturoidea (pepinos de mar u holoturios), Asteroidea (estrellas de mar), Ophiuroidea (ofiuros), Crinoidea (lirios y plumas de mar) y Echinoidea (erizos de mar). Los organismos de las clases Asteroidea y Holoturoidea se caracterizan por producir mezclas complejas de glicósidos esteroidales y triterpenoidales, respectivamente, los cuales son responsables de su toxicidad general, pudiendo cumplir un rol defensivo debido a sus propiedades membranotrópicas. Estos metabolitos secundarios (saponinas) son muy comunes en el reino vegetal pero en el reino animal se han encontrado sólo en estos equinodermos y en algunas esponjas, alcionarias, algas verdes y en peces del género *Pardachirus*. Varias características estructurales de las agliconas y de las cadenas de oligosacárido diferencian a las saponinas de estrellas de mar (asterosaponinas) de las de holotureos (holoturinas) (Fig. 1).

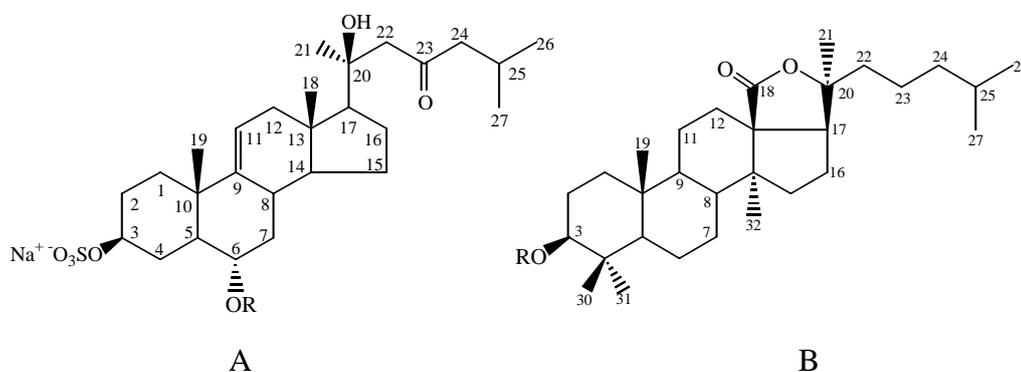


Figura 1: saponinas de estrellas de mar (estructura A) y de holotureos (estructura B).

Las asterosaponinas (estructura A) contienen un núcleo esteroidal con un grupo sulfato unido al C-3 y una cadena de oligosacárido unida al C-6 de la aglicona. Las holoturinas (estructura B) presentan una cadena de oligosacárido unida al C-3 del esqueleto triterpenoidal con grupos sulfato unidos a las unidades de monosacárido en un 60 % de las holoturinas aisladas hasta el momento [2]. Las saponinas de estrellas de mar y holotureos presentan un amplio espectro de actividades biológicas: antifúngica, citotóxica, hemolítica, antiviral, antitumoral e inmunomoduladora, las cuales son una consecuencia de su acción membranotrópica frente a Δ^5 -esteroles en membranas celulares. Las saponinas forman complejos con estos esteroides desarrollando canales iónicos y poros de mayor tamaño lo que produce una alteración de las propiedades físico-químicas de las membranas. Las estrellas y pepinos de mar son resistentes a sus propias saponinas debido a la presencia de Δ^7 - y $\Delta^{9,11}$ -esteroides, Δ^5 -esteroides sulfatados y β -xilósidos de esteroides en lugar de los Δ^5 -esteroides libres.

Los primeros trabajos de evaluación de actividades biológicas de saponinas aisladas de equinodermos se realizaron con extractos purificados de estos organismos marinos. Esta tendencia ha cambiado en los últimos años y actualmente las estructuras novedosas publicadas en la literatura incluyen estudios de actividad biológica que permiten establecer correlaciones estructura-actividad y contribuyen a una mejor comprensión de la función que cumplen estos metabolitos secundarios en los organismos productores. Por ejemplo, la estrella de mar *Anasterias minuta*, endémica de las costas cercanas a Comodoro Rivadavia, produce tres saponinas mayoritarias (**1-3**) (Fig. 2), las cuales presentan la misma cadena de hexasacárido y se diferencian en la estructura de la cadena lateral del esqueleto esteroidal [3].

