



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS

**AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN Y ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE COMPUESTOS
QUÍMICOS EXTRAÍDOS DE LA ESPONJA MARINA DE INDONESIA *Xestospongia* sp.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS EN
ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

OC. NATALIE MILLÁN AGUIÑAGA

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA., MÉXICO AGOSTO DE 2009.

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS
POSGRADO EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

**AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN Y ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE COMPUESTOS
QUÍMICOS EXTRAÍDOS DE LA ESPONJA MARINA DE INDONESIA *Xestospongia* sp.**

TESIS

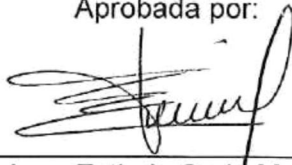
QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

OC. NATALIE MILLÁN AGUIÑAGA

Aprobada por:



Dr. Irma Esthela Soria Mercado
Presidente del jurado



Dr. Luis Manuel Enríquez Paredes
Sinodal



Dr. Philip George Williams
Sinodal

RESUMEN

Una gran variedad de compuestos químicos tipo quinonas e hidroquinonas pentacíclicos han sido aislados de esponjas marinas de los géneros *Xestospongia* y *Haliclona*. Este tipo de metabolitos secundarios han mostrado una amplia gama de actividades biológicas incluyendo antibióticas, cardiotónicas, y citotóxicas. Como parte de los continuos esfuerzos para identificar productos naturales bioactivos, el presente trabajo se enfocó a un extracto de acetato de etilo de la esponja marina de Indonesia *Xestospongia* sp. Este extracto crudo presentó una variedad de actividades biológicas, incluyendo la inhibición de la enzima β -secretasa (BACE-1), la cual está involucrada en la formación de placas de β -amiloide en el cerebro de pacientes con enfermedad de Alzheimer. Asimismo presentó actividad antimicrobiana contra el patógeno *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA). Con base en estos resultados, los compuestos obtenidos fueron purificados mediante HPLC fase reversa C-8 y la elucidación estructural de los compuestos fue deducida empleando espectroscopía de resonancia magnética nuclear en una y dos dimensiones, infrarrojo, ultravioleta, así como rotación óptica, espectrometría de masas y la reacción de Mosher. Se aislaron 2 compuestos nuevos y 5 previamente reportados, con estructuras base de hidroquinonas. Los dos nuevos compuestos son: 11-hidroxi-12b-metil-2,3,10,11-tetrahidro-1H-tetrafenol[5,4-*bc*]furan-6,8(9H,12bH)-diona y 8-hidroxi-12b-metil-2,3,9,10-tetrahidro-1H-tetrafenol[5,4-*bc*]furan-6,11(8H,12bH)-diona. Dos de los compuestos conocidos, Adociaquinonas A y B mostraron actividad potencial contra la cepa MRSA (IC_{50} de 9.47 y 4.23 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente). Por lo que se puede concluir que la esponja *Xestospongia* sp. recolectada de Indonesia representa una especie con actividad potencial contra la inhibición de la enzima β -secretasa y contra el patógeno MRSA.

ABSTRACT

A variety of pentacyclic quinone and hydroquinone compounds have been isolated from marine sponges of the genera *Xestospongia* and *Adocia*, and these secondary metabolites have exhibited a wide range of biological activities including antimicrobial, cardiotoxic, and cytotoxic. As part of our continuing efforts to identify bioactive natural products, we obtained ethyl acetate extracts of two marine sponges from Indonesia. These extract exhibited a variety of biological activities including inhibiting aspartic protease BACE 1, which is responsible involved in the formation of β -amyloid plaques in the brains of patients with Alzheimer's disease, and inhibited the growth of the pathogen Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Bioassay-guided fractionation afforded a series of new pentacyclic compounds, whose structures were assigned by 1 and 2D RMN spectroscopic methods, EM, IR, UV, OR, CD and chemical reaction through the Mosher's method, to obtain the absolute stereochemistry of a secondary alcohol in a new compound. The new compounds are: 11-hydroxy-12b-methyl-2,3,10,11-tetrahydro-1*H*-tetraphenol[5,4-*bc*]furan-6,8(9*H*,12*bH*)-dione and 8-hydroxy-12b-methyl-2,3,9,10-tetrahydro-1*H*-tetraphenol[5,4-*bc*]furan-6,11(8*H*,12*bH*)-dione. Two of the known compounds the Adociaquinones A and B showed activity against the MRSA strain (IC_{50} of 9.47 y 4.23 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively)

DEDICATORIA

Gracias al apoyo y amor incondicional de mi familia:

A mis papás:

Roberto Millán Núñez

Por el gran ejemplo que siempre me has dado.

Yolanda Aguiñaga de Millán

Por ser mi madre y mejor amiga.

A mis hermanas:

Yolanda Millán

Yanelí Millán

Yeimmy Millán

Por el amor que siempre me han brindado.

Y a mis sobrinos:

Pável Cortez Millán

Sofía Ramírez Millán

Por hacer más alegres los días al brindarme su linda sonrisa.

....Gracias por compartir conmigo este sueño hecho realidad y por seguir apoyándome en los sueños que todavía quiero lograr....

Gracias por existir

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a todos los que de alguna forma, directa o indirectamente, hicieron posible la realización de esta tesis.

A la Dra. Irma E. Soria Mercado por adoptarme como una hija, gracias por su amistad y apoyo en la realización y culminación de este posgrado. Gracias por la oportunidad de abrirme camino hacia nuevas experiencias de vida.

Al Dr. Philip Williams al cual le agradezco infinitamente todo su apoyo al darme la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo. Gracias por todo su conocimiento, sus consejos e invaluable ayuda para la realización de esta tesis. Sin su ayuda, simplemente esta tesis no existiría.

Al Dr. Luis M. Enríquez Paredes al aceptar ser miembro de mi comité, por su apoyo y sus observaciones tan atinadas. Gracias por ampliar el panorama de esta tesis.

Al departamento de Química de la Universidad de Hawai'i por todas sus facilidades al haberme permitido realizar este trabajo en sus instalaciones.

A mi grupo de laboratorio en Hawai'i: especialmente agradezco a Analía Sorribas por su ayuda en la realización de los bioensayos BACE-1. Gracias por toda su ayuda al abrirme las puertas de su casa sin conocerme, pero sobre todo, por ser una gran amiga y compartir conmigo grandes momentos de mi vida.

A Dr. Jingqiu Dai, por toda la ayuda a la realización de esta tesis, por adoptarme como una hija y escucharme cada capítulo de mi película.

A Dr. Brent K. Rubio por compartir sus conocimientos y amistad fuera y dentro del laboratorio....Celebrate good times, come on!!!!!!

A Zhibin Liang por su amistad y ayuda brindada a lo largo de mi estancia de investigación; así como agradezco el apoyo de Alejandro Preciado y Kristen Wheeler.

A Wesley Yoshida, por su invaluable ayuda con los espectros de resonancia.

A Russell S. Barlow por su amistad y ayuda en la realización de los bioensayos citotóxicos y antimicrobiales.

Al Dr. Benjamin Philmus por compartir su conocimiento químico, pero sobre todo por compartir su tiempo y su cariño. Gracias por existir en mi vida.

A todos mis amigos hawaianos, especialmente a Ming, Elsie, Mahdi, Diego, Blake, Husain, Volker, Ángel, Krystian, Pascale, Lambros, Adytia, Danielle, Jesse y Gideon, por hacer más grata y divertida mi estancia de investigación.

A mi amiga Mónica Torres por sus comentarios y sugerencias en la realización de este trabajo. Pero sobre todo, por ser una verdadera amiga, por siempre estar ahí cuando la necesito, por escucharme, por darme ánimos y porque no importa que oscuro se vea el camino, ella siempre ve la luz y el lado bueno de la vida. Gracias por ser parte de mi vida. ...Life is good!!!!

Al M.C. Damián Díaz, por ser un gran amigo, por todo su apoyo y darme ánimos para la culminación de este trabajo.

A todos mis amigos Oceanólogos y compañeros de maestría, en especial a Violeta, Anahí, Santiago, Faviola, Andrea, Karla, Michelle, Duarte, Denise y Karina. Gracias por su amistad.

A mis cuñados, José Luis, Roger y Pável por apoyo y amistad.

A mis abuelos, tíos, primos y a mi abuelo adoptivo Alfonso del Valle por su cariño.

A la Facultad de Ciencias Marinas por todo el apoyo brindado para la culminación de este grado, en especial a Angélica, Evelia, Yoli, Neli, Lorena y Manuel por su amistad.

Gracias a CONACyT por la beca brindada con número 215455.

MAHALO :)

ÍNDICE

1. Introducción	1
2. Antecedentes	6
3. Objetivo	13
3.1 Objetivos particulares	13
4. Hipótesis	13
5. Método	14
5.1 Recolecta	14
5.2 Extracción y aislamiento de compuestos	15
5.3 Análisis físicos y espectroscópicos	17
5.4 Método Mosher	18
5.5 Ensayos biológicos	19
5.5.1 BACE-1	19
5.5.2 Antimicrobial	19
5.5.3 Citóxico: SRB	21
6. Resultados y discusión	23
7. Discusiones finales	58
8. Conclusiones	60
9. Referencias	61
10. Anexos	65

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Estructura de Halenaquinona.....	8
2. Compuestos bioactivos derivados de esponjas marinas que se encuentran en fases clínicas.....	8
3. Hipótesis de la cascada β -amiloide. La ruptura de APP por la enzima BACE-1 es el paso central en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer.....	11
4. Sitio de recolecta y muestra de la esponja marina <i>Xestospongia</i> sp.....	14
5. Diagrama de flujo del proceso de separación de los compuestos de la fracción 3, 4, 6, 9, 10, 11 y 13.....	25
6. Estructura del compuesto Xestosaprol A.....	28
7. Estructura del compuesto 3,13-Dideoxo-1,2,14,15-tetrahidro-3,13-dihydroxyhalenaquinona.....	31
8. Estructura del compuesto 13,14,15.16-Tetrahidroxestoquinol.....	35
9. Semi-estructuras del compuesto aislado de la fracción 9.....	40
10. Estructura propuesta del compuesto 9 con base a las correlaciones observadas en los espectros.....	41
11. Diagrama para deducir la absoluta configuración de un alcohol con base al experimento de $\Delta\delta^{T1T2}$ en las señales para MPA ésteres, R o S.....	43
12. Valores obtenidos después de los espectros de ^1H RMN para determinar la absoluta estereoquímica del grupo hidroxilo en el compuesto 9.....	43
13. Estructura del compuesto 11-hidroxi-12b-metil-2,3,10,11-tetrahidro-1 <i>H</i> -tetrafenol[5,4- <i>bc</i>]furan-6,8(9 <i>H</i> ,12 <i>bH</i>)-diona, purificado de la fracción 9.....	44
14. Espectro de dicroísmo circular de los dos materiales de inicio recuperados después de la reacción (322 uma).....	45
15. Estructura del compuesto Adociaquinone A.....	47
16. Estructura del compuesto Adociaquinone B.....	48
17. Estructura propuesta para el compuesto 13 con base a las correlaciones observadas en los espectros.....	52
18. Estructura del compuesto 8-hidroxi-12b-metil-2,3,9,10-tetrahidro-1 <i>H</i> -tetrafenol[5,4- <i>bc</i>]furan-6,11(8 <i>H</i> ,12 <i>bH</i>)-diona, purificado de la fracción 13.....	52

