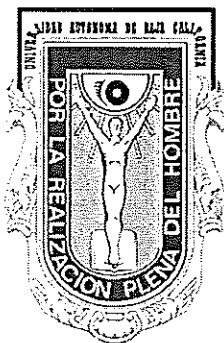


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLOGICAS



“AISLAMIENTO Y ELUCIDACION ESTRUCTURAL DE
SEMINAFTOQUINONAS BIOACTIVAS, A PARTIR DE UN NUEVO GENERO
DE ACTINOMICETO MARINO DE LA FAMILIA STREPTOMYCETACEAE”

TESIS

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS
NECESARIOS PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFIA COSTERA

PRESENTA:

IRMA ESTHELA SORIA MERCADO

Ensenada, Baja California, México. Agosto de 2004.

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLOGICAS
POSGRADO EN OCEANOGRAFIA COSTERA

AISLAMIENTO Y ELUCIDACION ESTRUCTURAL DE
SEMINAFTOQUINONAS BIOACTIVAS, A PARTIR DE UN NUEVO GENERO
DE ACTINOMICETO MARINO DE LA FAMILIA STREPTOMYCETACEAE.

TESIS

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS
NECESARIOS PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS


PRESENTA:

IRMA ESTHELA SORIA MERCADO

Aprobada por:



Dr. William Fenical
Presidente del jurado




Dr. Ramón Cajal Medrano
Sinodal



Dr. José Vinicio Macías Zamora
Sinodal



Dr. Gerardo Aguirre Hernández
Sinodal



Dr. Miguel Angel Huerta Díaz
Sinodal

INDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCION	3
ANTECEDENTES	9
OBJETIVO	14
METAS	15
HIPOTESIS	16
METODOLOGIA	17
RESULTADOS Y DISCUSION, CEPA CNQ-525	24
RESULTADOS Y DISCUSION, CEPA CNQ-904	65
CONCLUSIONES.....	69
BIBLIOGRAFIA	71
ANEXO 1	78

DEDICATORIA

Al hombre de mi vida, a Humberto, quien es uno de los más grandes regalos que me ha dado Dios nuestro señor, por todo tu apoyo, comprensión, cariño y respeto; mi amor, admiración y agradecimiento por siempre, porque sólo tú hubieras podido hacer lo que hiciste por mí.

A mi querido César, quien es mi mayor motivación e inspiración, con todo mi amor, para que ésta sea una de sus metas en la vida.

A la memoria de mis padres José y Elvira, Dios los tenga en su bendita gloria.

A mis segundos padres: María de Jesús y Samuel, con todo mi cariño.

A todos mis hermanos, sobrinos y cuñados con todo mi amor.

A mis queridos exalumnos, como un ejemplo del esfuerzo que uno de sus maestros puede hacer para superarse y poder transmitirles lo mejor cada día sin importar la edad.

AGRADECIMIENTOS

A Dios gracias, por haberme permitido lograr esta meta tan difícil en una etapa de mi vida aún más difícil; por nunca dejarme de lado, por acompañarme en cada momento y por hacerse presente en mi vida en cada momento, sobre todo en aquellos en que más lo necesite. Su presencia es el mayor estímulo que siempre puedo tener.

Al Dr. William Fenical a quien tuve la fortuna de conocer siendo aún una estudiante de Química y en quien siempre pensé como la persona idónea para dirigir un trabajo en esta área. Agradezco profundamente todo su apoyo, el darme la oportunidad de formar parte de su selecto grupo de investigadores, con todos los derechos y obligaciones que a ello concierne; es la mejor oportunidad que he tenido en mi vida. Gracias mil Dr. Fenical, siempre tendrá mi respeto y admiración.

A todos los miembros de mi comité de tesis, por su apoyo, sus observaciones tan atinadas y todo el tiempo que dedicaron a este trabajo, gracias mil.

Un especial agradecimiento a mi tutor académico Dr. Miguel Angel Huerta, quien orgullosamente puedo decir que es el mejor Tutor Académico que conozco, gracias por su amistad y por el apoyo incondicional en la culminación de este posgrado.

Un agradecimiento muy especial para Alejandra Prieto, quien fue mi alumna y después mi compañera de laboratorio. Gracias Alejandra por todo tu apoyo, por tu compañía, por abrirme las puertas de tu casa cuando lo necesité,

por ser mi traductora oficial, pero sobre todo, gracias por ser una verdadera amiga, sé que siempre estarás ahí y confío en tí plenamente, Que Dios nuestro señor te acompañe siempre.

A los amigos que de una forma u otra me apoyaron en la realización de esta tesis, gracias Paul, Kwon, Tim, Eric, Amayaly, Lik, Chris, Matt, Sara, Liza, Olvin, J Young, Erin, Ana Paula y Ale.

A mis compañeros del CBMB, Lik, Kwon, Mercedes, Paul, J Young, Eric, Dong Chan, Tim, Phillips, Ana Paula, Sebastián, Tracy, Chris, Chrisy, Matt, Francesca, Liza, Sara, Stephanie, gracias por su amistad y los buenos momentos en los campings, fiestas, reuniones y demás.

Al Centro de Biotecnología Marina y Biomedicina del Instituto de Oceanografía Scripps, Universidad de California, San Diego, por haberme permitido realizar este trabajo en sus instalaciones.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para la realización de este trabajo.

Al Programa de Mejoramiento del Profesorado, por la beca compensatoria que se me otorgó para la realización de este trabajo.

A la Facultad de Ciencias Marinas por todo el apoyo brindado para la culminación de este grado, en especial al Director de la Facultad, Dr. Roberto Millán Núñez por su confianza y apoyo.

A mis amigotas de siempre: Mayra, Angélica, Lorena, Mary, Nely, Martha y Rosario, por su incondicional apoyo.

RESUMEN

A partir de la cepa bacteriana CNQ-525 de actinomicetos marinos, se aislaron tres compuestos nuevos y dos compuestos conocidos con estructuras base de dihidroquinonas, estructuralmente relacionados con los terpenoides tipo lineales de seminaphtoquinonas, conocidas en parte como napyradiomycinas. El extracto presentó actividad antibacterial y anticancerígena por lo que fue separado mediante cromatografía en columna fase reversa C-18 y los compuestos obtenidos fueron purificados mediante HPLC C-18. Los compuestos obtenidos fueron etiquetados como CNQ-525-512, CNQ-525-510, CNQ-525-492, CNQ-525-528 y CNQ-525-546 y mostraron actividad potencial contra la cepa resistente a Meticilina *Staphylococcus aureus* (MIC= 1.953, 15.625, 1.953, 1.9, 1.9 $\mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente) y contra la cepa resistente a Vancomicina *Enterococcus faecium* (MIC= 3.906, 15.625, 1.953, 3.9, 3.9 $\mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente). Los compuestos CNQ-525-512, CNQ-525-510, CNQ-525-528 y CNQ-525-546, también presentaron actividad citotóxica contra células de carcinoma colorectal HCT-116 (IC₅₀= 2.404, 0.969, 1.84 y 4.22 $\mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente). La elucidación absoluta de los cinco compuestos fue deducida empleando espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear en una y dos dimensiones, Infrarrojo, Ultravioleta, así como Rotación óptica y Espectrometría de Masas.

ABSTRACT

From the marine strain CNQ-525 of marine actinomycetes were isolated three novel and two known dihydroquinones. The metabolites were structurally related to a linear terpenoid seminaphthoquinone known, in part, as the napyradiomycins. The filtrate extract showed antibacterial and cytotoxic activity, and the fractionation by C-18 column chromatography and C-18 HPLC was undertaken. The compounds were labeled as CNQ-525-512, CNQ-525-510, CNQ-525-492, CNQ-525-528 y CNQ-525-546. These compounds showed potential activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MIC= 1.953, 15.625, 1.953, 1.9, 1.9 $\mu\text{g mL}^{-1}$ respectively) and against vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (MIC = 3.906, 15.625, 1.953, 3.9, 3.9 $\mu\text{g mL}^{-1}$ respectively). The compounds CNQ-525-512, CNQ-525-510, CNQ-525-528 and CNQ-525-546, also showed significant potency against HCT-116 human colon carcinoma (IC_{50} = 2.404, 0.969, 1.84 and 4.22 $\mu\text{g mL}^{-1}$ respectively).

The absolute elucidation of the five compounds were deduced using one and two dimensional NMR, IR and UV spectroscopy as well as $[\alpha]^{25}_{\text{D}}$ and mass spectrometric analyses.

INTRODUCCION

La investigación en el campo de los productos naturales obtenidos de plantas y animales ha provocado el aislamiento de miles de compuestos con aplicaciones prácticas, tales como pigmentos, insecticidas, fragancias, productos farmacéuticos, y, sobre todo, como herramienta médica. Aproximadamente el 25 % de los productos que actualmente se emplean en tratamientos contra algún tipo de cáncer, son obtenidos de fuentes naturales y otro 25 % a través de compuestos sintéticos derivados de productos naturales (Davidson, 1995). En los años 60's los investigadores enfocaron su atención hacia los océanos ya que éstos cubren más del 70 % de la superficie de la tierra, incluyendo habitat tan diversos como aguas someras, tropicales, arrecifes coralinos y trincheras de mar profundo, entre otros. Asimismo, las variaciones ambientales son extremas en cuanto a presión, temperatura y salinidad, por lo que se pueden encontrar una infinidad de organismos de todo tipo, con capacidades metabólicas y fisiológicas únicas, los cuales producen compuestos químicos que les sirven en su adaptación y sobrevivencia. De las 14 millones de especies que se conocen, el 90 % son marinas (Pellew, 1996) y de los 33 fila, 15 son exclusivamente marinos y solo uno es exclusivamente terrestre (Heywood y Watson, 1995), por lo que los organismos marinos representan una fuente potencial de metabolitos secundarios con estructuras nuevas y con una aplicación farmacológica de enormes dimensiones (Faulkner, 1996; Davidson, 1995).

La investigación en este campo ha estado enfocada especialmente a algunos organismos como esponjas, corales blandos, algas, ascideas, bryozoarios y moluscos y se ha encontrado que los organismos marinos producen metabolitos secundarios únicos, con aplicaciones médicas relevantes (Ireland *et al.*, 1993; Carté, 1993). Sin embargo, ha existido el problema de que en ocasiones, los compuestos aislados presentan estructuras muy complicadas para ser sintetizadas, por lo que resultan incosteables. Asimismo, no han sido desarrolladas ampliamente las técnicas acuaculturales con estos organismos y, en ocasiones, los resultados en la producción de compuestos no son reproducibles. La relativa mayor facilidad de cultivo de microorganismos y su velocidad de crecimiento, originó que los investigadores enfocaran su atención a este campo.

Los microorganismos marinos se encuentran presentes en la columna de agua, en los sedimentos, en objetos inanimados y en la superficie de todos los animales marinos. De hecho, existen muchos estudios sobre bacterias asociadas a invertebrados marinos como simbiosis, lo que ha dado como resultado trabajos de gran interés ecológico al determinar la influencia de los microorganismos en la producción de metabolitos secundarios (Kelly-Gutiérrez, 1999.; Faulkner *et al.*, 2000).

Los microorganismos marinos incluyendo bacterias, hongos y microalgas, han recibido un interés cada vez mayor en los últimos 20 años. Desde el descubrimiento de la penicilina en 1929 se incrementaron los estudios en bacterias y hongos, sobre todo en aquellos que provienen de sedimentos

marinos, ya que se ha encontrado que poseen una fuente rica de metabolitos secundarios bioactivos (Fenical, 1993). En los últimos 70 años se han descubierto más de 50,000 productos naturales a partir de microorganismos marinos. Más de 10,000 son biológicamente activos y más de 8,000 de entre ellos presentan actividades antibióticas y antitumorales (Berdy, 1989; Betina, 1989).

A finales de los años cuarentas y cincuentas, los pioneros de la microbiología marina (Rosenfeld and Zobell, 1947; Grein and Meyers, 1958) demostraron que las bacterias marinas producían agentes antimicrobiales. También se demostró que el plancton (Steeman-Nielsen, 1955) y las bacterias (Baam *et al.*, 1966; Baslow, 1969) producían antibióticos.

Los estudios realizados sobre microorganismos marinos han permitido descubrir que cada día los antibióticos obtenidos a partir de ellos causan resistencia a las bacterias, por lo que es necesario enfocar las investigaciones hacia la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos con la finalidad de suplir las carencias de medicamentos efectivos contra enfermedades infectocontagiosas. En los años cuarentas, todas las cepas de la bacteria *Staphylococcus aureus* eran sensibles a la penicilina G, mientras que para 1992 esta cepa era resistente a este antibiótico.

Los actinomicetos están cercanamente relacionados con las bacterias verdaderas por su tamaño, composición química y actividades biológicas. También lo están con los hongos debido a su crecimiento filamentoso y en forma de colonias de micelios. Los actinomicetos han sido definidos como

microorganismos unicelulares filamentosos, con un diámetro aproximado de 1 μm de diámetro. Su nombre se deriva del griego *aktino* que significa rayo y *mykes* que significa hongos. Los actinomicetos han sido considerados como un grupo separado de microorganismos que ocupan una posición intermedia entre los hongos verdaderos y las bacterias verdaderas (Walksman, 1967). Esto ha sugerido que los actinomicetos forman parte del prototipo original del cual se derivaron los hongos y las bacterias. Ciertos géneros de actinomicetos como *Nocardia* (la cual es responsable de causar una variedad de infecciones, incluyendo mycetoma), están íntimamente relacionados con micobacterias y corinebacterias. Otros géneros notables son *Streptomyces* y *micromonospora*, los cuales tienen su contraparte en los hongos (Walksman, 1967). El aislamiento de antibióticos a partir de cultivos de actinomicetos marcó el punto más alto de desarrollo de su conocimiento, cambiando el concepto antiguo que los consideraba: "un grupo pequeño e insignificante de organismos que causan ciertas enfermedades desconocidas", al reconocimiento actual de: "un gran grupo micro biológicamente importante de distribución universal con numerosas actividades bioquímicas y que posee una gran potencialidad práctica".

En el Centro de Biotecnología Marina y Biomedicina (CBMB) del Instituto Oceanográfico de Scripps, en la Universidad de California San Diego, se ha estado investigando desde hace 10 años el potencial de los microorganismos marinos como una fuente de compuestos nuevos con actividad farmacológica. Desde el inicio, se seleccionaron los actinomicetos como objetivo lógico, dada su significancia histórica en la contraparte terrestre. Dado que se ha pensado que

los actinomicetos marinos se derivan de los terrestres y que sus esporas son acarreadas al mar, en donde pueden permanecer en forma latente por muchos años, se piensa que pueden generar una gran cantidad de metabolitos secundarios para adaptarse al medio marino (Fenical, 1993). Asimismo, pueden cambiar sus condiciones fisiológicas y desarrollar nuevas cepas bacterianas, por lo que los océanos pueden representar un gran reservorio de nuevas taxa de actinomicetos (Faulkner, 1996).

El grupo de investigadores del Dr. William Fenical del CBMB ha encontrado más de 30 metabolitos secundarios bioactivos nuevos derivados de actinomicetos, por lo que claramente estos microorganismos representan una fuente promisoría de productos naturales. Asimismo, estudios realizados relacionados con las variaciones en los medios de cultivo, ha permitido reconocer a un grupo nuevo de actinomicetos marinos, taxonómicamente llamado *Salinospora*, mismo que contiene un gran número de especies. Análisis filogenéticos indicaron que *Salinospora* forma parte de la familia Micromonosporaceae (Jensen *et al.*, 2003). El descubrimiento del grupo *Salinospora* es importante no solamente desde el punto de vista filogenético, sino que al ser muy prolífero, representa una fuente significativa de metabolitos secundarios bioactivos, como es el caso del compuesto Salinosporamide A, el cual fue aislado de este género de bacterias y representa un anticancerígeno muy potente. Este compuesto actualmente está siendo evaluado por los laboratorios farmacéuticos Nereus, con autorización de la Universidad de California. Nereus es una compañía de biotecnología enfocada al descubrimiento y desarrollo de fármacos a partir de organismos marinos (Se

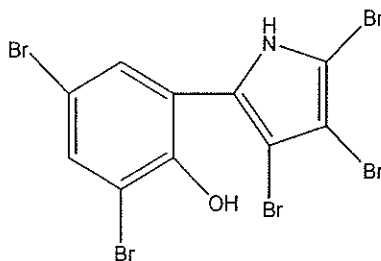
considera que un metabolito es potencialmente bioactivo, cuando su concentración mínima inhibitoria es menor de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ (www.Nereuspharm.com).

Actualmente se siguen descubriendo nuevos metabolitos secundarios bioactivos y nuevos géneros de actinomicetos, tal como en el caso de *Marinomyce* del cual se aislaron cuatro nuevos compuestos anticancerígenos llamados colectivamente Marinomycin (A a D) (Kwon, 2004). Asimismo, la bacteria empleada en esta investigación resultó ser un género desconocido de la familia *Streptomycetaceae* y una nueva fuente de compuestos antibióticos y anticancerígenos.

ANTECEDENTES

Los sedimentos marinos incluyen un microhabitat rico en materia orgánica que varía de lugar a lugar. Los sedimentos de estuarios y bahías son ricos en materia orgánica y proveen una diversidad de bacterias no encontradas comúnmente en hábitat limitados por nutrientes. En aguas costeras, incluyendo aguas templadas y de océanos tropicales, la diversidad de sedimentos presenta diferencias químicas muy marcadas, por lo que estos sedimentos podrían ser una fuente de flora bacteriana (Fenical, 1993). La diversidad y abundancia de los actinomicetos varía con la estación del año y con la profundidad. Se ha reportado que generalmente son más abundantes en verano en las capas más superficiales de sedimento (0.20 cm) (Ghanem *et al.*, 2000).

El conocimiento de bacterias aisladas de sedimentos marinos remonta a los trabajos pioneros de los investigadores del Instituto de Microbiología Química de Tokio, Japón, quienes aislaron del actinomiceto *Chainia purpurogena*, un antibiótico con estructura de benzantraquinona que presentó actividad antitumoral contra el carcinoma de Ehrlich (Kitahara, 1975). Este registro es el primero del orden Actinomycetales en ambientes marinos. Sin embargo, el primer metabolito aislado a partir de bacterias marinas fue un antibiótico de estructura pirrólica altamente bromado:



Este compuesto, obtenido de bacterias presentes en la superficie del pasto marino *Thalassia*, presentaba propiedades antibióticas contra bacterias Gram-positivas (Bulkholder *et al.*, 1966). Originalmente se clasificó a esta bacteria como *Pseudomona bromoutilis* pero, en 1980, Sherman *et al.*, la identificaron como una *Alteromona*. En trabajos más recientes, se han reportado tanto la síntesis de este compuesto, llamado actualmente pentabromopseudiline, como sus propiedades antitumorales, (Laatsch *et al.*, 1989).

En 1940 Actinomycin fue el primer antibiótico aislado en forma cristalina a partir de *Actinomyces antibioticus* (Walksman, 1967), seguido de streptothricin en 1942, y streptomycin en 1943. Este último, al igual que novobiocin, fueron una herramienta muy importante en la pos-guerra para la llamada revolución de los antibióticos, durante la cual se colocaron a este tipo de bacterias en el centro de la investigación de los productos naturales marinos con actividad farmacológica (Jensen, *et al.*, 2003).

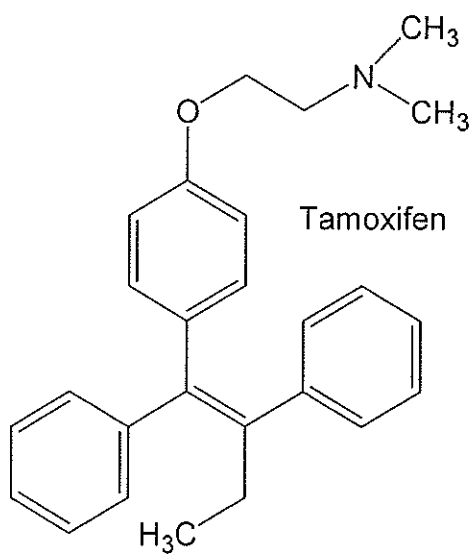
En 1974, Andersen *et al.*, aislaron un pigmento de color púrpura que presentó una fuerte actividad antibiótica, a partir de la cepa identificada originalmente como *Chromobacterium sp.* Esta cepa que fue identificada posteriormente como *Alteromonas*, presentó una fuerte actividad contra *S. Aureus*, *E. Coli*, *P. aeruginosa* y *C. Albicans* (Baumann *et al.*, 1981).

Uno de los trabajos pioneros en antibióticos aislados a partir de bacterias marinas fue el de Okazaki *et al.*, (1975), desarrollado en el Instituto de Química Microbiana de Tokio, Japón. Para este trabajo, los investigadores aislaron el compuesto hidroxiquinona SS-228Y del actinomiceto marino *Chainia sp.*, el cual

procedía de una muestra de sedimento marino. Este compuesto inhibe múltiples bacterias Gram-positivas y ciertos tipos de carcinoma. Alteramide A es un alcaloide citotóxico que fue aislado de la bacteria marina *Alteromonas* sp., la cual a su vez se aisló de la esponja marina *Halichondria okadai* (Shigemori *et al.*, 1992). El compuesto presentó actividad citotóxica contra células de leucemia P388 y linfoma L1210, así como contra el carcinoma de células epiteliales KB.

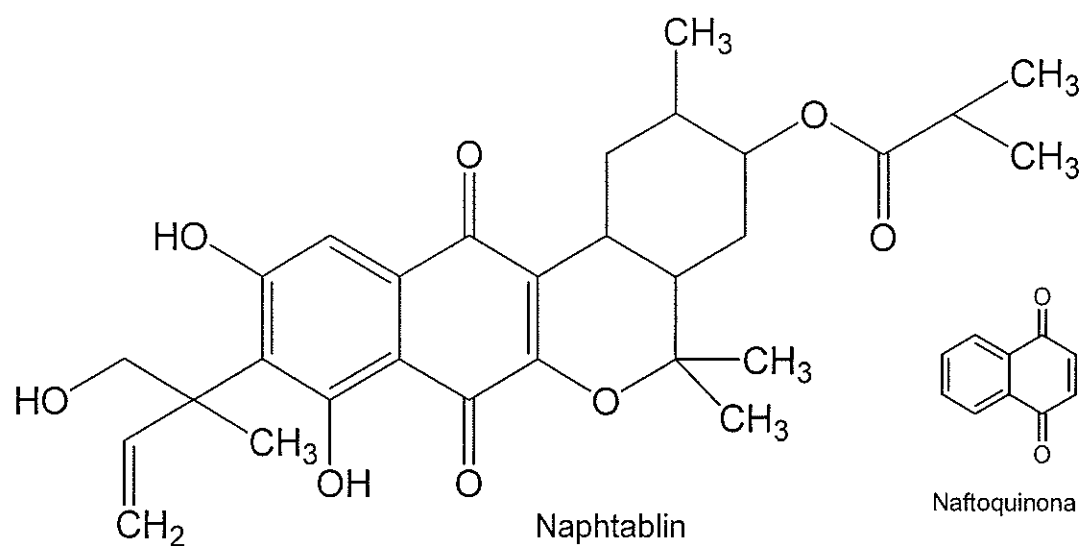
Algunos compuestos con estructuras de seminaftoquinonas, llamados por algunos autores napyradiomycinas (Shiomi *et al.*, 1986 a, b; Shiomi *et al.*, 1987), han presentado actividad antagonista de estrógeno-receptor (Hori *et al.*, 1993). Asimismo se ha reportado actividad inhibitoria contra bacterias Gram-positivas, incluyendo cepas resistentes a drogas (Shiomi, *et al.*, 1986a).

Los antagonistas estrógeno-receptor son usados en la terapia de enfermedades estrógeno-respuesta, incluyendo el cáncer de pecho y el cáncer endometrial. Tamoxifen, el antagonista estrógeno-receptor y un compuesto no esterooidal, es ahora la opción número uno en el tratamiento de cáncer avanzado de pecho.



Sin embargo, y a pesar de su efectividad, el uso prolongado de este medicamento y de algunos otros relacionados químicamente, sobre todo aquellos que presentan una porción de trifeniletileno, frecuentemente resulta en efectos de resistencia tumoral. Debido a las razones anteriores, actualmente se buscan con intensidad compuestos químicos que no contengan esta porción y que presenten actividad contra cáncer de pecho (Hori *et al.*, 1993).

Algunos compuestos como el Aristeromycin (Mizutani *et al.*, 1995) y Naphtablin (Umezawa *et al.*, 1995), con estructuras similares a las napyradiomycinas pero



con el esqueleto de una naftoquinona, han sido aislados de actinomicetos y han presentado actividad contra algún tipo de leucemia. Asimismo, compuestos antibióticos como el A80915A, aislado por primera vez por Fakuda *et al.* (1990-a) y también en el presente trabajo bajo el código CNQ-525-528, ha presentado actividad como potente inhibidor (H⁺-K⁺)-ATPasa gástrica, que es la enzima responsable de la secreción de ácido en el estómago.

Estudios recientes que están siendo realizados en la actualidad en el Centro de Biotecnología Marina y Biomedicina del Instituto de Oceanografía de Scripps han

permitido observar que los microorganismos presentan adaptaciones a diferentes condiciones de nutrientes, las cuales se relacionan con los nutrientes naturales en habitats marinos. Por lo que para estudios posteriores, es necesario considerar esos experimentos y desarrollar el medio de cultivo y los factores de crecimiento adecuados para la optimización en el aislamiento de bacterias y sus productos.

OBJETIVO

Aislar y elucidar la estructura de los compuestos bioactivos presentes en un género nuevo de actinomiceto marino perteneciente a la familia *Streptomycetacea*.

METAS

- Obtención de 35 L de cultivo del actinomiceto marino CNQ-525 y preparación del extracto correspondiente.
- Aislamiento y purificación de compuestos presentes en el extracto acetónico del actinomiceto marino CNQ-525, con actividad citotóxica y antibiótica, mediante métodos cromatográficos.
- Determinación de citotoxicidad de los compuestos elucidados, usando células de carcinoma colorectal HCT 116.
- Determinación de la actividad antibiótica de los compuestos aislados contra la cepa resistente a meticilina MR *Staphylococcus aureus* y resistente a vancomicina VR *Enterococcus faecium*.
- Difusión de los resultados mediante la publicación de dos artículos con arbitraje internacional.

HIPOTESIS

La cepa bacteriana CNQ-525 obtenida a partir de sedimentos marinos de la Bahía de San Diego, contiene compuestos nuevos con actividad anticancerígena y/o antibiótica

METODOLOGIA

Colecta:

La cepa bacteriana CNQ-525 se obtuvo a 500 m de profundidad a partir de sedimentos de la Bahía de San Diego, los días 6 de Septiembre y 9 de Noviembre del 2001. La muestra se colectó con una draga de acero inoxidable de 12 cm de longitud, Khalsico con adaptaciones hechas por técnicos del Instituto Oceanográfico Scripps para muestreos desde embarcaciones pequeñas. La cepa fue clasificada como CNQ-525, (Control Number por sus siglas en inglés, seguido por una letra del alfabeto de la A a la Z y un número distintivo para cada una). Esta cepa fue seleccionada debido a resultados obtenidos previamente por Prieto-Davo (2002), quien encontró actividad antibacteriana contra otras cepas muestreadas de manera similar.

La cepa bacteriana CNQ-904 se obtuvo a 40 m de profundidad, de sedimentos de la Isla Guam, USA, el día 19 de enero de 2002, las mismas mismas técnicas de recolección que en la cepa anterior.

Identificación de las bacterias

Las bacterias fueron identificadas mediante la secuenciación del RNA ribosomal 16S, para lo cual se amplificaron de 10 a 50 ng de DNA genómico por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), usando un oligonucleótido (PRIMER) FC27 (5'-a- 3' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG). Los productos del PCR fueron purificados con un equipo limpiador marca Qiagen QIAquick PCR, de acuerdo a los protocolos proporcionados por el proveedor (Qiagen Inc.,

Chatsworth, Calif.). Las amplificaciones del 16S rDNA fueron secuenciados usando un total de 6 primers: FC27 (usado en amplificación temporal), F514 (5'-a- 3' GTGCCAGCAGCCGCGGTAA), F1114 (5' -a- 3' GCAACGAGCGCAACCC), RC1492 (5' -a- 3' TACGGCTACCTTGTTACGACTT), R936 (5' -a- 3' GTGCGGGCCCCCGTCAATT), R530 (5' -a- 3' CCGCGGCTGCTGGCACGTA). Las 6 secuencias individuales resultantes fueron ensambladas para dar un total de 1500 nucleótidos.

Análisis Filogenéticos

Las secuencias del 16S rDNA fueron comparadas con las secuencias disponibles en la base de datos y las similitudes entre ellas fueron calculadas usando la matriz de similitud del Proyecto de Datos Ribosomales (RDP) en línea. Los análisis filogenéticos fueron realizados usando el algoritmo "neighbor-joining" (vecino más cercano) de la interfase Phylip del RDP, (Maidak, B. L. *et al.*, 2001).

Cultivo y preparación del extracto

Las cepas bacterianas fueron almacenadas en un criocongelador a -26.66°C y cultivada bajo condiciones de laboratorio a 30°C en presencia de medio de cultivo líquido A1, el cual contenía 10 g de almidón, 2 g de extracto de levadura, 2 g de bactopectona y 16-18 g de agar en 1 L de agua de mar. La escala inicial de cultivo fue de 10 mL, seguida por 1L y finalmente a nivel masivo de 35 L, para el caso de la cepa CNQ-525, y a 10 L en el caso de la cepa CNQ-904.

En el primer caso, el cultivo se dejó crecer por 9 días (tiempo óptimo determinado previamente) y en el segundo caso, por 7 días. Transcurrido este tiempo, se adicionó entre 20 a 30 mg de la resina Ambertlita XAD7 por litro de cultivo. El cultivo se dejó en presencia de la resina por dos horas y posteriormente se filtró a través de gasa y, finalmente, a través de papel filtro Whatman grado 802 de 12.5 cm de diámetro. El sólido obtenido en el filtro, el cual contenía la resina con las células bacterianas, se extrajo exhaustivamente con acetona y, finalmente, el disolvente se evaporó mediante destilación a presión reducida (rotaevaporador marca Buchi modelo 461 con una bomba de vacío Vacuubrand modelo CVC2). Las muestras se pesaron y se disolvieron en metanol, con adición subsecuente de una pequeña cantidad de gel de sílice fase reversa C-18. El disolvente se evaporó de nuevo totalmente mediante destilación a presión reducida para obtener el extracto en forma de polvo.

Separación cromatográfica

Para la separación cromatográfica se empleó en ambos casos por separado, una columna de 50 x 2 cm, la cual se llenó hasta la mitad con 80 g de gel de sílice fase reversa C-18 y con un matraz receptor se adaptó al sistema de vacío. Para estabilizar la columna, se adicionó agua grado milli-Q y enseguida se introdujeron 2 g de la muestra en polvo en la superficie de la gel de sílice fase reversa, la cual se eluyó con 250 mL de agua milli-Q con aplicación de vacío (Fig. 1). La fracción obtenida representó la fracción 100 % agua (H₂O). La segunda fracción se obtuvo eluyendo la columna con una mezcla de

agua:metanol 2:1, la tercera con agua:metanol 1:1, la cuarta con agua:metanol 1:2 y la quinta con metanol (MeOH) 100%. Finalmente, la columna se lavó dos veces, primero con acetonitrilo (MeCN) y enseguida con acetato de etilo (AcOet). Este proceso se repitió hasta separar todo el extracto en forma de polvo, obtenido en la etapa anterior.

Cada una de las fracciones se evaporó, a sequedad mediante destilación a presión reducida bajo las mismas condiciones aplicadas al extracto original. Cada fracción se pesó y corrió en cromatografía de capa delgada (TLC) en placas de plástico Whatman cubiertas con una capa de 0.20 mm de espesor de gel de sílice 60 F₂₅₄, así como en placas de vidrio Poligram cubiertas con una capa de gel de sílice fase reversa C-18 de 0.2 mm de espesor. Cada una de las fracciones antes mencionadas se eluyeron con diferentes mezclas de agua, metanol y acetonitrilo hasta obtener las condiciones óptimas mediante las cuales se observaron los diferentes compuestos presentes en las fracciones. Como agente cromogénico se empleó el reactivo de Godin, el cual consiste en una mezcla 1:1 de las soluciones A (vanillina al 1% en etanol absoluto) y B (ácido perclórico al 3% en agua). Finalmente se agregó ácido sulfúrico al 10% en etanol absoluto con ayuda de un aspersor y se calentaron con un secador de cabello por aproximadamente 20 segundos, hasta la aparición de las manchas.

Las fracciones de interés se purificaron mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) (Fig. 1) empleando para este fin un instrumento semipreparativo Acuflo[®] Serie II, un detector de índice de refracción marca Waters modelo R401, y una columna fase reversa C-18 Dynamax 60A de

1.0 x 25 cm, con un flujo de 2.0 mL min^{-1} , empleando una mezcla 1:9 de $\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN}$ como fase móvil. Otras fracciones fueron separadas en este mismo equipo en una columna fase normal con gel de sílice marca Dynamax 60A de 1 x 25 cm, a un flujo de 2.0 mL min^{-1} y con un disolvente preparado a base de una mezcla de hexano (C_6H_{14}): AcOEt en la proporción 3.2:1.

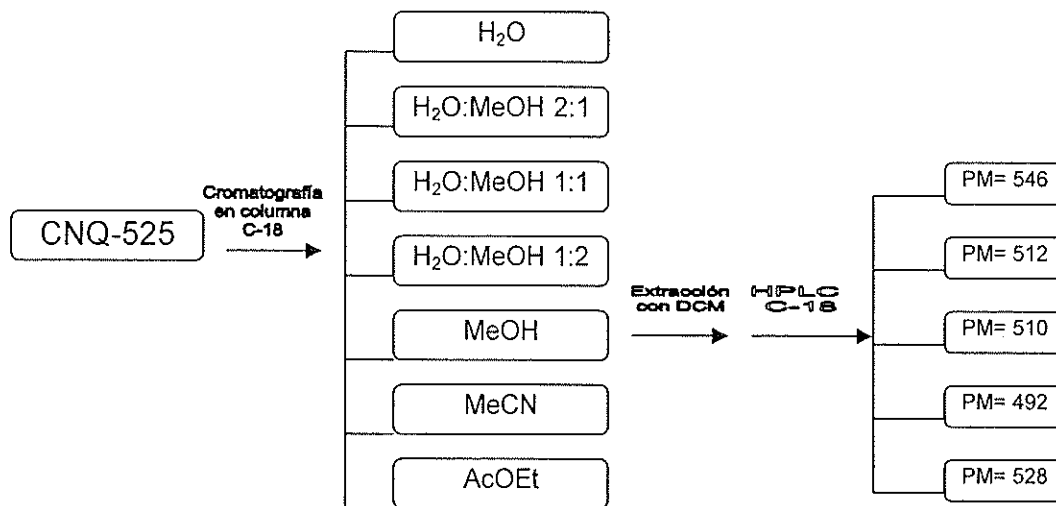


Figura No. 1. Diagrama de bloques del proceso de separación de los compuestos CNQ-525-546, CNQ-525-512, CNQ-525-510, CNQ-525-492 y CNQ-525-528.