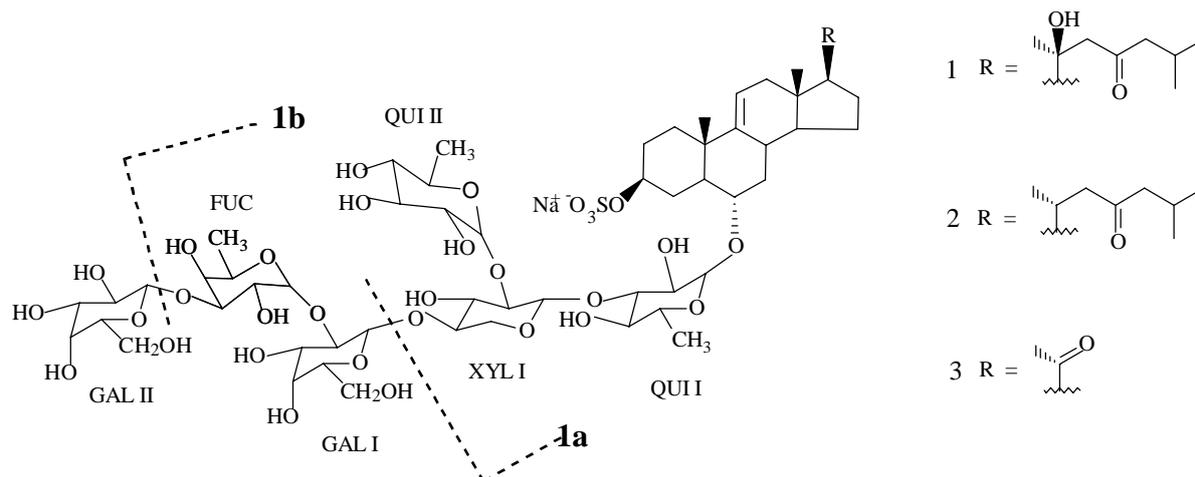


Figura 2: Saponinas aisladas de *Anasterias minuta*.

La evaluación de la actividad antifúngica frente al hongo fitopatógeno *Cladosporium cucumerinum* de los tres compuestos mostró que mientras Versicosido A (**1**) y Anasterósido A (**2**) resultaron activos, Anasterósido B (**3**) no mostró actividad antifúngica. También resultó inactivo el producto obtenido por desulfatación solvolítica de la saponina **1**. Por otra parte, la hidrólisis enzimática de **1** con una mezcla de glicosidasas de *Charonia lampas* rindió dos glicósidos, el triglicósido **1a** (Forbésido H) y el pentaglicósido **1b** (Thornasterósido A). Luego de su separación por HPLC, **1b** presentó una actividad antifúngica similar a la de las saponinas **1** y **2**, mientras que el triglicósido **1a** resultó inactivo. Estos resultados indicarían que la cadena de oligosacárido junto con la cadena lateral del esteroide y la presencia de un grupo sulfato en C-3 son características estructurales importantes en la actividad antifúngica de estas saponinas.

La toxicidad de las saponinas aisladas de *Anasterias minuta* y de una estrella de mar de Chile (*Heliaster helianthus*) ha sido demostrada *in situ* con especies de invertebrados intermareales en Mar del Plata, Comodoro Rivadavia y Península Valdés. Se observaron reacciones de escape, inmovilidad y muerte de los organismos al contacto con las fracciones enriquecidas en saponinas [4]. Un ejemplar del molusco *Siphonaria lessoni* liberó una mucosidad blanquecina al entrar en

contacto con estas fracciones. Una reacción similar se produjo en ejemplares de *S. lessoni* bajo estímulo mecánico, mediante presión del manto del animal. El análisis por RMN ^1H y de ^{13}C del extracto de cloruro de metileno de la mucosidad mostró la presencia de dos compuestos polipropionados (**3** y **4**) (Fig. 3), los cuales habían sido aislados previamente de *S. lessoni* de Chile y *S. pectinata*. Algunos autores han sugerido que los compuestos polipropionados en moluscos de la especie *Siphonaria* cumplirían un rol defensivo. La identificación de estos compuestos en alta concentración en la mucosidad liberada avalaría esta propuesta.