ÍNDICE DE TABLAS

I	Condiciones necesarias para la realización de los bioensayos antimicrobianos.....	21
II	Porcentajes de actividad de los extractos crudos de la esponja en los diferentes bioensayos realizados.....	23
III	Porcentajes de actividad de las 22 fracciones obtenidas del extracto crudo de acetato de etilo de la muestra de esponja mediante HPLC.....	24
IV	Subfracciones obtenidas de la fracción 3 y su respectivo porcentaje de actividad contra la enzima BACE 1. En paréntesis la desviación estándar.....	28
V	Señales de resonancia magnética nuclear protónica y de carbono trece (^1H y ^{13}C RMN) del compuesto Xestosaprol A en DMSO- d_6	29
VI	Subfracciones obtenidas de la fracción 4 y su respectivo porcentaje de actividad contra la enzima BACE-1.....	31
VII	Subfracciones obtenidas de la fracción 5 y su respectivo porcentaje de actividad contra la enzima BACE-1.	32
VIII	Subfracciones obtenidas de la fracción 6 y su respectivo porcentaje de actividad contra la enzima BACE-1.....	35
IX	Subfracciones obtenidas de la fracción 7 y su respectivo porcentaje de actividad contra la enzima BACE-1.....	37
X	Asignaciones de ^{13}C y ^1H RMN para el compuesto 11-hidroxi-12b-metil-2,3,10,11-tetrahidro-1 <i>H</i> -tetrafenol[5,4- <i>bc</i>]furan-6,8(9 <i>H</i> ,12 <i>bH</i>)-diona de la fracción 9, hechas con base en los experimentos de HSQC, HMBC, COSY y NOESY.....	46
XI	Asignaciones de ^{13}C y ^1H RMN para el compuesto de la fracción 13, hechas con base en los experimentos de HSQC, HMBC, COSY y ROESY.....	53
XII	Extracción con metanol, fracciones y porcentajes de bioactividad contra la cepa MRSA.....	54
XIII	Subfracciones de la muestra de 65% metanol y porcentajes de bioactividad contra la cepa MRSA.....	55
XIV	Subfracciones de la muestra de 80% metanol y porcentajes de bioactividad contra la cepa MRSA.....	56

ABREVIATURAS

APP	Proteína precursora β -amiloide
ATFA	Ácido trifluoroacético
BACE- 1	Enzima β -secretasa
br	Señal ancha
BuOH	Butanol
CA	<i>Candida albicans</i>
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
COSY	Espectroscopía de correlación
DCM	Diclorometano
dd	Doble de dobles
ddd	Triple de dobles
DMSO	Sulfóxido de dimetilo
DMSO-d ₆	Sulfóxido de dimetilo deuterado
dt	Doble de triples
EA	Enfermedad de Alzheimer
EAE	Extracto crudo de Acetato de Etilo
EC	<i>Escherichia coli</i>
EM	Extracto crudo de metanol
EtOH	Etanol
H ₂ O	Agua
HCOOH	Ácido fórmico
HMBC	Espectros bidimensionales heteronucleares múltiples
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución

HSQC	Espectros bidimensionales heteronucleares sencillos
IC ₅₀	Concentración inhibitoria media
IsoOH	Isopropanol
<i>J</i>	Constantes de acoplamiento
LC/MS	Cromatógrafo de líquidos con detector de masas
m	Multiplete
MarinLit	Base de datos de productos naturales marinos
MeCN	Acetonitrilo
MeCN-d ₃	Acetonitrilo deuterado
MeOH	Metanol
MHz	Mega Hertz
MIC	Concentración mínima inhibitoria
MRSA	Resistente a Meticilina <i>Staphylococcus aureus</i>
RMN	Resonancia magnética nuclear
NOESY	Espectroscopía de efecto nuclear overhauser
ppm	Partes por millón
s	Singulete
SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
SKOV-3	Células de adenocarcinoma de ovario
SRB	Sulforhodamina B
t	triplete
VREF	Resistente a Vancomicina <i>Enterococcus faecium</i>
DCC	Diciclohexilcarbodiimida
MPA	Metoxi-L-ácido fenilacético
DMAP	4-Dimetilaminopiridina

1. INTRODUCCIÓN

A pesar del considerable esfuerzo por el estudio de nuevas fuentes de fármacos, se ha observado que existe una notable disminución en el hallazgo de nuevos productos a partir de los recursos naturales terrestres. La gran diversidad de especies acuáticas (plantas y animales) es una fuente potencial de nuevos metabolitos secundarios farmacológicamente activos (Leiva *et al*, 2004).

Consecuentemente las principales compañías farmacéuticas e investigaciones académicas han establecido alrededor del mundo la exploración de nuevas fuentes de biodiversidad hacia los océanos. Durante las últimas siete décadas de exploración de productos naturales marinos se han aislado compuestos de 4796 distintos géneros y especies; 95% de ellas de origen eucariota y en su gran mayoría de los Phyla Porifera, Cnidaria y Chromofita (Blunt *et al*, 2007).

La química de productos naturales marinos comenzó en 1952, cuando Bergmann y Feeney descubrieron 2 nucleósidos poco comunes: la espongouridina (1- β -D-arabinofuranosiluracilo) y la espongotimidina (1- β -D-arabinofuranosiltimina). Ambos compuestos, aislados de la esponja de las Bahamas *Cryptotethya crypta* sirvieron como estructura base de algunos medicamentos antivirales como Ara-A (1- β -D-arabinofuranosiladenina) (Bergmann y Feeney, 1951 citado en Sánchez-Nava, 2006). Otros compuestos aislados fueron la sponguridina proveniente de la esponja *Tethya crypta*, el cual dio lugar al fármaco Ara-C usado clínicamente contra el linfoma de Hodgkins y la leucemia mielocítica. En los años 70's se dio el aislamiento de la 1-metil-iguanosina proveniente de la esponja *Tedania digitata*, la cual funciona como relajante muscular, antiinflamatorio y antialérgico (Quinn *et al*, 1980 citado en Prieto-Davó, 2000).

Por lo que el ambiente marino representa una fuente potencial de metabolitos secundarios con estructuras nuevas y con una aplicación farmacológica de enormes dimensiones. El notable incremento en el número de productos naturales marinos que se encuentran en fases pre-clínicas y clínicas es la evidencia más importante de dicho potencial (Chevalier et al, 2006).

La búsqueda de compuestos bioactivos en un organismo marino generalmente se lleva a cabo mediante diferentes procedimientos químicos como la extracción y purificación de los compuestos, pruebas de bioactividad de los mismos y determinación de sus estructuras mediante reacciones químicas específicas y análisis espectrofotométricos, como son; resonancia magnética nuclear, infrarrojo, ultravioleta-visible y espectrometría de masas. Normalmente los compuestos bioactivos se encuentran en pequeñas concentraciones en los organismos por lo que es importante conocer no sólo su estructura sino buscar también la forma de sintetizarlos en el laboratorio (Kelly-Gutiérrez, 1997; Molinski *et al*, 2009). En ocasiones, el desarrollo de fármacos del ambiente marino presenta dificultades asociadas a la disponibilidad del organismo fuente, razón por la que se han propuesto soluciones innovadoras para resolver el problema; tal es el caso de la acuicultura de invertebrados marinos (Molinski *et al*, 2009).

La química de productos naturales marinos ha permitido importantes descubrimientos en pruebas biomédicas; algunos ejemplos, son el ácido okadaico, que es un inhibidor de fosfatasa producido por dinoflagelados y la xestospongina C, que es un bloqueador intracelular de calcio producido por una esponja marina. Otro ejemplo, es el primer fármaco del mar, el ziconotido (ω -conotoxina MVIIA) el cual es un péptido aislado originalmente de un caracol marino tropical, siendo aprobado en los Estados Unidos en 2004 bajo la marca de Prialt para el tratamiento de dolor crónico de lesión de espina

vertebral (Newman y Cragg, 2007). Un segundo fármaco, es el antitumoral Trabectedin (Yondelis/ecteinascidin-743/ET-743) aislado de un calamar tropical, este compuesto fue aprobado recientemente por la Unión Europea en octubre de 2007 para el tratamiento de sarcoma y representa el primer fármaco anti cancerígeno derivado de especies marinas. Actualmente, una gran cantidad de compuestos derivados de productos naturales marinos y que son empleados para el tratamiento de varios tipos de cáncer, han sido presentados y están siendo evaluados en fases pre-clínicas y clínicas en los Estados Unidos y Europa (Molinski *et al*, 2009).

Aproximadamente el 60% de los compuestos con actividad antibiótica que se utilizan son aislados de productos naturales (Butler *et al*, 2007). Las esponjas marinas son una fuente fértil de diversos metabolitos secundarios que frecuentemente presentan propiedades antimicrobianas, y por lo tanto han sido de gran interés para la química medicinal y sintética, así como de la ecología marina (Roll y Scheuer, 1983). Cabe mencionar que la actividad antimicrobiana siempre ha sido de gran relevancia, debido a la resistencia que presentan las bacterias a los antibióticos; como ejemplo se tiene a *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* y *Streptococcus pneumoniae*.