Análisis físicos y espectroscópicos

La rotación óptica de todos los compuestos aislados fue medida en MeOH y/o cloroformo (CHCl_3), en un polarímetro Rudolph Research Autopol III en una celda de 10 cm utilizando la línea D del sodio. Los puntos de fusión se determinaron en un instrumento Melt-Temp 50/60 cycles de 200 watts, los cuales se reportan sin corrección. Los espectros ultravioleta (UV) e infrarrojos IR se obtuvieron con un espectrofotómetro Beckman marca Coulter DU modelo 640 y Perkin-Elmer modelo 1600 FTIR respectivamente. Para estos últimos, se utilizó el método de película, el cual consiste en disolver la muestra en CHCl_3 , colocar

unas gotas en la celda y dejar evaporar por completo el disolvente. Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica (^1H RMN) y de carbono-13 (^{13}C RMN) fueron obtenidos en espectrofotómetros Varian Inova Instruments a 400 y/o 300 megahertz (MHz) y a 75 ó 100 MHz, respectivamente. Los espectros se corrieron en deuterocloroformo (CDCl_3), deuterioacetona (CD_3COCD_3) y/o deuterometanol (CD_3OD). Los desplazamientos químicos (δ) fueron referenciados a las señales de los disolventes en unidades de partes por millón (ppm) para $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ a δ 7.24/77.0 ppm, δ 2.04/206.0 ppm y δ 4.78/49.0 ppm para CDCl_3 , CD_3COCD_3 y CD_3OD , respectivamente. Los experimentos en una dimensión (1D), ROESY (**R**otating **O**verhauser **E**ffect **S**pectroscopy) , NOESY (**N**uclear **O**verhauser **E**ffect **S**pectroscopy) y DEPT (**D**istortion **E**nhancement **P**olarization **T**ransfer), así como en dos dimensiones (2D), ^1H - ^1H COSY (**C**orrelation **s**pectroscopy), ^1H - ^{13}C HMBC (**H**eteronuclear **M**ultiple **B**ond **C**oherente), MeHSQC (**M**ethyl **H**eteronuclear **S**hift **Q**uantum **C**oherente) y HMQC (**H**eteronuclear correlation through **M**ultiple **Q**uantum **C**oherente), también fueron determinados en los mismos instrumentos usando las secuencias de pulsos estándares proporcionadas por estos instrumentos. Los espectros de masas (EM) de baja resolución se determinaron por medio de un cromatógrafo de líquidos con detector de masas (LC/MS) Hewlett-Packard MSD 1100 en una columna C-18 RP con el método estándar. Este consistió en utilizar como fase móvil una mezcla 9:1 de H_2O :MeCN, variando esta razón hasta llegar a MeCN 100 % en 30 minutos. Los espectros de alta resolución fueron obtenidos

mediante un instrumento Agilent ESI-TOF por el método de electroespray y en un IonSpect Ultima FTMS por MALDI-FTMS como método de ionización.

Ensayos biológicos

Todas las fracciones y los compuestos puros fueron probados contra células de cáncer de colorectal HCT-116 a una concentración de 10 mg mL⁻¹ en sulfóxido de dimetilo (DMSO), a partir de la cual se obtuvo la concentración inhibitoria media (IC₅₀) en µg mL⁻¹, empleando un método de dilución y después de 72 horas de incubación se leyó su absorbancia a 490 nm. También se realizaron pruebas de actividad antibiótica en todos los compuestos puros, utilizando la misma concentración y tipo de disolvente que el caso anterior, contra meticilin-resistente (MR) *Staphylococcus aureus* y contra vancomycin-resistente (VR) *Enterococcus faecium*. Esta actividad se reporta como concentración mínima inhibitoria (MIC) en µg mL⁻¹, para lo cual se empleó un método de dilución y después de 15 horas de incubación, se leyó su absorbancia a 600 nm.

RESULTADOS Y DISCUSION

Cepa bacteriana CNQ-525:

La cepa bacteriana CNQ-525 fue identificada como un actinomiceto que pertenece a un género nuevo de bacterias de la familia Streptomycetaceae a la cual todavía no se le ha asignado un nombre, lo cual permitió aumentar el árbol filogenético que se encuentra en constante estudio por los investigadores del área de Biología Molecular del Instituto de Oceanografía de Scripps en la Universidad de California, San Diego.

Al término del cultivo y concentración de la muestra, se obtuvieron 10.5 g de extracto crudo, el cual se separó mediante cromatografía en columna fase reversa con gel de sílice C-18. En total se obtuvieron siete fracciones, de las cuales las más abundantes fueron la de H₂O 100 % (4.65 g) y la de MeOH 100 % (3.58 g). La primera de ellas contenía en su mayoría sales, razón por la cual se descartó, mientras que la segunda, resultó ser la más importante con respecto a su espectro de ¹H NMR y a su bioactividad ante células de cáncer de colon HCT116, (Tabla 1).

Tabla 1. Fracciones obtenidas del extracto de la cepa bacteriana CNQ-525, mediante cromatografía en columna fase reversa con gel de sílice C-18. NA= no analizada, ANS= actividad no significativa.

Fracción No.	Disolventes empleados v/v	Peso (g)	Bioactividad (µg mL ⁻¹)
1	H ₂ O 100 %	4.65	NA
2	H ₂ O:MeOH 2:1	0.4737	ANS
3	H ₂ O:MeOH 1:1	0.3673	ANS
4	H ₂ O:MeOH 1:2	0.6138	15.5
5	MeOH 100 %	3.58	3.4
6	MeCN 100 %	0.18	15.8
7	AcOEt 100 %	0.048	ANS

Una vez eliminado el disolvente de la fracción MeOH100 %, se trató de redissolver en la mezcla que se empleó en la separación por HPLC (H₂O:MeCN 1:9), pero desafortunadamente resultó muy poco soluble, por lo que se secó de nuevo y se ensayaron diferentes tipos de disolventes para encontrar uno en el que fuera soluble. Finalmente se encontró que el diclorometano (DCM) era el más indicado, realizando la extracción con este disolvente. De esta fracción se obtuvieron 2.2 g de extracto, el cual se redisolvió en 44 mL de diclorometano se filtró a través de filtros millipore de 0.2 µm de tamaño de poro para obtener una concentración final de 50 mg mL⁻¹. Los 44 mL de esta fracción fueron separados mediante HPLC en una columna fase reversa C-18 con una mezcla de H₂O:MeCN 1:9 como fase móvil. En cada ocasión, se inyectaron 50 µL de muestra hasta terminar con los 44 mL. Se obtuvieron en total 20 fracciones en un tiempo de 50 minutos (Figura 2). Todas las fracciones se concentraron, se pesaron, se les determinó su bioactividad contra células de cáncer de colon HCT116, y se determinaron sus espectro de ¹H NMR y de masas.

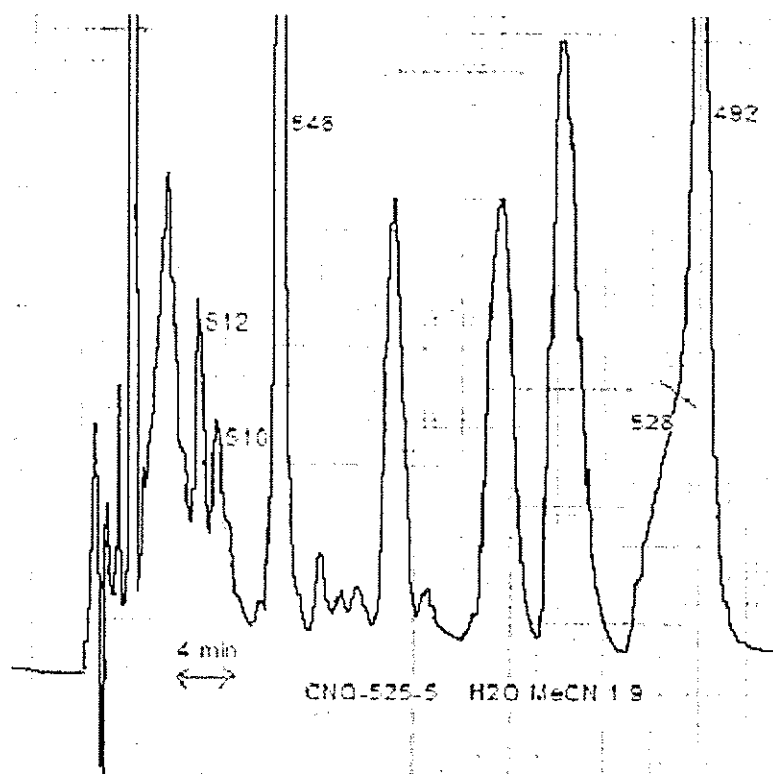


Figura 2. Cromatograma de la fracción CNQ-525-5 corrida en HPLC en una columna C-18 con agua:acetinitrilo en una proporción 1:9.

Las fracciones No. 7 (marcada en el cromatograma de la Figura 2 con el número 512), 8 (510), 11 (546), 19 (528) y 20 (492) tuvieron tiempos de retención de 11, 12, 16, 41 y 45 min, respectivamente. Estas cinco fracciones resultaron ser las más interesantes, tanto desde el punto de vista espectroscópico, como desde el punto de vista de bioactividad. El resto de las fracciones continúa en estudio, razón por la cual en adelante sólo se presentarán resultados para las fracciones 7, 8, 11, 19 y 20, sin que necesariamente se presenten en este orden.

Fracción No. 11

La fracción 11, que corresponde al número 546 en la Figura 2, se obtuvo como un compuesto cristalino de color amarillo, una vez que se evaporó el disolvente. Este compuesto llamó la atención debido a la facilidad con que cristalizaba, por lo que se procedió a realizar una recristalización, por medio de su disolución con MeOH y adición de DCM en una proporción 95:5. Después de 30 minutos se formaron los cristales, mismos que se redisolieron debido a que cristalizaron en forma de agujas blancas. Después de una segunda recristalización con el mismo método se obtuvieron cristales adecuados en cuanto a tamaño y forma, según se pudo comprobar a través de su observación al microscopio de disección (Figura 3). Los cristales se filtraron, se secaron y se les determinó el punto de fusión, mismo que resultó ser de 183-185°C. Asimismo se determinó su rotación específica, la cual resultó ser $[\alpha]_D^{25} = -190^\circ$ (c, 0.3047 CHCl₃) y $[\alpha]_D^{25} = -86.4^\circ$ (c, 0.3181 CH₃OH). Soluciones de estos cristales en MeOH presentaron longitudes de onda de máxima absorción (λ_{max}) a 266, 326 y 357 nm, con coeficientes de extinción molar (ϵ) de 21,500, 8,800 y 7,800 respectivamente. En el infrarrojo (IR) (Fig. 1, Anexo), los cristales presentaron absorciones características para grupos oxhidrilo (OH) a 3300 cm⁻¹, para anillos aromáticos a 3100 cm⁻¹ y para alcanos a 3000-2880 cm⁻¹. También se observó la absorción característica de grupos carbonilos a 1700, 1650 y 1615 cm⁻¹.

La muestra también fue analizada en un LC/MS para determinar su peso molecular más probable y se encontró un ion (M + Na)⁺ a m/z 569, así como el ion (M-H₂O)⁺ a m/z 528 y un patrón de fragmentación característico de

compuestos triclorinados (M^+ , M^+2 , M^+4 , con abundancias relativas en una proporción de 7:4.5:1). Al determinar el espectro de masas de alta resolución ESI-TOF por el método de electrospray, se encontró el ion $(M-H)^+$ a m/z 545.1271, cuyo peso molecular exacto fue de 546.1342 uma (Fig. 8, Anexo).

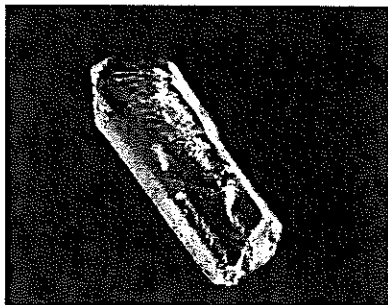


Figura 3. Cristal del compuesto CNQ-525-546 observado al microscopio de disección Leica modelo MZ6 de McBain Instruments.

El espectro de ^1H NMR (400 MHz, acetona- d_6) (Tablas 2 y 3 y Fig. 2, Anexo) presentó las siguientes señales: dos singuletes a 12.3 y 10.27 ppm característicos de protones de $^{\circ}\text{OH}$ aromáticos, el primero de ellos quilatados y un singulete a 7.3 ppm que integra para un protón y es característico de protones aromáticos. También se presentó a 4.69 ppm, otro singulete característico de $^{\circ}\text{OH}$ alifáticos, por lo que se puede deducir que la molécula contiene tres grupos $^{\circ}\text{OH}$. Adicionalmente, se observó una señal doble de dobles (dd) a 4.58 ppm, con constantes de acoplamiento (J) de 12.0 y 4.0 Hz, características de acoplamientos axial-axial y axial-ecuatorial; razón por la cual se buscaron los protones con los que se estaba acoplado. Como resultado de esta búsqueda, se encontraron dos señales dd a 2.73 y a 2.52 ppm, la primera de ellas con constantes de acoplamiento $J = 14.4$ y 12.0 Hz y la segunda con $J = 14.4$ y 4.0 Hz. La J correspondiente 14.4 Hz en la señal a 2.73 ppm es característica de acoplamientos de protones geminales.

Asimismo se pudo observar que en la señal a 2.52 ppm se presentó este mismo valor para J , por lo que se dedujo que se trataba de dos protones que se encontraban substituidos en el mismo carbono. Por otro lado, la J de 12.0 Hz en la señal a 2.73 ppm coincide con la J de 12.0 Hz encontrada en la señal a 4.58 ppm, por lo que se deduce que son protones que se encuentran en carbonos adyacentes que interaccionan de manera axial-axial en planos opuestos en el espacio. Finalmente, se puede observar que en la señal a 2.52 ppm se presenta una J de 4.0 Hz, al igual que la segunda J en la señal en 4.58 ppm, que corresponde a un acoplamiento axial-ecuatorial. Lo anterior fue confirmado mediante el espectro en 2D ^1H - ^1H COSY NMR (Fig. 5, Anexo) en el cual se observa una correlación entre estos tres protones.

Por medio de la determinación simultánea de los espectros ^{13}C NMR, el espectro 2D ^1H - ^{13}C HMQC NMR y DEPT (Fig. 4, Anexo), se determinó que la molécula contenía un total de 26 carbonos (mismos que serán discutidos más adelante), y se determinó el tipo de carbono presente en cada señal. Este fue el caso de la señal en 4.58 (que corresponde a un CH) y las señales en 2.73 y 2.52 (que corresponden a un CH_2). Mediante el espectro DEPT NMR también se pudo comprobar que el protón en 7.3 ppm, correspondía a un CH.

En el espectro de ^1H NMR también se presentó una señal dd en 3.74 ppm con constantes de acoplamiento $J = 12.0$ y 4.0 Hz, por lo que se buscaron las señales con las que se estuviera acoplado. Desafortunadamente, no se presentaron señales claramente definidas en base a las cuales se pudieran determinar las constantes de acoplamiento, por lo que se caracterizaron como

Tabla 2. asignaciones de ^{13}C y ^1H NMR para el compuesto CNQ-525-546, hechas con base en los experimentos de HMQC. s= simple, dd= doble de dobles, m= múltiple, br= ancha. ppm=partes por millón, J= constante de acoplamiento, Hz= unidades Hertz

Carbon #	^{13}C δ (ppm)	^1H δ ppm (J, Hz)	DEPT	COSY	$^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ HMBC	Asig.
1	71.4	-	C		C1, C6, C12, C5, C7, C22, C21, C23, H4, H21, H2a, H7b	
2	42.7	1.54 m 1.73 m	CH ₂		C2, C6, C1, C4, H4, H22, H23	Ha Hb
3	31.8	1.76-1.80 m 1.87 m	CH ₂		C3, C1, C5, C22, C23, H4, H3a	Ha Hb
4	72.6	3.74 dd (12.0, 4.0)	CH	C4-C3	C4, C1, C2, C7, C6, C5, C22, H3b, H6	
5	41.7		C		C5, C1, C3, C7, C21, C22, C23, H4, H6, H22, H23	
6	51.0	1.6 brdd (7.2, 1.6)	CH	C6-C7	C6, C1, C8, C12, H7b, H6, H21, H22, H23	
7	38.3	1.63 dd (16.8, 1.6) 2.64 dd (16.8, 7.2)	CH ₂		C7, C1, C5, C6, C8, C12, C21, C22, C23, H7a	Ha Hb
8	85.1		C		C8, C1, C5, C6, C7, C12, C21, C23, C25	
9	81.8		C		C9, C10, C11, C25, H10, H11b, H7b, H24, H25	
10	59.7	4.58 dd (12, 4)	CH	C10-C11	C10, C8, C12, C24, C25, H11a, H11b, H24, H25	
11	43.4	2.73 dd (14.4, 12.0) 2.52 dd (14.4, 4.0)	CH ₂		C11, C24, C9, H10, H7a, H25	Ha Hb
12	82.5		C		C12, C5, C6, C7, C8, C22, H11b, H7a	
13	192.3		C		C13, C8, C12,	
14	108.5		C		C14, C13, C16, C17, C18, H26	
15	163.9		C		C15, C16, C19, H26	
16	120.3		C		C16, C14, C18, C19, C20, C26, H18, H26	
17	164.3		C		C17, C14, C16, C18, C20, H18	
18	108.6	7.3 s	CH		C18, C14, C16, C17, C20, H18, H26	
19	132.5		C		C19, C14, C16, H18, H26	
20	193.7		C		C20, C6, C14, C16, C17, C18, C19, H-18, H7b	
21	25.6	1.14 s	CH ₃		C21, C1, C6, C7, C22, C23, H2b, H2a	Me3
22	29.3	0.37 s	CH ₃		C22, C1, C3, C5, C6, C7, C21, C23, H4, H21	Me1
23	16.7	0.65 s	CH ₃		C23, C4, C5, C6, H4, H22	Me2
24	23.2	1.3 s	CH ₃		C24, C9, C10, C11, C25, H4	Me4
25	29.5	1.4 s	CH ₃		C25, C9, C11, C24, H4, H7a	Me5
26	8.8	2.16 s	CH ₃			Me6
O(1)		4.69	OH			
O(4)		12.3	OH			
O(5)		10.27	OH			

Tabla 3. Asignaciones en ^1H y ^{13}C NMR para los compuestos 512, 510, 546, 528 y 492. ^aAsignaciones hechas con base en experimentos de DEPT, COSY, MeHSQC, HMQC, y HMBC. ^bConstantes de acoplamiento en Hz. ^cSeñal traslapada con alguna otra.

#	Compuesto 512(CD ₃ OD)		Compuesto 510 (CDCl ₃)		Compuesto 546 (CD ₃ COCD ₃)		Compuesto 492 (CD ₃ COCD ₃)		Compuesto 528 (CD ₃ COCD ₃)	
	δ_c	δ_{H1} mult. (J ^b)	δ_c	δ_{H1} mult. (J ^b)	δ_c	δ_{H1} mult. (J ^b)	δ_c	δ_{H1} mult. (J ^b)	δ_c	δ_{H1} mult. (J ^b)
1	72.2 C		70.9 C		71.0		147.0 C		146.9 C	
2	42.5 CH ₂	1.76-1.82 m ^c 1.52-1.56 m ^c	40.9 CH ₂	1.34-1.40 m 1.95-2.0 m ^c	42.7	1.54 m 1.73 m	36.7 CH ₂	2.09 m 2.26 m	35.0 CH ₂	2.03-2.06 m 2.27-2.3 m
3	31.9 CH ₂	1.75-1.79 m 1.79-1.85 m	30.0 CH ₂	1.73-1.79 m 1.9-1.95 m ^c	31.8	1.76-1.80 m 1.87 m	35.1 CH ₂	1.7 m	35.2 CH ₂	1.67-1.75 m 1.98-2.03 m ^c
4	72.1 CH	3.67 dd (12.0, 4.0)	71.6 CH	3.44 dd (12.0, 3.0)	72.6	3.74 dd(12.0, 4.0)	71.4 CH	4.18 dd (11.1, 4.8)	71.7 CH	3.88 dd (12.0, 4.0)
5	41.8 C		40.7 C		41.7		42.7 C		43.3 C	
6	51.9 CH	1.55 d (6.5)	52.7 CH	1.4 m	51.0	1.6 brdd(7.2, 1.6)	48.2 CH	2.07 br s	46.3 CH	2.10-2.14 m
7	41.3 CH ₂	1.82 d (16.0) 2.08 dd (16.0, 6.5)	40.1 CH ₂	2.0-2.02 m 2.07-2.11 m ^c	38.3	1.63 dd(16.8, 1.6) 2.64 dd(16.8, 7.2)	37.3 CH ₂	1.86 br s 1.9 br s	34.1 CH ₂	2.64-2.74 m
8	81.6 C		82.8 C		85.1		83.2 C		84.9 C	
9	81.2 C		79.0 C		81.8		76.7 C		79.0 C	
10	62.5 CH	4.09 dd (12.0, 4.0)	58.7 CH	4.56 d (1.8)	59.7	4.58 dd(12.0, 4.0)	60.4 CH	4.97 d (1.5)	60.1 CH	4.43 dd 12.0, 4.0)
11	35.3 CH ₂	2.37 dt (13.0, 4.0) 2.06 q (13.0)	135.0 CH	6.94 d (1.8)	43.4	2.73 dd(14.4, 12.0) 2.52 dd (14.4, 4.0)	137.7 CH	6.78 d (1.5)	42.0 CH	2.47- 2.52 m 2.56- 2.64 m
12	58.4 CH	3.36 dd (13.0, 4.0)	133.4 C		82.5		137.2 C		82.6 C	
13	196.1 C		187.4 C		192.3		189.4 C		193.5 C	
14	108.0 C		110.2 C		108.5		111.2 C		108.0 C	
15	162.6 C		163.0 C		163.9		163.8 C		163.8 C	
16	120.2 C		119.2 C		120.3		118.8 C		119.3 C	
17	164.7 C		163.4 C		164.3		164.0 C		164.1 C	
18	109.6 CH	7.08 s	108.1 CH	7.37 s	108.5	7.3	107.7 CH	7.15 s	108.3 CH	7.23 s
19	133.4 C		138.0 C		132.5		133.8 C		132.7 C	
20	196.2 C		192.3 C		193.7		194.7 C		194.3 C	
21	24.7 CH ₃	1.15 s	23.9 CH ₃	1.23 s	25.6	1.14	109.4 CH ₂	4.77 br s 4.33 br s	110.2 CH ₂	4.84 d (4.2)
22	29.5 CH ₃	0.44 s	28.4 CH ₃	0.48 s	29.3	0.37	27.0 CH ₃	1.11 s	26.6 CH ₃	0.64 s
23	16.6 CH ₃	0.68 s	15.6 CH ₃	0.68 s	16.7	0.65	14.5 CH ₃	0.61 s	15.5 CH ₃	0.56 s
24	29.3 CH ₃	1.44 s	27.0 CH ₃	1.59 s	23.2	1.3	27.2 CH ₃	1.49 s	27.7 CH ₃	1.3 s
25	21.4 CH ₃	1.23 s	20.5 CH ₃	1.25 s	29.5	1.4	20.6 CH ₃	1.02 s	22.6 CH ₃	1.2 s
26	8.4 CH ₃	2.13 s	8.2 CH ₃	2.22 s	8.8	2.16	8.1 CH ₃	2.14 s	8.3 CH ₃	2.14 s
OH1				5.65 s		4.69				
OH5				12.78 s		12.3				

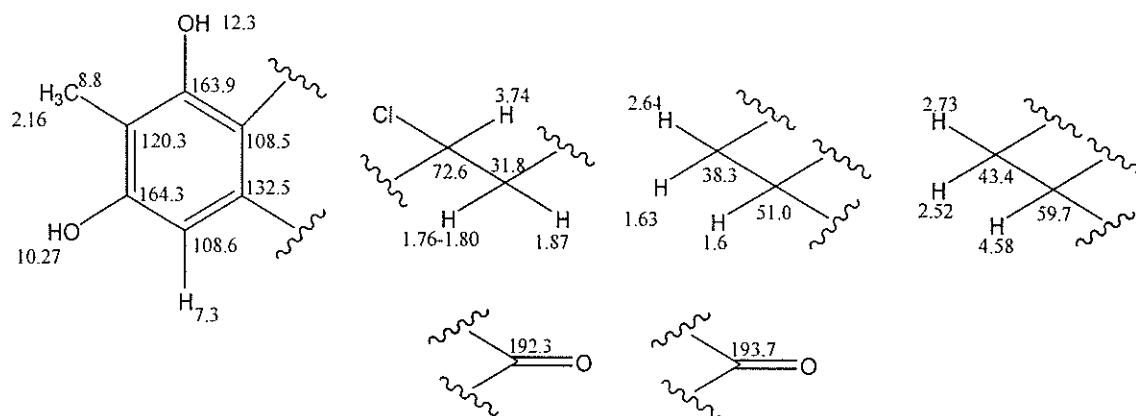
multipletes (m) entre 1.76-1.80 ppm y a 1.87 ppm. Dado que el espectro en 2D ^1H - ^1H COSY NMR presentó correlación entre estos protones (3.74 y 1.76-1.80), se dedujo que se encontraban substituidos en carbonos vecinos. El desplazamiento a campo bajo de la señal a 3.74 sugiere la presencia de un elemento muy electronegativo substituido en el mismo carbono, posiblemente un cloro. Mediante el espectro DEPT se determinó que se trataba de un grupo CH. En virtud de que no se encontró otro acoplamiento para este carbono, se deduce que se trata de un carbono substituido con un protón, un elemento electronegativo que en este caso resultó ser un cloro y por otro lado, unido al carbono que contiene los protones en 1.76-1.80, más la unión con un carbono cuaternario. Otras señales que se presentaron fueron por un lado una señal ancha (br) dd a 1.63 ppm ($J = 16.8, 1.6$ Hz) y a 2.64 dd ($J = 16.7, 7.2$ Hz), por lo que se dedujo que la constante de acoplamiento (en ambos casos de 16 Hz), corresponde a dos protones en disposición geminal que interacciona con el protón a 1.6 br dd ($J = 7.2, 1.6$ Hz). Esta unión presenta J de 7.2 y 1.6 Hz, las cuales coinciden con las de las dos señales dd anteriores. Estas características sugieren que se trata de protones vecinos interaccionando entre sí en carbonos vecinos, de acuerdo a los resultados del espectro en 2D ^1H - ^1H COSY NMR, que mostró correlación entre los dos protones, en donde el primero corresponde a un CH_2 y el segundo a un CH (según fue confirmado por el espectro DEPT). Otras señales presentes en el espectro de ^1H NMR fueron dos señales múltiples (m) a 1.54 y 1.73 ppm y que corresponden a protones geminales, de acuerdo a los resultados del espectro DEPT, ya que este desplazamiento químico

corresponde a los protones del carbono en 42.7 ppm, en donde se observó la presencia de un CH_2 . Asimismo, en el espectro ^1H se observan singuletes para seis grupos metilos a 2.16, 1.4, 1.3, 1.14, 0.65 y 0.37. El primero de ellos es característico de metilos substituidos en anillos aromáticos.

El espectro de ^{13}C NMR (75 MHz, acetona- d_6) (Tablas 2 y 3 y Fig. 3, Anexo) presentó dos señales características para carbonos de carbonilos a 193.7 y 192.3 ppm y seis señales de carbonos aromáticos. Los más desplazados a campo bajo en 164.3 y 163.9 ppm, debido, posiblemente, a los dos OH^- encontrados en ^1H NMR a 12.3 y 10.27 ppm. El resto de los carbonos aromáticos se encontraron a 132.5, 120.3, 108.6 y 108.5 ppm. Los carbonos con δ en 108.6 y 120.3 ppm corresponden a carbonos que soportan el protón y metilo aromáticos (7.3 y 2.16 ppm en ^1H respectivamente). La señal del carbono a 132.5 también se encuentra desplazada a campo bajo debido al afecto de algún elemento electronegativo cercano a él. Otras señales observadas fueron para cinco carbonos cuaternarios en 85.1, 82.5, 81.8, 71.0 y 41.7 ppm, para tres grupos CH a 72.6, 59.7 y 51.0 ppm, para cuatro grupos CH_2 a 43.4, 42.7, 38.3 y 31.8 ppm, y para los seis CH_3 a 29.5, 29.3, 25.6, 23.2, 16.7 y 8.8 ppm.

De acuerdo al espectro ^1H - ^{13}C HMQC NMR (Fig. 7, Anexo), los desplazamientos de los carbonos en 72.6, 59.7, 51.0, 43.4, 42.7, 38.3 y 31.8 ppm les corresponden los protones presentes en 3.74, 4.58, 1.6, 2.73 y 2.72, 1.54 y 1.73, 1.63 y 2.64, y 1.76-1.80 y 1.87 ppm, respectivamente.

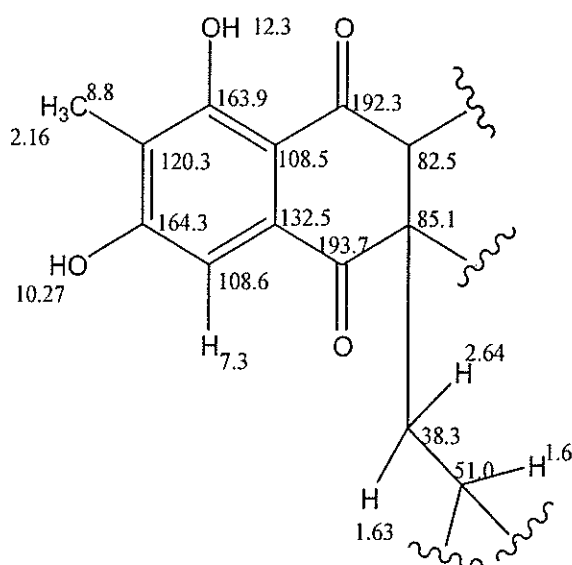
Con la información anterior y con las correlaciones en el espectro 2D ^1H - ^1H COSY se pueden deducir las semi-estructuras de la molécula:



Con la finalidad de ampliar la información con respecto a las uniones de estos fragmentos se determinó el espectro ^1H - ^{13}C HMBC NMR para observar las correlaciones entre los átomos (Tabla 3). De acuerdo a estos resultados, el carbono en 108.6 ppm interacciona con los carbonos en 108.5, 120.3, 164.3 y 193.7 ppm, así como con los protones en 7.3 ppm y en 2.16 ppm, lo que sugiere que la posición asignada en la semiestructura mostrada arriba, podría ser la adecuada. A partir de estos resultados también se deduce que cercano a este carbono (108.6 ppm) podría estar sustituido el grupo carbonilo de 193.7 ppm, con la posición más cercana correspondiendo al carbono 132.5 ppm. Dado que el carbono en 108.5 interacciona con los carbonos en 192.3, 120.3, 164.3, 108.6 ppm y los protones del metilo aromático en 2.16 ppm, se puede deducir que cercano a éste (108.5 ppm), se encuentra sustituido el otro grupo carbonilo (192.3 ppm), lo cual deja como única posibilidad que el carbono en 132.5 ppm se encuentre sustituido efectivamente enseguida del carbono 193.7 ppm. El carbono en 163.9 ppm interacciona con el carbono en 120.3 y 132.5 ppm, así como con los protones del metilo aromático en 2.16 ppm, mientras que el carbono en 120.3 ppm interacciona con los carbonos en 108.5, 108.6, 132.5 y 193.7 ppm, así como con el protón aromático en 7.3 ppm. Finalmente, el

carbono en 193.7 ppm interactúa con los carbonos 108.5, 120.3, 164.3, 108.6 y 132.5 ppm, con el carbono en 51.0 ppm y con los protones en 2.64 y 2.13 ppm. Toda la información anterior apoya la semiestructura propuesta, además de aumentar el número de sustituciones de los dos grupos carbonilos e indicar la cercanía con el protón en 2.64 ppm. También se observan interacciones entre el carbono 85.1 ppm y los carbonos 82.5, 71.4, 41.7, 51.0, 38.3 ppm y el correspondiente a los metilos en 25.6, 16.7 y 29.5 ppm.

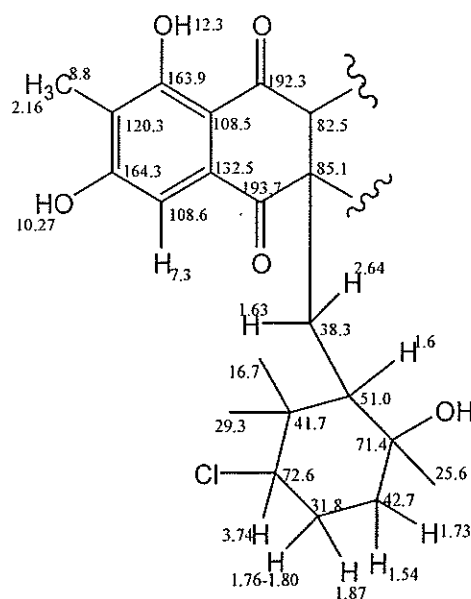
El carbono en 82.5 ppm interactúa con los carbonos en 85.1, 51.0, 41.7 y 38.3 ppm y con los protones 2.52 y 1.63 ppm. Como los carbonos 85.1 y 82.5 ppm interactúan entre sí y a su vez ambos interactúan con protones del mismo carbono (2.64 y 2.52 ppm) se puede suponer que estos dos carbonos se encuentran unidos entre sí y muy cercanos al carbono 38.3 ppm que contiene a los protones en 2.64 y 2.52 ppm. En base a lo anterior y como ya se había observado la existencia de una interacción entre el carbono 193.7 ppm y los protones en 2.64 y 1.63 ppm, se propone la siguiente subestructura:



También se observan las siguientes interacciones: el carbono 31.8 ppm con los carbonos 71.4, 41.7, 29.3 y 16.7 ppm y con el protón 3.74 ppm; el carbono 72.6 ppm con los 71.4, 42.7, 41.7, 51.0, 38.7, y 29.3 ppm así como con los protones 1.87 y 1.6 ppm; el carbono 71.4 ppm con los carbonos 51.0, 41.7, 38.3, 82.5, 25.6, 29.3, 16.7 ppm y con los protones 1.54, 3.74, 2.64 y 1.14 ppm; el carbono en 42.7 ppm con los situados en 71.4, 72.6, 51.0 ppm y con los protones 3.74, 0.37 y 0.65 ppm; el carbono en 51.0 con el carbono 71.4, 85.1, 82.5 ppm y con los protones 1.6, 2.64, 1.14, 0.37 y 0.65 ppm. Finalmente, el carbono en 41.7 ppm interacciona con los carbonos 71.4, 31.8, 38.3, 25.6, 29.3, 16.7 ppm, así como con los protones 3.74, 1.6, 0.37 y 0.65 ppm.