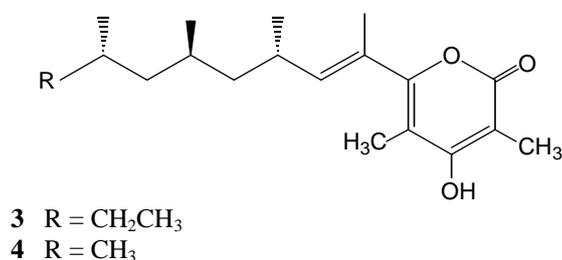


Figura 3: Norpectinatone (**3**) y Pectinatone (**4**) identificados en la mucosidad de *Siphonaria lessoni*.

Además de saponinas, las estrellas de mar producen glicósidos de esteroides polihidroxlados, los cuales forman mezclas complejas de compuestos minoritarios. Las unidades de monosacárido (una o dos) están usualmente unidas al C-24 de la cadena lateral de la aglicona esteroidal, aunque en varios de estos metabolitos secundarios los sitios de glicosidación comprenden C-3, C-26, C-28 o C-29. Estos compuestos muestran una variabilidad estructural mucho mayor que la de las asterosaponinas debido a la posibilidad de hidroxilación en distintas posiciones del esqueleto esteroidal (3 β , 6 (α o β), 8, 15 (α o β), 16 (α o β) y 24), a la identidad y posición de la unidad de monosacárido y a la presencia de grupos sulfato. La estrella *A. minuta*, además de las saponinas **1-3**, contiene los monoglicósidos sulfatados **5-7** (Fig. 4) [5], los cuales presentan una actividad antifúngica menor que las saponinas **1** y **2**.

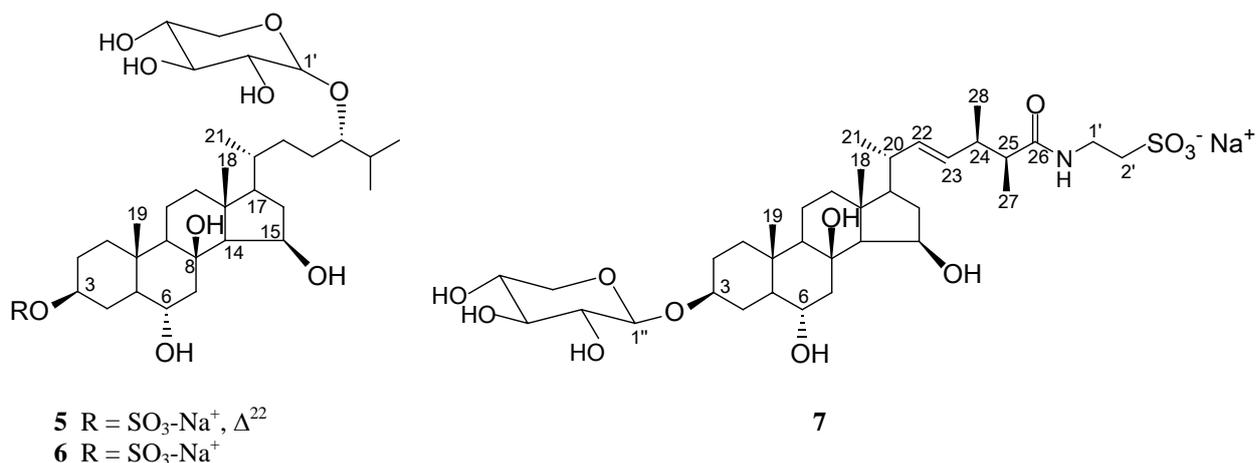


Figura 4: glicósidos polihidroxlados sulfatados de *A. minuta*.