Las esponjas marinas (Phylum Porífera) representan un componente importante de las comunidades bentónicas en todo el mundo, tanto en términos de biomasa como en su papel ecológico dentro del ambiente bentónico y pelágico. Las esponjas se encuentran entre los animales pluricelulares más primitivos y poseen una modesta complejidad en lo que respecta a la diferenciación y organización de sus tejidos. Son organismos sésiles, cuya alimentación, intercambio gaseoso y eliminación de desechos dependen del flujo de agua a través del cuerpo. Las más de 6000 especies de esponjas descritas ocurren en

una gran variedad de hábitat marinos y de agua dulce, encontrándose desde los trópicos hasta regiones polares (Taylor et al, 2007).

El phylum Porífera es una agrupación que consta de tres clases: la Hexactinellida Calcarea y Demospongiae. Éste último grupo es el más diverso, abundante y con la distribución más amplia. La estructura de las esponjas marinas es muy diferente a la de cualquier otro taxón, ya que de la morfología dependen muchos aspectos de la biología de estas, incluyendo la interacción con microorganismos (Taylor et al, 2007).

Debido a que las esponjas marinas son organismos sésiles con probabilidades muy altas de descomposición y de pérdida de hábitat dentro del ambiente marino competitivo, necesitan desarrollar una forma química de defensa, esta es una de las razones por la que este Phylum contiene el intervalo más amplio de metabolitos secundarios reportados en cualquier Phylum marino (Prieto-Davó, 2000).

Las esponjas marinas son la fuente más importante de productos naturales con poder bioactivo con aplicación biomédica (Piel et al, 2004). Los avances en biología molecular y celular han permitido una explotación racional de los recursos naturales de los metabolitos secundarios y biomateriales a partir del phylum Porífera. Se ha establecido que los elementos estructurales y funcionales son altamente conservados desde las esponjas hasta los taxa como Protostomia (*Drosophila melanogaster* y *Caenorhabditis elegans*) y Deuterostomia (humanos), por lo tanto, es evidente que la etiología molecular de las enfermedades en los metazoos tienen una base común. Por lo tanto, el gran reto científico para el estudio de la química de productos naturales es elucidar la parte activa y selectiva de los metabolitos secundarios, para después abordar la aplicación clínica. De ahí que los metabolitos secundarios obtenidos de esponjas y sus microorganismos simbiotes sean de los más importantes en cuanto a potencial farmacológico (Müller et al, 2004).

Diferentes hipótesis han sido propuestas para entender el motivo por el que las esponjas producen metabolitos secundarios. La primera es por protección directa: las esponjas y sus microorganismos simbioses (bacterias y hongos) producen una serie de compuestos bioactivos en contra de sus atacantes. Se dice que se tienen efectos tóxicos contra otros organismos marinos, como es la producción de sustancias nocivas con la capacidad de causar dermatitis al contacto con ellos. La esponja sintetiza compuestos bioactivos que brindan protección contra los microorganismos o eucariontes. Otros metabolitos secundarios de esponjas y de sus microorganismos asociados es que juegan un doble papel; están involucrados en la defensa así como en la activación de rutas críticas para su autodefensa (activador metabólico). Una segunda hipótesis está relacionada con la protección inmune; la esponja produce moléculas proteicas para detener el crecimiento de bacterias, o destruir células eucariotas. Esta última estrategia, es para protección indirecta: la esponja selecciona cepas bacterianas para que se desarrollen en su superficie y produzcan compuestos que actúan específicamente contra otras bacterias (Müller et al, 2004).

2. ANTECEDENTES

Cada año, la mayoría de los metabolitos bioactivos nuevos son obtenidos del phylum Porifera, teniendo una amplia gama de propiedades farmacológicas como antibacteriales, antiprotozoarios, antituberculosis, antivirales, anticancerígenos, antiinflamatorios, entre otras; muchos de los cuales se encuentran en estudios preclínicos y ensayos clínicos (Mayer et al, 2007; Taylor et al, 2007) .

Esta amplia gama de compuestos bioactivos presenta una gran variedad de clases de estructuras químicas, desde terpenos, sesquiterpenos hidroquinonas, alcaloides, péptidos, poliéteres y policétidos, entre otros, siendo los alcaloides los más ocurridos en las esponjas marinas (Blunt et al, 2007).

Kobayashi et al (1985) reportó dos nuevos compuestos pentacíclicos llamados Halenaquinol y Halenaquinol sulfatado aislado de la esponja de Okinawa *Xestospongia sapra*. Por su parte Schmitz y Bloor (1988) trabajaron con el género *Adocia* colectada en la laguna Truk, reportando los compuestos Xestoquinona y Halenaquinona. Éste último compuesto ha presentado una inhibición a la proteína oncogénica tirosina quinasa la cual codifica para el virus del sarcoma de Rous, bloqueando la proliferación celular. Este tipo de proteínas (tirosina quinasa) son una clase de enzimas que están involucradas en la regulación del crecimiento celular y sus señales (Lee et al, 1992). Además, posee actividad antibiótica in vitro contra *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* (Roll y Scheuer, 1983).

Uno de los géneros de esponjas con mayor número de compuestos bioactivos aislados es *Xestospongia*, ejemplo de ello son los ácidos bromados poliacetilénicos de la esponja *Xestospongia mutua*. Estos ácidos acetilénicos son las primeras muestras que

han demostrado inhibir a la HIV-proteasa, una enzima crítica en la reproducción del virus de inmunodeficiencia humana (Kelly-Gutiérrez, 1997).

Otro ejemplo son los compuestos aislados de este género en un espécimen de Sri Lanka, con actividad biológica contra *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* (Kelly-Gutiérrez, 1997).

De la esponja *Xestospongia* cf. *carbonaria* fueron aislados compuestos con actividad en el bioensayo de la proteína tirosina kinasa (PTK) que ha sido asociada con la proliferación de enfermedades como el cáncer y psoriasis (Alvi *et al*, 1993).

En general se han aislado una gran variedad de quinonas e hidroquinonas pentacíclicas de los géneros *Xestospongia* y *Adocia*, donde los metabolitos secundarios han mostrado actividad antimicrobiana, cardiotónica y citotóxica (Kobayashi *et al*, 1992). Además de estas propiedades se han observado que este tipo de compuestos son potentes inhibidores de la enzima Topo I, purificadas del núcleo de células de leucemia en ratón. Se conoce que las topoisomerasas modulan la estructura del ADN tanto en células eucariotas como en procariotas y son esenciales para una gran variedad de procesos celulares incluyendo la replicación y la transcripción (Concepción *et al*, 1995).

Se han detectado altos niveles de topoisomerasa II relacionados con células de tumores y a su vez a su alta proliferación, por lo que estas enzimas (Topo I y II) son importantes blancos contra agentes antitumorales y anticancerígenos en usos clínicos, sobre todo en cáncer de colon (Bae *et al*, 1993). De la esponja *Xestospongia* sp., colectada en Filipinas se aislaron compuestos como Adociaquinone A y B, los cuales mostraron actividad inhibitoria en ensayos de topoisomerasa (Concepción *et al*, 1995).

Actualmente se ha indicado que la estructura de la quinona terminal de las moléculas policíclicas de la familia de Xestoquinonas-Halenaquinonas; y la presencia del

grupo cetona en el carbono número tres, (Fig. 1) están relacionadas con la presencia o no de actividad biológica (Nakamura *et al*, 2005).

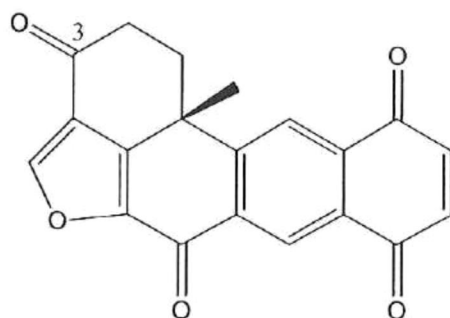


Figura 1. Estructura de Halenaquinona.

Algunos de los compuestos derivados de esponjas marinas que todavía no son aprobados pero presentan gran actividad contra líneas celulares de cáncer son: Hemiasterlin, un tripéptido antimetabólico que fue aislado de la esponja *Hemiasterella minor*, el cual presenta citotoxicidad contra leucemia a concentraciones nanomolares. Discodermolide, el cual fue aislado de la esponja *Discodermia dissoluta* de las Bahamas a 300 m de profundidad, este compuesto muestra una actividad contra cáncer colorectal y actualmente se encuentra en fase clínica I (Fig. 2).

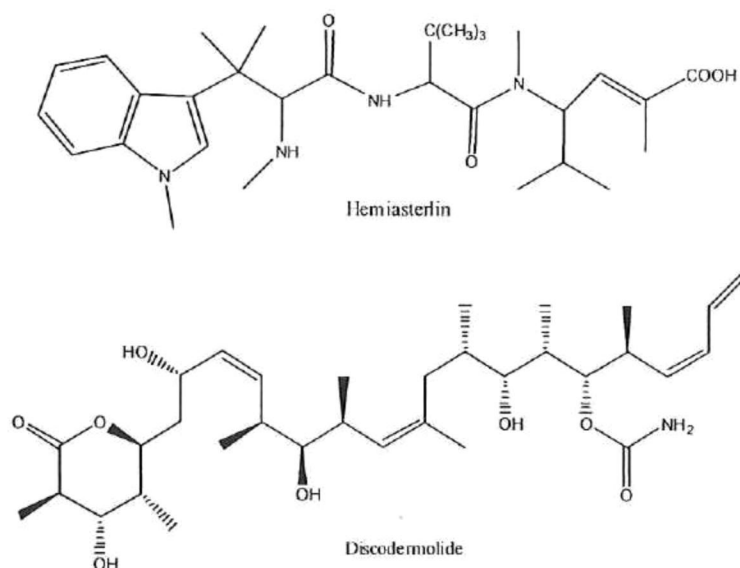


Figura 2. Compuestos bioactivos derivados de esponjas marinas que actualmente se encuentran en fases clínicas.

Halichondrin B es otro compuesto con grandes expectativas para ser utilizado como fármaco para el cáncer (Molinski *et al*, 2009). El compuesto Psammaphlin A aislado de *Psammaphysilla* sp. ha mostrado una inducción a la apoptosis celular de cáncer de pecho. Otros compuestos aislados de esponjas con actividad antifungal y antimalarial es el ácido-3,6-epidioxy-4, 6, 8, 10-tetraetiltetradeca-7, 11-dienóico y el ácido- [3,5-dietil-5-(2-etil-hex-3-enil)-5H-furan-2-ylideno] acético, aislado de *Plakortis* sp. De la misma manera se han aislado macrolidos exigulide de *Geodia exigua* que ha mostrado una inhibición de la fertilización de los erizos de mar pero no de la embiogenesis (Blunt *et al*, 2008).