Los resultados anteriores indican que todos estos carbonos (51.0, 41.7, 42.7, 31.8, 71.4 y 72.6 ppm) interaccionan con los carbonos o con los protones de los metilos en 29.3 y 16.7 ppm, mientras que el carbono en 71.4 ppm interacciona con el metilo en 25.6 ppm. A su vez, esto indica que los carbonos antes mencionados forman un anillo de seis miembros en el cual el carbono cuaternario en 71.4 ppm se encuentra substituido con el grupo metilo en 25.6 ppm y un OH , que equivaldría al tercer OH de la molécula. Esta conclusión se basa en el desplazamiento químico observado a campo bajo. La doble interacción entre los carbonos 51.0 y 71.4 ppm, así como sus interacciones con el carbono 82.5 ppm y el carbono o el protón del metilo en 25.6 ppm, sugieren que estos dos carbonos se encuentran unidos. En el mismo sentido, si observamos al carbono cuaternario en 41.7 ppm, en especial, su interacción con los carbonos 51.0 y 38.3 ppm, se deduce que este carbono también se

encuentra unido al carbono 51.0 ppm y que sería el único con posibilidades de acomodar la sustitución de dos grupos metilos. Otra información con la que se cuenta hasta este momento, es la correlación de los carbonos 72.6 y 31.8 ppm en el espectro ^1H - ^1H COSY, los cuales se encuentran unidos. Si además de lo anterior consideramos las interacciones del carbono 72.6 ppm con los carbonos 41.7, 51.0 y 38.3 ppm, se puede suponer que el carbono 72.6 ppm se encuentra unido al carbono cuaternario en 41.7 ppm, dejando la única posición libre para el carbono 42.7 ppm, el cual interacciona perfectamente con sus vecinos más cercanos. Hasta el momento, la estructura parcial sería la siguiente:

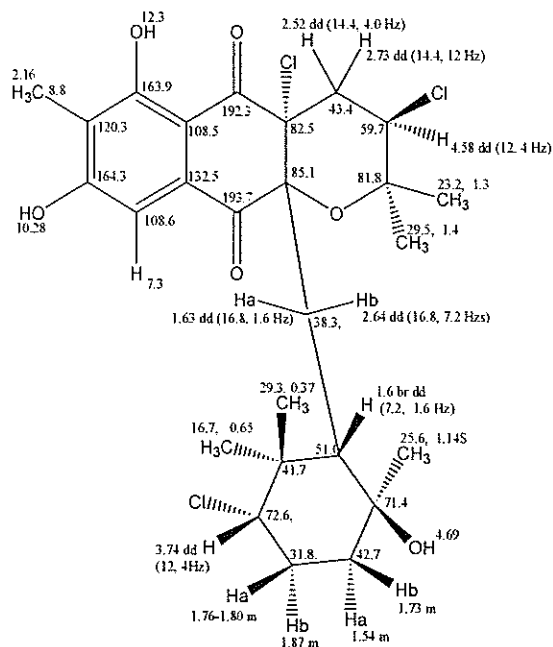


Asimismo, el carbono en 43.4 ppm corresponde a un CH_2 que interacciona con el CH en 81.8 ppm y con los carbonos de los metilos en 23.2 y 29.5 ppm. Adicionalmente, se observa una interacción entre el carbono 43.4 ppm y el protón en 4.58 ppm, el cual se encuentra sustituido como un CH en el carbono 59.7 ppm. Esta información confirmaría la correlación encontrada en el espectro ^1H - ^1H -COSY para los carbonos 59.7-43.4 ppm y también indicaría que

se encuentra cercano al carbono 81.8 ppm el cual, debido a su desplazamiento químico es posible que se encuentre cercano a un elemento electronegativo.

Analizando la información con la que se cuenta hasta este punto sobre la molécula, se sabe que la molécula tiene un peso molecular de 546.1342 uma, de los cuales 312 uma corresponden a 26 carbonos, 105 uma a 3 cloros, 33 uma a 33 hidrógenos (18 en seis CH_3 , ocho en cuatro CH_2 , cuatro en cuatro CH y tres en tres OH), 80 uma a cinco oxígenos (dos en dos $\text{C}=\text{O}$ y tres en tres OH), lo que representa un peso total de 530 uma. Faltarían 16 unidades, las cuales corresponderían a un oxígeno, lo que sugeriría la fórmula molecular $\text{C}_{26}\text{H}_{33}\text{O}_6\text{Cl}_3$. Esta fórmula presenta nueve grados de insaturación, a diferencia de la última semiestructura propuesta en la cual se tienen únicamente ocho (dos de los carbonilos + tres de los dobles enlaces aromáticos + tres de los anillos). Para la parte faltante de la estructura se propone un anillo en el que uno de los miembros sea el oxígeno faltante y que la posición más coherente con respecto a los desplazamientos químicos, sea entre los carbonos 85.1 y 81.8 ppm. Es muy importante observar también las interacciones entre los carbonos 81.8 y 59.7 ppm, ya que el primero es un carbono cuaternario. Esta característica sugiere la posibilidad de que en ese carbono se encuentren substituidos los dos metilos restantes ya que éstos a su vez interaccionan con los carbonos 81.8, 59.7, 85.1 y 43.4 ppm. De esta manera, el carbono 59.7 ppm (que corresponde a un CH) tendría un substituyente Cl , por lo que el último cloro estaría forzosamente substituido en el carbono 82.5 ppm. Este desplazamiento químico apoya la substitución del cloro en este carbono, ya que también se consideró

con el efecto del carbonilo al otro lado de la molécula. En base a la discusión anterior, se propone como posible estructura la siguiente:



Al analizar todas las constantes de acoplamiento se observa que la estructura presenta una congruencia total. Al revisar la base de datos *AntiBaseTM* de la Universidad de California en San Diego, no se encontró molécula alguna que tuviera el peso molecular y las características químicas del compuesto elucidado en este trabajo, razón por la cual se pensó que se trataba de una estructura nueva. Sin embargo, y tomando en cuenta que se contaba con los cristales, se envió una muestra a analizar mediante difracción de Rayos X. Este análisis confirmó que la asignación de la molécula era la correcta y que el peso molecular era de 547.17 uma, mismo que al ser introducido en la base de datos anteriormente mencionada, dió como resultado la existencia de una patente a nombre de Fakuda *et al.* (1990 a,-b) en la que se encontraba incluida esta molécula (además de otras tres), las cuales presentaban actividad antibiótica. Al compuesto patentado se le asignó el número A80915C y fue

extraído del actinomiceto *Streptomyces aculeolatus*, presente en sedimentos de las Islas Palau, Micronesia. A partir de esta información se estableció que este compuesto presenta el mismo esqueleto *seminaftoquinona* de algunos otros compuestos, a los que algunos autores nombraron *napyradiomycinas* (Shiomi *et al.* 1986a,-b, 1987; Shomura *et al.* 1987; Gomi *et al.* 1987; Hori *et al.* 1993) y que presentaron actividad antibiótica. La molécula fue analizada para probar su actividad como antibiótico y como anticancerígeno por lo que se realizaron pruebas de citotoxicidad contra células de carcinoma colorectal humano HCT 116 obteniendo una $IC_{50}=4.22 \mu\text{g mL}^{-1}$. Estos resultados también indicaron actividad positiva contra la cepa resistente a meticilina *Staphylococcus aureus* con una $MIC = 1.9 \mu\text{g mL}^{-1}$. Resultados similares se encontraron para la cepa resistente a vancomicina *Enterococcus faecium*, con una $MIC = 3.9 \mu\text{g mL}^{-1}$. Los resultados positivos contra *S. Aureus* y *E. Faecium* presentaron una actividad más potente para el mismo compuesto obtenido por Fakuda *et al.* (1990-a), razón por lo cual se piensa que en este estudio el compuesto tenía un mayor grado de pureza.

A pesar de que la estructura tridimensional de la molécula se patentó, no se encontraron evidencias de su elucidación estructural absoluta de la misma, por lo que la configuración absoluta por difracción de rayos X de monocristal, fue sometida y aceptada para su publicación en la revista *Acta Crystallographica Sección E*. Los datos cristalograficos se indican en la Tabla 4 y la estructura se muestra en la Figura 3.

Tabla No. 4. Datos cristalográficos de Rayos X de la estructura cristalina del compuesto CNQ-525-546

Clave:	CNQ- 525-546	Reflecciones colectadas:	19158
Fórmula empírica:	C ₂₆ H ₃₃ Cl ₃ O ₆	Reflecciones independientes:	6125 [R(int)=0.0330]
Peso fórmula:	547.87		
Temperatura:	218(2)°K	Incompleto a to theta	97.3 %
Longitud de onda:	0.71073 Å	=28.29°.	
Grupo especial:	P2(1)2(1)2(1)	Corrector de absorción:	Sadabs/multiscan
Sistema cristalino:	Ortorómbico	Transmis. Max. y min.	0.9433 y 0.8584
Dimensiones de la Celda unitaria	a= 12.1542 (10) Å α= 90°	Método de refinamiento:	Full-matrix least-squar.
	b= 13.8359 (10) Å β= 90°		Sobre F ²
	c= 15.3928 (12) Å γ = 90°	Datos/ rest./param.:	6125/0/328
Volumen:	2588.5(3) Å ³	Ajustes sobre F ² :	1.029
Z:	4	Indices R finales	R1= 0.0400, wR2= 0.1029
Densidad calculada:	1.406 mgm ⁻³	[I>2sigma(I)]:	
Coeficiente de abs.:	0.394 mm ⁻¹		
Tamaño del cristal:	0.40X0.25X0.15 mm ³	Indices R (todos los datos):	R1= 0.0439, wR2= 0.1059
F(000):	1152	Parámetro de estructura absoluta:	-0.04(5)
Rangos de índices:	-15<=h<=16, -18<=k<=18, -9,<=l,<=19	Los más grandes dic. Pesk y completo:	0.457 y -0.243 e Å ⁻³
Rango teta para la colección de datos:	1.98 to 28.29°		

Una vez confirmada la estructura, se decidió utilizar la numeración de acuerdo al esquema en rayos X para evitar confusiones (Tablas 2 y 3), por lo que en lo sucesivo se referirán todos los datos de esa manera en lugar del uso de la nomenclatura UIQPA, mediante la cual se nombraron las moléculas. El nombre que correspondería a esta molécula según la UIQPA sería: 3,4a-dicloro-10a-(3-cloro-6-hidroxy-2,2,6-trimetil-cyclohexylmetyl)-6,8-dihidroxy-2,2,7-trimetil-3,4,4a,10a-tetrahidro-2H-benzo[g]cromeno-5,10-diona.

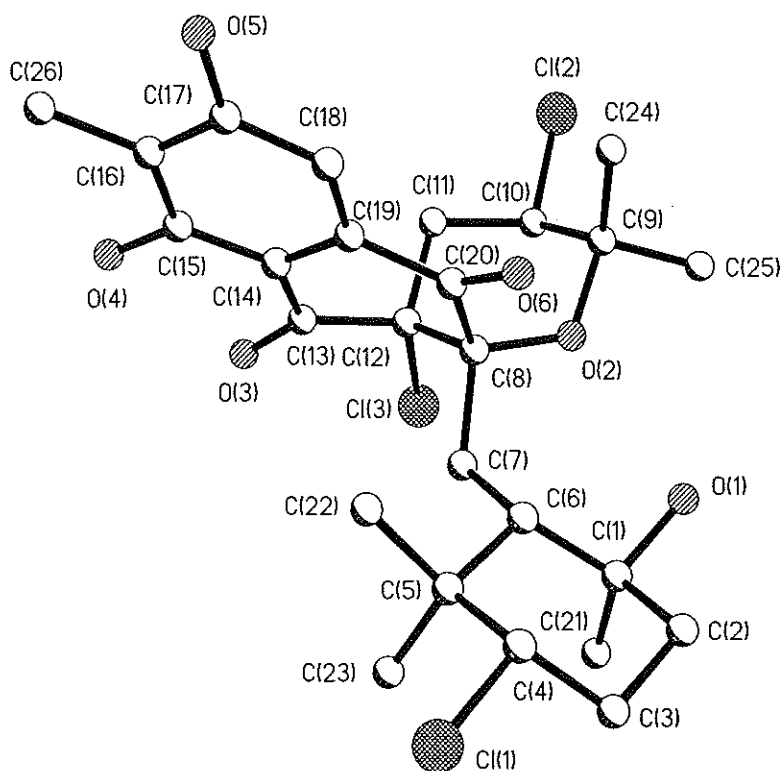
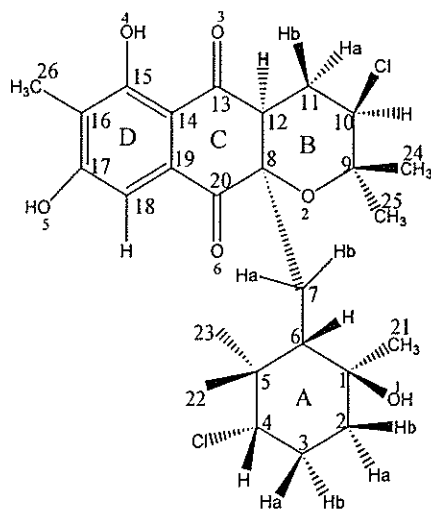


Figura 4. Estructura del compuesto CNQ-525-546 obtenida por difracción de rayos X de monocristal, representando la estereoquímica absoluta.

De acuerdo a la estructura mostrada por rayos X, la molécula presentaría la siguiente numeración:



Esta estructura es muy parecida a la napyradiomycina B4 encontrada previamente por Shiomi *et al.* (1987), con la diferencia que el compuesto reportado por estos autores no contiene el metilo 26 en la posición 15 de nuestra estructura.

La napyradiomycina B4 (Shiomi *et al.* 1987) se presentó también como un compuesto cristalino de color amarillo pálido, aunque estos autores no determinaron su bioactividad, su estructura fue determinada por difracción de rayos X además de incluir datos de ^1H NMR, los cuales resultaron ser muy similares a los encontrados en este trabajo, así como a los reportados por Fakuda *et al.* (1990 a). La única diferencia fue la presencia de un menor desplazamiento a campo bajo en las señales de los grupos oxhidrilos en la molécula de Shiomi *et al.* (1987), la diferencia entre la señal para el protón en la posición 16 de la estructura reportada por estos autores, ya que en nuestro caso se observa un grupo metilo en esa posición. Adicionalmente, el punto de fusión (168-171°C) que reporta Shiomi *et al.* (1987), es muy diferente al encontrado en este trabajo (183-185°C), mientras que en el trabajo de Fakuda *et al.* (1990 a) no se reportan puntos de fusión.

Fracción no. 7

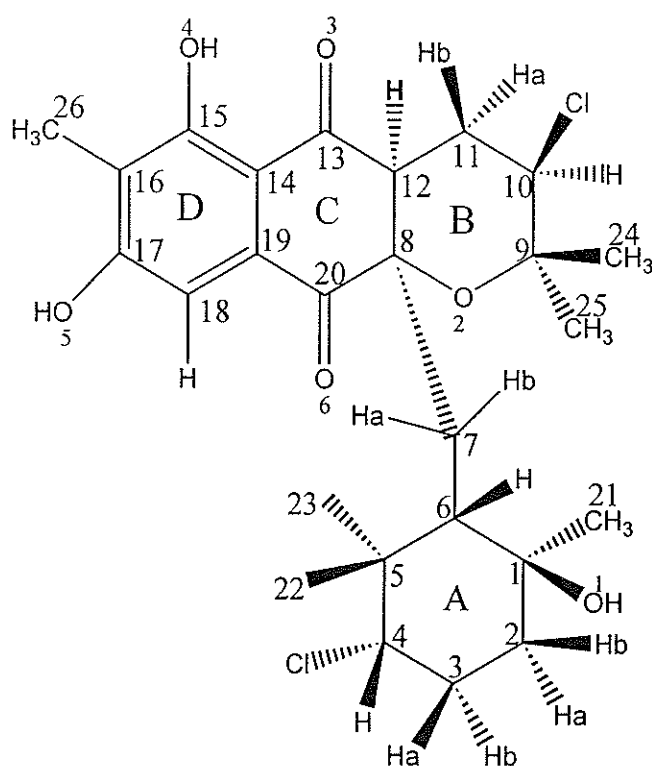
La fracción No. 7, que se encuentra identificada en el cromatograma de la Figura 2 con el número 512, fue concentrada y de este proceso se obtuvo un polvo amarillo pálido que posteriormente se cristalizó en las mismas condiciones que el compuesto anterior. Los cristales obtenidos fueron de color Amarillo

pálido, con un punto de fusión de 198° C. Al ser analizados mediante LC/MS se encontró el ion $[M+Na]^+$ a m/z 535 una y una vez que se determinó el espectro de masas de alta resolución MALDI-FTMS, se obtuvo el ion $[M+H]^+$ $m/z(\text{obsd.})=513.1805$ (Fig. 15, Anexo). Los datos anteriores concuerdan con la fórmula molecular $C_{26}H_{34}Cl_2O_6$. Esta fórmula sugirió nueve grados de insaturación en la molécula, la cual, si observamos su fórmula molecular y la comparamos con el compuesto elucidado anteriormente, encontramos que la única diferencia es la sustitución de un cloro por un hidrógeno. Estas características sugirieron que ambos compuestos podrían tener estructuras muy parecidas. El compuesto de la fracción 7 presentó una rotación específica $[\alpha]_D^{25} = -24.3^\circ$ (c, 0.144 g/100 mL CH_3OH), y absorciones en el UV λ_{max} MeOH a 258, 300 y 356 nm con valores de ϵ de 3,809, 1,500 y 1,250, respectivamente. El espectro de infrarrojo (Fig. 9, Anexo) mostró también señales características para grupos alcoholes, aromáticos, alcanos, carbonilos, éteres, y la banda característica de cloruros de alquilo a ν_{max} 3370, 3110, 2900 y 2860, 1680 y 1600, 1260 y 1100, y 730 cm^{-1} , respectivamente.

Los análisis de los espectros en RMN de 1H y ^{13}C (Tablas 5 y 3) (Fig. 10 y 11, Anexo) mostraron un singulete para un protón aromático a δ 1H : 7.08 ppm y, al igual que en el compuesto anterior, se le asignó al protón del carbono 18, lo que se confirmó posteriormente con los espectros de ^{13}C (δ ^{13}C : 108 ppm) y el espectro de 2D NMR HMQC. También se encontró al grupo metilo en el anillo aromático con desplazamientos en δ 1H : 2.13 ppm para H-26 y en ^{13}C : 8.4 ppm para C-26. El resto de las señales para los carbonos del anillo aromático

resultaron bastante similares a las del compuesto CNQ-525-546, en 162.6 y 164.7 ppm para los carbonos que soportan a los OH fenólicos, a 120.2 ppm, para el carbono que soporta al C-26 del metilo, y a 133.4 y 108 ppm para los carbonos que forman parte de los dos anillos del grupo dihidronaftoquinona. Asimismo se observaron las señales para los carbonos de carbonilos a 196.1 y 196.2 ppm. El análisis de 2D ^1H NMR HMBC (Fig. 14, Anexo) presentó correlaciones entre los carbonos C-12 con C-7, C-8, C-10, C-11, C-18 y H-18, por lo que claramente se establecen las vecindades en esta parte de la molécula (anillos D y C) similares a los reportados por Fakuda *et al.* (1990 a,-b). El espectro de ^1H NMR presentó correlación consecuente con una J de 4.0 Hz entre el protón H-10 y el protón H-11-b, correspondiente a una disposición axial-ecuatorial, así como una J de 12.0 Hz con el protón H-11b para un acoplamiento axial-axial. El protón H-11b correlaciona con el H-11a en un acoplamiento geminal con J de 13.0 Hz y con H-10 y H-12 con una J de 4.0 Hz en acoplamiento axial-ecuatorial (Tabla 5). Estos desplazamientos y correlaciones son muy similares a los obtenidos para el compuesto deducido anteriormente. Las únicas diferencias se encontraron en el espectro de ^1H NMR, en el cual apareció una señal dd en 3.36 ppm con una J de 13.0 y 4.0 Hz. Asimismo, en el espectro de ^{13}C NMR desaparece la señal en 82.5 ppm que corresponde al C-20 y aparece una a campo alto a 58.4 ppm, misma que se confirmó mediante el espectro 2D ^1H - ^{13}C HMQC ya que contenía al protón de la señal dd en 3.36 ppm. Estos datos fueron confirmados mediante el espectro de DEPT, ya que el C-12 pasa de carbono cuaternario a CH. Análisis de 2D ^1H NMR COSY mostraron la

presencia de tres sistemas de spin al igual que en la molécula anterior (Fig. 12, Anexo), uno correlacionando los protones H-3 y H-4, otro, correlacionando los protones H-10 y H-11 y el otro correlacionando los protones H-11 y H-12. Estos datos apoyarían la conclusión de que en la posición 12 se encuentra un protón en lugar de un cloro. Mediante los análisis de 2D NMR HMQC, MeHMQC y HMBC se asignaron todos los protones y los carbonos por lo que se propone para este compuesto la siguiente estructura:



Para confirmar la estructura propuesta, se revisó detenidamente el espectro de HMBC y se encontraron correlaciones entre el H-10 con C-9, C-11, C-24 y C-25; entre el C-11a con el C-6, C-8, C-9, C-10, C-20, H-10 y H-12; entre el H-4 y el C-23; entre el H-12 con C-7, C-8, C-10, C-11, C-13, C-18, C-20, y H-18. Estas correlaciones apoyan la propuesta de estructura antes mencionada, y

Tabla 5. asignaciones de ^{13}C y ^1H NMR para el compuesto CNQ-525-512, hechas con base en los experimentos de HMQC. s= simple, dd= doble de dobles, m= múltiple, br= ancha. ppm=partes por millón, J = constante de acoplamiento, Hz= unidades Hertz

Carbon #	^{13}C δ (ppm)	^1H δ ppm (J , Hz)	MeHSQC	COSY	^1H - ^{13}C HMBC	ROESY	Asig.
1	72.2				H-21, H-22, H-23, H-2b, H-3, H-7b		
2	42.5	1.76-1.82 m 1.52-1.56 m	CH ₂		C-22		H-2a H-2b
3	31.9	1.75-1.79 m 1.79-1.85 m	CH ₂		C-22, H-23, H-24, H-10		H-3a H-3b
4	72.1	3.67 dd (12.0, 4.0)	CH	H-3-H-4	C-23	H-3b, H-6, H-22	
5	41.8				H-21		
6	51.9	1.55 d(6.5)	CH		C-8, C-1, C-5, C-21, C-23, H-11b, H-12,	H-4, H-2a, H-7b, H- H-22	
7	41.3	1.82 d (16.0) 2.083 dd (16.0, 6.5)	CH ₂		C-20, C-8, C-4, C-10, C-12, C-6, H-2b, H-3, H-22, H-23		H-7a H-7b
8	81.6	-					
9	81.2	-			H-24, H-25, H-7, H-11		
10	62.5	4.09 dd (12.0, 4.11)	CH	H-10-H-11	C-9, C-11, C-24, C-25	H-12, H-11b, H-25	
11	35.3	2.06 q(13.0) 2.37 dt (13.0, 4.0)	CH ₂		C-20, C-8, C-1, C-10, C-12, C-6, H-12 C-9, C-10, C-12, H-12, H-10	H-10, H-11a, H-12	H-11a H-11b
12	58.4	3.36 dd (13.0, 4.0)	CH	H-12-H-11	C-18, C-13, C-20, C-8, C-10, C-7, C-11, H-18	H-10, H-11a, H- 11b, H-7a	
13	196.1						
14	108.0	-					
15	162.6				H-26		
16	120.2	-			H-18, H-26		
17	164.7				H-26		
18	109.6	7.08 s	CH		C-20, C-18, C-16, H-12,		
19	133.4	-			H-26		
20	196.2				H-7, H-12		
21	24.7	1.15 s	CH ₃		C-1, C-6, C-2, H-22, H-23, H-21, H-23, H-6, H- 2a, H-3b	H-2a, H-7b, H-23	Me3
22	29.5	0.44	CH ₃		C-1, C-6, C-5, C-23, H-23, H-21, H-6, H-2a, H- 3b	H-4, H-6, H-7a, H- 18, H-23	Me1
23	16.6	0.68	CH ₃		C-1, C-6, C-5, C-22, H-23, H-21, H-6, H-2a, H- 3b	H-3b, H-2a, H-7b, H-21, H-22	Me2
24	21.4	1.23 s	CH ₃		C-9, C-10, C-25, H-24, H-25, H-9	H-11a, H-25	Me4
25	29.3	1.44	CH ₃		C-9, C-10, C-24, H-25, H-10, H-11b, H-12	H-10, H-24	Me5
26	8.4	2.13	CH ₃		C-15, C-17, C-16		Me6

a la vez establecen claramente todas las conexiones existentes entre los anillos B y el metileno de unión con el anillo A. Algunas otras interacciones son las que corresponden al H-9 con H-7, H-11, H-24 y H-25; entre H-6 con C-1, C-5, C-8, C-20, C-23, H-11b y H-12; entre H-2 con C-22; entre H-5 con C-21; entre H-22 con C-1, C-2, C-6, H-2a, H-3b, H-6, H-21 y H-23; entre H-25 con C-9, C-10, H-10 y C-24; entre H-23 con C-1, C-5, C-6, C-21, H-2^a, H-3b, H-6, H-21 y H-23. La estereoquímica absoluta del compuesto CNQ-525-512 fue determinada mediante la interpretación del espectro de 2D ¹H NMR ROESY, en donde se encontró que el protón H-22 correlaciona con los protones H-23, H-6, H-7a, H-4 y H-18, indicando la correcta posición de estos protones. El protón H-23 correlaciona con H-22, H-3b, H-7a, H-7b y H-21, mientras que la posición de los metilos C-22 y C-23 se observa que es axial y ecuatorial, respectivamente. Los protones del metilo 21 correlacionan con H-2a, H-23 y H-7b. También se observan correlaciones entre H-6 con H-7a, H-4, H-21 y H-22, así como las correlaciones geminales típicas entre los protones H-7a y H-7b ($J=16.0$ Hz). El protón H-7 también correlaciona con H-22, H-23 y H-21, y el protón H-4 con H-3b y H-3a, cada uno de los cuales presentó constantes de acoplamiento típicas para una disposición axial-axial y axial-ecuatorial ($J=12.0, 4.0$ Hz). Estos datos confirman la posición correcta de todos los protones del anillo D, el cual tiene la disposición de un geranilo. En el anillo B, el protón H-10 también presentó correlación con los protones H-12 y H-25, el protón H-11a con los protones H-10, H-11b y H-12, congruente con una disposición axial-axial ($J= 13.0$ Hz). El protón H-12 se correlacionó con el H-11a en una disposición axial-axial ($J= 13.0$ Hz) y

con el protón H-11b en una disposición axial-ecuatorial ($J = 4.0$ Hz), así como con el H-24. Esta estructura corresponde a un derivado de la anterior, pero con la única diferencia que esta contiene un cloro menos en la posición 12 (Figura 4).

Al igual que el compuesto

anterior, este también es similar a las estructuras reportadas previamente para algunas napyrodiomicynas (Fakuda *et al.* 1990 a,-b; Shiomi *et al.* 1987). Sin embargo, una búsqueda en *AntiBase*TM produjo resultados negativos para compuestos con las características de CNQ-525-512, por lo que se dedujo que era un compuesto nuevo, el cual será sometido para su publicación a *Journal of Natural products*.

La estructura se confirmó mediante difracción de rayos X de monocristal (Fig. 5). Los resultados se muestran en la tabla 6.

Tabla No. 6. Datos cristalográficos de Rayos X de la estructura cristalina del compuesto CNQ-525-512.

Clave:	CNQ-525- 512	Reflecciones colectadas:	19874
Fórmula empírica:	$C_{26}H_{34}Cl_2O_6$	Reflecciones independientes:	5288[R(int)=0.0221]
Peso fórmula:	512.74	Incompleto a to theta	
Temperatura:	213(2)°K	=28.29°	95.6 %
Longitud de onda:	0.71073 Å	Corrector de absorción:	Semiempírica de eq
Grupo espacial:	P2(1)2(1)2(1)	Transmis. Max. y min.	1.000 y 0.522
Sistema cristalino:	Tetragonal	Método de refinamiento:	Full-matrix least-Cuadrados Sobre F ²
Dimensiones de la Celda unitaria	a= 21.4200 (10) Å α = 90° b= 21.4200 (10) Å β = 90° c= 12.5774 (12) Å γ = 90°	Datos/ rest./param.:	5288/1/307
Volumen:	5770.7(7) Å ³	Ajustes sobre F ² :	0.834
Z:	8	Indices R finales	
Densidad calculada:	1.279gcm ⁻³	[I>2sigma(I)]:	R1= 0.0448, wR2=
Coefficiente de abs.:	0.267 mm ⁻¹		0.1238
Tamaño del cristal:	0.70X0.45X0.45 mm ³	Indices R (todos los datos):	R1= 0.0467, wR2=
F(000):	2364		0.1258
Rangos de índices:	-28<=h<=28, -28<=k<=28,- 15<=l<=16	Parámetro de estructura absoluta:	0.07(6)
Rango teta para la Colección de datos:	1.88 to 28.24°	Los más grandes dic. Pesk y completo:	0.457 y -0.243 e Å ⁻³

En base a los resultados obtenidos hasta el momento, se propone la siguiente estructura cristalina para esta molécula:

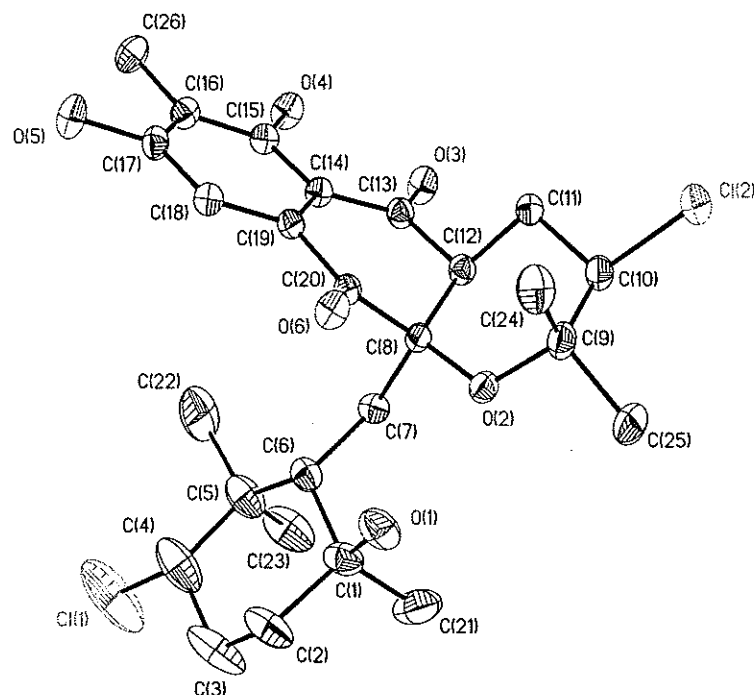


Figura 5. ORTEP del compuesto CNQ-525-512, obtenido mediante difracción de Rayos X de monocristal.

El nombre del compuesto, según la UIQPA, es: 3-cloro-10a-(3-cloro-6-hidroxi-2,2,6-trimetil-ciclohexilmetil)-6,8-dihidroxi-2,2,7-trimetil-1,3,4,4a,10a-tetrahidro-2H-benzo[g]cromeno-5,10-diona. Las tablas referentes a las coordenadas de todos los átomos, las longitudes y los ángulos de enlace, así como los desplazamientos anisotrópicos, se encuentran descritos en el Anexo 2.

Al realizar las pruebas de bioactividad de esta estructura se encontró que presentó actividad tanto anticancerígena, como antibiótica, con valores de $IC_{50} = 2.404 \mu\text{g mL}^{-1}$ contra células de carcinoma colorectal HCT 116, y una $MIC = 1.953 \mu\text{g mL}^{-1}$ para el bioensayo de antibiosis contra MR *S. Aureus* y de $MIC = 3.906 \mu\text{g mL}^{-1}$ para el bioensayo contra VR *E. Faecium*. Como se puede ver, las propiedades de este compuesto son prometedoras por lo que actualmente se

continúa con su estudio, sobre todo en lo concerniente a algunas otras actividades biológicas como actividad antifungal y antiviral. Su estructura fue sometida para su publicación en el *Journal of Natural Products*.

Fracción no. 8

La fracción 8 marcada en el cromatograma de la Figura 2 con el número 510 fue aislada como un compuesto aceitoso de color amarillo pálido, cuya fórmula molecular es $C_{26}H_{32}Cl_2O_6$, la cual fue establecida mediante espectrometría de masas de alta resolución ESI-TOF. En base a este mismo análisis se obtuvo la presencia de un ión molecular además de un sodio a $[M+Na]^+$ m/z (obsd.)= 533.1470 (Fig. 22, Anexo). Esta fórmula sugirió diez grados de insaturación, razón por la cual se dedujo que debía tener una insaturación adicional al de las moléculas estudiadas anteriormente. Su rotación específica mostró un valor $[\alpha]_D^{25} = -6.25^\circ$ (c, 0.128 g/100 mL CH_3OH) y presentó longitudes de máxima absorción en el UV a λ_{max} 268 nm MeOH ($\epsilon = 13,008$), a 325 nm ($\epsilon = 6,485$) y a 352 nm ($\epsilon = 5,770$). Por otro lado, el espectro de IR mostró absorciones para grupos hidroxilos, insaturaciones, alcanos, carbonilos, éteres y la banda característica para cloruros de alquilo a ν_{max} 3360, 3110-3030, 2920-2860, 1750, 1630, 1280-1120 y 800-700 cm^{-1} , respectivamente (Fig. 16, Anexo).