Al igual que *A. minuta*, la mayoría de las estrellas de mar producen mezclas complejas de glicósidos esteroidales, lo cual requiere de la aplicación de varios pasos de purificación para obtener los compuestos puros. Al trabajar con extractos etanólicos de organismos marinos, el primer paso es la eliminación de sales, principalmente cloruro de sodio. Esto se logra percolando el extracto acuoso remanente de la evaporación del etanol por la resina Amberlite XAD-2, lavando con agua destilada hasta reacción negativa de cloruro (con una solución acuosa de nitrato de plata) y eluyendo los glicósidos con metanol. El extracto metanólico contiene la mezcla de asterosaponinas y de

glicósidos de esteroides polihidroxilados, los cuales pueden separarse en ambos grupos de metabolitos secundarios en función del peso molecular en una columna de Sephadex LH60 utilizando una mezcla de MeOH:H₂O (2:1) como solvente de elución. Las fracciones obtenidas se purifican por cromatografía en columna seca de sílica gel C-18 con mezclas de metanol y agua, con cantidades crecientes de metanol. La separación final de los glicósidos se realiza por HPLC en columna de fase reversa eluyendo en general con MeOH:H₂O (60:40).

Los compuestos se caracterizan luego por espectrometría de masa y RMN ¹H y de ¹³C en una y dos dimensiones. La espectrometría de masa es una técnica analítica muy sensible que posibilita el estudio de compuestos polares de alto peso molecular mediante la aplicación de técnicas de ionización suaves como el bombardeo con átomos rápidos (FAB, fase atom bombardment), electrospray (ESI) y MALDI (matriz assisted laser desorption ionization), ya sea en modo de iones negativos o positivos. Los glicósidos esteroidales sulfatados pueden ser caracterizados por estas técnicas sin derivatización previa, obteniéndose datos sobre su peso molecular y la secuencia de monosacáridos en la cadena de oligosacárido a partir del análisis de patrones de fragmentación. La aplicación de técnicas de espectrometría de masa tandem (EM/EM) permite obtener información sobre mecanismos de fragmentación de compuestos conocidos e información estructural sobre metabolitos nuevos.

A diferencia de las saponinas de estrellas de mar, las holoturinas son compuestos de mayor toxicidad, se encuentran en mayor proporción en los organismos productores y son específicos para diferentes grupos taxonómicos de holotureos. Las agliconas de estas saponinas presentan un anillo lactónico 18,20 y se clasifican en dos series: las que presentan un doble enlace $\Delta^{9,11}$ y aquéllas con uno Δ^7 . Recientemente hemos estudiado tres especies de holotureos, dos de ellos recolectados en el Mar Argentino: *Psolus patagonicus* y *Hemoiedema spectabilis* y un tercero en las cercanías de las Islas Georgias del Sur: *Staurocucumis liouvillei*. Los tres holotureos producen tetraglicósidos triterpenoidales sulfatados en las unidades de monosacárido.

Los Hemoiedemósidos A (**8**) y B (**9**) (Fig. 5) presentan la misma aglicona triterpenoidal y se diferencian en el grado de sulfatación de la cadena tetraglicosídica. Ambos glicósidos presentaron actividad antifúngica frente al hongo fitopatógeno *Cladosporium cucumerinum*, siendo más activos que benomyl, un fungicida comercial [6]. La evaluación de las zootoxicidades de **8** y **9** en el bioensayo de mortalidad de larvas del crustáceo *Artemia salina* mostró una alta toxicidad del glicósido **8** (CL₅₀ 18.7 ppm) en comparación con **9** (CL₅₀ 47.5 ppm), mientras que el derivado semisintético desulfatado resultó mucho menos citotóxico (CL₅₀ 424.5 ppm).

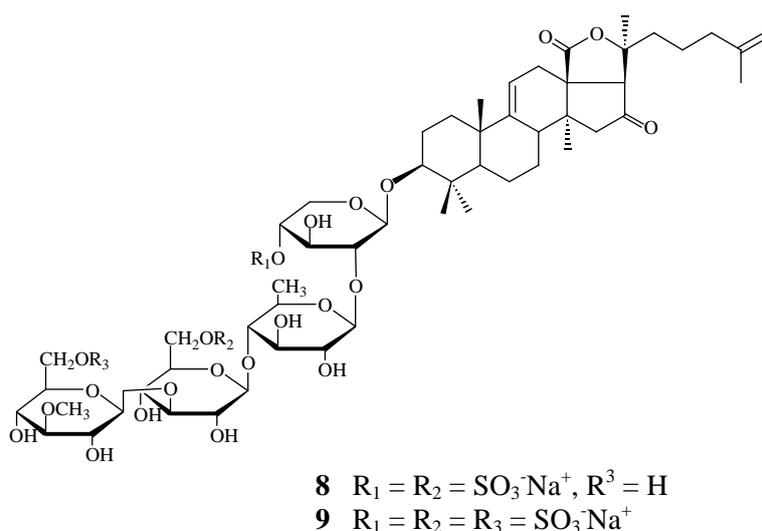


Figura 5: Holoturinas aisladas de *Hemoiedema spectabilis*.