Uno de los problemas que se han presentado en la obtención de estos compuestos biológicamente activos es que se producen en pequeñas cantidades y frecuentemente por organismos raros, cuyas poblaciones naturales no pueden sostener la extensa colecta necesaria para los ensayos clínicos. Un ejemplo son los compuestos anticancerígenos halicondrinas, un grupo de macrólidos poli éteres primeramente aislados de la esponja japonesa *Halichondria okadai* y subsecuentemente de *Lissodendoryx* sp. recolectada en la costa sureste de Nueva Zelanda. Por cada tonelada métrica de la especie *Lissodendroyx* sp. solo se obtienen 300 mg del compuesto Halicondrina B y se estima que la biomasa natural de esta esponja es de 280 toneladas métricas, por lo que su recolecta no es redituable, por lo que el cultivo de la esponja se ha convertido en punto de interés. Un segundo ejemplo es la lactona macrocíclica Pelorusida A con propiedades anticancerígenas, aislada de la desmospongia de Nueva Zelanda *Mycale hentscheli*, obteniendo por cada 200 kilogramos de esponja, 2 gramos del compuesto puro. Otros compuestos de interés farmacológico son también producidos por esta misma esponja, como el policétido cito-tóxico Mycalamida A y el macrólido Pateamina. La concentración de estos metabolitos en poblaciones naturales de esponja varía significativamente en tiempo y en espacio, lo que sugiere que los factores tanto físicos como ecológicos están

involucrados en su producción. Por ende, es evidente que el entendimiento del papel ecológico de éstos y otros compuestos, pueden beneficiar en gran medida los programas de recolección como guía en las primeras fases del descubrimiento de fármacos en ambientes marinos (Taylor *et al*, 2007).

Debido a la amplia gama de actividades biológicas que presentan los organismos marinos, recientemente el laboratorio del Dr. Philip Williams, de la Universidad de Hawai'i, inició un programa de búsqueda para descubrir inhibidores de enzimas kinasa y proteasa. Específicamente, los esfuerzos fueron dirigidos a descubrir inhibidores de β -secretasa (BACE-1), una proteasa que es responsable de la formación de placas en la enfermedad de Alzheimer (Dai *et al*, 2008).

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa más común de demencia, siendo un estado clínico patológico en donde se dice que el paciente presenta pérdida de la capacidad de pensar (Gandy, 2005). Esta enfermedad neurodegenerativa del cerebro se caracteriza por la formación progresiva de placas amiloides. Estas placas extracelulares consisten principalmente en agregados de A β 42, un fragmento de un péptido formado por la secuencia de procesamiento proteolítico de la proteína precursora β -amiloide (APP) por dos enzimas, la β y γ -secretasa. A pesar de que todavía está en debate que las placas amiloides sean las responsables de la cascada patogénica que conduce a la pérdida neuronal y demencia, hasta el momento la búsqueda de inhibidores de APP han sido de gran importancia para las aproximaciones terapéuticas en la enfermedad de Alzheimer (Stachel *et al*, 2004) (Fig. 3).

La enzima β -secretasa (BACE-1), un nuevo tipo de proteasa aspartil transmembranal, fue identificada en 1999 y se cree que es la responsable de la ruta de formación de APP. Ratones genéticamente deficientes en BACE-1 no muestran una producción de los péptidos amiloides, por lo que la inhibición de la enzima β -secretasa es considerada como una arma terapéutica atractiva en el tratamiento y prevención del Alzheimer (Stachet et al, 2004; Jakob-Roetne y Jacobsen, 2009).

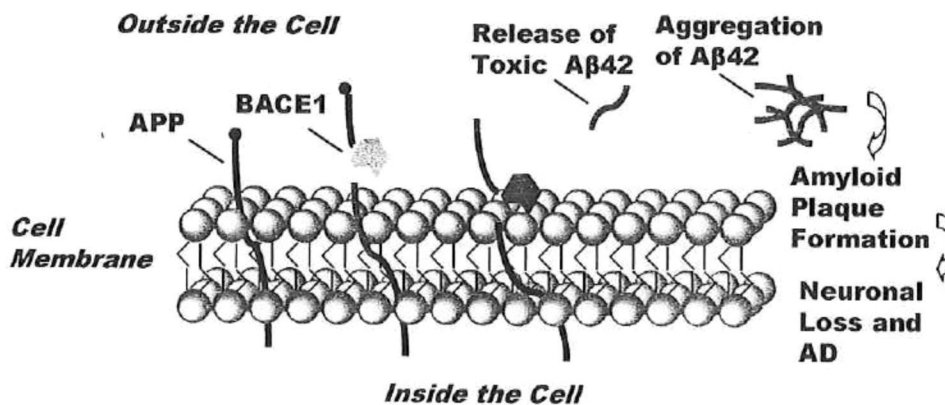


Figura 3. Hipótesis de la cascada β -amiloide. La ruptura de APP por la enzima BACE-1 es el paso central en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer.

En los últimos años se ha observado un incremento sorprendente en el esclarecimiento de las posibles causas del Alzheimer y por ende de cómo puede ser atacado y tratado. De igual manera, el cáncer es la segunda causa principal de muerte, detrás de las enfermedades cardíacas. Pero se estima que a lo largo del siglo XXI, el cáncer será la principal causa de muerte en los países desarrollados. Otro problema de salud pública es la resistencia a los antibióticos por parte de patógenos, como es el caso de *Staphylococcus aureus* resistente a metilina, la cual es la principal especie patógena de causa común de infecciones de origen comunitario como hospitalario.

Debido a que las esponjas marinas son la especie de mayor producción de productos naturales bioactivos, éstas resultan una fuente potencial para la búsqueda de posibles fármacos que permitan resolver esta problemática de salud pública. El principal interés del presente trabajo es obtener compuestos con potencial farmacológico a partir de una muestra de esponja marina de Indonesia perteneciente al género *Xestospongia*, para así contribuir con la generación de información y el desarrollo de la farmacognosia

3. OBJETIVO

Llevar a cabo el aislamiento, purificación y la elucidación estructural de los compuestos presentes en la esponja marina de Indonesia *Xestospongia* sp. y determinar su potencial farmacológico.

3.1 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Aislar los compuestos presentes de la esponja marina *Xestospongia* sp.
2. Elucidar la estructura de los compuestos presentes en la esponja marina.
3. Determinar la actividad inhibitoria del extracto de esponja sobre la enzima β -secretasa (BACE-1) responsable en gran medida de la enfermedad de Alzheimer.
4. Determinar la actividad antibiótica del extracto de esponja contra las cepas: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), *Staphylococcus aureus* (SA), *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina (VREF), *Candida albicans* (CA) y *Escherichia coli* (EC).
5. Determinar la actividad citotóxica del extracto de esponja, usando células de carcinoma de ovario SKOV-3.

4. HIPÓTESIS

Debido a que las esponjas marinas han sido el grupo marino más importante en cuanto a la producción de compuestos bioactivos, la esponja marina *Xestospongia* sp. recolectada en Indonesia contiene compuestos activos antimicrobianos, inhibitorios contra la enzima β -secretasa y/o citotóxicos contra cáncer de ovario.

5. MÉTODO

5.1 Recolecta

La muestra de esponja etiquetada como UHM-96IND30-2 fue recolectada el 17 de marzo de 1996 mediante buceo libre a una profundidad de 25 m, cerca de la bahía Tortuga en Sangalaki, Indonesia ($2^{\circ} 04' 59''$ N, $118^{\circ} 24' 41''$ E) (Fig. 4). Esta espécimen es parte de una gran colección de esponjas y otros organismos marinos que la Universidad de Hawai'i se encuentra estudiando con fines exploratorios para determinar su potencial farmacológico a través de diversos bioensayos.

La esponja recolectada presentaba una forma gruesa con ramificaciones y superficie relativamente lisa. La coloración externa e interna en el medio marino es de un color marrón oscuro. La esponja fue identificada como *Xestospongia* sp. perteneciente al Orden Haplosclerida, Familia Petrosiidae. Cabe mencionar que esta esponja muestra características similares a la esponja *Xestospongia subtriangularis*, la cual solamente ha sido reportada y descrita en zonas del Atlántico Centro-Occidental.

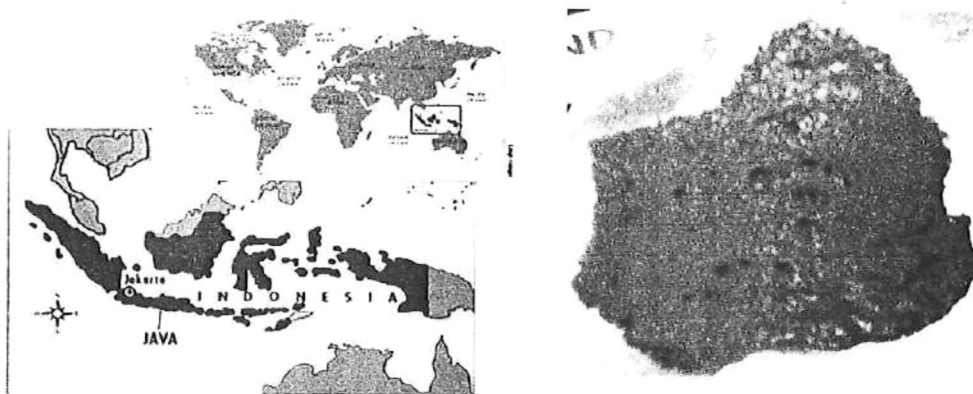


Figura 4. Sitio de recolecta y muestra de la esponja marina.

5.2 Extracción y aislamiento de compuestos

La esponja (69.62 gr) fue descongelada y cortada en trozos pequeños para llevar a cabo la extracción de sus compuestos. La extracción se realizó tres veces con acetato de etilo (1L) a temperatura ambiente y dejándose en agitación durante toda la noche. La solución fue filtrada y concentrada mediante destilación a presión reducida, obteniendo así el extracto crudo de acetato de etilo (EAE). El concentrado fue filtrado por cromatografía flash en una columna de gel de sílice fase reversa C8 y eluido con Metanol (MeOH) al 100% con 0.1% de ácido fórmico (HCOOH).