Análisis de 1H y ^{13}C NMR (Tabla 3 y 7) (Fig. 17 y 18, Anexo) mostraron desplazamientos químicos similares a los del compuesto CNQ-525-512, pero con diferencias en los carbonos No. 11 y 12, además de la existencia de un

doble enlace entre estos dos carbonos. La doble ligadura fue fácilmente reconocida por la pérdida de las señales para el hidrógeno del metino en la posición 11 (2.73 dt y 2.06 q) del compuesto CNQ-525-512 y la de los protones del metileno para el carbono 12 (3.36 dd) de ese mismo compuesto en lugar de la cual apareció una señal doble a δ 6.94 ($J = 1.8$ Hz) en el carbono 12. El espectro de ^{13}C NMR mostró también desplazamiento a campo bajo para los carbonos C-11 y C-12, el primero de los cuales se convierte en un metino mientras que el segundo se convierte en carbono cuaternario. Lo anterior fue confirmado mediante el espectro 2D ^1H - ^{13}C MeHSQC NMR (Fig. 20, Anexo). Análisis ^1H - ^1H -COSY NMR presentaron correlaciones entre dos sistemas de spin, uno involucrando a los protones del carbono C-4 y C-3 y la otra con los protones de C-10 y C-11 (Fig. 19, Anexo). La interpretación del espectro 2D HMQC y HMBC NMR permitieron llevar a cabo las asignaciones para todos los carbonos y protones. Podemos resaltar las numerosas correlaciones obtenidas mediante HMBC (Fig. 21, Anexo), como lo fueron las correlaciones de H-4 con H-3b, H-2a, H-21; de C-6 con H-2a; de H-10 con C-11, C-24, H-25, H-24 y H-7b y de H-11 con H-10, H-24 y H-25, estableciendo de manera clara las conexiones asignadas a la molécula, las cuales se pueden observar en la Tabla 7.

La estereoquímica absoluta de esta molécula fue confirmada mediante el experimento ROESY NMR, en el cual se encontraron correlaciones entre el protón H-11 con H-10, H-24 y H-25 y entre el protón H-10 con H-11, H-24, H-25 y H-7b, indicando que la posición correcta para el doble enlace era C11=C12. (Figura 6). En este compuesto se observaron las señales para dos protones de

grupos oxhidrilos: el OH-1 en δ 5.65 ppm y el OH-4 en δ 12.78 ppm. En el espectro ROESY también se observaron interacciones entre estos dos oxhidrilos con sus vecinos espaciales, el OH-1 mostró correlación entre H-2a, H-24 y H-25 y el OH-5 mostró correlación con el H-26, (Figura 6)

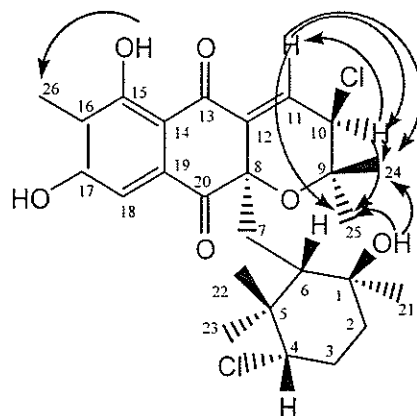


Figura 6. Representación del compuesto CNQ-525-510, donde las flechas indican las interacciones ROESY NMR.

Esta estructura se puede considerar como correspondiente a un nuevo compuesto que no ha sido reportado en la literatura. Su actividad frente a células de cáncer colorectal humano HCT 116 fue bastante prometedora ($IC_{50} = 0.969 \mu\text{g mL}^{-1}$), razón por la cual se considera un anticancerígeno mucho más potente que los compuestos CNQ-525-546 y CNQ-525-512. Sin embargo, su actividad antibiótica contra MR *S. aureus* y contra VR *E. faecium* fue muy baja ($MIC = 15.625 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $MIC = 15.625 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente), por lo que se puede considerar que el compuesto CNQ-525-510 es mejor anticancerígeno que antibiótico. Cabe mencionar que este fue el compuesto que se obtuvo en menor proporción debido a que se descompone muy rápidamente, ya que es sensible a

Tabla 7. asignaciones de ^{13}C y ^1H NMR para el compuesto CNQ-525-510, hechas con base en los experimentos de HMQC. s= simple, dd= doble de dobles, m= múltiple, br= ancha. ppm=partes por millón, J= constante de acoplamiento.

Carbon #	^{13}C δ (ppm)	^1H δ ppm (J, Hz)	MeHSQC	COSY	^1H - ^{13}C HMBC	ROESY	Asig.
1	70.9		C		H-22, H-23		
2	40.9	1.95-2.0 m 1.34-1.40 m	CH ₂		C-8, C-5, C-7, C-21, C-23, H-8		H2a H2b
3	30.02	1.9-1.95 m ^c 1.73-1.79 m	CH ₂			H-21, H-2a, H-3b H-2b, H-22, H-23	H3a H3b
4	71.6	3.44 dd (12.0, 3.0)	CH	H-4-H-3	H-21	H-21, H-2a, H-3b	
5	40.7		C				
6	52.7	1.4 m	CH		C-4, C-2, H-21, H-22, H-23	H-2b	
7	40.13	2.0-2.02 m ^c 2.07-2.11 m ^c	CH ₂		C-20, C-8, C-4, H-7b	H-7b, H-21, H-23, H-10 H-7a, H-22, H-23, H-2b	H7a H7b
8	82.8		C		H-11, H-7a		
9	79.0		C		H-10, H-25, H-24		
10	58.7	4.56 d(1.8)	CH	H-10-H-11	C-9, C-11, C-12, C-24, C-25	H-11, H-25, H-24, H-7b	
11	135	6.94 d (1.8)	CH		C-13, C-8, H-7a	H-10, H-24, H-25	
12	133.4		C				
13	187.4		C				
14	110.2		C				
15	163		C				
16	119.2		C		HO(4), H-18, H-26		
17	163.4		C		H-26		
18	108.14	7.37 s	CH		C-16, C-18, C-20	H-6, H-22	
19	138		C				
20	192.3		C				
21	23.9	1.25 s	CH ₃		C-4, C-6, C-5, H-6, H-7a, H-7b	H-23, H-3a, H-3b, H-7b, HO(1)	
22	28.49	0.48 s	CH ₃		C-23, C-5, C-6, C-1, H-23, H-7a	H-23, H-6, H-7a, H-4	
23	15.6	0.68 s	CH ₃		C-22, C-7, C-6, C-1, H-7a, H-22, OH-1	H-22, H-21, H-7b, H-7a, H-3a	
24	20.55	1.23 s	CH ₃		C-10, C-9, C-25, H-25, H-10	H-25, H-10, H-11	
25	27	1.59 s	CH ₃		C-10, C-9, C-24, H-10	H-24, H-10	
26	8.26	2.22 s	CH ₃		C-17, C-16, H-18, OH-2		
O(1)		5.65	OH			H-25, H-24, H-2a	
O(4)		12.78	OH		C-16, C-14	H-26	

la luz, al calor, a la humedad y, en general a cambios bruscos de las condiciones ambientales, debido posiblemente a la doble ligadura que presenta. Como las moléculas anteriores, esta estructura está siendo sometida para su publicación en el *Journal of Natural Products*.

Fracción 20

El compuesto de la fracción 20, que en el cromatograma de la Figura 2 aparece con el número 492, se presentó mezclado con el compuesto de la fracción 19 (que aparece con el número 528). Aunque se colectaron separados, eventualmente ambos se juntaron, para ser separados posteriormente mediante HPLC utilizando una columna de fase normal, debido a su baja polaridad. La mezcla de disolventes que se empleó fue $C_6H_{14}:AcOEt$ 3.2:1 y la separación se llevó a cabo en un tiempo máximo de 10 minutos, durante la cual únicamente se obtuvieron los compuestos 19 y 20 mencionados anteriormente.

El compuesto 492 (fracción 20) se obtuvo como un compuesto cristalino de color blanco con un punto de fusión de $179-181^{\circ} C$, para el cual se obtuvo la fórmula molecular $C_{26}H_{30}Cl_2O_5$, determinada mediante el espectro de masas de alta resolución ESI-TOF High-Acc, con el cual se obtuvo un ión a m/z 491.1395, que correspondió al fragmento $[M-H]^+$ (Fig. 36, Anexo). Esta fórmula representa 11 grados de insaturación, por lo que se pensó que era una estructura similar a la anterior, pero con una insaturación adicional. El compuesto presentó una rotación específica $[\alpha]_D^{25} = -7.7319^{\circ}$ (c, 0.388 g/100 mL CH_3OH), y se determinaron las longitudes de onda de máxima de absorción, las cuales

resultaron ser λ_{\max} MeOH 272 nm ($\epsilon = 3420$), a 327 nm ($\epsilon = 1613$) y a 356 nm ($\epsilon = 1460$). El espectro IR presentó la banda característica para HO⁻ a ν_{\max} 3320 cm^{-1} , la señal característica de anillos aromáticos a ν_{\max} 3100 cm^{-1} , señales características para alcanos a ν_{\max} 2930 y 2870 cm^{-1} , así como señales características para carbonilos a ν_{\max} 1720, 1650 y 1620 cm^{-1} , éteres a ν_{\max} 1280 y 1100 cm^{-1} y cloruros de alquilo a ν_{\max} 800-700 cm^{-1} (Fig. 30, Anexo). Los análisis de ^1H y ^{13}C NMR (Tablas 3 y 8) (Fig. 31 y 32, Anexo) presentaron desplazamientos químicos similares a los del compuesto CNQ-525-510, pero con diferencias localizadas en los carbonos C-1 y C-21, en donde se presentó un segundo doble enlace. Estos resultados son congruentes con las 11 insaturaciones estimadas al principio de la descripción de este compuesto. Este doble enlace fue fácilmente asignado, ya que se observó claramente la desaparición del grupo metilo C-21 (de las moléculas anteriores) así como la señal para el HO⁻ en ese mismo carbono. Para este último carbono se presentaron dos singuletes anchos a δ 4.77 ppm y a δ 4.33 ppm (Tablas 3 y 8). El espectro de ^{13}C NMR presentó señales a campo bajo para los carbonos C-21 y C-1.

También se comprobó la presencia de un CH₂ y un carbono cuaternario para C21 y C1, respectivamente, mediante el espectro 2D NMR MeHSQC (Fig. 34, Anexo). El análisis de 2D ^1H - ^1H COSY NMR (Fig. 33, Anexo) mostró correlaciones para tres sistemas de spin, uno correlacionando los protones de C-4 y C-3, otra correlacionando los protones de C3 y C2, y un último correlacionando los protones de C-10 y C-11. La interpretación de los espectros

2D HMQC y HMBC NMR (Fig. 35, Anexo) permitió realizar la asignación a todos los protones y carbonos. Se encontró una gran cantidad de correlaciones en el espectro HMBC, como las observadas para el H-4 con C-5, C-6, C-23 H-22 y H-23, las del H-7 con C-1, C-5, C-6, C-8, C-11, H-6, H-2a y H-21, las de H-10 con C-9, C-24, H-25 y C-24; y las de H-8 con C-5, C-11 y H-7, entre H-2 con C-1, C-6, C-2 y H-21, entre H-21 con C-2, C-6 y H-21, así como entre H-26 con C-15, C-16 y C-17. Con estas correlaciones se establecieron las conexiones asignadas mediante el espectro COSY.

La estereoquímica absoluta se determinó mediante el análisis por NOESY NMR, en el cual se observó que el protón H-21 correlacionó con el H-6, el H-3 con el H-4 y H-6, y el H-4 con el H-3, indicando la correcta posición de la doble ligadura (Figura 7).

Este compuesto, que presentó actividad contra MR *Staphylococcus aureus* (MIC = 1.953 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y contra VR *Enterococcus faecium* (MIC = 1.953 $\mu\text{g mL}^{-1}$), es muy parecido al reportado por Shiomi *et al.*, (1986b) para la napyradiomycina B2. La diferencia, de nuevo (al igual que en el caso del compuesto CNQ-546 con respecto a la Napyradiomycina B4), fue el metilo en la posición No. 16 de esta estructura. De esta manera, la Napyradiomycina B2 contiene dos protones aromáticos en su estructura y carece del metilo marcado en nuestra estructura como Me 6. Los datos espectroscópicos son bastante similares, aunque se observó que el compuesto CNQ-525-492 presentó una actividad antibacteriana mayor que la mostrada por la napyradiomycina B2 para.

la misma bacteria *S. aureus*, (Shiomi *et al.*, 1986). Esta estructura está siendo sometida para su publicación en el *Journal of Natural Products*.

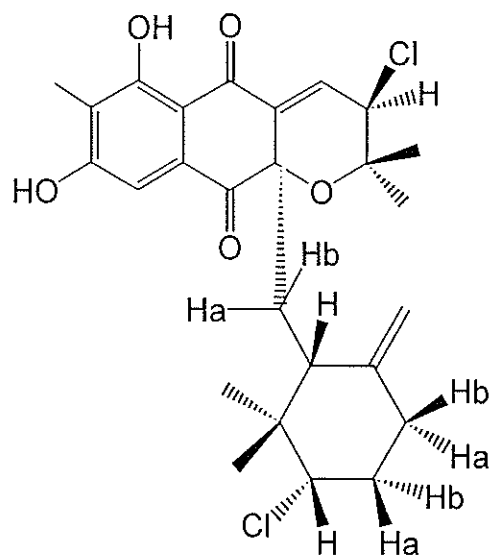


Figura 7. Representación de la estructura del compuesto CNQ-525-492.

Tabla 8. asignaciones de ^{13}C y ^1H NMR para el compuesto CNQ-525-492, hechas con base en los experimentos de HMQC. s= simple, dd= doble de dobles, m= múltiple, br= ancha. ppm=partes por millón, J = constante de acoplamiento.

Carbon #	^{13}C δ (ppm)	^1H δ ppm (J, Hz)	Me- HSQC	COSY	^1H - ^{13}C HMBC	NOESY	Asig.
1	147.0						
2	36.7	2.09 m 2.26 m	CH ₂		C-1, C-6, C-2, H-21		H2a, H2b
3	35.1	1.7 m	CH ₂	H3-H2	C-4, H-23, H-22	H-4, H-6	
4	71.45	4.2 dd(11.1, 4.8)	CH	H4-H3	C-6, C-5, C-23, H-22, H-23	H-3	
5	42.7	-	C		H-22, H-23		
6	48.26	2.07 br s	CH				
7	37.3	1.86 br s 1.9 br s	CH ₂		C-1, C-11, C-8, C-6, C-5, H-2a, H-21	H-23	H7a, H7b
8	83.24	-	C		C-5, H-11, H-7b		
9	76.74	-	C		H-24, H-25		
10	60.4	4.97 d(1.5)	CH	H10-H11	C-9, C-24, H-24		
11	137.7	6.78 d (1.5)			C-13, C-8		
12	137.2		C				
13	189.4		C				
14	111.21						
15	163.8		C				
16	118.8		C		H-18, H-26		
17	164.09	-	C				
18	107.7	7.15 s	CH		C-20, C-15, C-19, C-16, C-14, H-26		
19	133.8	-	C				
20	194.7		C				
21	109.4	4.77 br s; 4.33 br s	=CH ₂		C-6, C-2, H-21	H-6	=CH ₂
22	27.06	1.11	CH ₃		C-4, C-6, C-5, H-7a, H-7b, H-2a, H-21, H-23		
23	14.5	0.61	CH ₃		C-4, C-6, C-5, C-22, H-22, H-21		
24	20.69	1.02	CH ₃		C-9, C-10, C-25, H-25, H-10		
25	27.24	1.49	CH ₃		C-9, C-10, C-24, H-10, H-24	H-21	
26	8.19	2.14 s	CH ₃		C-15, C-16, C-17		
O(4)		12.98	OH				

Fracción 19

La fracción 19, una vez purificada mediante HPLC en fase normal, tenía la apariencia de un aceite viscoso de color amarillo que, al ser analizada mediante espectrometría de masas de alta resolución ESI-TOF high-acc, presentó un ion a m/z 527.1153 que correspondió al fragmento $[M-H]^+$ (Fig. 29, Anexo). De acuerdo a estos datos, la fórmula molecular del compuesto sería $C_{26}H_{31}Cl_3O_5$, la cual sugiere diez grados de insaturación. Este compuesto presentó una rotación específica $[\alpha]_D^{25} = -71.57^\circ$ (c, 0.584 g/100 mL CH_3OH) y la siguiente información espectroscópica: absorciones en el UV λ_{max} MeOH a 264 nm (ϵ : 21,380), 327nm (ϵ : 8107) y 351 nm (ϵ : 8894). El espectro de IR también presentó absorciones características para grupos hidroxilos, aromáticos, insaturaciones (hay que instaurar una semana dedicada a las insaturaciones de las moléculas), alcanos, carbonilos, éteres y el grupo de los cloruros de alquilo a ν_{max} 3360, 3040, 2920- 2820, 1700-1600, 1270-1120 y 750-670 cm^{-1} , respectivamente (Fig. 23, Anexo).

El análisis de los espectros de 1H y ^{13}C NMR (Fig. 24 y 25, Anexo) permitió realizar todas las asignaciones a los protones y a los carbonos de la molécula (Tablas 3 y 9). De manera similar al compuesto anterior, se encontró una doble ligadura entre el C-1 y el C-21. El espectro ^{13}C NMR mostró señales para C-21 y C-1 a δ 110.2 y 146.9, respectivamente correspondientes al sistema de la olefina. Este compuesto mostró diferencias con el compuesto CNQ-525-492 en los carbonos C-11, C-12 y en el protón H-12. Sin embargo, mostró similitud con el compuesto CNQ-525-546 en esta parte de la molécula. El espectro 2D

MeHSQC NMR (Fig. 27, Anexo) permitió asignar al carbono C-11 como un metileno y al carbono C-12 como un carbono cuaternario, de manera similar al compuesto CNQ-525-546, incluso con la presencia de desplazamiento químicos bastante parecidos (δ 82.6 ppm para CNQ-525-528 y δ 82.5 ppm para CNQ-525-546). El análisis de 2D ^1H - ^1H COSY NMR (Fig. 26, Anexo) mostró correlación para tres sistemas de spin: uno involucrando a los protones de C-4, C-3 y C-2, otro involucrando a los protones de C-6 y C-7, y un último a los protones de C-10 C-11. También se observaron una gran cantidad de correlaciones en el espectro HMBC NMR (Fig. 28, Anexo), como aquellas entre H-1 con H-21, H-7 y H-3a, entre H-3 con C-1, C-4, C-5, C-6 y C-7, entre H-6 con H-3, H-22, H-23, H-7, H-21, entre H-7 con C-1, C-6, C-8, C-12, C-20 y H-21, entre H-8 con H-2, H-7, H-11 y H-25, entre H-9 y C-10 con H-11, H-24 y H-25, entre H-16 con H-16, entre H-18 con C-20, C-17, C-19, C-16 y H-7, así como la interacción entre los grupos metilos del grupo ciclohexanilo, entre H-21 con C-1, C-3, C-6, H-3^a, H-3^b, H-7 y H-11, entre H-22 con C-4, C-6, C-23, H-2, H-3^a y H-21, entre otras estableciendo las conexiones asignadas anteriormente.

La estereoquímica absoluta fue determinada mediante análisis por NOESY NMR por medio del cual se observó que el protón H-25 correlaciona con H-21, el protón H-4 correlaciona con H-2b, H-3a, H-22, H-23, y los protones H-21 correlacionan con H-2a, H-2b, H-24 y H-25, indicando que la posición correcta del doble enlace se encuentra entre C-1 y C21 (Figura 8). Este compuesto presentó una fuerte actividad contra células de carcinoma colorectal HCT 116 de $\text{IC}_{50} = 1.84 \mu\text{g mL}^{-1}$, mientras que la actividad antibacterial contra

Tabla 9. asignaciones de ^{13}C y ^1H NMR para el compuesto CNQ-525-528, hechas con base en los experimentos de HMQC. s= simple, dd= doble de dobles, m= múltiple, br= ancha. ppm=partes por millón, J= constante de acoplamiento.

Carbon #	^{13}C δ (ppm)	^1H δ ppm (J, Hz)	MeHSQC	COSY	^1H - ^{13}C HMBC	NOESY	Asig.
1	146.97				H21, H7, H3a		
2	35.0	2.03-2.06 m 2.27-2.3 m	CH ₂				2a 2b
3	35.2	1.67-1.75 m 1.98-2.03 m ^c	CH ₂	H3-H2	C-1, C-4, C-5, C-6, H-7		3a 3b
4	71.7	3.90 dd (12.0, 4.0)	CH	H4-H3	C-3, C-23, C-22, H-7	H-2b, H-3a, H-7, H-22, H-23	
5	43.3		C				
6	46.3	2.10-2.14 m	CH	H6-H7	H-3, H-22, H-23, H-7, H-21,		
7	34.1	2.64-2.74 m	CH ₂		C-20, C-1, C-8, C-12, C-6, H-21	H-6, H-25	
8	84.9				H-7, H-11, H-2, H-25		
9	79				H-11, H-24, H-25		
10	60.14	4.47 dd (12.0, 4.0)	CH	H10-H11	H-11, H-24, H-25	H-11, H-7, H-24, H-25	
11	42	2.47-2.52 m 2.56-2.64 m	CH ₂	H11-H10	C-8, C-12, C-9, C-10, H-7		11a 11b
12	82.6				H-7, H-11		
13	193.5						
14	108.0						
15	163.8						
16	119.3				H-18		
17	164.15						
18	108.35	7.23 s	CH		C-20, C-17, C-19, C-16, C-18, H-7		
19	132.7						
20	194.35						
21	110.21	4.84 d (4.2)	CH ₂	H-21-H-6	C-1, C-6, C-3, H-11, H-7, H-3a, H-3b	H-2a, H-2b, H-24, H-25	
22	26.6	0.66 s	CH ₃		C-4, C-6, C-23, H-21, H-3a, H-2		
23	15.5	0.56 s	CH ₃		C-4, C-6, C-22, H-3a, H-22		
24	22.6	1.2 s	CH ₃		C-9, C-10, C-25, H-25, H-7,		
25	27.7	1.3 s	CH ₃		C-9, C-10, C-24, H-10, H-11, H-24	H-21	
26	8.36	2.14 s	CH ₃		C-17, C-16, C-19, H-18		
O(4)		12.39	OH				

contra MR *Staphylococcus aureus* y VR *Enterococcus faecium* fue de MIC = 1.9 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y MIC = 3.9 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Esta actividad, así como los espectros de ^1H y ^{13}C NMR, fueron muy similares a los reportados por Fakuda *et al.* (1990a,b) mediante un diagrama tridimensional para la molécula con propiedades antibióticas A80915A. Sin embargo, al igual que para el caso del compuesto CNQ-525-546, no se encontró publicada la elucidación absoluta estructural de la molécula, por lo que su elucidación se someterá a publicación junto con las demás estructuras descritas anteriormente.

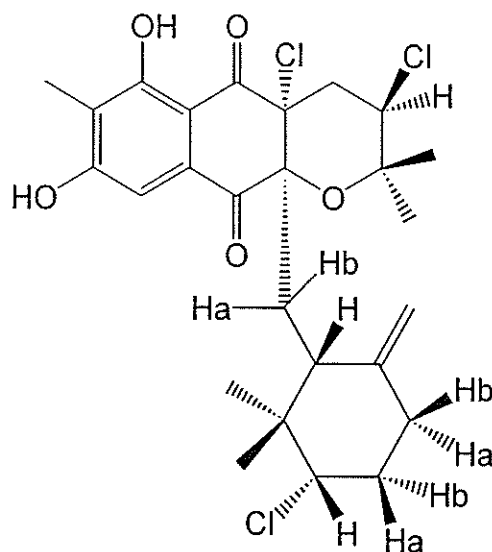


Figura 8. Representación de la estructura del compuesto CNQ-525-528.

Cepa Bacteriana CNQ-904

La cepa bacteriana CNQ-904 fue identificada como un actinomiceto que pertenece a la familia Streptomyetaceae. Al término del cultivo y concentración de la muestra, se obtuvieron 4 g de extracto crudo, el cual se separó mediante cromatografía en columna fase reversa con gel de sílice C-18. En total se obtuvieron 7 fracciones, de las cuales las más abundantes fueron la de H₂O 100% (1.1 g) y la de MeOH 100% (1.8 g). La primera de ellas contenía en su mayoría sales, razón por la cual se descartó. Sin embargo, la segunda, resultó ser la más interesante con respecto a su espectro de ¹H NMR y a su bioactividad ante células de cáncer de colon HCT116 (Tabla 10).

Tabla 10. Fracciones obtenidas del extracto de la cepa bacteriana CNQ-904, mediante cromatografía en columna fase reversa con gel de sílice C-18. NA= no analizada, ANS= actividad no significativa.

Fracción No.	Disolventes empleados v/v	Peso (g)	Bioactividad ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
1	H ₂ O 100 %	1.1	NA
2	H ₂ O:MeOH 2:1	0.266	ANS
3	H ₂ O:MeOH 1:1	0.281	72.89
4	H ₂ O:MeOH 1:2	0.310	72.34
5	MeOH 100 %	1.8	16.9
6	MeCN 100 %	0.137	ANS
7	AcOEt 100 %	0.020	ANS

Una vez que se eliminó el disolvente, la fracción extraída con MeOH 100%, se disolvió en la misma mezcla que se empleó en la separación por HPLC (H₂O:MeCN 2:8) para tener 6 mL de solución con una concentración final de 50 mg mL⁻¹. Una vez hecho lo anterior, la solución se pasó a través de filtros

desde el punto de vista espectroscópico, como por su bioactividad. La fracción CNQ-904-512 presentó una bioactividad contra células de carcinoma colorectal HCT116, IC_{50} de $1.915 \mu\text{g mL}^{-1}$ y la fracción CNQ-904-510 un $IC_{50} \leq 0.076 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Fracción No. 512

La fracción 512 se obtuvo como un compuesto cristalino de color amarillo pálido con un punto de fusión de $197\text{-}198^\circ\text{C}$. Los datos anteriores sugieren que se trataba del compuesto obtenido de la cepa CNQ-525, el cual presentó un punto de fusión de 198°C . El compuesto se corrió en LC/MS y se encontró que presentó el mismo peso molecular que el compuesto CNQ-525-512, obteniendo un ion molecular a m/z 535 que correspondió al $M^+ + \text{Na}$. Su espectro de ultravioleta resultó ser idéntico. Al comparar los dos compuestos mediante TLC, ambos resultaron con la misma relación frontal, forma y color. Asimismo, se determinó que su rotación óptica era $[\alpha]_D^{25} = -25.2^\circ$ (c, $0.153 \text{ g}/100\text{mL}$ en CH_3OH), la cual coincide con el compuesto CNQ-525-512. Este compuesto también presentó un espectro de $^1\text{HRMN}$ bastante similar al compuesto CNQ-525-510, quizá con la presencia de algunas impurezas en la región de 3.1 ppm , mismas que son observadas también en el espectro de masas. Sin embargo, en este trabajo se supondrá que se trata del mismo compuesto. Sus espectros de $^1\text{HRMN}$, masas y UV, se encuentran en el Apéndice 1.

Fración No. 510

La fracción 510 se obtuvo como un compuesto aceitoso de color amarillo pálido, el cual se analizó por medio de LC/MS, dando como resultado el mismo peso molecular que el compuesto CNQ-525-510, con un ión molecular a m/z 533 que correspondió al $M^+ + Na$. Su espectro de ultravioleta resultó ser idéntico. Este compuesto también fue comparado con el compuesto CNQ-525-510 mediante TLC y estos resultados indicaron que ambos poseían la misma relación frontal y la misma forma y color. Asimismo, se determinó su rotación óptica, la cual fue $[\alpha]_D^{25} = -10.5^\circ$ (c, 0.143 g/100mL en CH_3OH), cuyo valor coincide con el obtenido para el compuesto CNQ-525-510. Este compuesto también presentó un espectro de 1H RMN bastante similar al compuesto CNQ-525-510, por lo que se deduce que se trata del mismo compuesto. Sus espectros de 1H RMN, masas y UV se encuentran descritos en el Apéndice 1.

CONCLUSIONES

1.- Las cepas CNQ-525 y CNQ-904 fueron identificadas como actinomicetos de la familia *Streptomycetaceae*, la primera de ellas perteneciente a un nuevo género de actinomiceto.

2.- A partir del actinomiceto marino CNQ-525 obtenido de sedimentos de la Bahía de San Diego, se aislaron tres compuestos nuevos con estructuras base de dihidroquinonas con pesos moleculares de 512, 510 y 492 uma y dos compuestos conocidos, con estructuras de hidroquinonas y reconocidos como napyradiomycinas con pesos moleculares de 546 y 528 uma.

3.- A partir del actinomiceto marino CNQ-904 obtenido de sedimentos de la Bahía de San Diego, se aislaron dos de los compuestos nuevos obtenidos en la cepa CNQ-525, los compuestos con peso molecular 512 y 510 uma.

4.- Los compuestos de peso molecular 546, 512, 510 y 528 aislados de la cepa bacteriana CNQ-525, presentaron actividad citotóxica ante células de carcinoma colorectal HCT 116 de 4.22, 2.404, 0.969 y 1.84 $\mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente, como concentración inhibitoria media.

5.- Los compuestos de peso molecular 546, 512, 492 y 528 aislados de la cepa bacteriana CNQ-525, presentaron actividad antibiótica ante la cepa bacteriana MR *Staphylococcus aureus* de 1.953 $\mu\text{g mL}^{-1}$, así como actividad

contra la cepa bacteriana VR *Enterococcus faecium* de 3.906, 3.906, 3.906 y 1.953 $\mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente, como concentración mínima inhibitoria.

BIBLIOGRAFIA

Andersen, R.J.; Wolfe, M.S. and Faulkner, D.J. 1974. Autotoxic antibiotic production by a marine Chromobacterium. *Mar. Biol.* 24: 281-285.

Armitage F E and Wingo C S. 1995. Luminal acidification in K-replete OMCDi: inhibition of bicarbonate absorption by K removal and luminal Ba. *American Journal of Physiology* 269 (1 Pt 2): 132-135.

Baam, R. B.; Gandhi, N. M. and Freitas, Y. M. 1966. *Helgog Wiss Meeresunters.* 13:188-191.

Baslow, M. H. 1969. *Marine Pharmacology.* The Williams and Wilkins Co. Baltimore. Pp. 8-59.

Baumann, P. and Baumann, L. 1981. In: *The Prokaryotes*; Starr, M.P.; Stalp, H.; Truper, H.G.; Balows, A. and Schlegel, H.G. Eds. Springer-Verlag; Berlin. Vol. 11: 1302-1331.

Berdy, J. 1989. Bioactive metabolites from microorganisms, *Progress in Microbiology*; Bushell, M. E. and Grafe, U., Eds. Elsevier: Amsterdam. 27: 3-25.

Betina, V. 1983. The chemistry and biology of antibiotics. Elsevier. Amsterdam. pp. 4-16.

Burkholder, P. R.; Pfister, R. M. and Leitz, F. H. 1966. Production of a pyrrole antibiotic by a marine bacterium. *Applied microbiology*. 14(4): 649-653.

Carté, B. K. 1993. Marine natural products as a source of novel pharmacological agents. *Curr. Opin. Biotechnol.* 4: 275-279.

Dantzig, A. H.; Minor, P. L.; Garrigus, J. L.; Fukuda, D. S. and Mynderse, J. S. 1991. Studies on the mechanism of action of A80915A, a semi-naphthoquinone natural product, as an inhibitor of gastric (H(+)-K+)-ATPase. *Biochemical pharmacology*. 42(10): 2019-2026.

Davison, B. S. 1995. New dimensions in natural products research: cultured marine microorganisms. *Biotechnology*. 6: 284-291.

Fakuda, D. S.; Mynderse, J. S.; Baker, P. J.; Berry, D. M.; Boeck, L. D.; Yao, R. C.; Mertz, F. P.; Nakatsukasa, W. M. and Mabe, J.; 1990a. A80915, a new antibiotic complex produced by *Streptomyces aculeolatus*. Discovery, taxonomy, fermentation, isolation, characterization, and antibacterial evaluation. *Journal of Antibiotics*. 43(6): 623-633.

Fakuda, D. S.; Mynderse, J. S. and Yao, R. C. Manufacture of antibiotics A 80915 with Streptomyces and preparation of dehydrochlorinated derivatives. U.S. 1990 b. 10 pp. CODEN: USXXAM US 4904590 A 19900227 CAN 113:22221 AN 1990:422221 CAPLUS

Faulkner, D. J. 1996. Marine Natural Products. Nat. prod. Reports. 13: 75-125.

Faulkner, D. J.; Harper, M. K.; Haygood, M. G. Salomon, C. E. and Schmidt, E. W. 2000. in: Drugs from the Sea. Ed. N. Fusetani. Karger. pp. 107-120.

Fenical, W. 1993. Chemical Studies of Marine bacteria: Developing a New Resource. Chem. Rev. 93: 1673-1683.

Fenical. 2003. The true potential of the marine microorganisms. www.currentdrugdiscovery.com pp. 17-19.

Ghanem, N. B.; Sabry, S. A.; Zeinab M.; El-S, and Gehan A. 2000. Isolation and enumeration of marine actinomycetes from seawater and sediments in Alexandria. http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/JGAM/vol_46?460301?460301.htm.

Gomi, S.; Ohuchi, S.; Sasaki, T.; Itoh, J. and Sezaki, M. 1987. Studies on new antibiotics SF2415. II. The structural elucidation. Journal of antibiotics 40(6): 740-749.

Grein, A. and Meyers, S. P. 1958. Growth characteristics and antibiotic production of actinomycetes isolated from littoral sediments and materials suspended in sea water. *J. Bacteriol.*76: 457-463.

Henkel, T. and Zeeck, A. 1991. Secondary metabolites by chemical screening. 15. Structure and absolute configuration of naphthomevalin, a new dihydronaphthoquinone antibiotic from *Streptomyces* sp. *Journal of Antibiotics* 44(6): 665-669.

Heywood, V. H. and Watson, R. T. 1995. Global Biodiversity Assessment Published for the United Nations. Environmental Program. Cambridge University Press, pp.1140.

Hori, Y.; Abe, Y.; Shigematsu, N.; Goto, T.; Okuhara, M. and Kohsaka, M. 1993. Napyradiomycins A and B1: non-steroidal estrogen-receptor antagonists produced by a *Streptomyces*. *Journal of Antibiotics*.46(12): 1890-1893.

<http://www.umbi.umd.edu/virtue>.

Ireland, C. M.; Copp, B. R.; Foster, M. P.; McDonald, L. A. Radisky, D. C. and Swersey, J. C. 1993. Biomedical potential of marine natural products. *Marine Biotechnology. Pharmaceutical and bioactive natural products.* 1: 1-43.

Jensen, P.R. and W. Fenical. 1996. Marine Bacterial diversity as a resource for novel microbial products. *J. Of Industrial Microbiology.* 17: 346-351.

Kelly-Gutiérrez, L. 1999. Detección y variación estacional de bioactividad en invertebrados bentónicos de bahía Concepción, BCS., México. Tesis Maestría, UABC. Ensenada, BC. México.

Kitahara, T.; Naganawa, H.; Okazaki, T. ; Okami, Y. and Umezawa, H. J. 1975. Structure of SS-228Y, an antibiotic from *Chainia* species. *J. Antibiot.* 28: 280-285.

Laatsch, H.; Pudleiner, H.; 1989. Marine bacteria. I. Synthesis of pentabromopseudilin, a cytotoxic phenylpyrrole from *Alteromonas luteoviolaceus*. *Liebigs, AnnalenChemie.* 9: 863-81.