Patagonicósido A (**10**) aislado de *P. patagonicus* (Fig. 6) presenta la misma cadena glicosídica que **8** y se diferencia de éste en el doble enlace en Δ^7 y la presencia de dos grupos hidroxilo en C-12

(α) y C-16 (α) [7]. Comparando las actividades antifúngicas de **8**, **9** y **10**, este último glicósido presenta una actividad menor. A diferencia de lo que se observa en asterosaponinas, los derivados semisintéticos desulfatados de **8-10** retienen la actividad antifúngica pero son mucho menos activos. Estos resultados sugieren que tanto la estructura de la aglicona como la presencia y el número de grupos sulfato en la cadena de oligosacárido juegan un papel importante en la actividad antifúngica de estas saponinas.

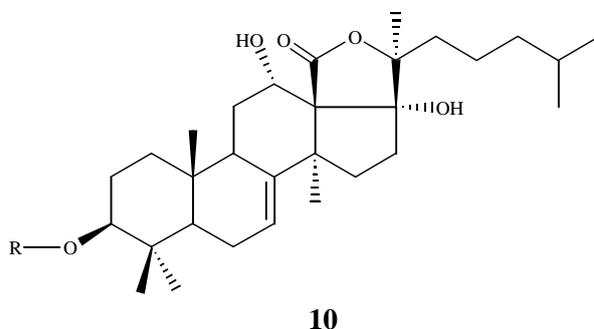


Figura 6: Patagonicosido A aislado de *Psolus patagonicus*.

Los Liouvillósidos A (**11**) y B (**12**) (Fig. 7) aislados de *Staurocucumis liouvillei* son glicósidos trisulfatados con la misma cadena glicosídica que **9**. Ambos compuestos se diferencian en un doble enlace en C-24 y presentan actividad virucida frente a herpes simplex, siendo el glicósido **12** el más activo [8]. Varias saponinas naturales aisladas de plantas presentan un comportamiento similar, ya sea ejerciendo un efecto virucida directo o por interferencia en un paso del ciclo de replicación del virus.

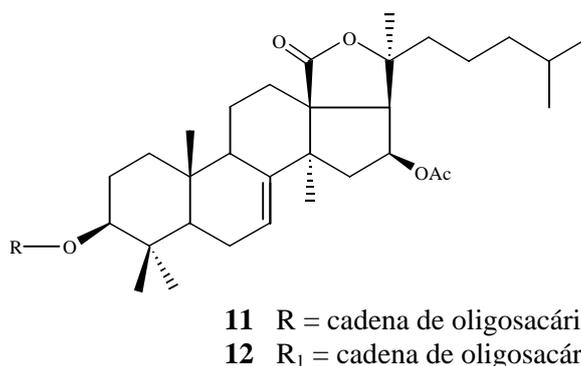


Figura 7: Holoturinas aisladas de *Staurocucumis liouvillei*.

A diferencia de los organismos de las clases Asteroidea y Holoturoidea, los ofiuros se caracterizan por producir esteroides disulfatados en C-3 (α) y C-21 con grupos hidroxilo adicionales en los anillos A y B. Estos compuestos también han sido aislados de algunas especies de esponjas. En los últimos años hemos caracterizado varios esteroides sulfatados novedosos de ofiuros del Atlántico Sur como por ejemplo los compuestos **13-16** (Fig. 8) aislados de *Ophiocoma echinata* y *Ophioplocus januarii* [2]. Estos compuestos presentaron actividad antiviral frente a virus patógenos en humanos como el virus herpes simplex, sincitial respiratorio y virus Junin, responsable de la fiebre hemorrágica argentina. La evaluación de la actividad antiviral de otros esteroides disulfatados naturales aislados del ofiuro antártico *Astrotoma agassizii*, nos permitió identificar como característica estructural importante para la actividad antiviral la presencia de grupos hidroxilo sulfatados en C-2 y C-3 del núcleo esteroidal.