El producto filtrado se fraccionó mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) empleando para este fin un instrumento preparativo y una columna fase reversa C8 [Columna Phenomenex Luna 10U C8 (2) 100, 250 x 21,20 mm 10 μ m], empleando un gradiente lineal de 20-60% Acetonitrilo: agua (MeCN: H₂O) con 0.1% de HCOOH como fase móvil en un tiempo de 90 min a un flujo de 10 mL min⁻¹. Seguida de la purificación de compuestos por medio de una columna de fase reversa C8 [Columna Phenomenex Luna 5U C8 (2) 100, 250 x 10,00 mm 5 μ m], utilizando un gradiente de elución con H₂O, MeOH y MeCN hasta obtener las condiciones óptimas mediante las cuales se observaron los diferentes compuestos presentes en las fracciones. Cabe aclarar que para la purificación de todos los compuestos aislados en este trabajo, se empleó la misma columna de fase reversa descrita anteriormente.

Después de la extracción con acetato de etilo, la esponja fue sometida a una nueva extracción con MeOH al 100% (1L) con las condiciones antes descritas. La solución fue filtrada y concentrada mediante destilación a presión reducida, obteniendo así el extracto crudo de metanol (EM). El extracto obtenido se disolvió en

aproximadamente 300 mL. de H₂O-destilada y se sometió a un proceso de partición usando butanol (BuOH) como disolvente. La capa orgánica de BuOH fue concentrada hasta sequedad mediante destilación a presión reducida. Esta fracción fue sometida a cromatografía en columna flash mediante gel de sílice C8 utilizando como fase móvil 300 mL de cada sistema de disolventes: MeOH: H₂O 50:50, 65:35, 80:20 y MeOH. Posteriormente se realizaron dos lavados de la columna, el primero con una solución de isopropanol (IsoOH) al 99.9% conteniendo 0.1% de ácido trifluoroacético (ATFA) y el segundo con 99.9% de diclorometano (DCM) con 0.1% de ATFA.

5.3 Análisis físicos y espectroscópicos

La rotación específica de todos los compuestos aislados fue medida en MeOH en un polarímetro Jasco-DIP-700 utilizando la línea D de lámpara de sodio (589nm) a una temperatura de 23°C, y la concentración se expresó en g por 100 mL de disolución. Los espectros de ultravioleta (UV) e infrarrojos (IR) se obtuvieron con un espectrofotómetro Hewlett-Packard modelo 8453 y Perkin Elmer modelo 1600 series FTIR, respectivamente. Para éstos últimos, se utilizó el método de película con un disco de CaF.

Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica (^1H RMN) y de carbono (^{13}C RMN) fueron obtenidos en espectrofotómetros Varian Inova a 500 megahertz (MHz) y 125 MHz, respectivamente. Los espectros se corrieron en cloroformo deuterado (CDCl_3), acetonitrilo deuterado (CD_3CN) y sulfóxido de dimetilo deuterado (DMSO_{d6}). 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 1.94/118.7 ppm y δ 2.50/39.5 ppm, respectivamente. Los experimentos en una dimensión (1D), NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) y en dos dimensiones (2D), ^1H - ^1H COSY (COrrrelation Spectroscopy), ^1H - ^{13}C HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherente), MeHSQC (Methyl Heteronuclear Shift Quantum Coherente), también fueron determinados en los mismos instrumentos usando las secuencias de pulsos estándares proporcionadas por estos instrumentos. Los espectros de masas (EM) de alta resolución se determinaron por medio de un cromatógrafo de líquidos con detector de masas (LC/MS) Agilent MSD-TOF en una columna Phenomenex Luna 5U C18, 250 x 10,00 mm 5 μm . Este consistió en utilizar como fase móvil una mezcla de H_2O : MeCN 8:2 con 0.1% de HCOOH, variando esta razón hasta MeCN 100 % en 30 minutos. Los espectros de alta resolución fueron obtenidos mediante el método ESI en modo positivo (ElectroSpray Ionization) como método de ionización.

5.4 Método Mosher

Procedimiento General de esterificación. Los ésteres fueron preparados con el correspondiente (R)-metoxi-L-ácidofenilacético (MPA) en presencia de dicitclohexilcarbodiimida (DCC) y 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (catalizador); bajo una atmósfera de nitrógeno y utilizando diclorometano como disolvente. La reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente por 2 horas. La reacción (capa orgánica) fue lavada por partición líquido-líquido con HCl (1 M), saturado con NaHCO₃ y NaCl, la cual se secó con sulfato de magnesio (Mg₂SO₄). Posteriormente se rotaevaporó a presión reducida hasta obtener el éster. La purificación se logró por HPLC de fase reversa, utilizando un método de 25-100% MeCN: H₂O por 40 minutos en una columna C8 [Columna Phenomenex Luna 5U C8 (2) 100, 250 x 10,00 mm 5 micrones].

Posteriormente a la purificación de los productos, se corrió un espectro de protones ¹H RMN a dos diferentes temperaturas a 20° C y -20° C, los cuales se obtuvieron utilizando cloroformo deuterado como disolvente (CD₃OD δ_H 3.34 ppm).

5.5 Ensayos biológicos

El extracto de esponja así como las fracciones y los compuestos puros obtenidos fueron probados mediante los bioensayos que se describen a continuación:

5.5.1 BACE-1

Para este bioensayo se utilizó el kit HitHunter β -secretasa, el cual es un bioensayo en el que está involucrada la inhibición de la enzima β -secretasa, relacionada con importantes funciones biológicas de la enfermedad de Alzheimer. Este bioensayo utiliza un sustrato de proteasa cíclica que rompe proteolíticamente la enzima β -secretasa y el dominio ED, que es un fragmento de péptido pequeño de la β -galactosidasa (β -gal). El péptido cíclico tiene una actividad mínima complementaria con la enzima y un fragmento inactivo de β -gal. La incubación del péptido cíclico con la enzima β -secretasa resulta en el rompimiento para formar un péptido lineal con el dominio ED que complementa con la enzima para la formación de la enzima activa β -gal, la cual subsecuentemente hidroliza el sustrato de manera luminiscente para la detección en un microplato (Naqvi *et al*, 2004). Los extractos se probaron a una concentración de $50\mu\text{g mL}^{-1}$ en DMSO y se incubaron por 16 horas, posteriormente se leyeron los microplatos utilizando el programa PolarStar, con el equipo Flustar con microplate Corning costar 3610.

5.5.2 Actividad antimicrobial

Las pruebas de actividad antibiótica fueron evaluadas contra células bacterianas de *Staphylococcus aureus* resistente a metacilina (MRSA), *Staphylococcus aureus* (SA), *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina (VREF), *Escherichia coli* (EC) y el hongo *Candida albicans* (CA). Los extractos se probaron a una concentración de 100 mg mL^{-1} en

DMSO y se obtuvo la concentración inhibitoria media (IC_{50}) en $\mu\text{g mL}^{-1}$; para lo cual se empleó el método de dilución y se leyó su absorbancia a 420 y 620 nm en un equipo Thermo Labsystems Multiskan MCC/340.

Preparación de medios de cultivo y activación de cepas bacterianas:

Los medios de cultivo se prepararon según indicaciones del proveedor.

Las bacterias se descongelaron en un baño a 37° C. Del criopreservado se tomaron 30 μl del patógeno y se vaciaron en 5ml del respectivo medio y se pusieron a incubar a 37° C por 15 horas.

Al segundo día las muestras se prepararon en viales de 0.5 mL disueltas en DMSO. Primeramente se pusieron a calentar los medios de cada uno de los patógenos a 37° C y se vaciaron 30 mL en cajas Petri. Los cultivos de patógenos incubados dentro de una campana de seguridad nivel 2, se diluyeron 2 veces; primeramente en los 5 mL del cultivo anteriormente preparado y después cuando se sembraron en las cajas Petri con medio; utilizando las condiciones óptimas para cada cepa (Tabla I).

Posteriormente se añadieron 200 μL de la dilución en cada pozo de un plato de 96 pozos, y la muestra por triplicado (28 muestras por plato). Se utilizó DMSO como control negativo y los antibióticos como control positivo (Tabla I). Las placas se incubaron a 37° C por 15 minutos y se leyeron en el espectrofotómetro a 405 y 620 nm, siendo ésta la lectura inicial o blanco. Posteriormente, las cepas de EC se dejaron incubar por 9 horas más y se leyó nuevamente su absorbancia a esas mismas longitudes de onda. Para realizar la segunda lectura, en el caso de MRSA y SA la incubación fue de 12 horas, para VREF de 16 horas y para CA de 24 horas.

Tabla I. Condiciones necesarias para la realización de los bioensayos antimicrobianos.

Patógeno (# de cepa)	Primera dilución (μL)	Segunda dilución (μL)	μL de muestra utilizado	Control positivo (Antibiótico)	Medio de cultivo
EC (ATCC 25922)	0.5	50	1	Gentamicina	LB broth (Luria Bertani)
SA (ATCC 25923)	1	50	1	Vancomicina	Tryptic Soy Broth
MRSA (ATCC 43400)	10	50	0.5	Vancomicina	Tryptic Soy Broth
VREF (ATCC 700221)	10	50	1	Chloramphenicol	Enterococcal broth
CA	10	200	0.5	Amphotericina B	Saboraud-Dextrose Broth (SB) o Yeast Mold Broth (YM)

5.5.3 Ensayo SRB (Sulforhodamina B)

Las pruebas de actividad citotóxica contra células de adenocarcinoma de ovario humano (SKOV-3) fueron realizadas en el Cancer Research Center of Hawai'i (CRCH). Para dicha evaluación los extractos probados se encontraban a una concentración de 10mgml^{-1} .

Se utilizaron células SKOV-3 criopreservadas y cultivadas en un medio de crecimiento de alto contenido de glucosa DME con 5% de Suero Fetal Bovino (FBS) y 0.01% de sulfato de gentamicina.

Una vez obtenidas las células, se utilizaron platos de 96 pozos y un hemocitómetro para calcular la concentración aproximada de 20,000 células por pozo. Con ayuda de una pipeta multicanal se añadieron asépticamente $200\mu\text{L}$ de la suspensión celular a cada pozo, mezclando constantemente la suspensión celular inicial para evitar el asentamiento de las células. El plato se dejó incubar toda la noche a 37°C .