Maidak, B. L., J. R. Cole, T. G. Lilburn, C. T. Parker, P. R. Saxman, R. J. Farris, G. M. Garrity, G. J. Olsen, T. M. Schmidt, and J. M. Tiedje. 2001. The RDP-II (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Res.* 29:173–174.

Mizutani, Y.; Masuoka, S.; Imoto, M.; Kawada, M. and Umezawa, K. 1995. Induction of erythroid differentiation in leukaemia K562 cells by an S-adenosylhomocysteine inhibitor, aristeromycin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 207 (69): 69-74.

Pellew, R. 1996. La evaluación mundial de la diversidad biológica. *Nuestro Planeta.* Revista del programa de las naciones Unidas para el medio ambiente. Tomo 7 (5). Contraportada.

Prieto-Davó, A. 2002. Inhibición del crecimiento de actinomicetos de sedimentos marinos por interacciones ecológicas entre ellos mismos. Tesis de Maestría, UABC. Ensenada, BC. México.

Rosenfeld, W. D. and Zobell, C. J. 1947. *Journal of Bacteriology* 54: 393-395.

Shigemori, H.; Bae, M. A.; Yazawa, K.; Sasaki, T. and Kobayashi, J. Alteramide A, a new tetracyclic Alkaloid from a bacterium *Alteromonas* sp. Associated with the marine s. ponge *Halichondria okadai*. *J. Org. Chem.* 57: 4317-4320.

Shiomi, K.; Nakamura, H.; Linuma, H.; Naganawa, H.; Isshiki, K.; Takeuchi, T.; Umezawa, H. and Iitaka, Y. 1986-a. Structures of new antibiotics napyradiomycins. *Journal of antibiotics* 39(4): 494-501.

Shiomi, K.; Linuma, H.; Hamada, M.; Naganawa, H.; Manabe, M.; Matsuki, C.; Takeuchi, T. and Umezawa, H. 1986-b. Novel antibiotics napyradiomycins. Production, isolation, physico-chemical properties and biological activity. *Journal of antibiotics* 39(4): 487-493.

Shiomi, K.; Nakamura, H.; Linuma, H.; Naganawa, H.; Takeuchi, T. and Umezawa, H. 1987. New antibiotic napyradiomycins A2 and B4 and stereochemistry of napyradiomycins. *Journal of antibiotics.* 40(9): 1213-1219.

- Shomura, T.; Gomi, S.; Ito, M.; Yoshida, J.; Tanaka, E.; Amano, S.; Watabe, H.; Ohuchi, S.; Itoh, J. and Sezaki, M. 1987. Studies on new antibiotics SF2415. I. Taxonomy, fermentation, isolation, physico-chemical properties and biological activities. *Journal of antibiotics*. 40(6): 732-9.
- Strohl, W. R. 2001. The history of Natural products at Merck & Co Inc. *SIM News*, 51, 5-19. citado en Jensen, P.R., Tracy J. Mincer y William
- Umezawa, K.; Masuoka, S.; Ohse, T.; Naganawa, H.; Kondo, S.; Ikeda, Y.; Hamada, M.; Sawa, T. y Takeuchi, T. 1995. Isolation from *Streptomyces* of a novel naphthoquinone compound, Naphtablin, that inhibits Ab1 Oncogene Functions. *Journal of Antibiotics*. 48(7): 321-322
- Waksman, Selman. A. 1967. *The Actinomycetes. A Summary of Current Knowledge*. The Ronald Press Co. USA.
- Zhou, X.; Xia, S. and Wingo, C. 1998. Chloride transport by the rabbit cortical collecting duct: dependence on H,K-ATPase. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 9(12): 2194-2202.

ANEXO 1

ESPECTROS CNQ-525-546

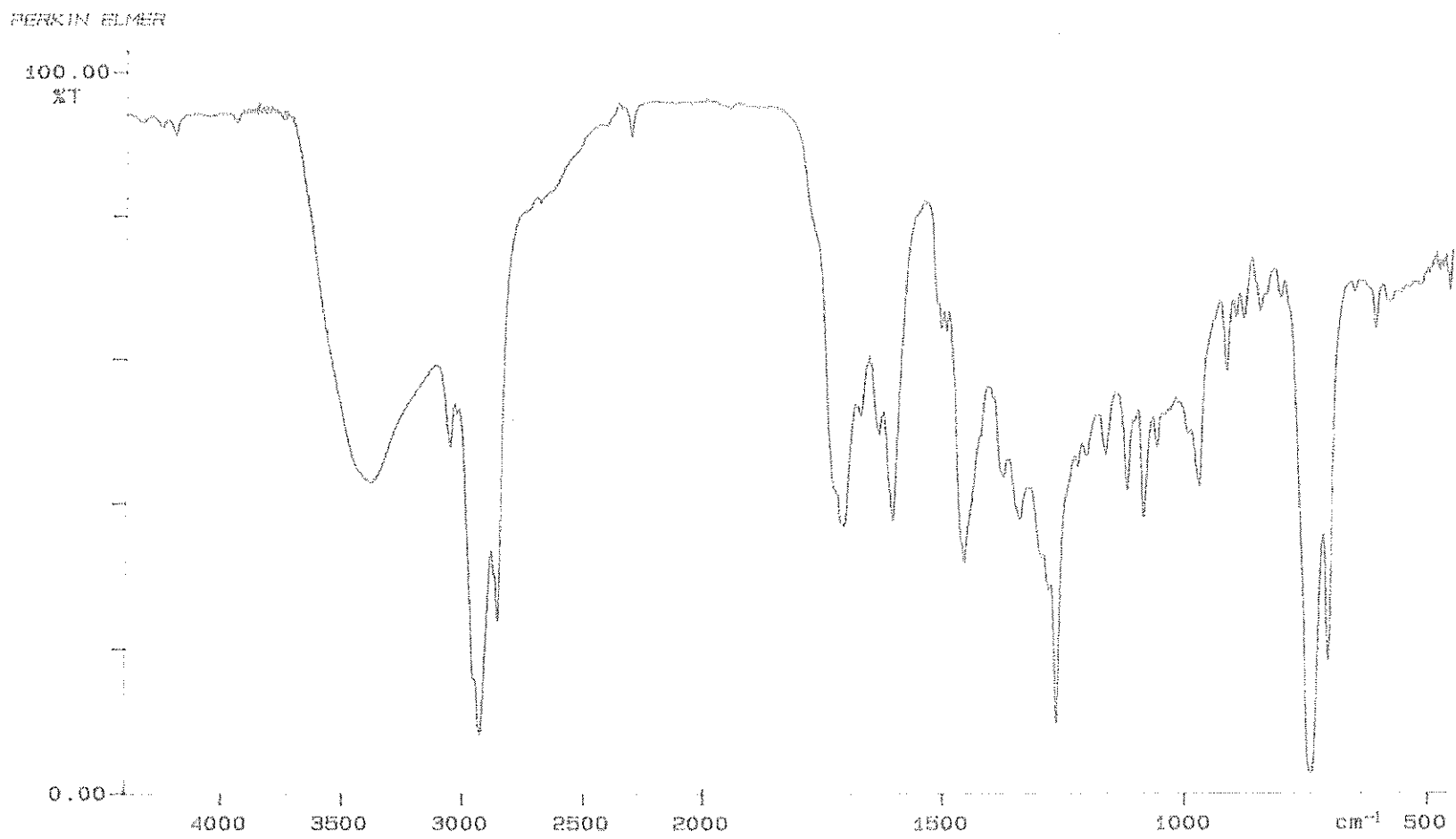


Figura 1. Espectro de Infrarrojo del compuesto CNQ-525-546.

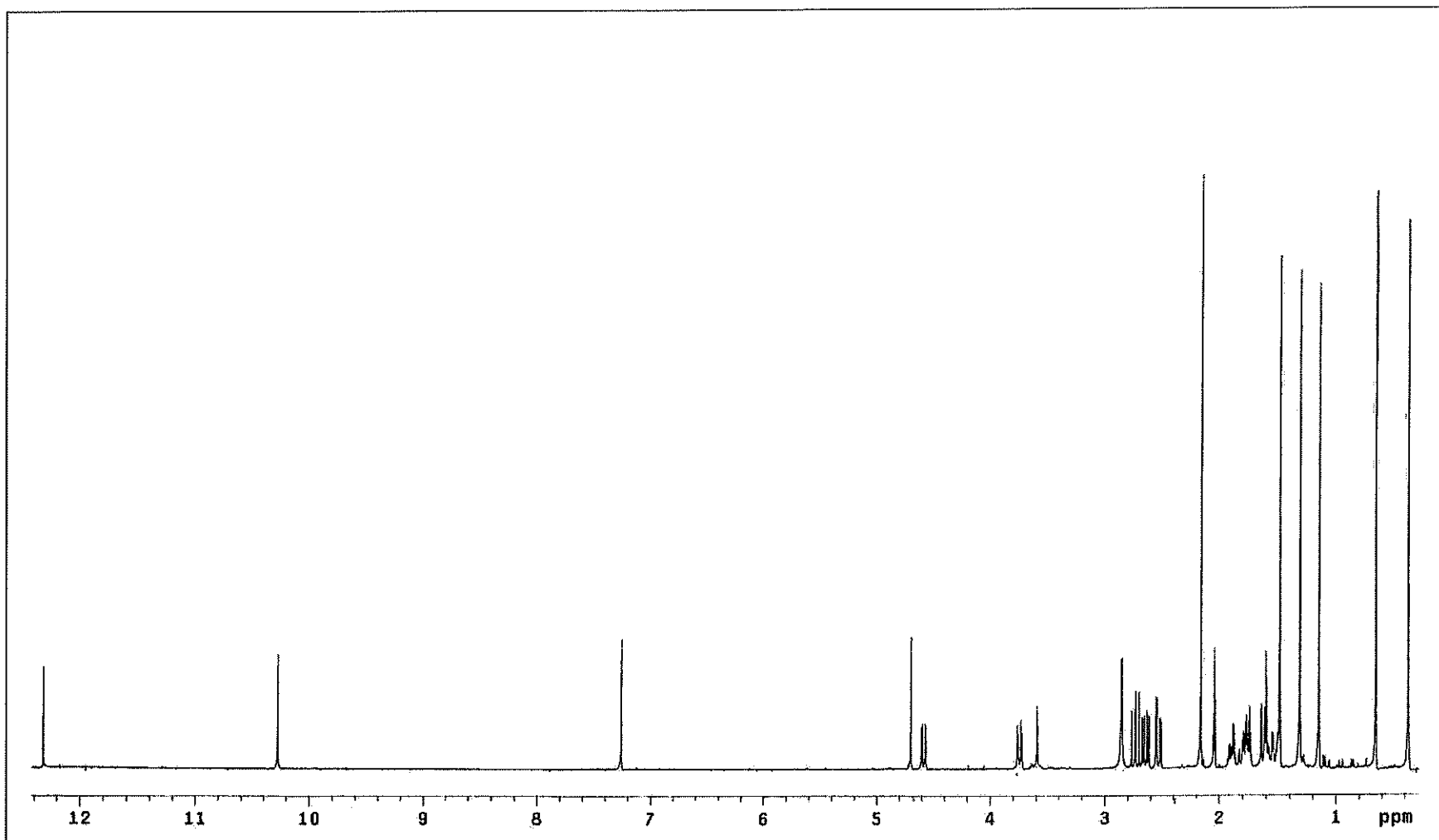


Figura 2. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear protónica ^1H (RMN) del compuesto **CNQ-525-546** (400MHz) en CD_3OD .

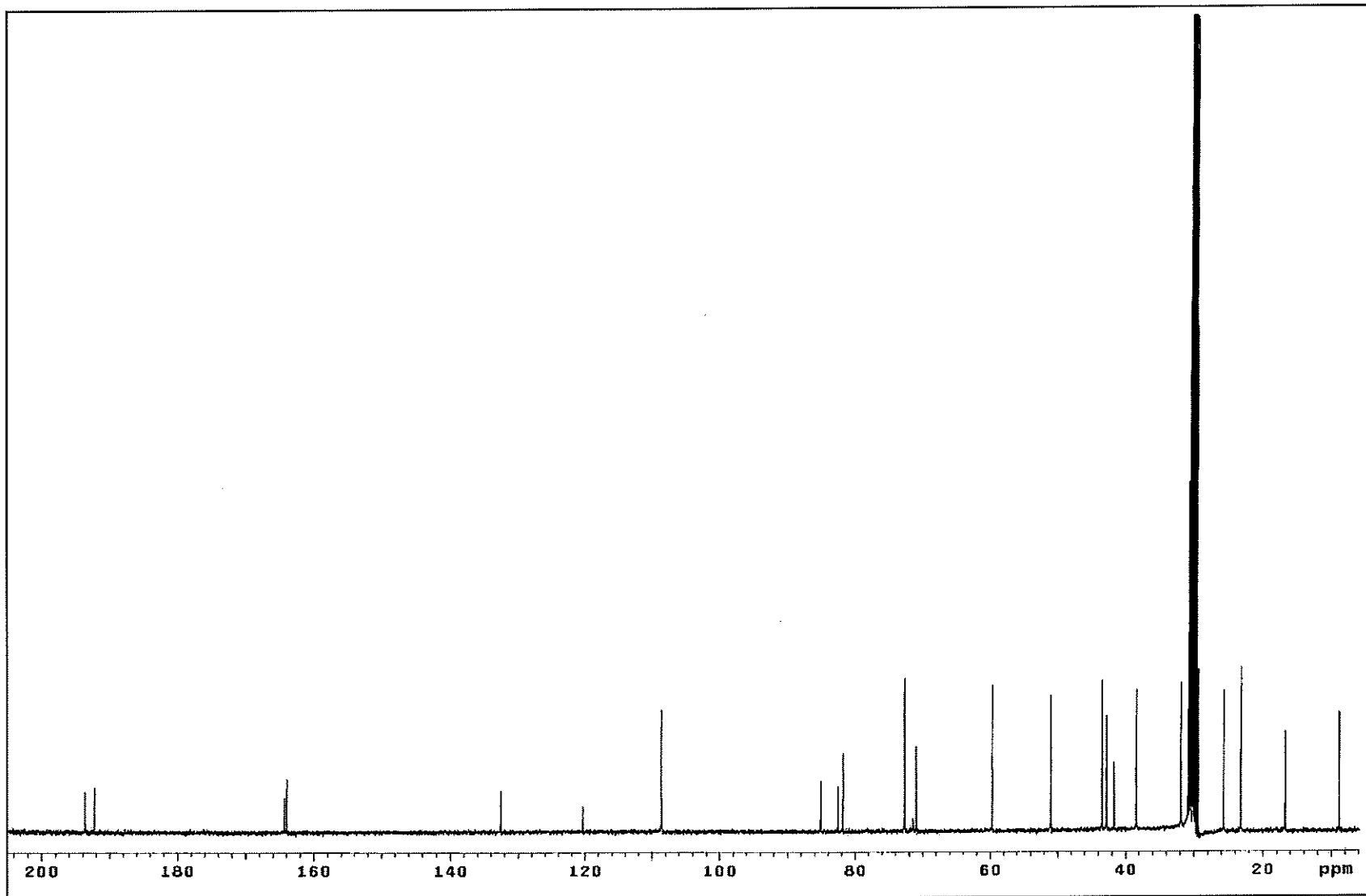


Figura 3. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear carbono ^{13}C (RMN) del compuesto CNQ-525-546 a 400 MHz en CD_3OD .

CNQ-525-546(300MHz)CD₃OD
Pulse sequence: DEPT

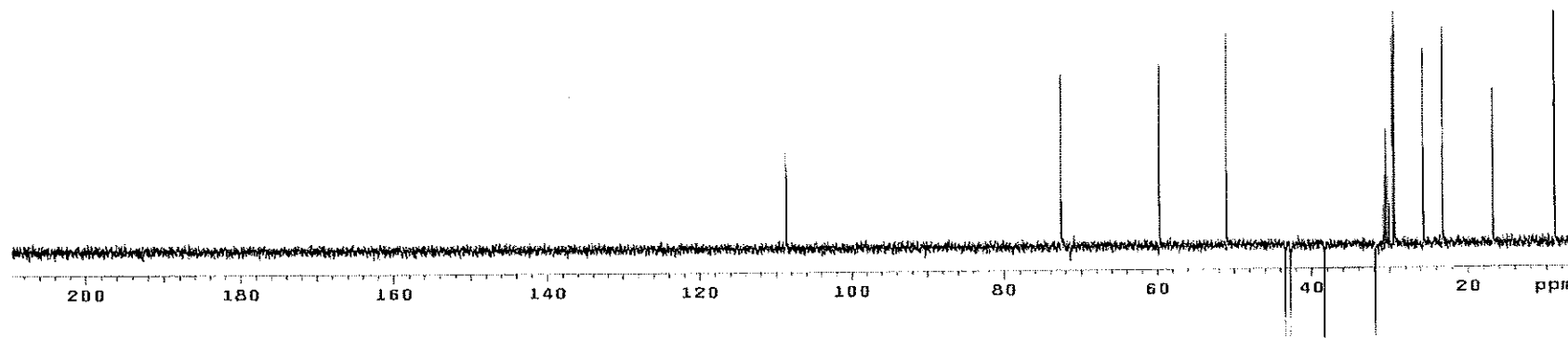


Figura 4. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear DEPT RMN del compuesto **CNQ-525-546** a 300 MHz en CD₃OD.

CNQ-525-546(300MHz)CD₃OD
Pulse sequence: COSY

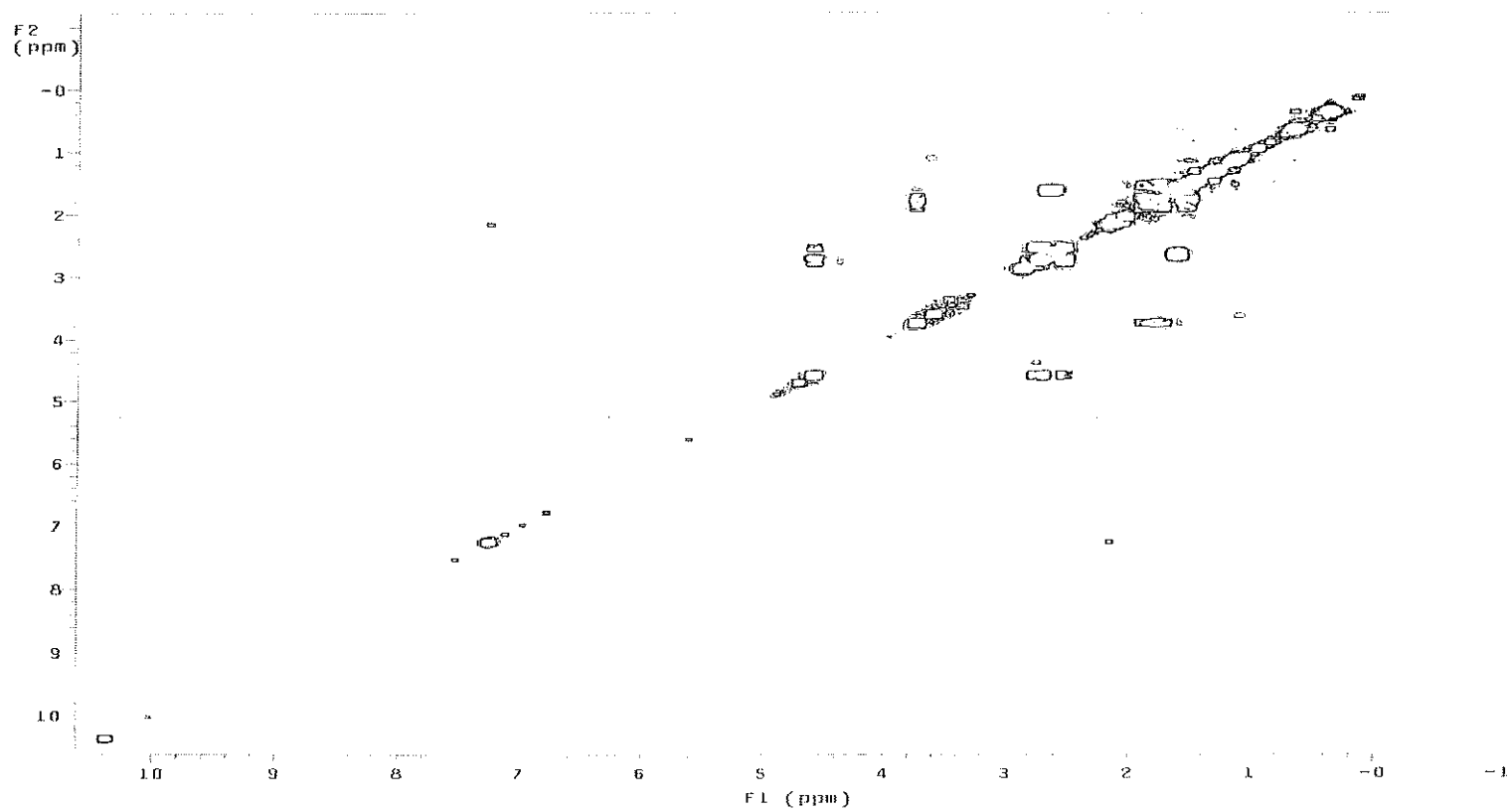


Figura 5. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear bidimensional: 2D ¹H-¹H RMN(COSY) del compuesto CNQ-525-546 a 300 MHz (CD₃OD)

CNQ-525-546(300MHz)CD₃OD
Pulse sequence: HMQC

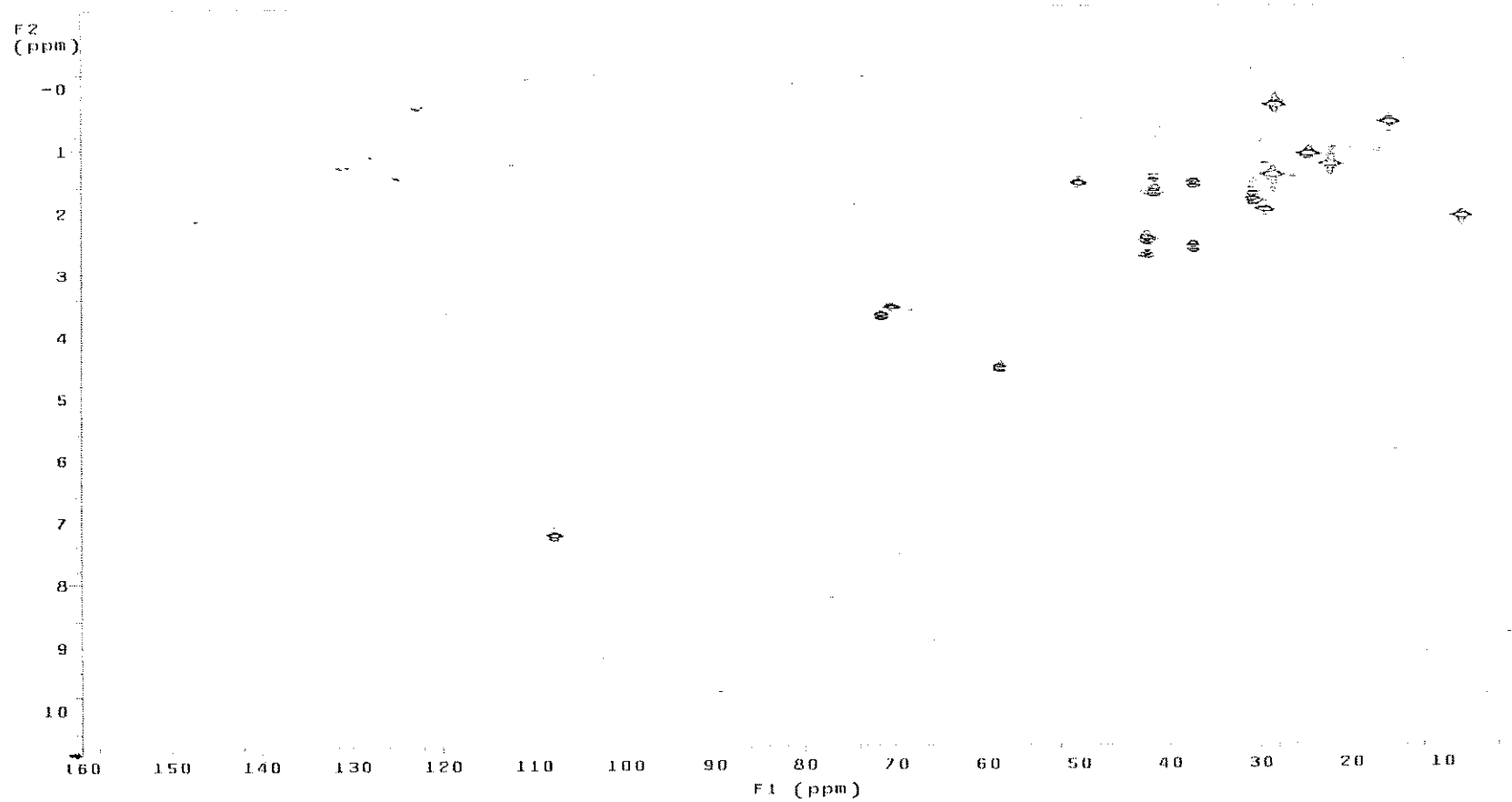


Figura 6. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear bidimensional: 2D ¹H-¹³C RMN(HMQC) del compuesto **CNQ-525-546** a 300 MHz (CD₃OD)

CNQ-525-546(300MHz)CD₃OD
Pulse sequence: HMBC

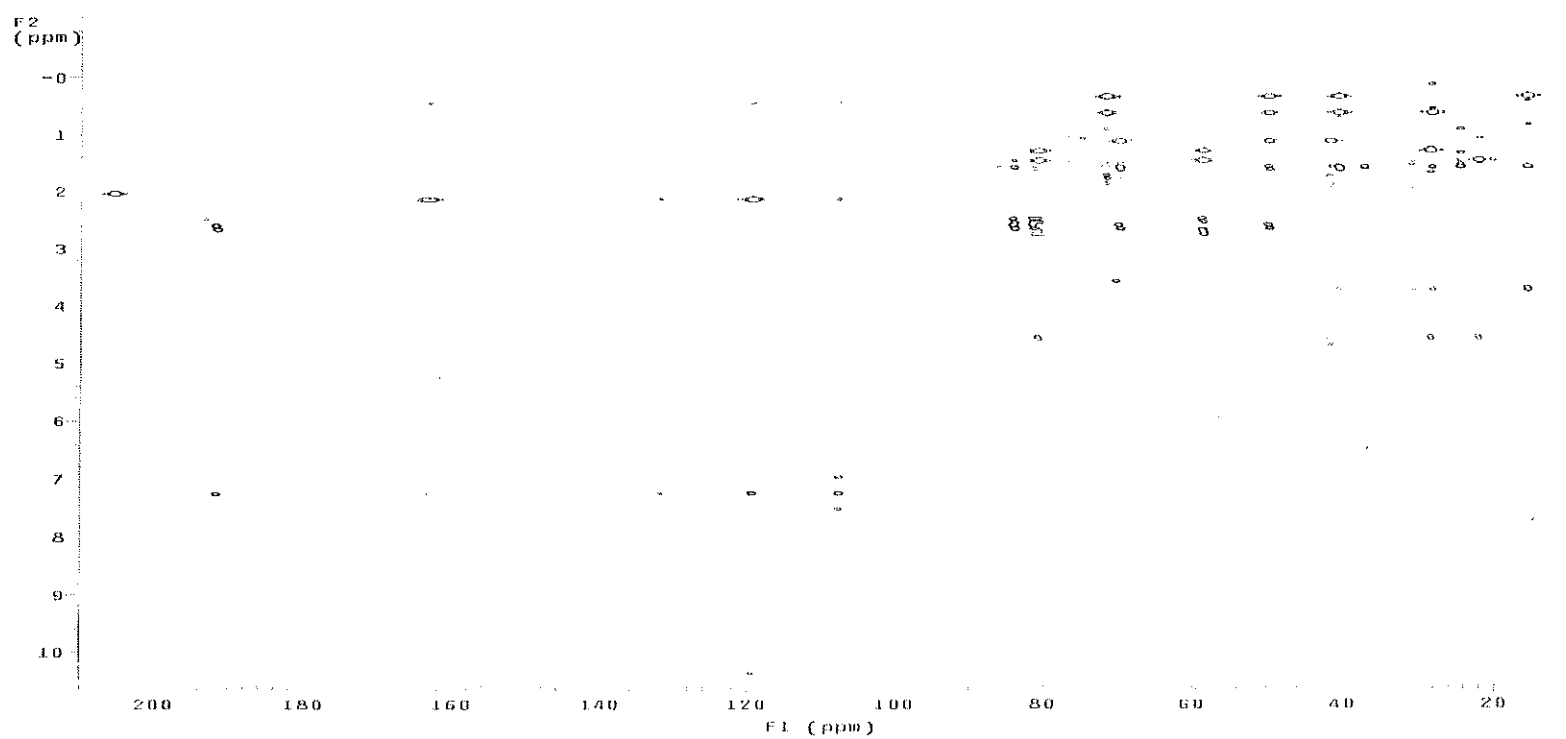


Figura 7. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear bidimensional: 2D ¹H-¹³C RMN(HMBC) del compuesto **CNQ-525-546** (300 MHz en CD₃OD).

*ESI-TOF

Sample Name: CNQ-525-546

Printing Time: 01:33:02 PM

Polarity/Scan Type: Negative

Printing Date: 21/04/2004

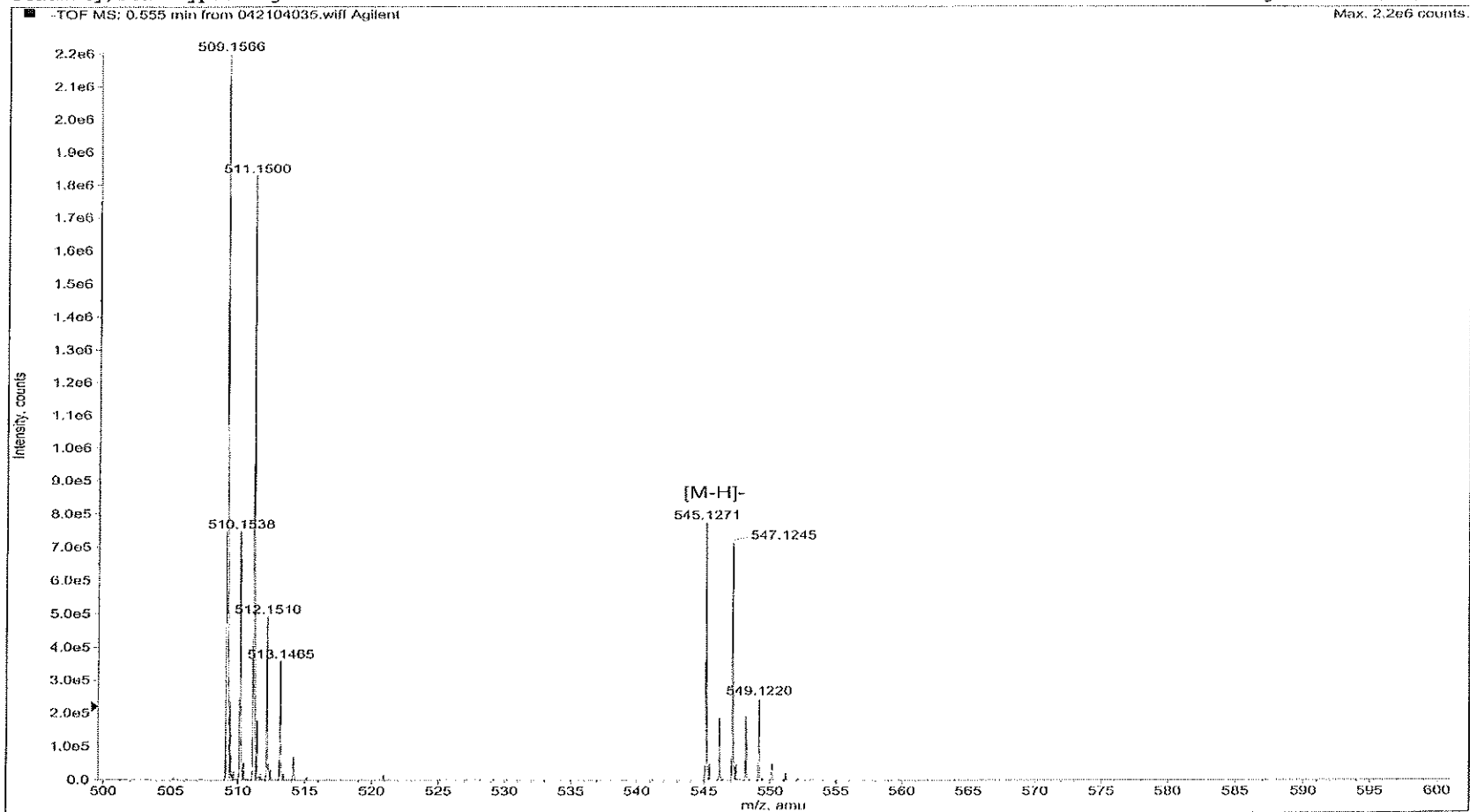


Figura 8. Espectro de Masas de alta resolución ESI-TOF (Electrospray) del compuesto CNQ-525-546 en CD₃OD.