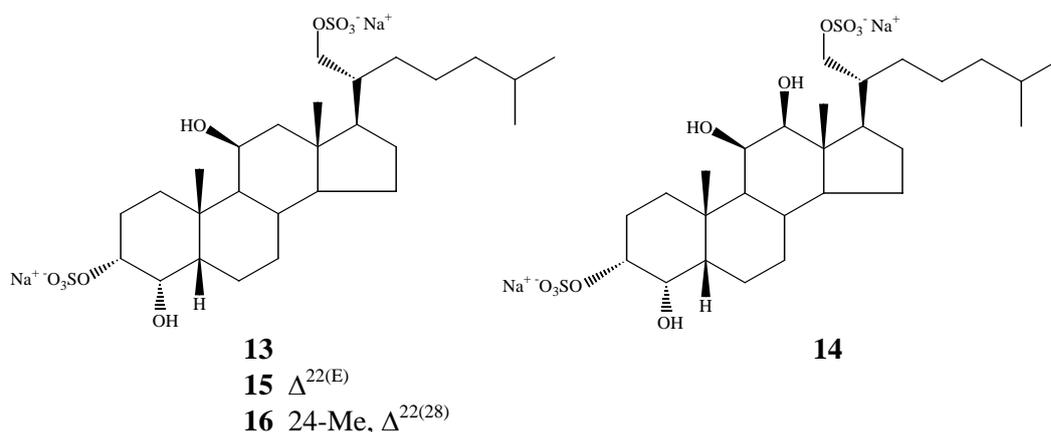
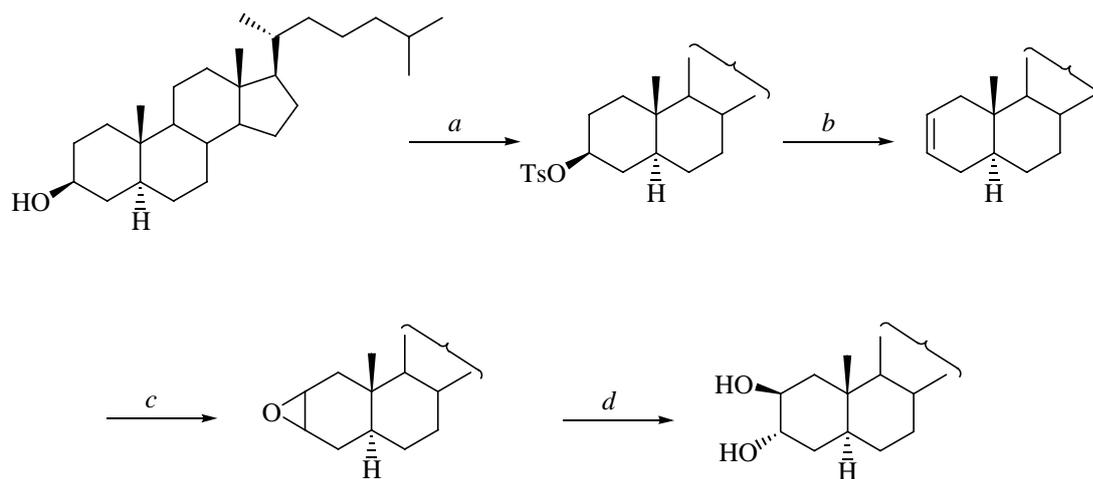


Figura 8: esteroides disulfatados aislados de *O. echinata* y *O. januarii*.

Dado que una limitación sería para la realización de estudios de actividad biológica de productos naturales marinos es su baja proporción en algunos organismos productores, la síntesis de análogos se presenta como la mejor alternativa en estos casos. Partiendo de 3 β -hidroxi-5 α -colestano, por tosilación y eliminación, introducimos un doble enlace en C-2–C-3, el cual por epoxidación y posterior apertura del epóxido en medio ácido rindió el análogo dihidroxilado en C-2 (β) y C-3 (α) (Esquema 1).