Al segundo día se agregaron los extractos crudos de la muestra de esponja disueltos en DMSO. Se agregó asépticamente 0.5 μL de un stock de 10mgmL^{-1} por triplicado para una concentración final de $25\ \mu\text{gmL}^{-1}$ del extracto crudo. Se utilizó DMSO como control negativo y se dejó incubar el plato a 37°C por dos días.

Al cuarto día se detuvo el bioensayo fijando las células. Primeramente se descartó el medio del plato y se añadió cloro. Posteriormente se agregó dentro del plato una solución de ácido tricloroacético al 10% y se dejó fijar por 30 minutos a temperatura ambiente. Después de este tiempo, se descartó el líquido y se enjuagó el plato delicadamente cuatro veces con agua destilada utilizando una pizeta.

Posteriormente se agregaron 100 μL de SRB (0.4g en 100mL con ácido acético al 1% en agua) en cada pozo. Se dejó reposar por 30 minutos y se descartó nuevamente la solución. Se enjuagó 3 veces suavemente con ácido acético al 3% utilizando una pizeta. Se agregaron 200 μL de Tris base 10mM a cada pozo, asegurando de mezclar bien el contenido.

Finalmente el plato fue leído a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro y los resultados fueron comparados con los controles negativos de DMSO.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A partir de la extracción de la esponja con acetato de etilo se obtuvieron 600 mg de extracto crudo, del cual después de su filtración mediante gel de sílice fase reversa C-8, se obtuvieron 297.7 mg de extracto crudo libre de precipitados (EAE).

En la segunda extracción de la esponja, la cual fue hecha con metanol se obtuvieron 5.63 gramos de extracto crudo (EM).

Teniendo ambos extractos crudos (EAE y EM), se realizaron los bioensayos BACE-1, antimicrobianos y SKOV-3, con los cuales fue posible observar los porcentajes de bioactividad, considerándose como extracto con potencial bioactivo, aquel que presentó un porcentaje de actividad mayor a 60% (Tabla II).

Tabla II. Porcentajes de actividad de los extractos crudos de la esponja en los diferentes bioensayos realizados.

Extracto	BACE I (50µg mL ⁻¹)	Antimicrobiano (250µg mL ⁻¹)					SKOV-3 (25µg mL ⁻¹)
		CA	EC	MRSA	SA	VREF	
EAE	66.66 %	0.0%	4.0%	90.0%	0.0%	0.0%	4.0%
EM	0.0%	0.0%	0.0%	56.0%	10.0%	16.0%	0.0%

Debido a los altos porcentajes presentados por el extracto de acetato de etilo, tanto en el bioensayo BACE-1, como con la cepa MRSA (66.66 y 90.0%, respectivamente), se decidió separar este extracto (297.7 mg) mediante HPLC, con inyecciones de 20mg en 50µL, debido a que éstas fueron las condiciones óptimas mediante las cuales se observaron los diferentes compuestos presentes en el extracto, obteniéndose así 20 fracciones (Fig. 5). Además se colectaron otras dos fracciones (21 y 22) de lavado de columna con 100% metanol (MeOH) y 100% isopropanol (IsoOH), para asegurar que no se perdiera nada del extracto crudo.

Una vez colectadas y eliminado el disolvente de las fracciones, se pesaron, y se les determinó su bioactividad contra la enzima BACE-1 y la cepa bacteriana MRSA (Tabla III), asimismo se determinaron sus espectros de ^1H RMN y de masas; para así poder guiar y purificar las fracciones de interés. Cabe mencionar que mediante la determinación de los espectros de masas y de ^1H RMN se decidió continuar con la purificación de los compuestos no solo desde el punto de vista de bioactividad sino desde el punto de vista de su estructura química.

Tabla III. Porcentajes de actividad de las 22 fracciones obtenidas del extracto crudo de acetato de etilo de la muestra de esponja mediante HPLC.

Fracción No.	Peso (mg)	Bioactividad en %	
		BACE I ($30\mu\text{g mL}^{-1}$)	MRSA ($50\mu\text{g}\mu\text{L}^{-1}$)
1	2.7	42.47	1.0
2	5.3	42.24	55.0
3	4.6	65.14	18.0
4	6.7	67.64	25.0
5	5.9	68.41	19.0
6	10.6	69.42	8.0
7	5.5	76.74	64.0
8	3.7	56.99	17.0
9	4.2	0.0	12.0
10	5.2	0.0	97.0
11	6.0	0.0	99.0
12	3.4	0.0	35.0
13	3.1	0.0	30.0
14	2.6	0.0	12.0
15	1.2	0.0	21.0
16	6.6	1.25	96.0
17	4.4	0.0	60.0
18	3.4	0.0	35.0
19	3.1	0.0	34.0
20	6.4	0.0	27.0
21	143.1	0.0	15.0
22	8.0	27.01	0.0

Como se puede observar en la Tabla III, fueron diferentes las fracciones que mostraron actividad contra BACE-1 y MRSA, así como las fracciones que mostraron pesos moleculares únicos no reportados con anterioridad en la base de datos SciFinder Scholar y MarinLit. Debido a las características antes mencionadas, las fracciones 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11 y 13 resultaron ser las más interesantes, tanto desde el punto de vista espectroscópico, como desde el punto de vista de bioactividad.

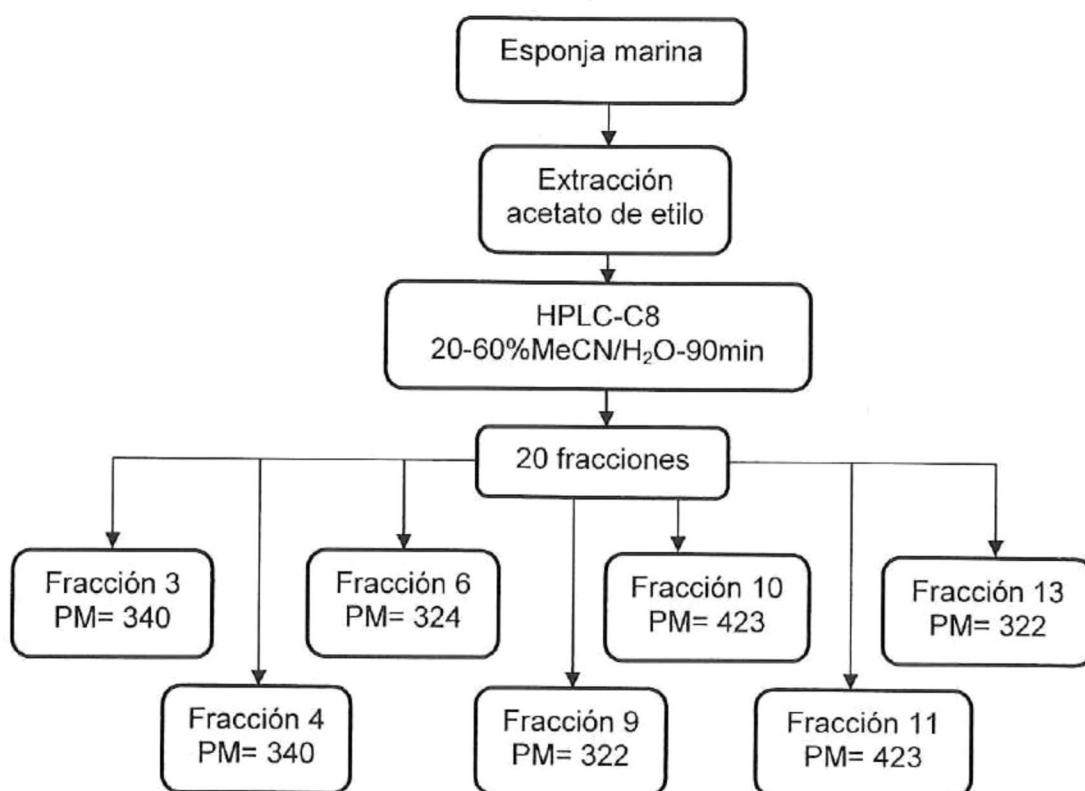


Figura 5. Diagrama de flujo del proceso de separación de los compuestos de la fracción 3, 4, 6, 9, 10, 11 y 13.

Fracción No. 3

De esta fracción se obtuvieron 4.6 mg, los cuales fueron purificados mediante HPLC fase reversa con MeCN y H₂O con 0.1% de HCOOH como fase móvil, en un gradiente de 30-60% durante 25 minutos con un flujo de 3 mLmin⁻¹.

El cromatograma reveló tres compuestos, de los que se colectaron 1.7, 2.7 y 0.8 mg, respectivamente. Debido a que el compuesto número 2 se encontraba puro, se procedió a obtener los datos espectroscópicos para su elucidación estructural. Al determinar el espectro de masas de alta resolución ESI-TOF por el método de electrospray, se encontró un ion a m/z 341.1392 correspondiente a M⁺1 con un error 0.9ppm, calculado para la fórmula C₂₀H₂₁O₅, así como se observaron las señales a 2M⁺Na y 3M⁺Na (Anexo 4).

El espectro de ¹H RMN (500 MHz, DMSO-d₆) (Tabla V, Anexo 2) presentó las siguientes señales importantes: dos singuletes a δ 7.93 y 8.49 ppm característicos de protones aromáticos y otro singulete a δ 1.49 característico de un grupo metilo. Con base al espectro protónico y a la integración de las señales fue posible estimar 18 protones. Debido al peso molecular del compuesto y a los 18 protones observados en el ¹H RMN, faltarían 2 protones, los cuales podrían ser intercambiables, sugiriendo tener 2 protones de grupos hidroxilos (OH).

Por medio de la determinación simultánea de los espectros de ¹³C RMN (Anexo 3), y los espectros de dos dimensiones (COSY, HSQC y HMBC) se determinó que la molécula contenía un total de 20 carbonos, determinándose el tipo de carbono de cada señal (Tabla V, Anexo 3). Con dicha información y realizando la búsqueda en bases de datos (SciFinder Scholar y MarinLit), se encontró que el compuesto aislado era Xestosaprol A, cuya fórmula molecular es C₂₀H₂₀O₅ (Fig. 6), aislado de la esponja

Xestospongia sapra por Kobayashi y colaboradores (1992). Para comprobar si se trataba de dicho compuesto, se determinaron sus propiedades físicas, obteniendo una rotación específica de $[\alpha]_D^{23} = -28.0$ (c, 0.1 g/100mL, MeOH) y absorciones en el UV λ_{\max} MeOH a 249 y 326 nm. El espectro de infrarrojo mostró señales características para grupos hidroxilos, aromáticos, y carbonilos a ν_{\max} 3402 (br), 1653, 1589 cm^{-1} respectivamente, los cuales coinciden con las reportadas por Kobayashi (1992) (Anexo 1). El espectro de infrarrojo nos confirmó la presencia de protones intercambiables debido a grupos hidroxilos.