ESPECTROS CNQ-525-512

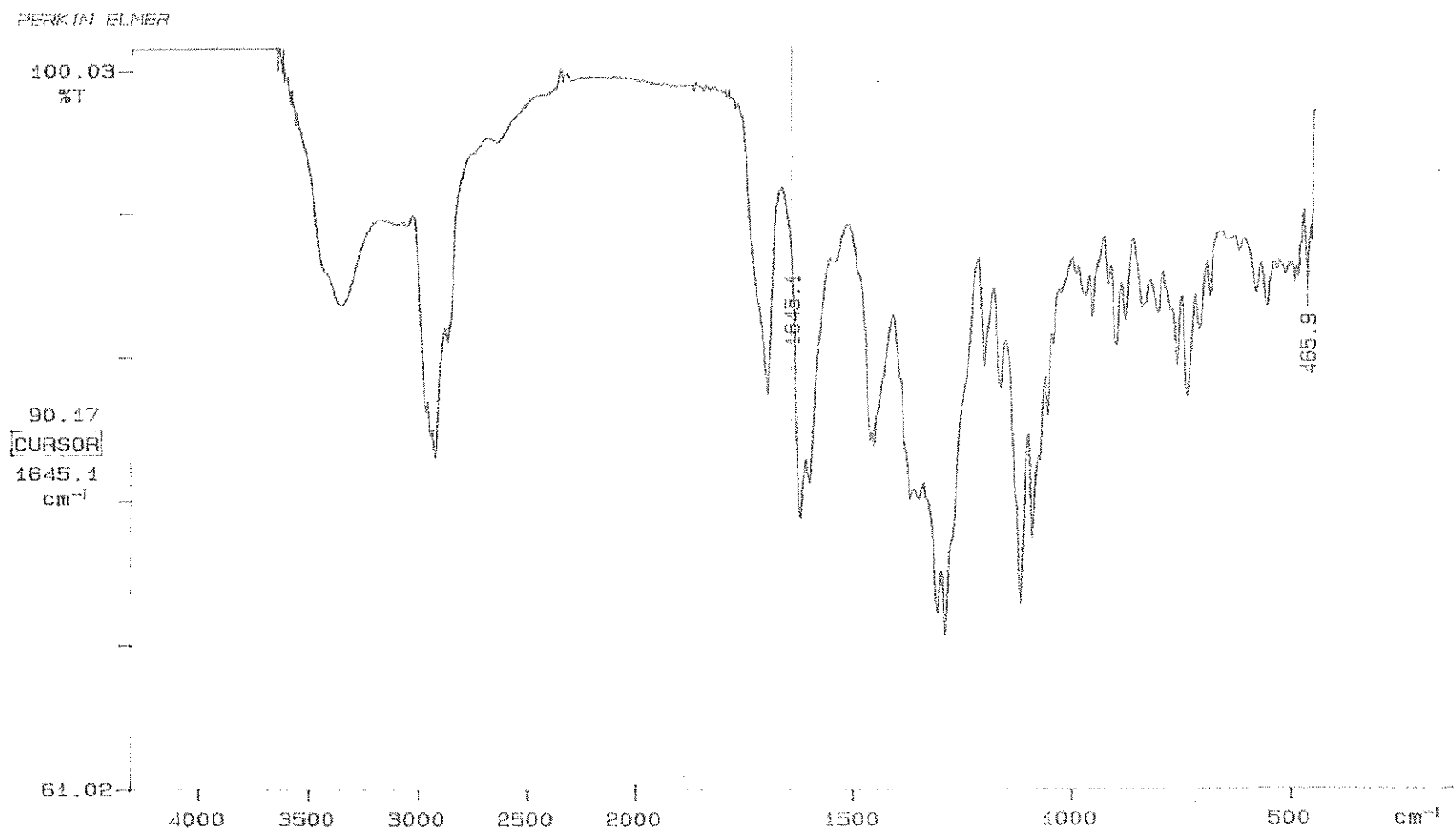


Figura 9. Espectro de Infrarrojo del compuesto CNQ-525-512

CNQ-525-512 (300 MHz, CDCl₃)

Pulse Sequence: s2pul

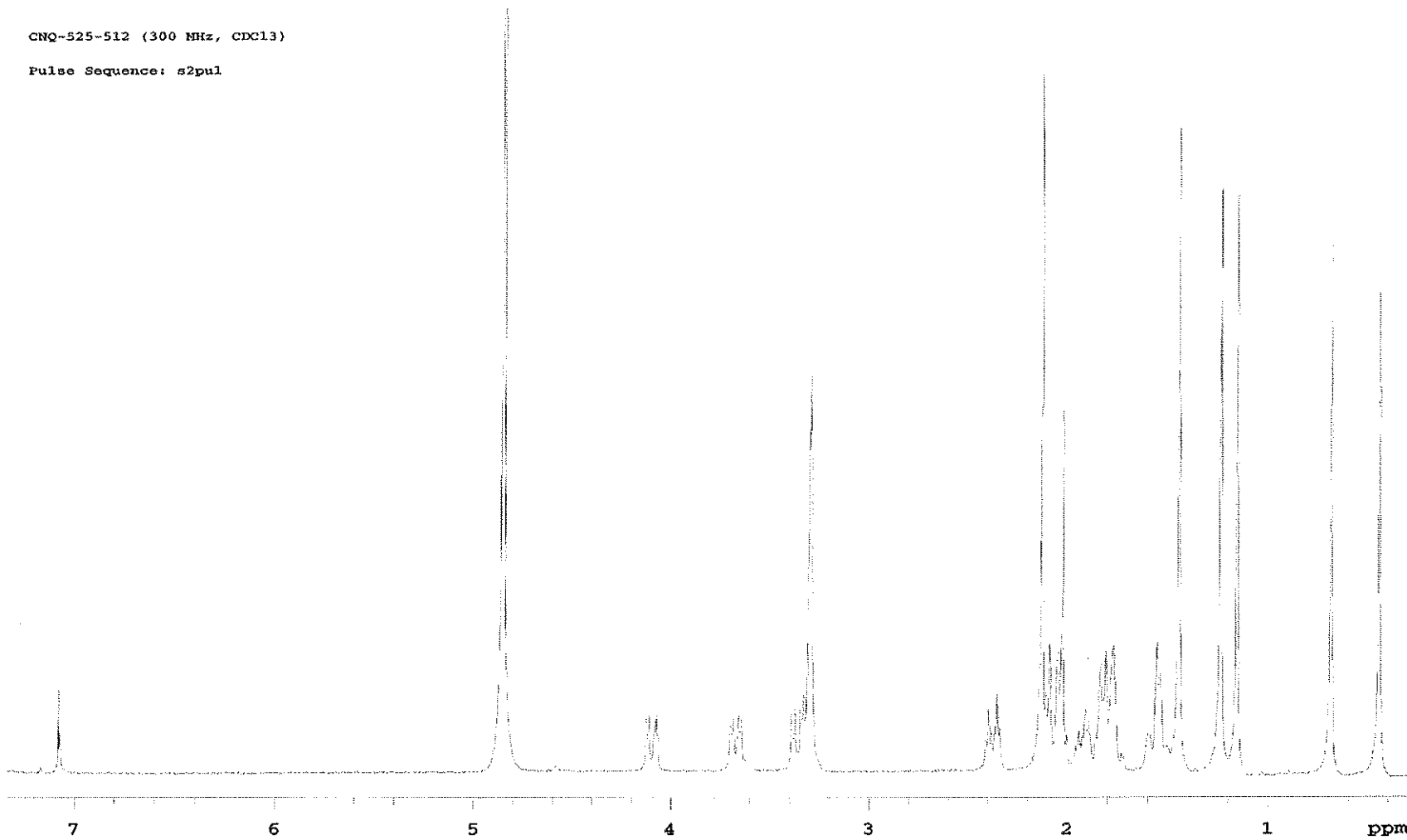


Figura 10. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear protónica: ¹H (RMN) del compuesto CNQ-525-512 a 300 MHz en CD₃OD.

CNQ525-512-cd3od
Archive directory: /export/home/fenical/strange/vnmrsys/data
Sample directory: CNQ525-512-cd3od_04Feb2004
File: CARBON
Pulse Sequence: s2pu1

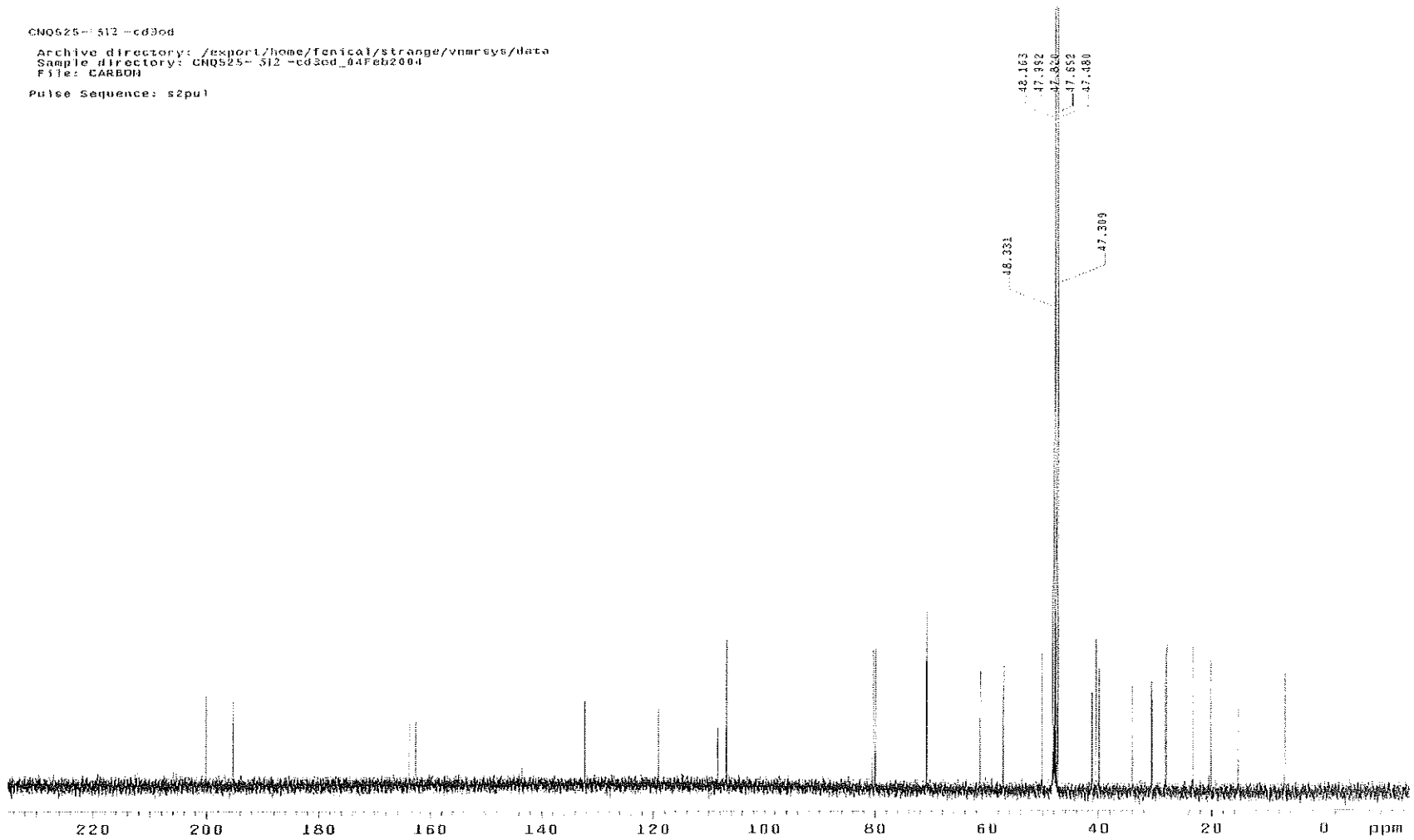


Figura 11. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de carbono 13: ¹³C (RMN) del compuesto CNQ-525-512 a 500 MHz en CD3OD.

CNQ-525-512 (300 MHz, CD3OD)

Pulse Sequence: gCOSY

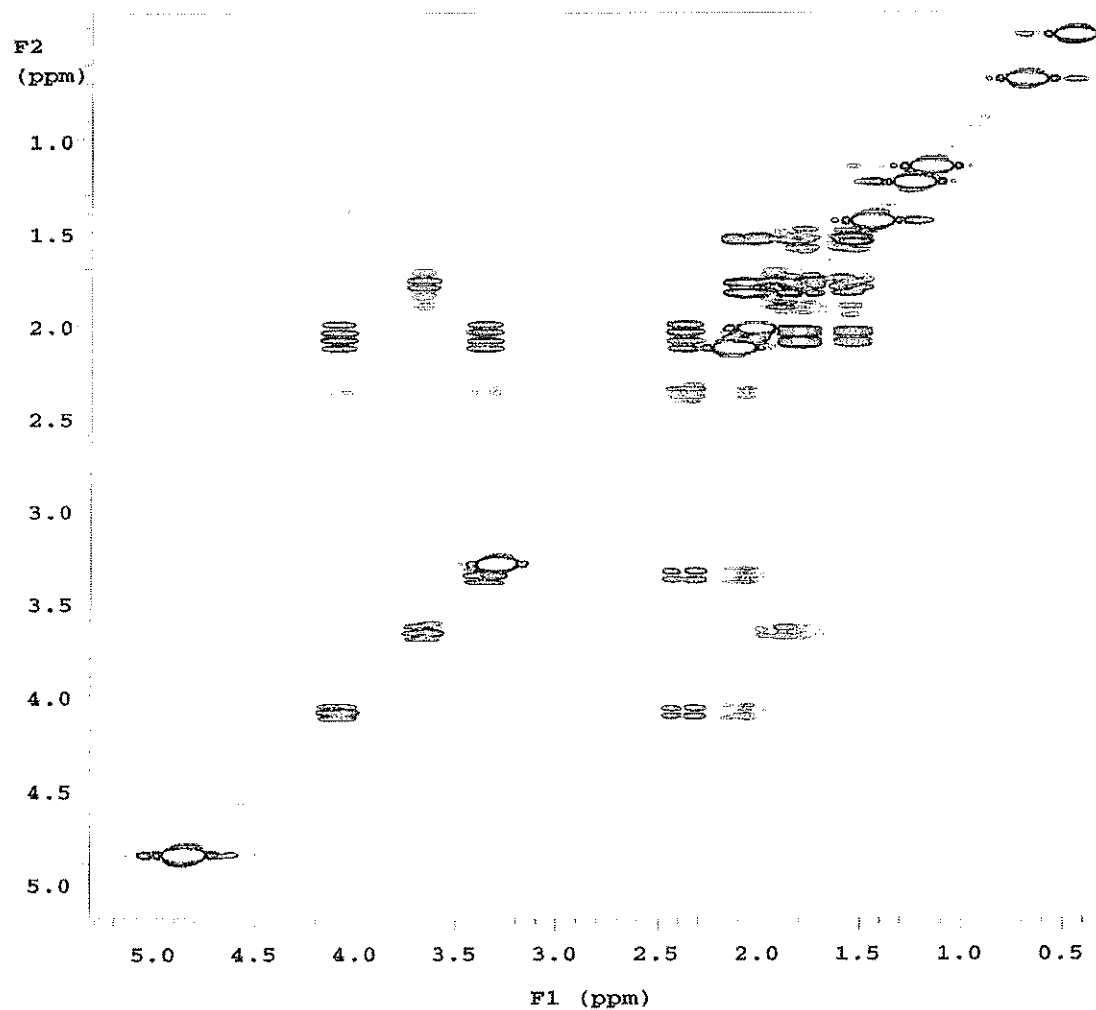


Figura 12. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear bidimensional: 2D ^1H - ^1H RMN(COSY) del compuesto CNQ-525-512 a 300 MHz en CD3OD.

CNQ-525-512 (300 MHz, CD3OD)

Pulse Sequence: meHSQC

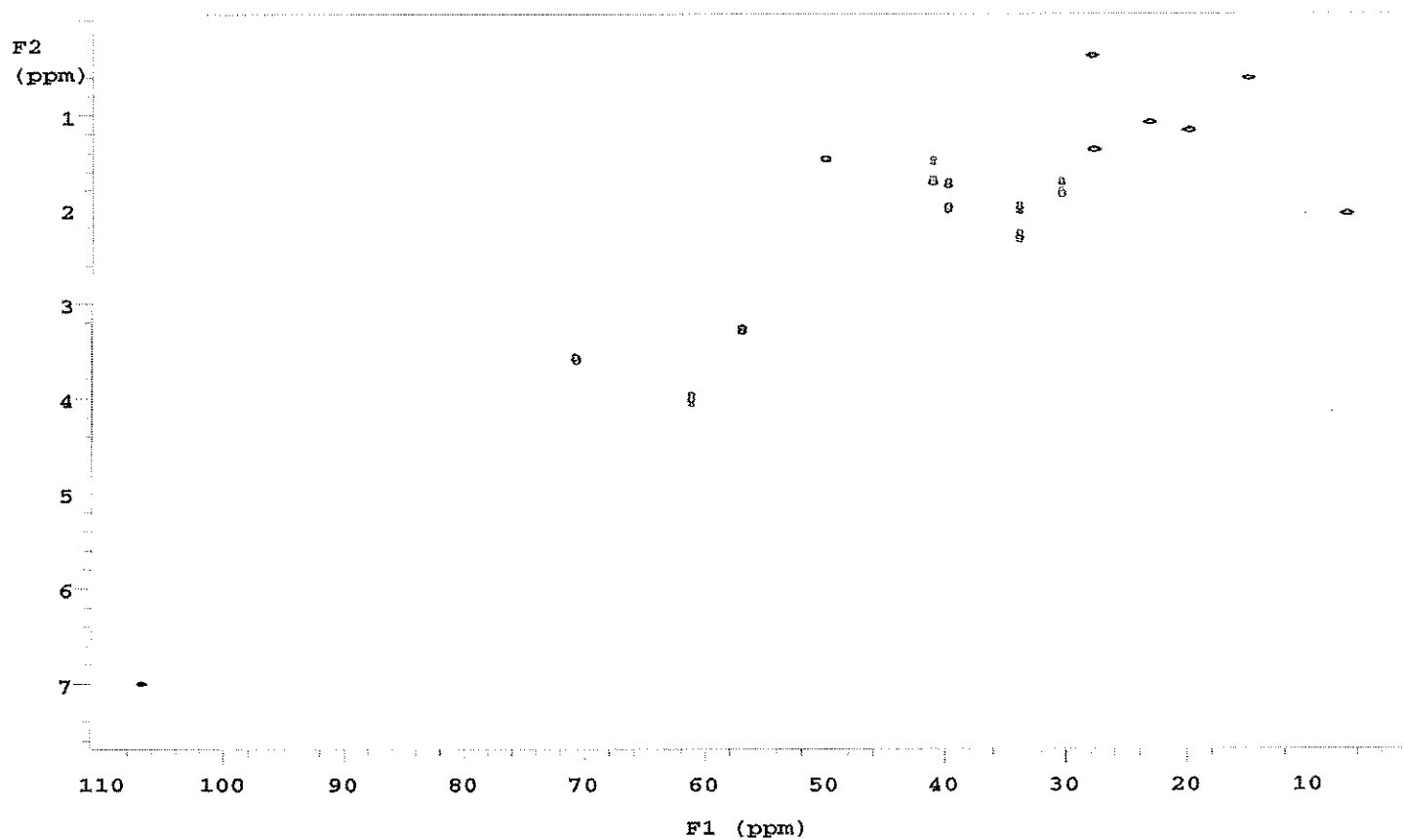


Figura 13. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear bidimensional: 2D ^1H - ^{13}C RMN(MeHSQC) del compuesto CNQ-525-512 a 300 MHz en CD3OD.

CNQ-525-512 (300 MHz, CDCl_3)

Pulse Sequence: gHMBC (ppm)

1

2

3

4

5

6

7

200

180

160

140

120

100

80

60

40

20

F1 (ppm)

Figura 14. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear bidimensional: 2D ^1H - ^{13}C RMN(HMBC) del compuesto CNQ-525-512 a 300 MHz en CD_3OD .

Base Formula: C₂₆H₃₄O₂ +
 Plus Adducts: H⁺
 Minus Fragment Losses:
 C₂₆H₃₅O₂ +1
 Monoisotopic Mass: 513.18052

A	513.1805	100.00
A+1	514.1839	28.71
A+2	515.1778	65.71
A+3	516.1811	18.03
A+4	517.1750	11.49
A+5	518.1786	3.12
A+6	519.1812	0.64

Calculated Isotope Distribution
 Mass Resolving Power: 30000

CNQ-525-512

IonSpec Corporation
 Exact Mass Calculator

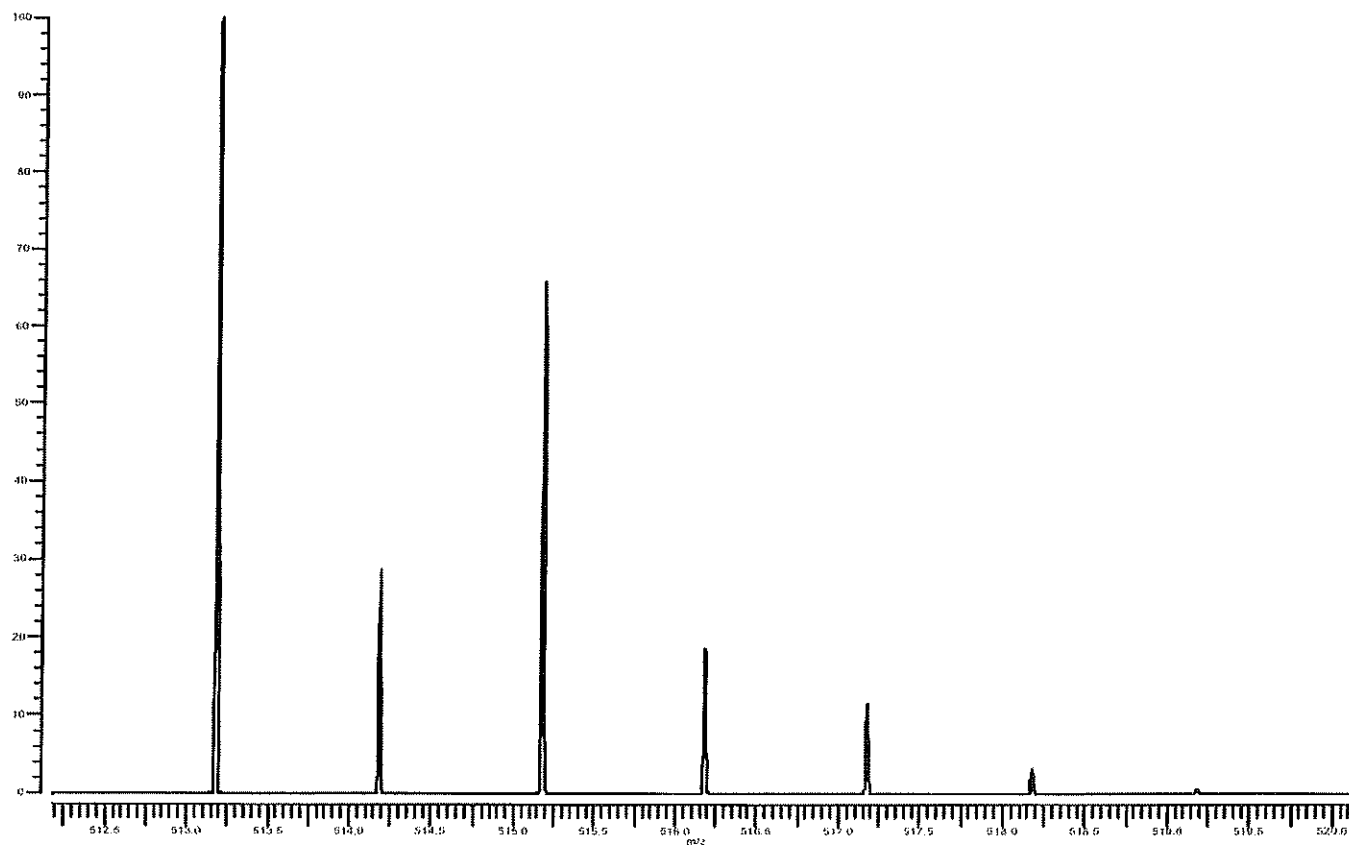


Figura 15. Espectro de Masas de alta resolución (MALDI) del compuesto CNQ-525-512 en Metanol.

ESPECTROS CNQ-525-510

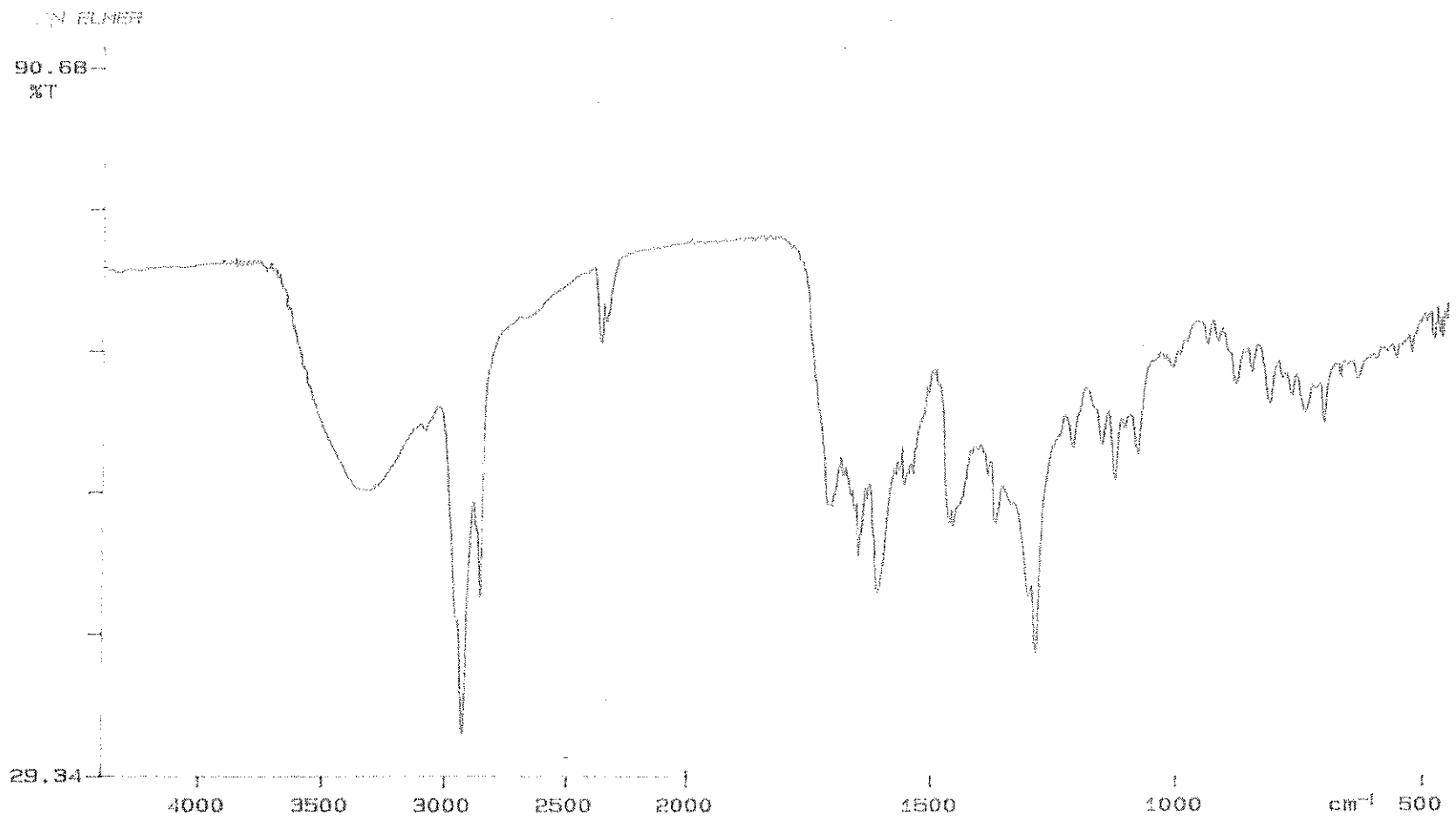


Figura 16. Espectro de Infrarrojo del compuesto CNQ-525-510

CNQ-525-510 (300 MHz, CDCl₃)

Pulse Sequence: s2pul

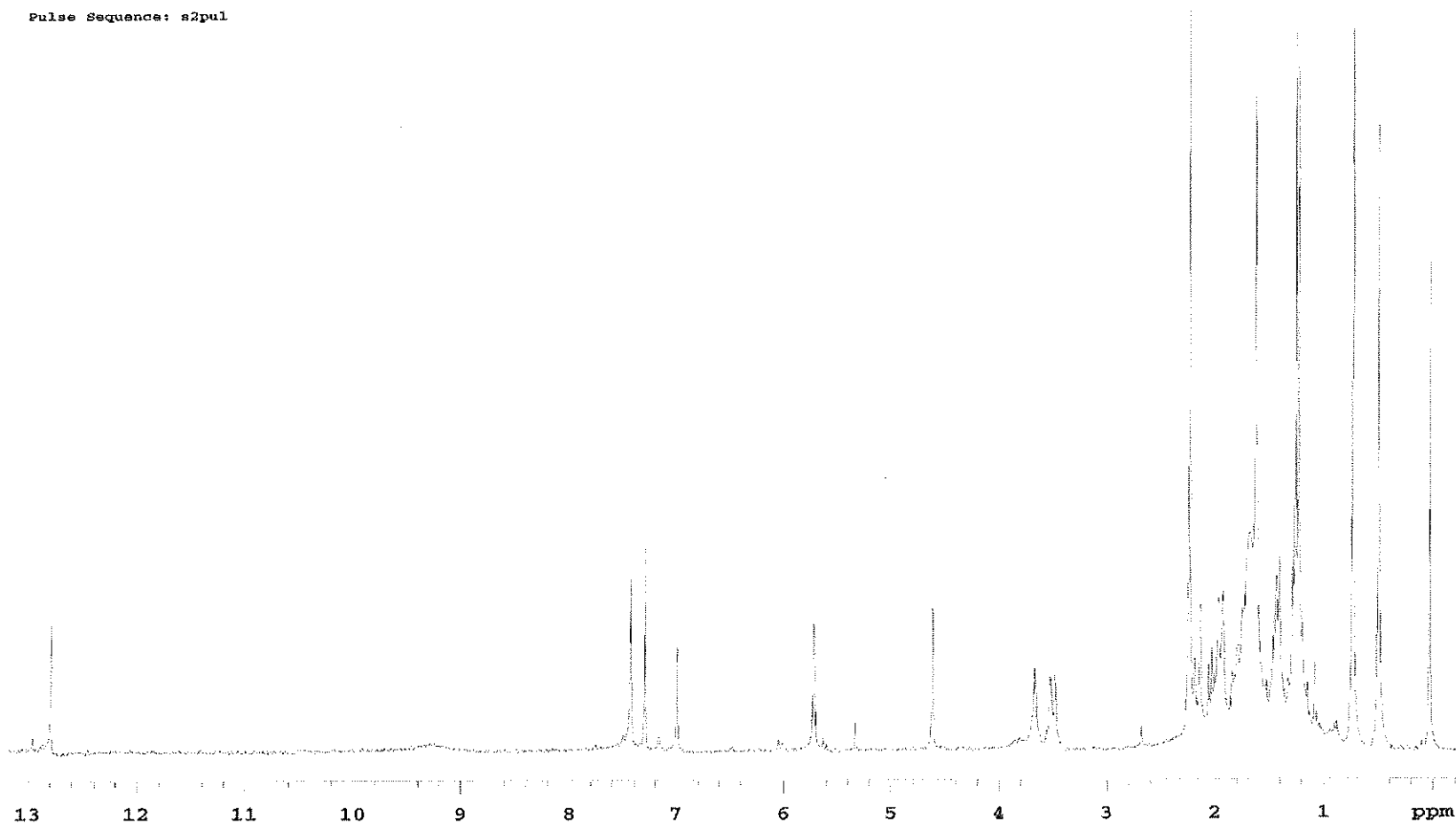


Figura 17. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear protónica: ¹H (RMN) del compuesto CNQ-525-510 a 300 MHz en CDCl₃.

CNQ-525-510-¹³C (500MHz)CDCl₃
Pulse sequence: s2pul

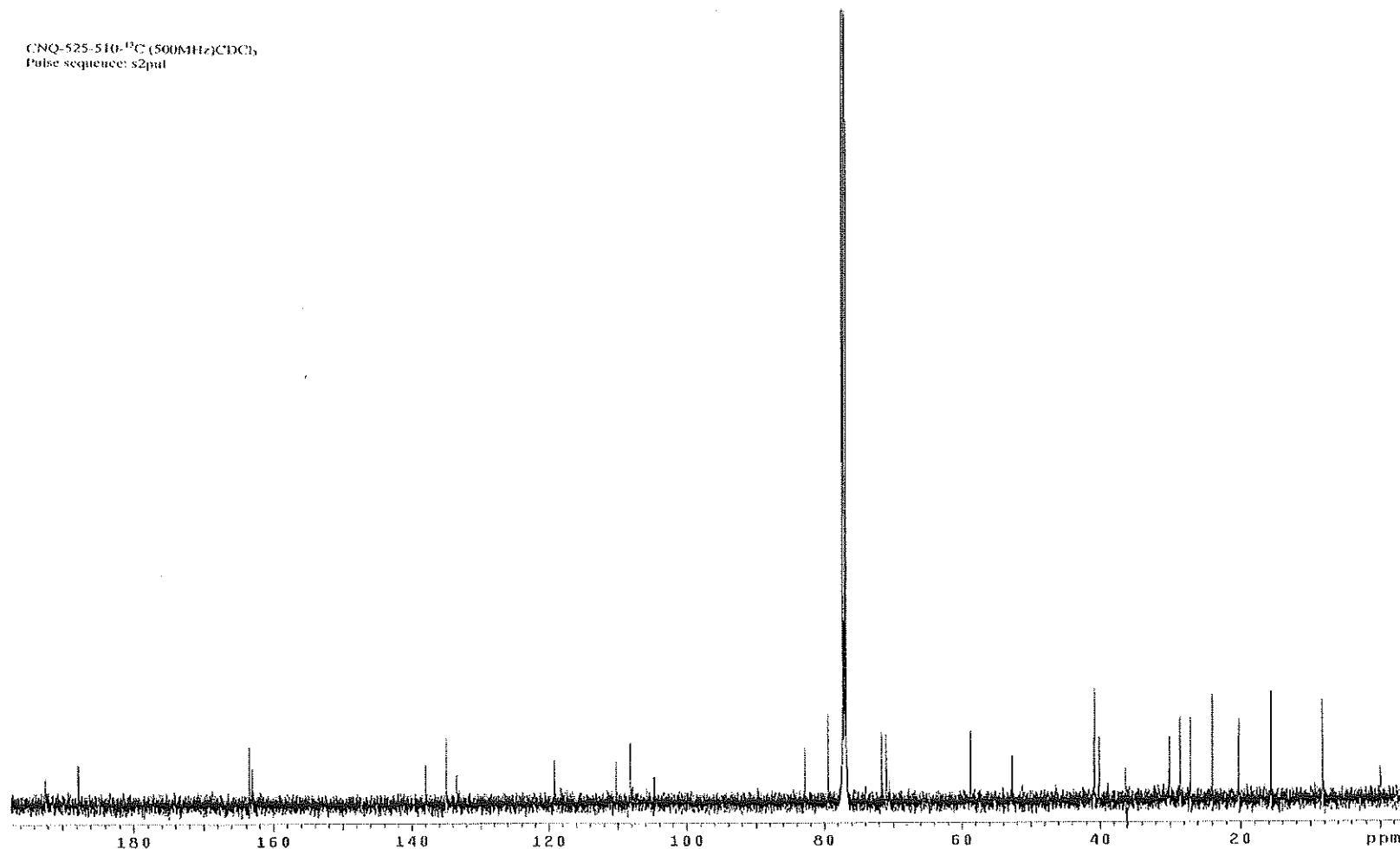


Figura 18. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de carbono 13: ¹³C (RMN) del compuesto CNQ-525-510 a 500 MHz en CDCl₃..