Esquema 1: a. TsCl, piridina, t.a., 24 h; b. LiBr, LiCO₃, DMF, reflujo, 1.5 h; c. ácido *m*-cloroperbenzoico, Na₂CO₃, Cl₂CH₂, t. a., 4 h; d. H₂SO₄ 1N, THF, t.a., 24 h

El 2 β ,3 α -dihidroxi-5 α -colestano fue sulfatado utilizando el complejo de trióxido de azufre-trietilamina obteniendo los compuestos monosulfatados en C-2 y C-3 y el disulfatado (Fig. 9):

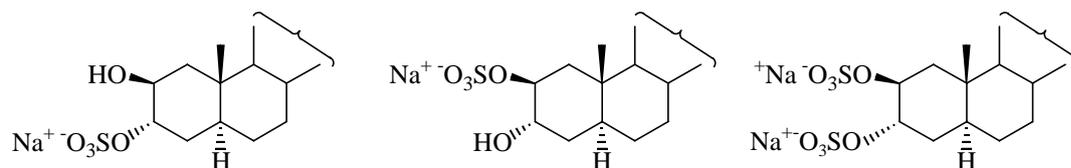


Figura 9: análogos monosulfatados y disulfatado de 2 β ,3 α -dihidroxi-5 α -colestano.

Los compuestos monosulfatado en C-2 y disulfatado fueron los más activos frente al virus herpes simplex (HSV-2), mientras que el dihidroxilado resultó inactivo. El esteroide disulfatado

presentó el mejor índice de selectividad (relación entre la concentración de compuesto necesaria para reducir la viabilidad de las células en un 50% y la concentración que reduce el número de placas de virus en un 50%) y por eso se continuó con las pruebas de actividad frente al virus Junin y al virus del dengue. El esteroide disulfatado resultó inactivo frente al virus Junin pero presentó una marcada actividad inhibitoria frente al virus del dengue [9]. Estos resultados indican que el 2 β ,3 α -dihidroxi-5 α -colestano disulfatado es un buen compuesto modelo para introducir grupos funcionales adicionales en el esqueleto esteroidal y la cadena lateral para establecer correlaciones entre la estructura y la actividad inhibitoria frente a virus patógenos en humanos. Recientemente se han aislado de esponjas varios esteroides polihidroxilados sulfatados en C-2 (α), C-3 (β) y C-6 (α) que presentan actividad antiviral frente al virus de la leucemia y HIV. Estos resultados indican que los esteroides sulfatados en los anillos A y B se presentan como compuestos con potencial actividad antiviral frente a virus patógenos en humanos.

En conclusión, los organismos marinos son una fuente poco investigada para el descubrimiento de nuevas moléculas con actividades biológicas promisorias. El estudio de especies del Mar Argentino desde el punto de vista químico permitirá encontrar nuevos metabolitos bioactivos, entender relaciones entre especies y aumentar nuestros conocimientos sobre recursos muy poco explotados por nuestro país.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- [1] F. Pietra. *Biodiversity and Natural Products Diversity*. Pergamon, United Kingdom, 2002.
- [2] M. S. Maier, A. P. Murray, *Secondary Metabolites of Biological Significance from Echinoderms*. En: M. Fingerman, R. Nagabhushanam. (Ed), *Biomaterials from Aquatic and Terrestrial Organisms*; Science Publishers, New Hampshire, 2006.
- [3] H. D. Chludil, A. M. Seldes, M. S. Maier, *J. Nat. Prod.* **2002**, 65, 153.
- [4] R. L. S. Centurión, *Evaluación del efecto de las saponinas aisladas de Heliaster helianthus (Lamarck, 1816) y Anasterias minuta Perrier 1875: ensayos in situ y bioactividad*. FCEyN, UBA, Buenos Aires, 2005.
- [5] H. D. Chludil, M. S. Maier, *J. Nat. Prod.* **2005**, 68, 1279.
- [6] H. D. Chludil, C. Muniain, A. M. Seldes, M. S. Maier, *J. Nat. Prod.* **2002**, 65, 860.
- [7] A. P. Murray, C. Muniain, A. M. Seldes, M. S. Maier, *Tetrahedron* **2001**, 57, 9563.
- [8] M. S. Maier, A. J. Roccatagliata, A. Kuriss, A. M. Seldes, C. A. Pujol, E. B. Damonte, *J. Nat. Prod.* **2001**, 64, 732.
- [9] G.A. Garrido Santos, A.P. Murray, C.A. Pujol, E.B. Damonte, M.S. Maier, *Steroids* **2003**, 68, 125.