Una vez elucidado el compuesto se realizó el bioensayo BACE-1, para verificar si éste es el responsable de la actividad de la fracción, obteniéndose datos no satisfactorios, ya que el porcentaje de actividad del compuesto Xestosaprol A fue de 19.87% a una concentración de 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y de 13.56 % a una concentración de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Por lo que aunque este compuesto fue el más abundante en dicha fracción, no es el responsable del 65.14% de actividad obtenido anteriormente.

Debido a estos resultados, se decidió realizar los bioensayos a los otros dos compuestos obtenidos de esta fracción. Sin embargo, los resultados no fueron satisfactorios, observando un porcentaje de actividad menor al 60% en el bioensayo de inhibición de la enzima BACE-1 (Tabla IV). Dichos resultados, revelan que posiblemente hubo una degradación de los compuestos que estaban provocando dicha actividad. Para eliminar el factor de efecto sinérgico de los compuestos, se volvió a realizar el bioensayo de la mezcla de los compuestos obteniendo un valor de 33.05% de actividad, que a pesar de ser mayor al porcentaje obtenido por separado, no volvió a reflejar la actividad de 65% obtenido anteriormente. Este segundo ensayo evidenció una degradación de los compuestos responsables de la actividad.

Tabla IV. Subfracciones obtenidas de la fracción 3 y su respectivo porcentaje de actividad contra la enzima BACE-1. En paréntesis la desviación estándar.

Subfracción	Bioactividad en % ($30 \mu\text{g mL}^{-1}$)
1	8.64 (10.90)
2 (Xestosaprol A) M+H= 341	19.87 (3.83)
3 (Análogo a Xestosaprol A) M+H= 341	5.54 (11.77)
4	6.6 (2.95)

A pesar de no haber presentado actividad en BACE-1, se ha reportado por Kobayashi y colaboradores (1992) que Xestosaprol A ha mostrado inhibición en el bioensayo de ADN topoisomerasa I con MIC de $12.5 \mu\text{g mL}^{-1}$.

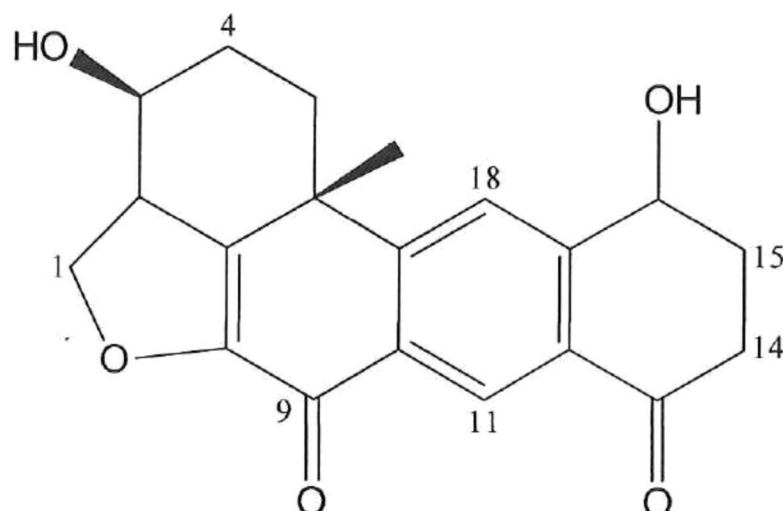


Figura 6. Estructura del compuesto Xestosaprol A, Kobayashi y colaboradores (1992) aislado de la fracción 3.

Tabla V. Señales de resonancia magnética nuclear protónica y de carbono trece (^1H y ^{13}C RMN) del compuesto Xestosaprol A en DMSO- d_6 . Los números entre paréntesis denotan el número de protones adheridos a cada carbono. s=singulete, m=multiplete, br=ancha.

Carbón #	^{13}C δ (ppm)	^1H δ ppm
1	70.7 (2)	4.49 m
2	46.6 (1)	3.52 m
3	66.2 (1)	3.90 (br) s
4	28.2 (2)	1.93 m, 1.75 m
5	33.7 (2)	2.09 m, 1.66 m
6	38.6 (0)	-
7	141.0 (0)	-
8	146.5 (0)	-
9	174.2 (0)	-
10	129.4 (0)	-
11	124.2 (0)	-
12	130.9 (0)	-
13	196.4 (0)	-
14	35.5 (2)	2.71 m
15	31.6 (2)	2.26 m, 2.00 m
16	66.1 (1)	4.89 m
17	150.4 (0)	-
18	125.1 (1)	7.93 s
19	156.1 (0)	-
20	24.4 (3)	1.49 s

Fracción No. 4

De esta fracción fueron purificados 6.7 mg mediante HPLC fase reversa teniendo como fase móvil, MeOH y H₂O con 0.1% de HCOOH. Como método se utilizó un gradiente de 40-45% MeOH/H₂O en 40 minutos con un flujo de 3mL/min, inyectando 0.5mg/50µL. Se obtuvieron 4 compuestos principales en las siguientes cantidades: 1.4, 1.4, 1 y 0.2 mg, y el número 5 que corresponde a los lavados de MeOH, de los que el compuesto número 3 se encontraba puro, presentando un tiempo de retención de 20 minutos. Posteriormente, se procedió a obtener los espectros de RMN para su elucidación.

El espectro de masas en su modo ESI positivo reveló el ion (M⁺H) a m/z 341.1403 una con un error de 4.1 ppm (Anexo 7). Una vez obtenidos y analizados los espectros de ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) (Anexo 5 y 6) y HMBC y haciendo una búsqueda en la base de datos, se observó que se trataba del compuesto: 3,13-Dideoxo-1,2,14,15-tetrahydro-3,13-dihidrohalenaquinona cuya fórmula molecular es C₂₀H₂₀O₅ (Fig. 7).

Una vez elucidado el compuesto se realizó nuevamente el bioensayo con BACE-1 y se obtuvo un porcentaje de actividad de 0.68% a una concentración de 30 µg mL⁻¹ y 9.69% a 1µg mL⁻¹, como se observa, este compuesto no es el responsable de la actividad obtenida anteriormente de 67.64%.

Posteriormente se decidió probar la actividad de las subfracciones obtenidas de esta fracción, para encontrar el compuesto responsable de dicha bioactividad. En esta fracción los resultados mostraron que el lavado con 100% metanol es el responsable de dicha bioactividad, lamentablemente, el lavado es una mezcla de compuestos, los cuales debido a la pequeña cantidad de muestra recuperada no fue posible aislarlos para así caracterizar los compuestos (Tabla VI).

Tabla VI. Subfracciones obtenidas de la fracción 4 y su respectivo porcentaje de actividad contra la enzima BACE-1. En paréntesis la desviación estándar.

Subfracción	Bioactividad en % (30 $\mu\text{g mL}^{-1}$)
1	29.06 (5.52)
2	19.13 (14.18)
3	0.68% (16.42)
4	18.89 (8.56)
5	60.29 (2.91)

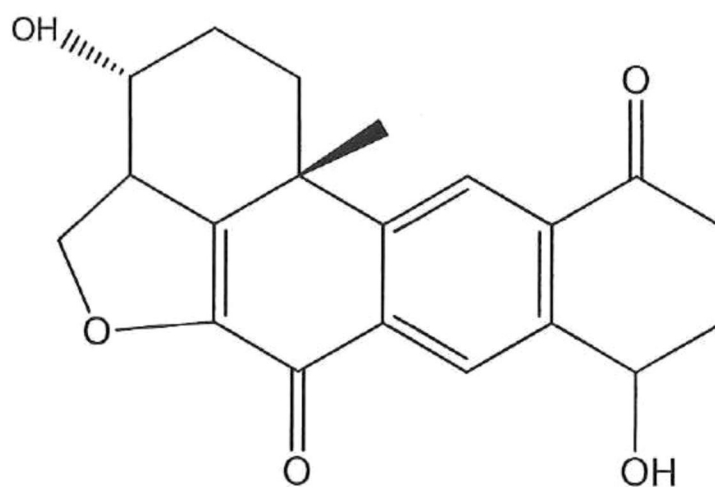


Figura 7. Estructura del compuesto 3,13-Dideoxo-1, 2, 14,15-tetrahidro-3,13-dihydroxyhalenaquinona.

Fracción No. 5

Fueron purificados 5.9 mg de esta fracción mediante HPLC fase reversa teniendo como fase móvil, MeOH: H₂O con 0.1% de HCOOH. Como método se utilizó un gradiente de 40-45% MeOH/H₂O durante 40 minutos con un flujo de 3mLmin⁻¹, inyectando 0.5mg/50µL. Dicha fracción se separó en 9 subfracciones principales.

Cabe mencionar que esta fracción presentó una actividad de 68.41% de inhibición contra la enzima BACE-1, por lo cual se decidió probar cada una de las subfracciones obtenidas para así continuar con el aislamiento de los compuestos activos (Tabla VII).

Tabla VII. Subfracciones obtenidas de la fracción 5 y su respectivo porcentaje de actividad contra la enzima BACE 1. En paréntesis la desviación estándar.

Subfracción	Bioactividad en % (30 µg mL ⁻¹)
1	10.26 (6.04)
2	17.7 (4.47)
3	14.08 (3.69)
4	21.97 (9.09)
5	50.06 (7.85)
6	28.94 (10.07)
7	58.84 (3.82)
8	48.45 (5.87)
9	50.48 (4.13)

Como se observa en la tabla VII, las subfracciones 5, 7 y 9 (lavado con MeOH) tienen un porcentaje de inhibición del más del 50%. Lamentablemente tanto para la subfracción 5 como la 7 se recuperó solamente 100 y 500 μg respectivamente, comprobando por medio del espectro de masas que se trataba de una mezcla de más de 2 compuestos, por lo que no se pudo realizar la separación de dichos compuestos. Debido a que se obtuvieron 1.5 mg de la subfracción 9 y su porcentaje de inhibición fue mayor al 50%, se decidió realizar una separación por medio de HPLC fase reversa teniendo como fase móvil, MeCN: H₂O con 0.1% de HCOOH.