CNQ-525-510 (300 MHz, CDCl₃)

Pulse Sequence: gCOSY

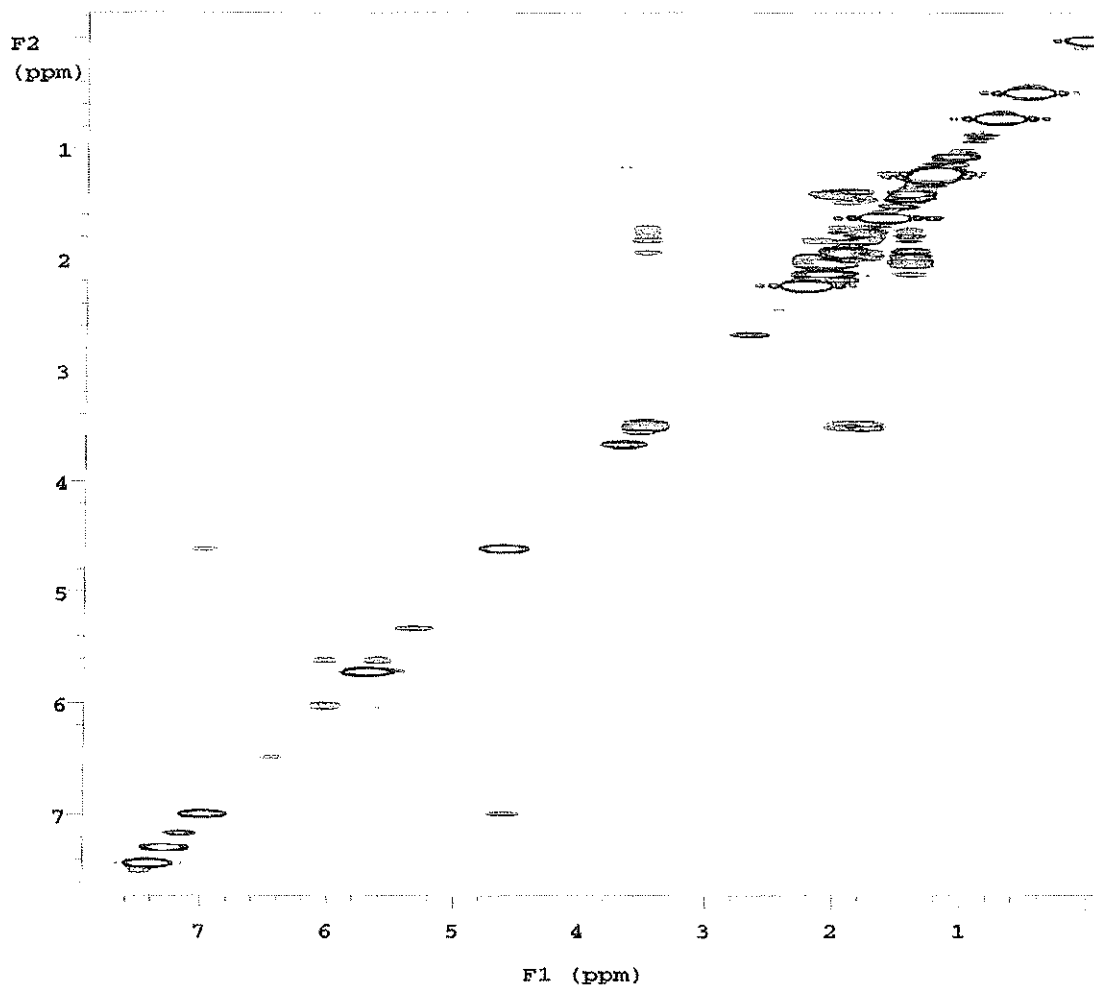


Figura 19. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear bidimensional: 2D ^1H - ^1H RMN(COSY) del compuesto **CNQ-525-510** a 300 MHz en CDCl_3 .

CNQ-525-510 (300 MHz, CDCl₃)

Pulse Sequence: gHMBC

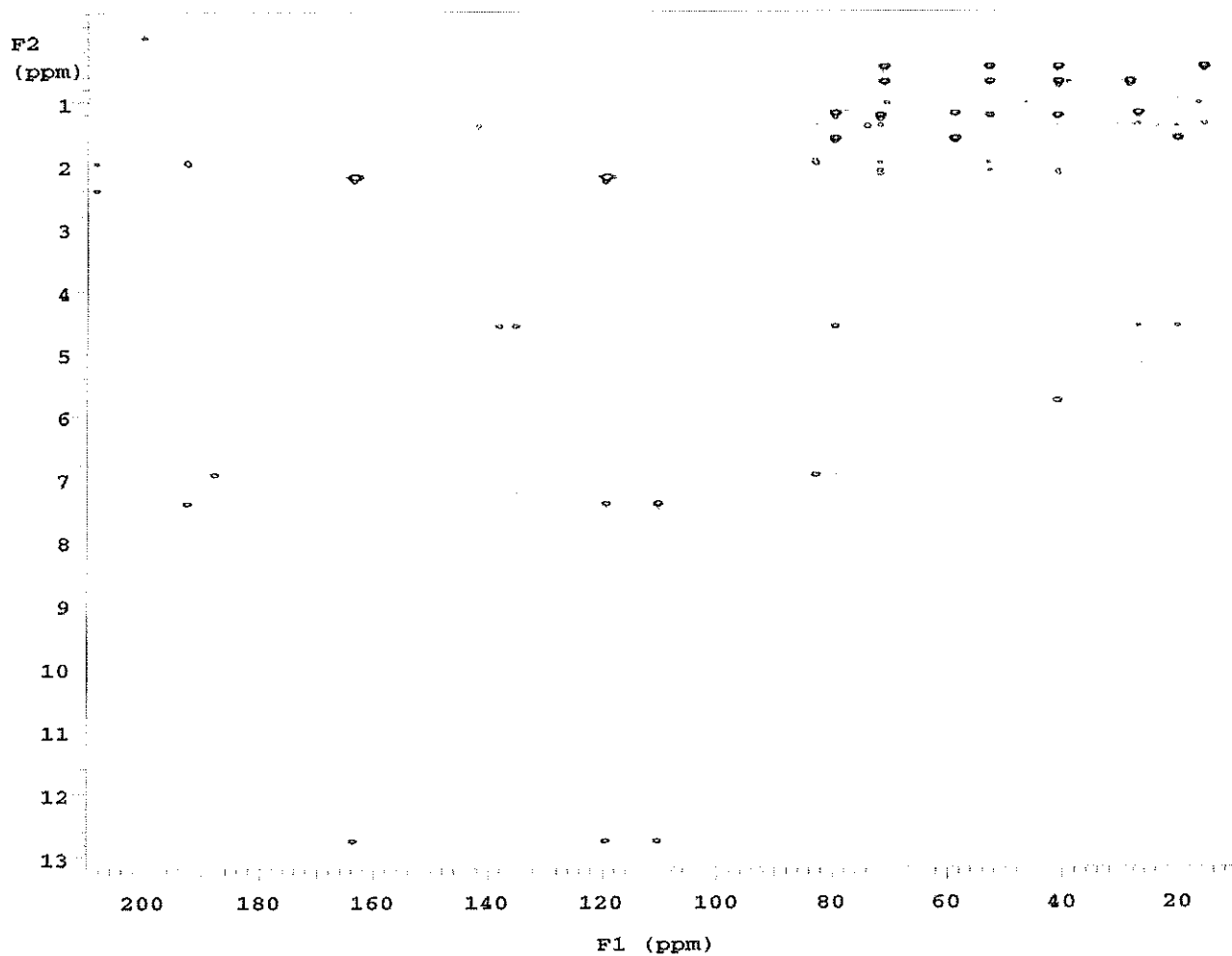


Figura 20. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear bidimensional: 2D ¹H-¹³C RMN(HMBC) del compuesto CNQ-525-510 a 300 MHz en CDCl₃.

CNQ-525-510 (300 MHz, CDCl₃)

Pulse Sequence: meHSQC (ppm)

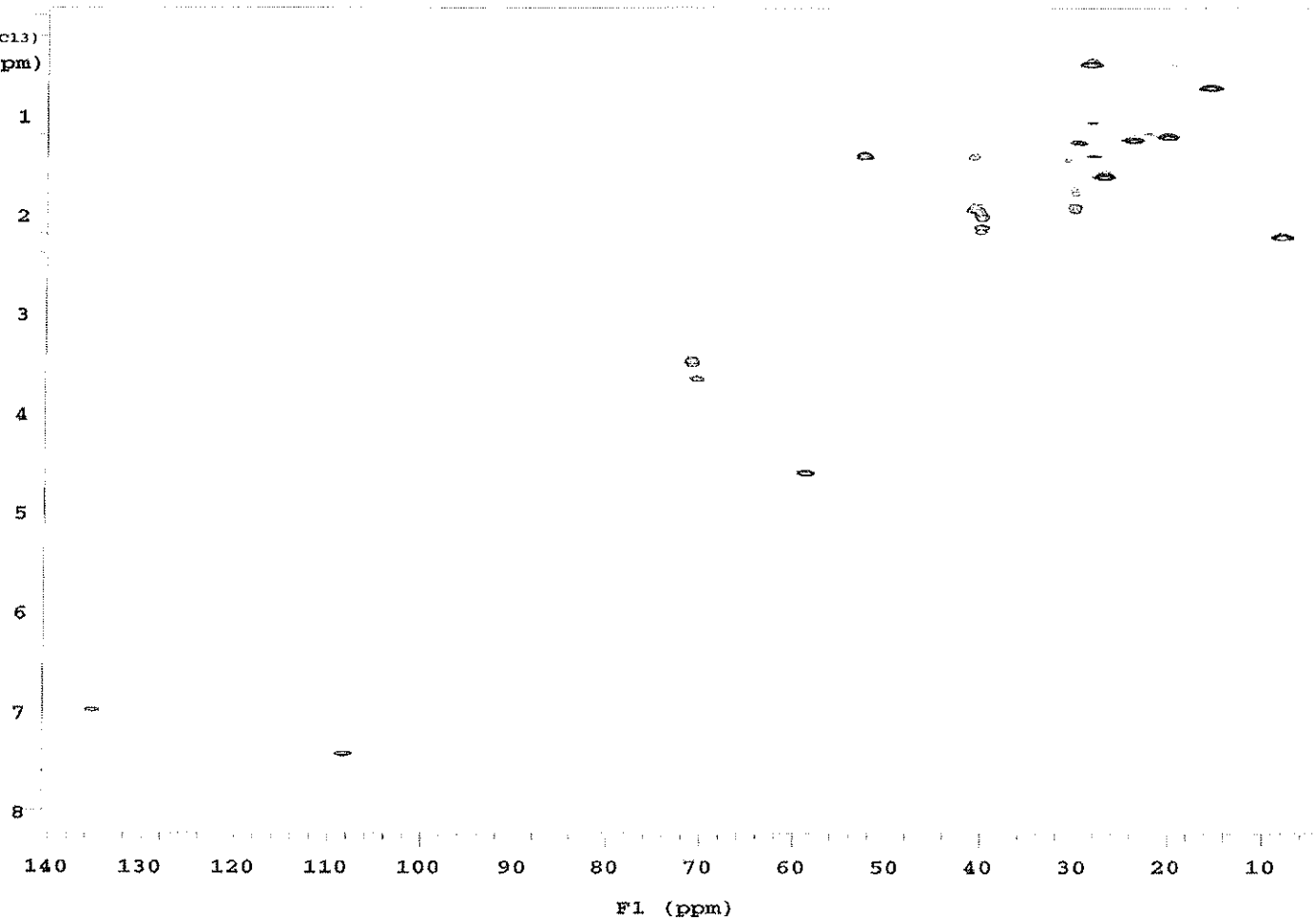


Figura 21. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear bidimensional: 2D ¹H-¹³C RMN(MeHSQC) del compuesto **CNQ-525-510** a 300 MHz en CDCl₃.

*ESI-TOF

Polarity/Scan Type: Positive

Sample Name: CNQ-525-510

Printing Time: 11:18:48 AM

Printing Date: 21/04/2004

+TOF MS: 0.581 to 0.672 min from 042104007.wiff Agilent

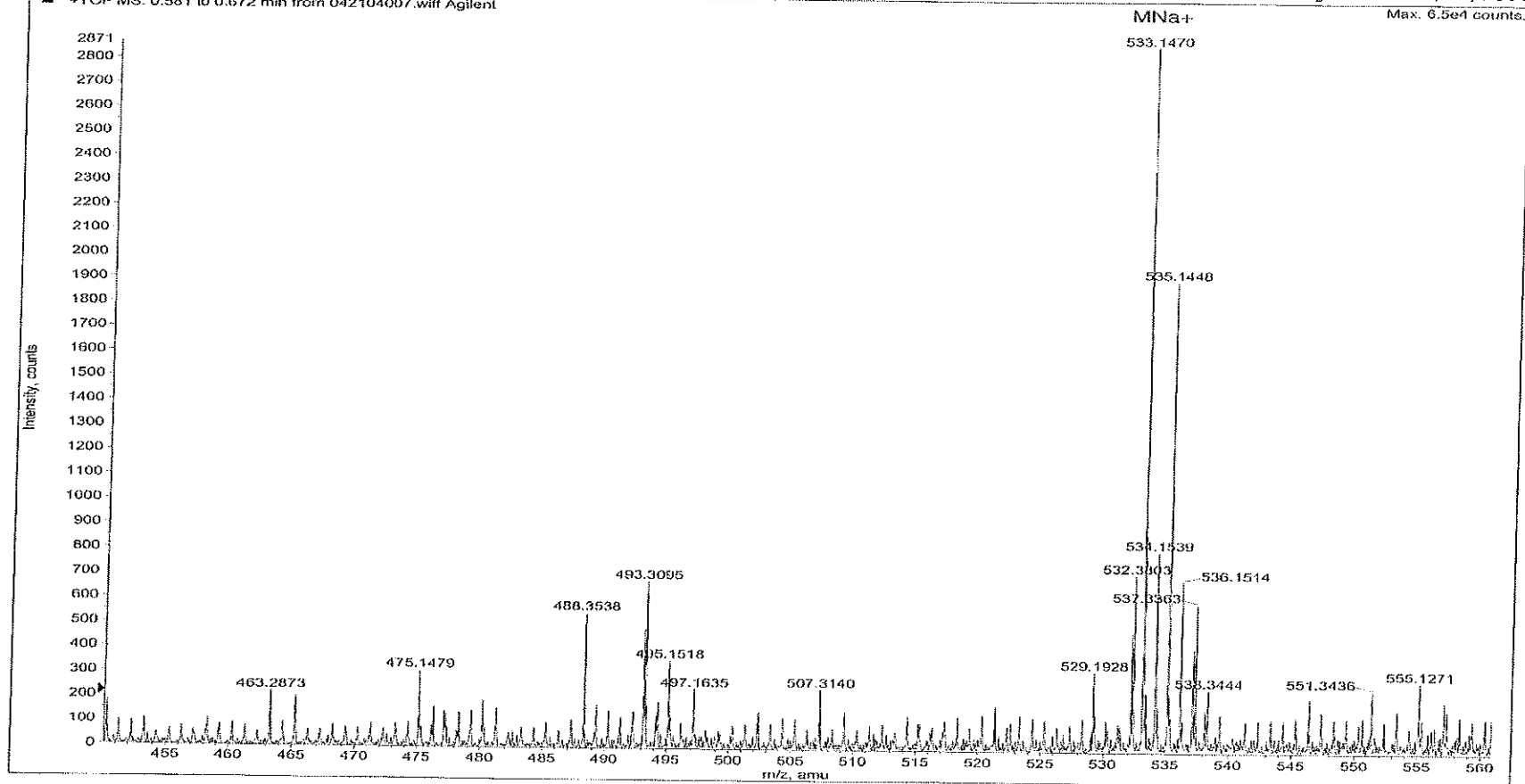


Figura 22. Espectro de Masas de alta resolución ESI-TOF (Electrospray) del compuesto CNQ-525-510 en Metanol.

ESPECTROS CNQ-525-528

PERKIN ELMER

100.00
%T

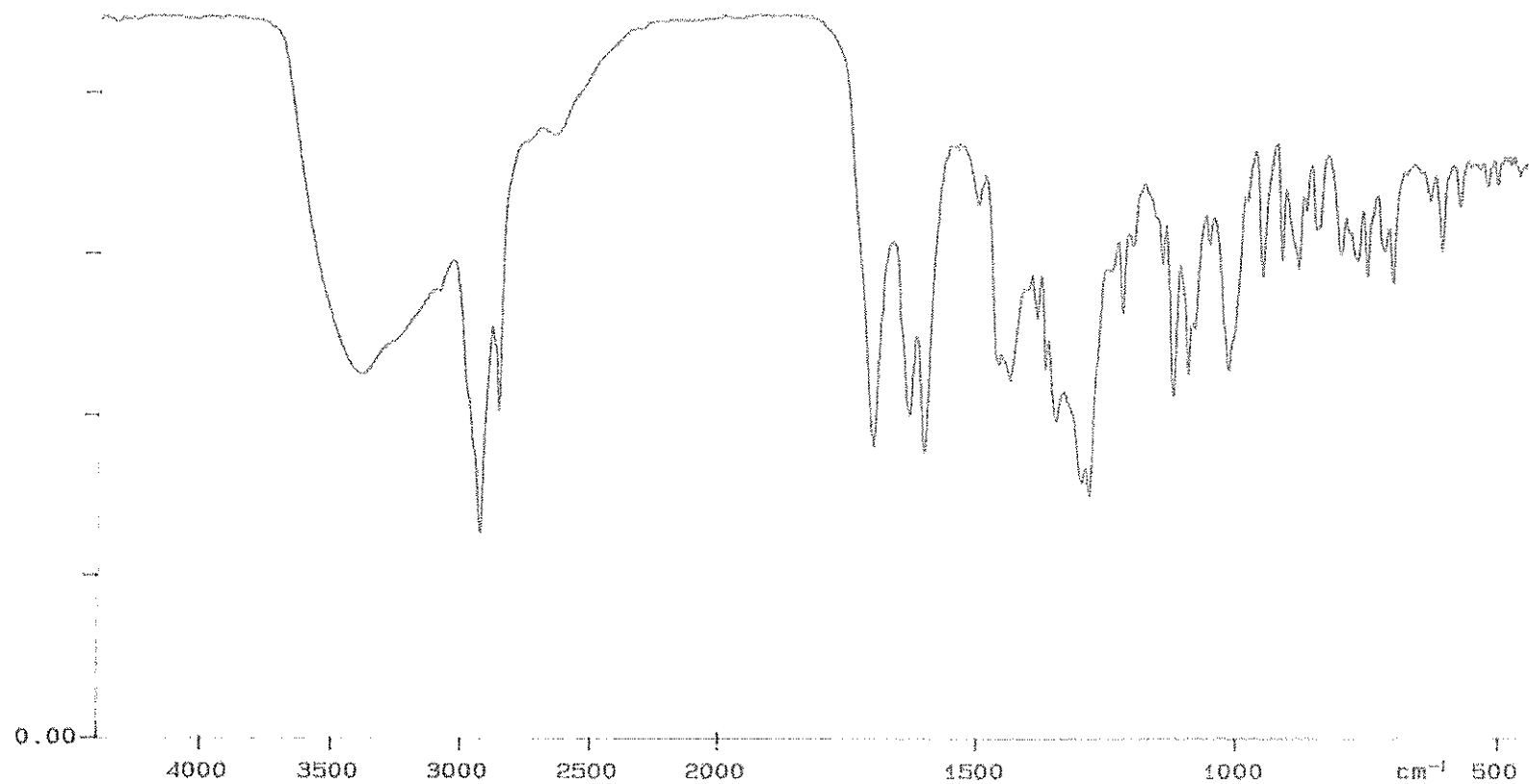


Figura 23. Espectro de Infrarrojo del compuesto CNQ-525-528

CNQ-525-528 (300 MHz, acetone)

Pulse Sequence: s2pul

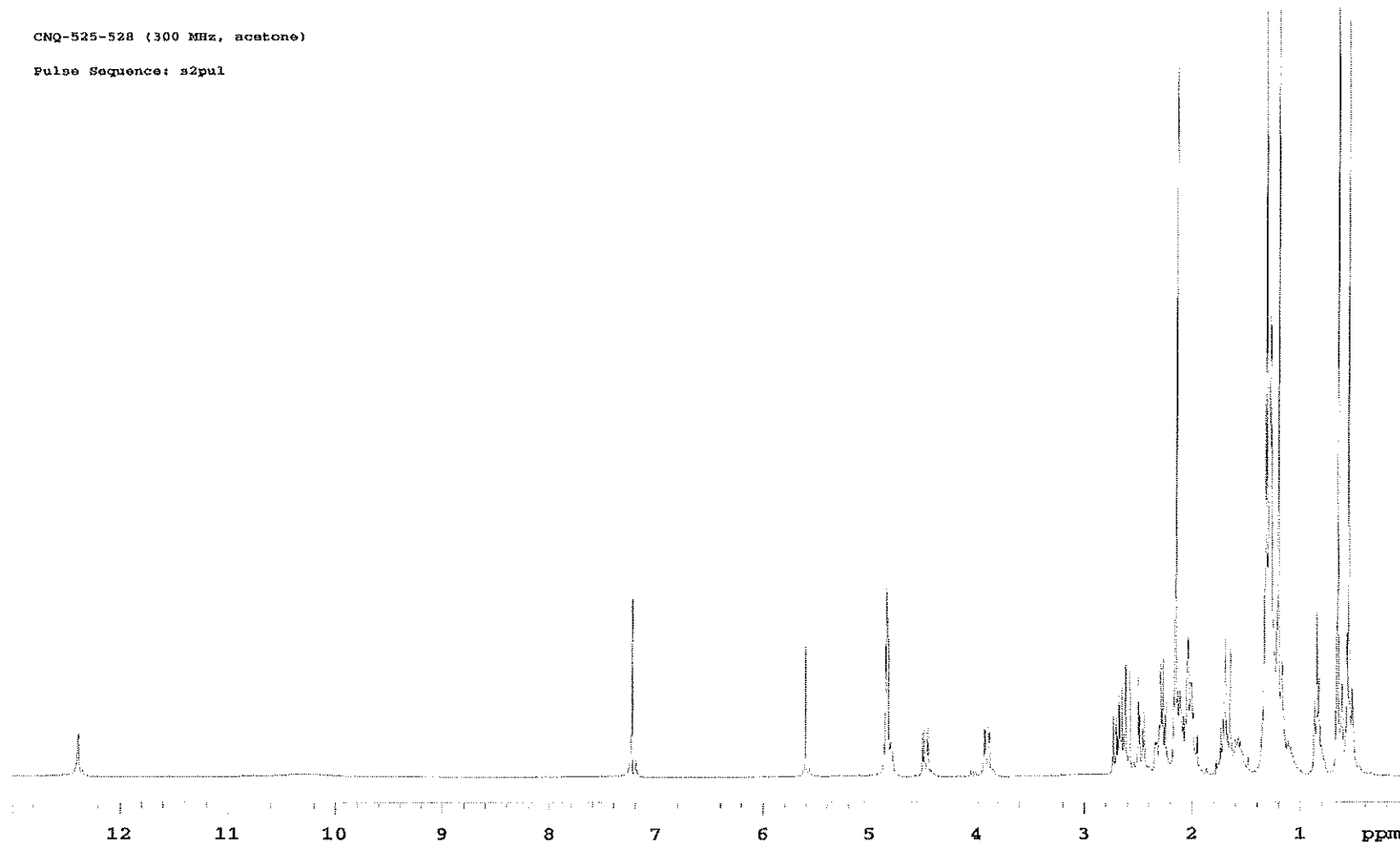


Figura 24. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear protónica: ^1H (RMN) del compuesto **CNQ-525-528** a 300 MHz en AcetD_6 .

CNQ-525-528 _Acetone_13C_17Mar2004
Pulse Sequence: s2pu1

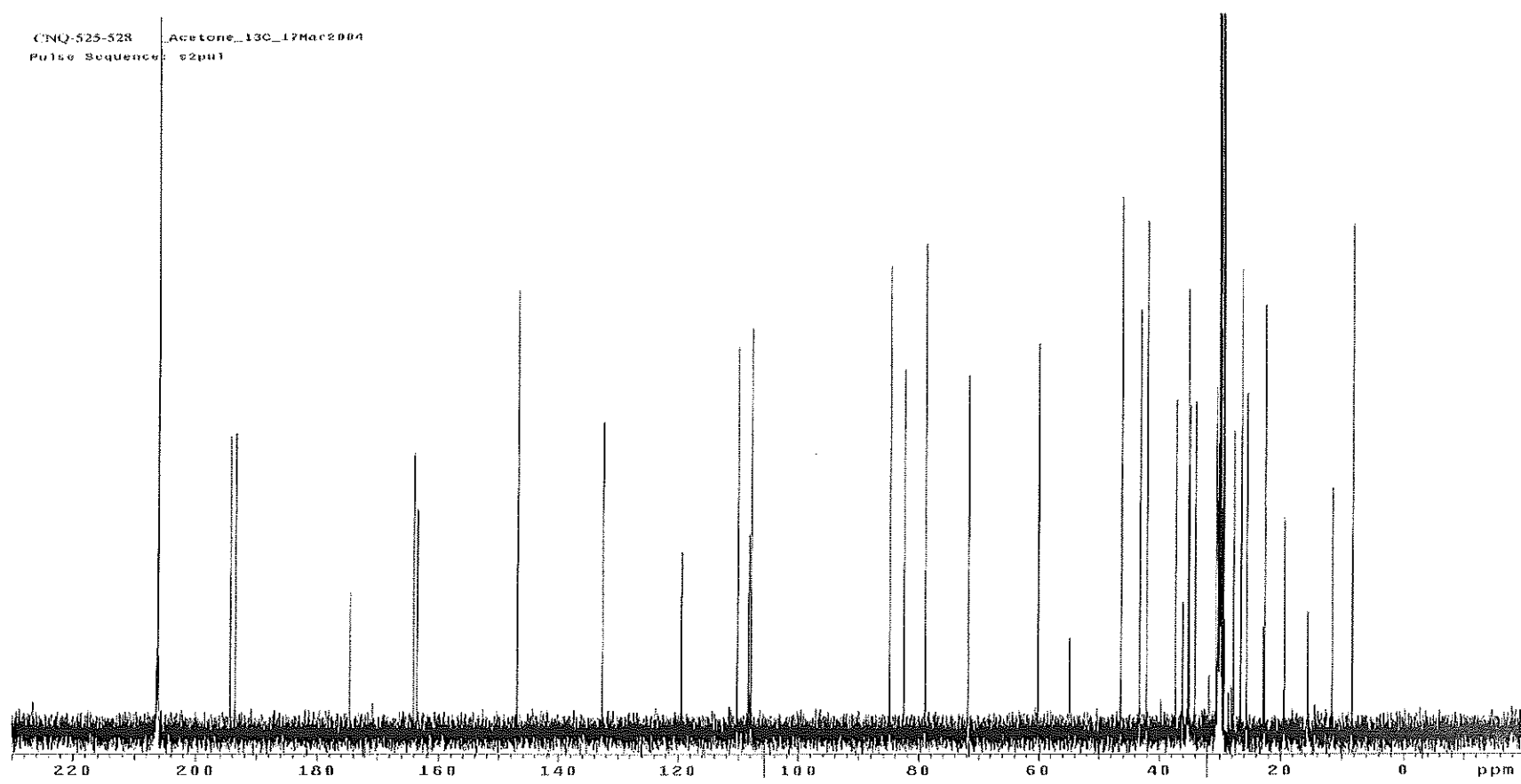


Figura 25. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de carbono 13: ^{13}C (RMN) del compuesto **CNQ-525-528** a 500 MHz en AcetD_6 .

CNQ-525-528 (300 MHz, acetone)

Pulse Sequence: gCOSY

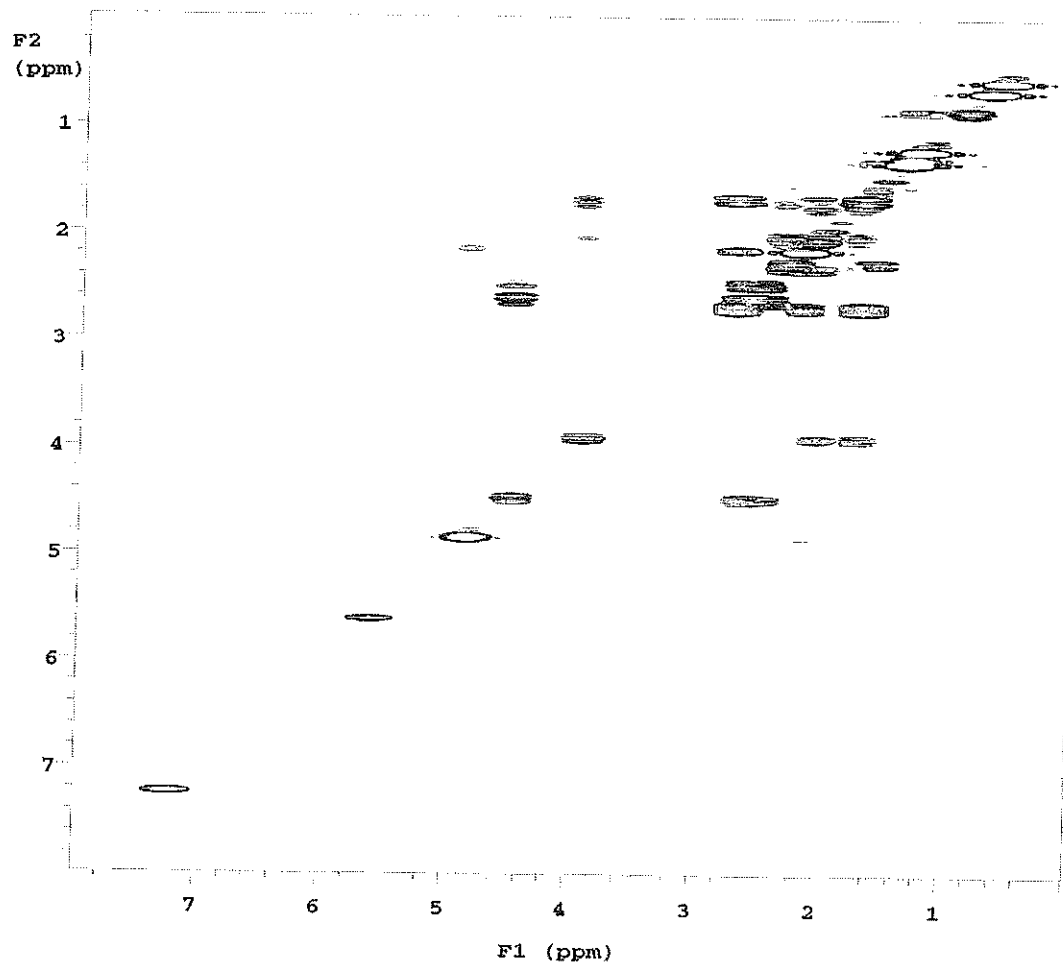


Figura 26. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear bidimensional: 2D ^1H - ^1H RMN(COSY) del compuesto CNQ-525-528 a 300 MHz en AcetD₆.

CNQ-525-528 (300 MHz, acetone)

Pulse Sequence: meHSQC

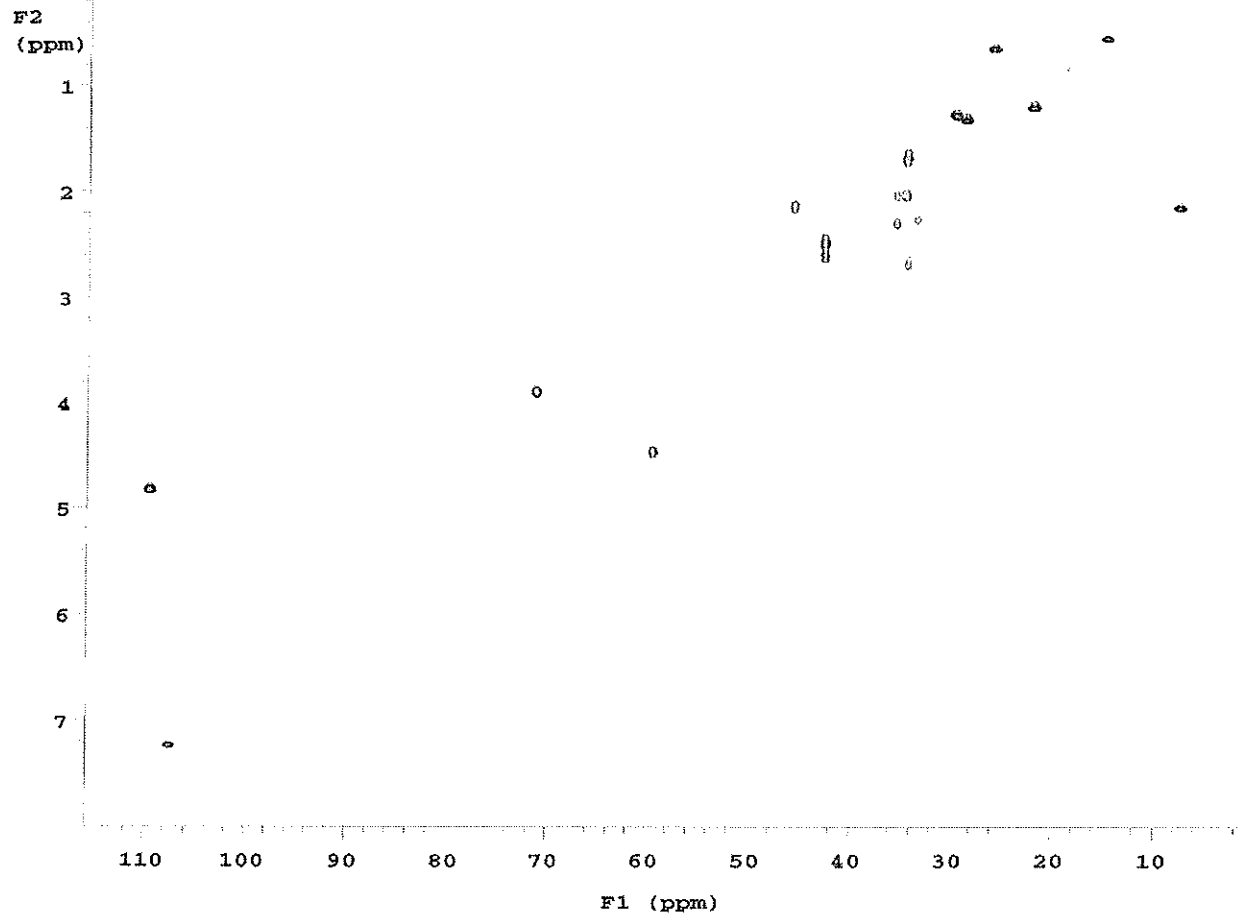


Figura 27. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear bidimensional: 2D ^1H - ^{13}C RMN(MeHSQC) del compuesto **CNQ-525-528** a 300 MHz en AcetD6.

CNQ-525-528 (300 MHz, acetone)
Pulse Sequence: gHMBC

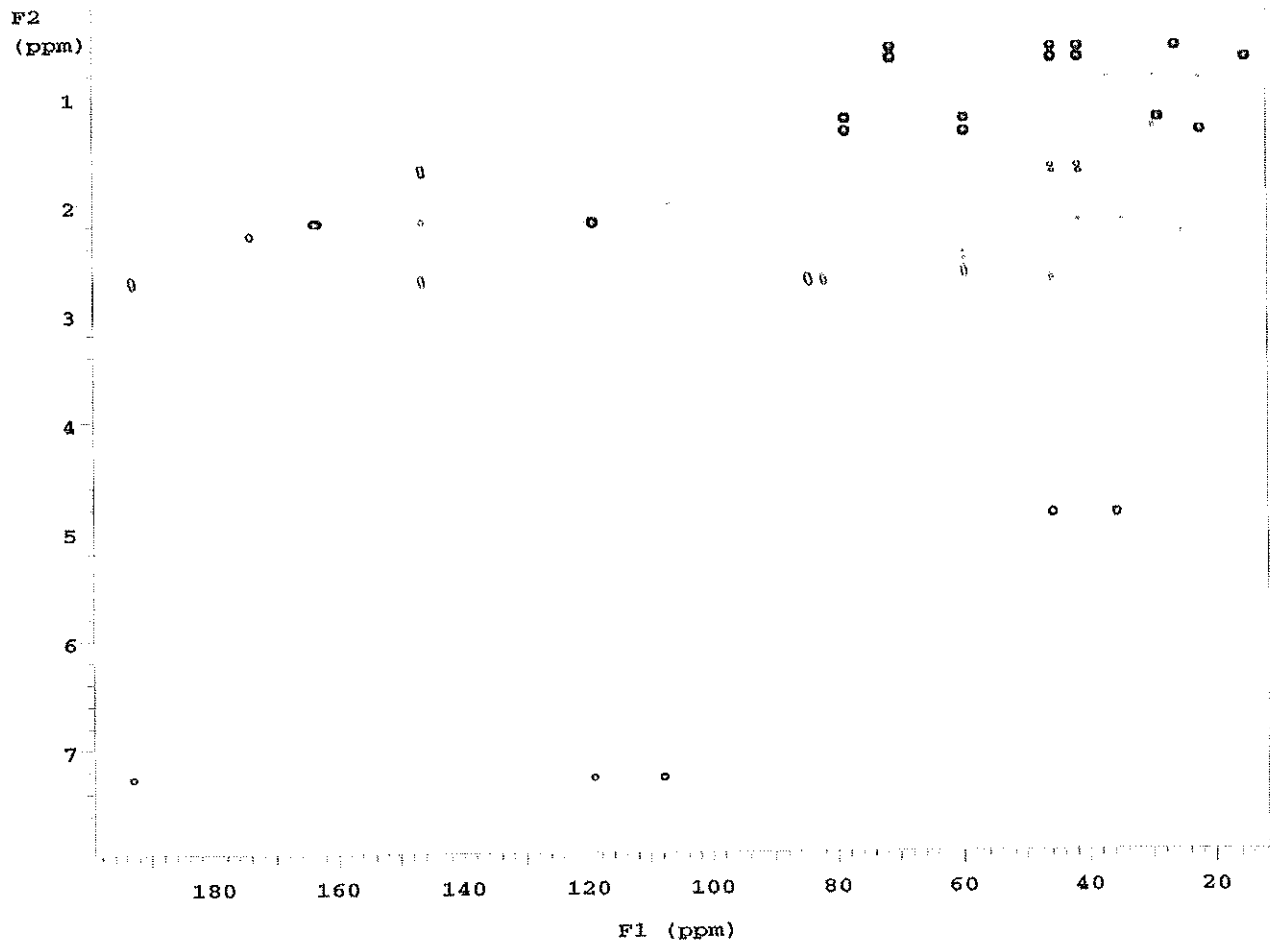


Figura 28. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear bidimensional: 2D ¹H-¹³C RMN(HMBC) del compuesto **CNQ-525-528** a 300 MHz en AcetD6.

*ESI-TOF

Sample Name: CNQ-525-528

Printing Time: 02:46:00 PM

Polarity/Scan Type: Negative

Printing Date: 13/04/2004

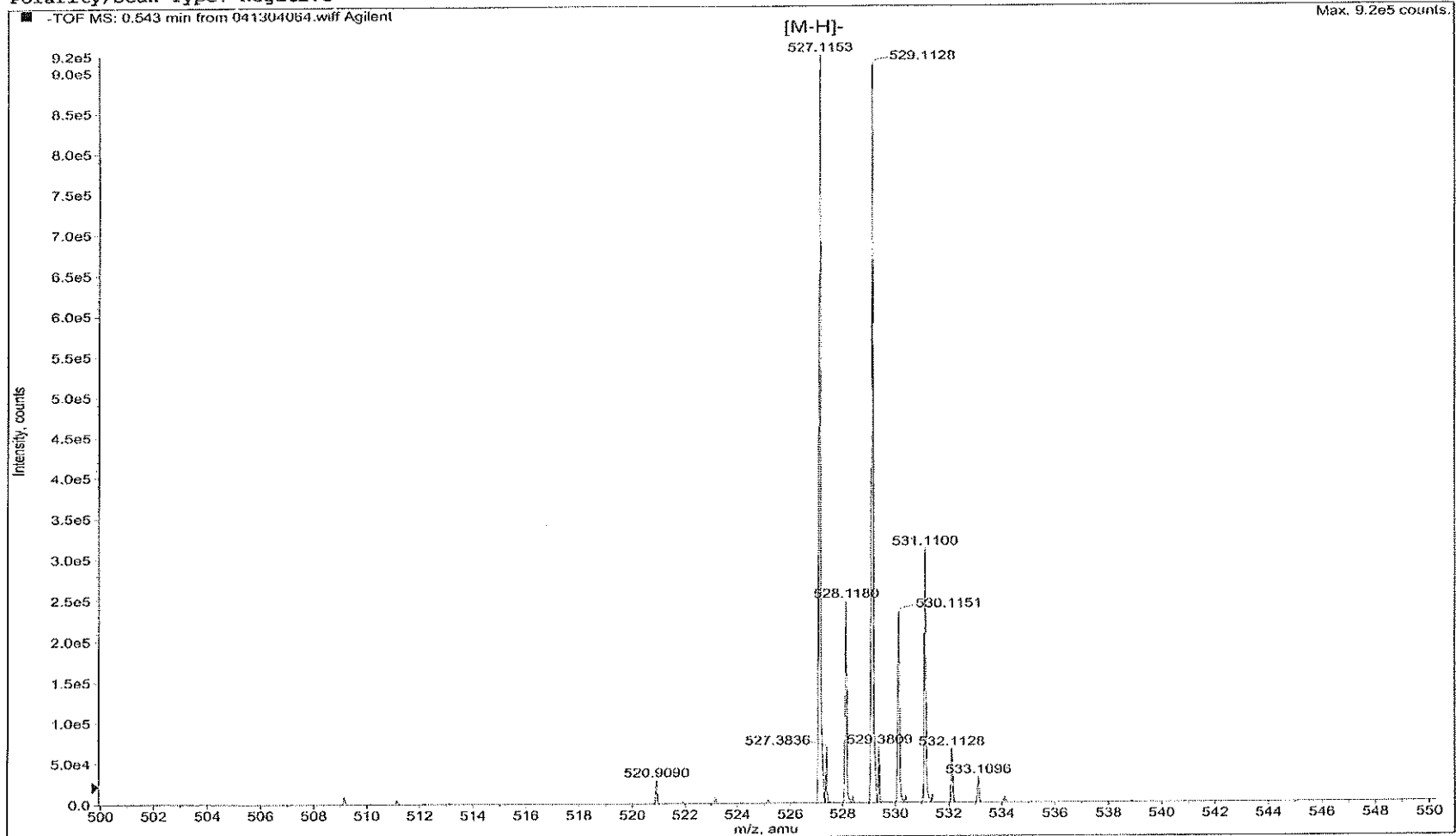


Figura 29. Espectro de Masas ESI-TOF (Electrospray) del compuesto CNQ-525-528 en Metanol.

ESPECTROS CNQ-525-492

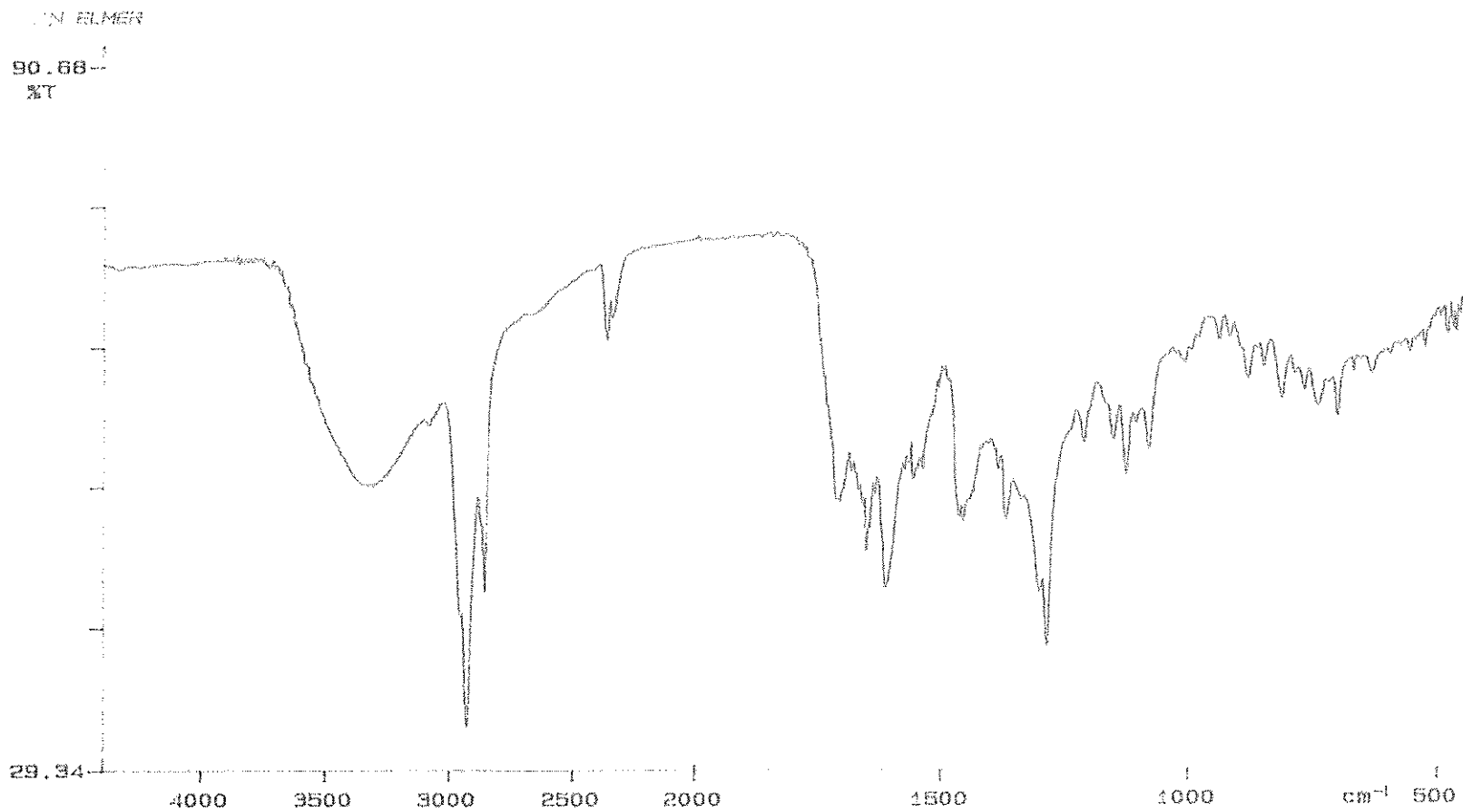


Figura 30. Espectro de Infrarrojo del compuesto CNQ-525-492.

CNQ-525-492 (300MHz) AcetoneD6

Pulse Sequence: s2pul

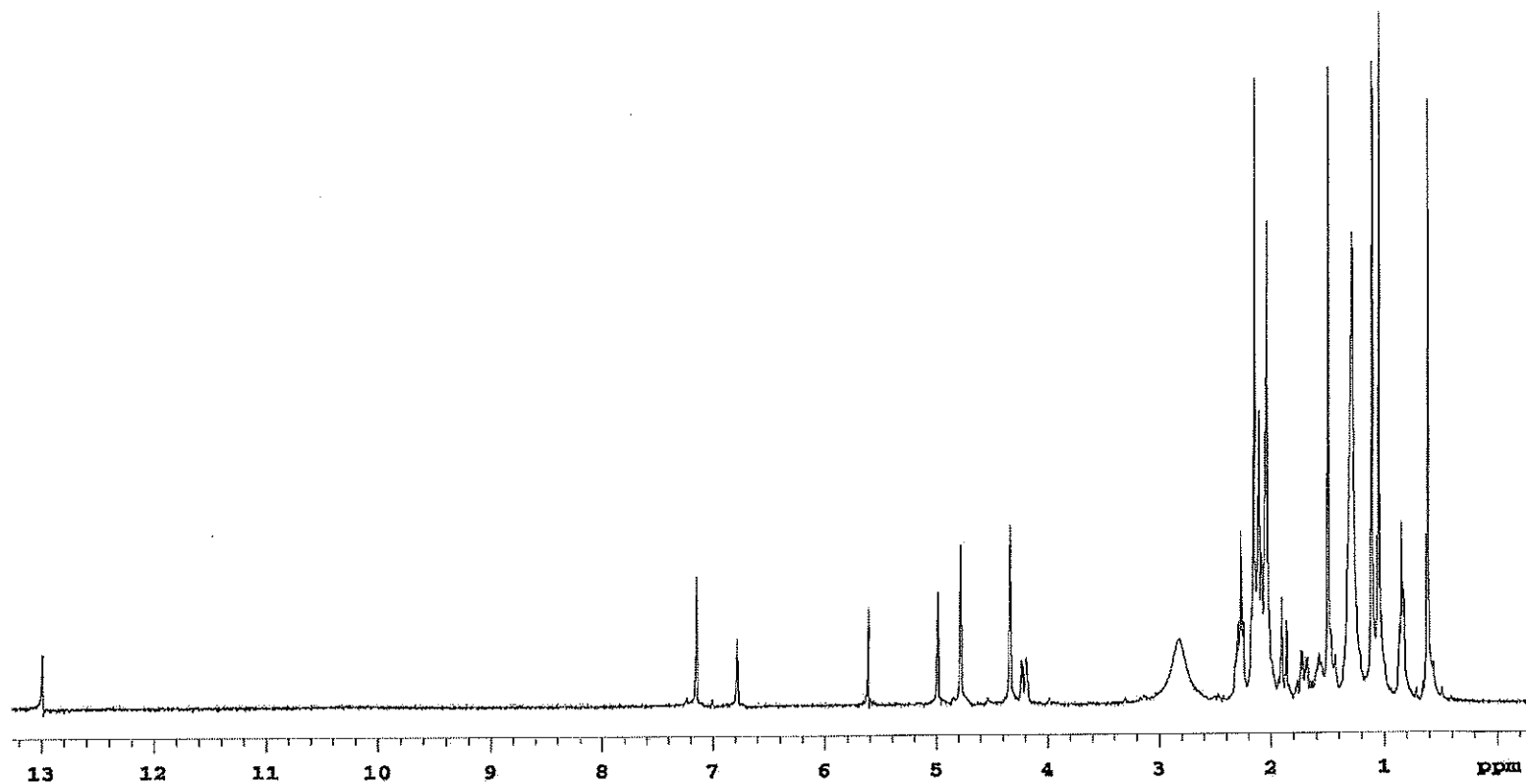


Figura 31. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear protónica: ¹H (RMN) del compuesto CNQ-525-492 a 500 MHz en AcetD₆.

CNQ-525-492 acetone-13C_17Mar2004
Pulse Sequence: s2pu1

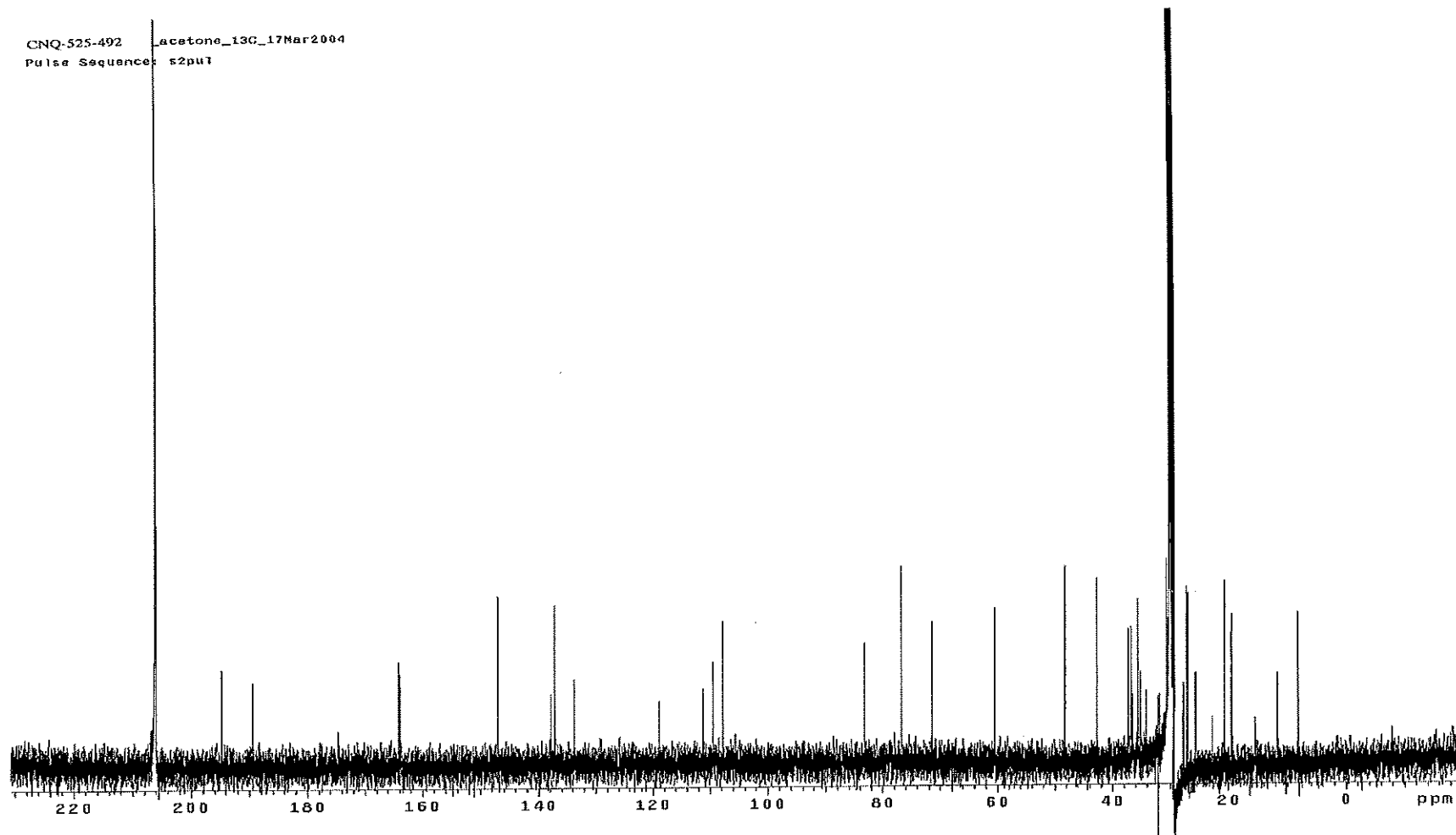


Figura 32. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de carbono 13: ^{13}C (RMN) del compuesto **CNQ-525-492** a 500 MHz en AcetD_6 .

CNQ525-492(300MHz)AcetoneD6

Pulse Sequence: gCOSY

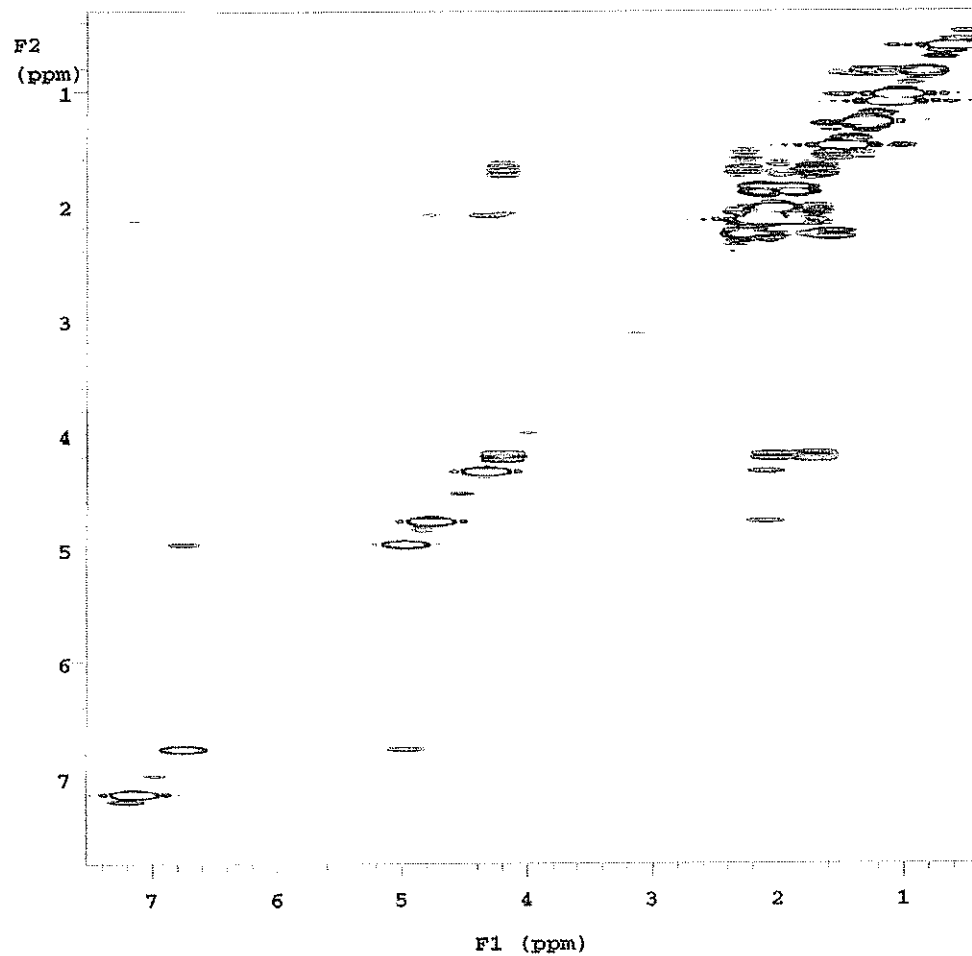


Figura 33. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear bidimensional: 2D ^1H - ^1H RMN(COSY) del compuesto **CNQ-525-492** a 300 MHz en AcetD₆.

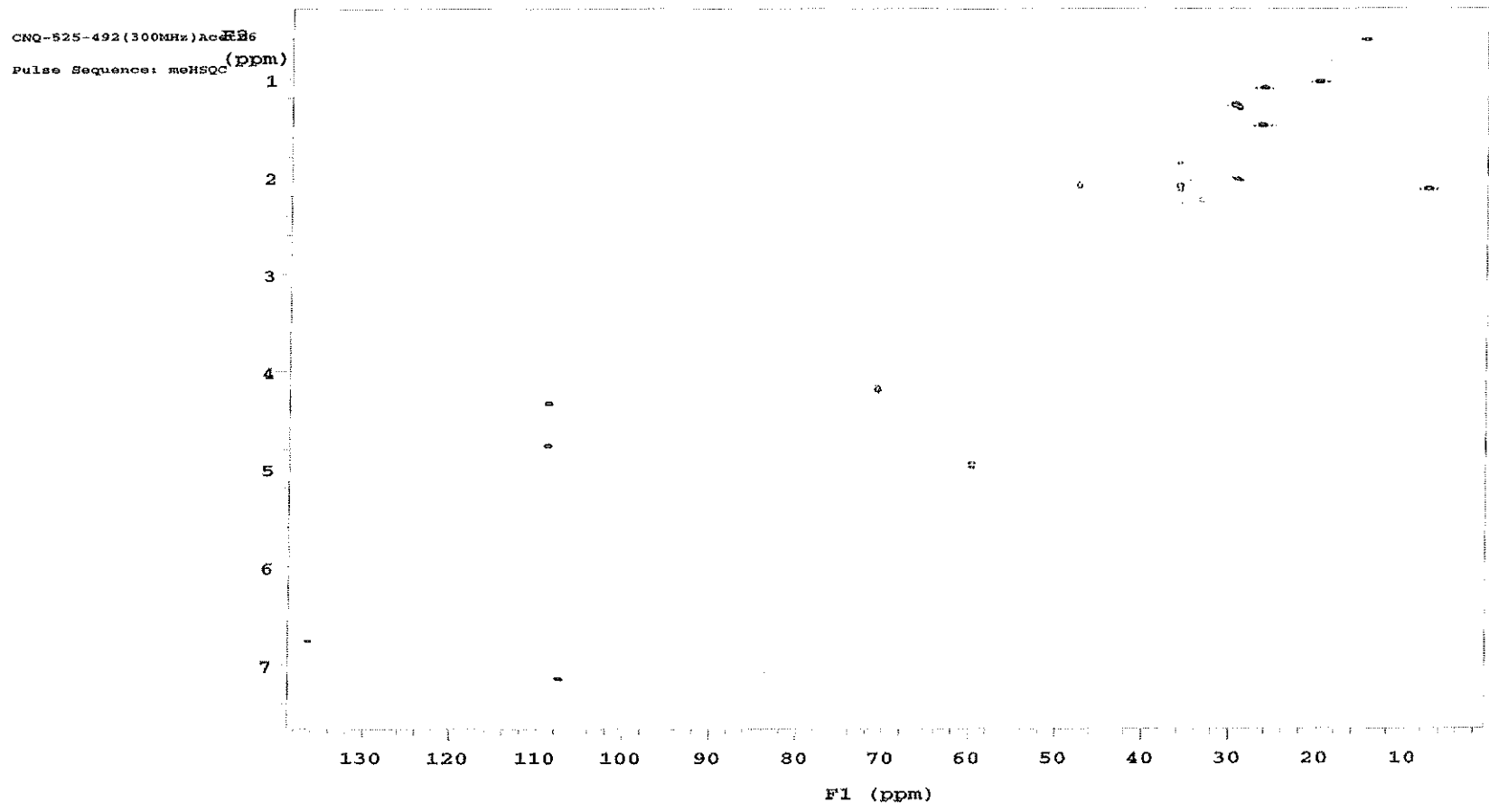


Figura 34. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear bidimensional: 2D ^1H - ^{13}C RMN(MeHSQC) del compuesto CNQ-525-492 a 300 MHz en AcetD6.

CNQ-525-492 (300MHz)AcetoneD6
Pulse Sequence: gHMBC

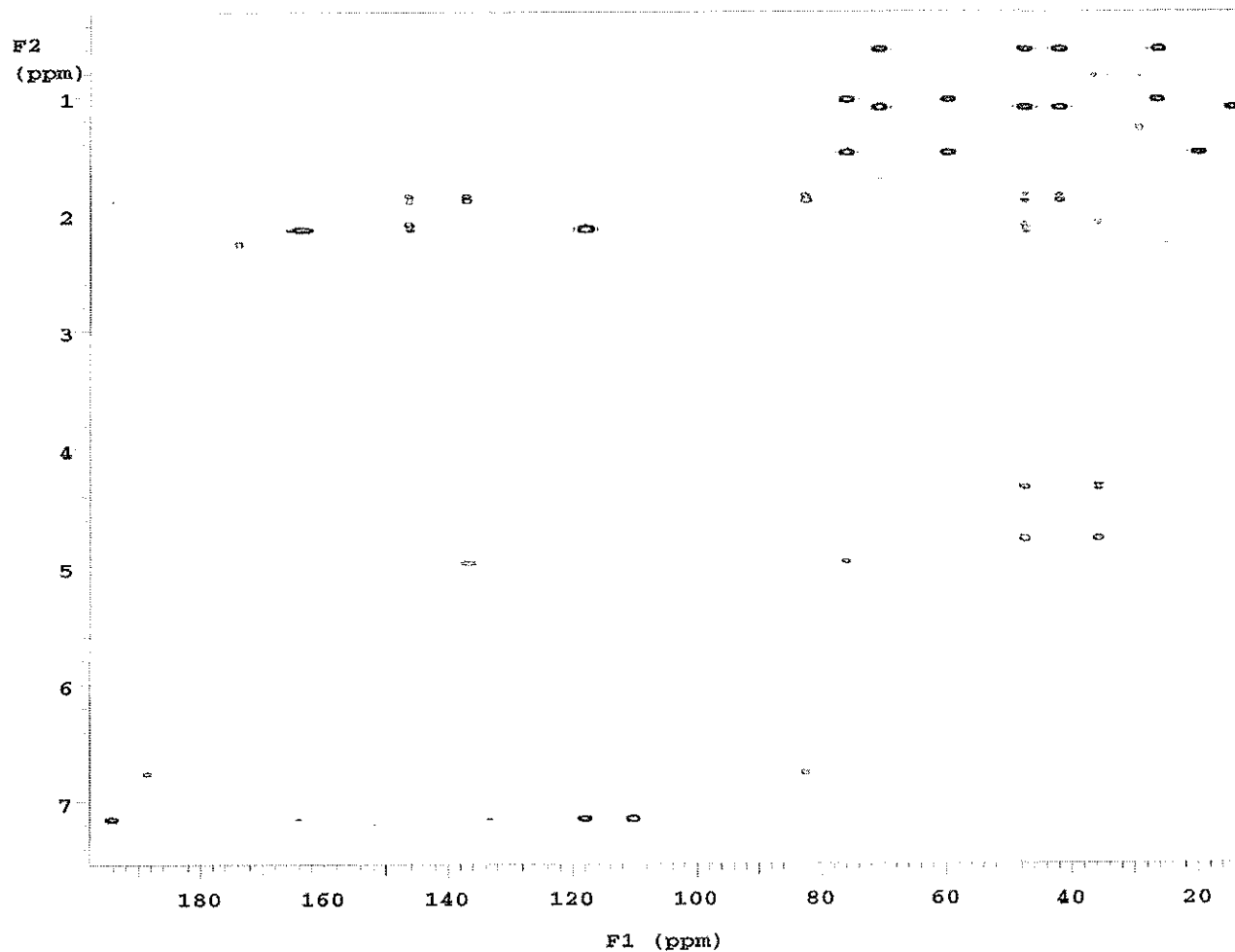


Figura 35. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear bidimensional: 2D ¹H-¹³C RMN(HMBC) del compuesto CNQ-525-492 a 300 MHz en AcetoneD₆.

*ESI-TOF

Sample Name: CNQ-525-492

Printing Time: 09:50:36 AM

Polarity/Scan Type: Negative

Printing Date: 16/04/2004

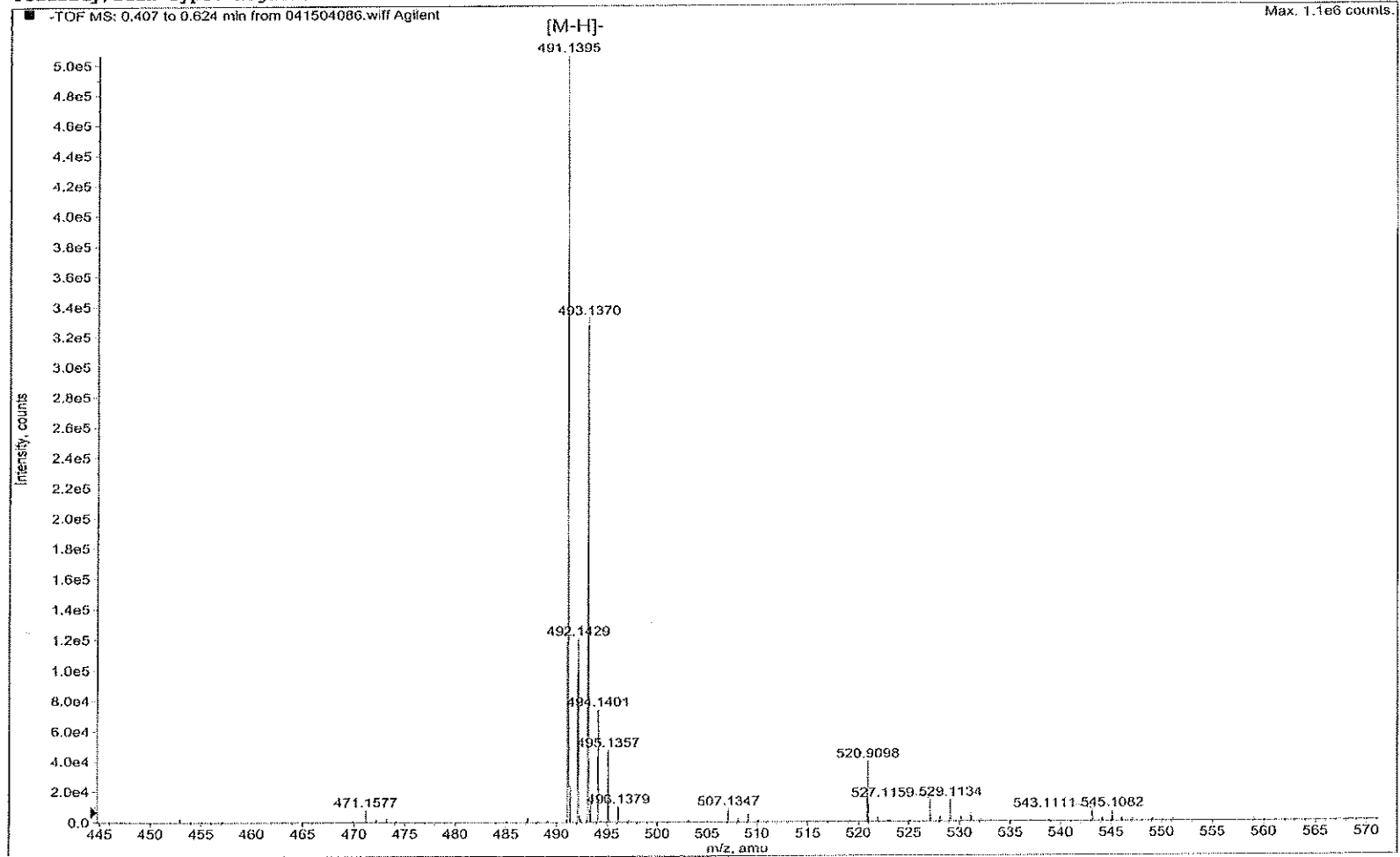


Figura 36. Espectro de Masas de alta resolución ESI-TOF (Electrospray) del compuesto CNQ-525-492 en Metanol.