Como método se utilizó un gradiente de 10-100% MeCN:H₂O durante 25 minutos con un flujo de 3mLmin^{-1} , inyectando 0.5mg/50 μL . Dicha subfracción se separó en 12 subfracciones en las cuales no fue posible el aislamiento de compuestos puros debido a la cantidad de masa recuperada. Del compuesto que más cantidad se recuperó, fueron 300 μg , el cual analizando su espectro de masas reveló un ión molecular (M^+H) de 341 uma, el cual nos evidencia un compuesto análogo a los anteriormente aislados.

Fracción No. 6

De esta fracción fueron purificados 10.6 mg mediante HPLC fase reversa teniendo como fase móvil, MeOH: H₂O con 0.1% de HCOOH. Como método se utilizó un gradiente de 40-60% MeOH:H₂O durante 40 minutos con un flujo de 3mLmin⁻¹, inyectando 1mg/50µl. Dicha fracción se separó en 4 compuestos principales, obteniéndose el tercer compuesto de manera pura (1mg) con un tiempo de retención de 22 minutos.

Con ayuda del espectro de masas y observando las señales de ¹H RMN, fue posible elucidar el compuesto, cuyo ión molecular (M⁺H) se reveló a 325.1420 uma con un error de 6.1 ppm (Anexo 9) y cuyas señales de resonancia (500 MHz, CDCl₃) (Anexo 8) coincidían con las reportadas por Schmitz en 1988, siendo el compuesto 13,14,15,16-Tetrahydroxestoquinol con la fórmula molecular de C₂₀H₂₀O₄ (Fig. 8).

Una vez elucidado el compuesto se realizó bioensayo BACE-1 para conocer la actividad del compuesto puro, los resultados mostraron un porcentaje de actividad de 17.28% a 30 µgmL⁻¹, lo cual nos revela que este compuesto no es el responsable de la actividad obtenida anteriormente de 69.42%.

Posteriormente se decidió probar la actividad de las subfracciones obtenidas, para así conocer la parte activa. En esta fracción los resultados mostraron que la actividad no fue encontrada en ninguna de las subfracciones ni en la suma de ellas. De nueva cuenta, aparentemente hubo una degradación de los compuestos responsables de la inhibición de la enzima (Tabla VIII).

Tabla VIII. Subfracciones obtenidas de la fracción 6 y su respectivo porcentaje de actividad contra la enzima BACE 1. En paréntesis la desviación estándar.

Subfracción	Bioactividad en % ($30 \mu\text{g mL}^{-1}$)
1	17.04 (4.83)
2	17.23 (8.46)
3	17.28% (6.46)
4	19.18 (2.73)
5	19.41 (3.40)
Suma de subfracciones	4.17 (1.71)

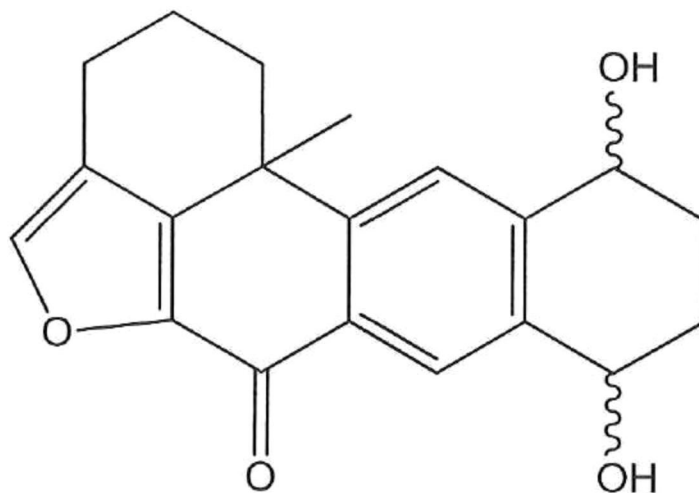


Figura 8. Estructura del compuesto 13, 14,15,16-Tetrahidroxestoquinol.

Fracción No. 7

Fueron purificados 5.5 mg mediante HPLC fase reversa teniendo como fase móvil, MeCN:H₂O con 0.1% de HCOOH. Como método se utilizó un gradiente de 25-45% MeCN:H₂O durante 50 minutos con un flujo de 3mLmin⁻¹, inyectando 0.5mg/50µL. Dicha fracción se separó en 13 subfracciones principales.

Cabe mencionar que esta fracción reportó una actividad de 74.74% de inhibición contra la enzima BACE-1, por lo cual se decidió probar cada una de las subfracciones para así continuar con el aislamiento de los compuestos activos (Tabla IX).

Como se observa en la tabla IX, la suma de subfracciones es la que muestra mayor porcentaje de actividad, aunque no de igual magnitud que la primera vez analizada. La degradación de los compuestos podría ser la causa de esta pérdida en la actividad. Cabe mencionar que cada una de las subfracciones fue analizada por espectro de masas, el cual nos reveló que cada una de ellas era una mezcla de compuestos. Por lo cual su separación no fue posible, debido a que fueron 800 µg la mayor cantidad recuperada.

Tabla IX. Subfracciones obtenidas de la fracción 7 y su respectivo porcentaje de actividad contra la enzima BACE-1. En paréntesis la desviación estándar.

Subfracción	Bioactividad en % (30 µg mL⁻¹)
1	18.03 (10.99)
2	8.19 (12.74)
3	14.08 (3.69)
4	33.3 (0.95)
5	34.89 (4.41)
6	46.16 (6.04)
7	45.37 (10.24)
8	7.91 (13.15)
9	20.1 (6.93)
10	5.62 (6.59)
11	0.56 (13.84)
12	22.53 (4.31)
13	0.28 (17.36)
Suma de subfracciones	50.93 (5.48)

Fracción No. 9

La fracción 9 fue aislada como un compuesto cristalino de color naranja (4.2mg), cuya fórmula molecular es $C_{20}H_{18}O_4$, la cual fue establecida mediante espectrometría de masas de alta resolución ESI-TOF. Con base en este mismo análisis se obtuvo la presencia de un ión molecular $[M^+H]$ m/z (obsd) de 323.1291 con un error de 2.4 ppm, con un patrón de fragmentación de M^+H , $2M^+H$ y $3M^+Na$ (Anexo 17). Su rotación específica mostró un valor $[\alpha]_D^{23} = +18.8$ (c, 0.1g/100mL, MeOH) y presentó longitudes de máxima absorción en el UV a λ_{max} 255 nm MeOH ($\log \epsilon = 9.76$), a 312 nm ($\log \epsilon = 8.60$). Por otro lado, el espectro de IR mostró absorciones para grupos hidroxilos, insaturaciones, alcanos, carbonilos, éteres a ν_{max} 3398, 1669, 1600, 1202 cm^{-1} (Anexo 10).

El espectro de 1H RMN (500 MHz, MeCN- d_3) (Tabla X, Anexo 11), presentó las siguientes señales: dos singuletes a δ 7.884 y 8.659 ppm que integran para un protón respectivamente y que son característicos de protones aromáticos y que a su vez mostraron correlación con los carbonos a 125.1 y 126.6, respectivamente (Fig. 9a) También se presentó a δ 1.5 ppm, otro singulete característico de un grupo metilo. Se encontraron las señales: dobles de triples (dt) a 2.5 ppm y triples de dobles (ddd) a 1.65 ppm, la primera de ellas con constantes de acoplamiento $J = 13.0$ y 3.6 Hz y la segunda con $J = 13.0$, 13.0 y 4.3 Hz. La J correspondiente a 13.0 Hz en la señal de 2.5 ppm es característica de acoplamientos de protones geminales; observándose que la señal a 1.65 ppm presentó la misma constante de acoplamiento (J), por lo que se dedujo que se trataba de dos protones que se encontraban sustituidos en el mismo carbono, siendo este el 31.9 observado en el espectro HSQC. Este grupo metileno muestra una correlación en el espectro COSY con otras señales de 1H RMN presentadas como multipletes en 2.25 y 2.1 ppm, que están relacionadas ambas al carbono 19.0 ppm (Fig. 8c; Anexo 13).

Por medio de la determinación simultánea de los espectros de ^{13}C RMN, el espectro 2D ^1H - ^{13}C HSQC RMN (Anexos 12 y 14), se determinó que la molécula contenía un total de 20 carbonos, y se determinó el tipo de carbono presente en cada señal. En el caso de la determinación simultánea de 2D ^1H - ^{13}C HSQC RMN se observaron la presencia de 11 carbonos cuaternarios, 3 metinos (CH), 5 metilenos (CH_2) y un metilo (CH_3). Otra señal que se presentó fue un triplete a 7.6 ppm con una constante de acoplamiento de $J= 1.3$ Hz, esta señal solo integró para un protón y aunque no se observó señal de acoplamiento con alguno de los carbonos en el espectro HSQC, si se observaron señales de acoplamiento del protón al carbono en 145.8 ppm en el espectro HMBC (Anexo 15), donde el mismo comportamiento se observa para las señales en 7.8 y 8.5 ppm. Observándose a su vez, que este protón (7.6 ppm) estaba correlacionado con los carbonos en 148.1 y 144.8. En el espectro de ^1H RMN también se presentaron dos señales dd, una a 2.78 y otra a 4.97 ppm con constantes de acoplamiento de $J= 6.3$ y 4.4 Hz y 9 y 4.1 Hz por lo que se buscaron las señales con las que se estuvieran acoplando. Desafortunadamente, no se presentaron señales definidas con base a las cuales se pudieran determinar las constantes de acoplamiento, por lo que se caracterizaron como multipletes (m) entre 2.6-2.7 ppm y 2.07-2.35 ppm. Dado que el espectro en 2D ^1H - ^1H COSY RMN presentó correlación entre estos protones (4.97 y 2.07-2.35), se dedujo que se encontraban substituidos en carbonos vecinos (Fig. 9b) (Anexo 13). Otras señales presentes en el espectro de ^1H RMN fueron dos señales múltiples a 2.83, 2.6, que con la relación del espectro HSQC fue posible determinar que integraban para 2 protones y así se determinó a que carbono estaban relacionados.

El espectro de ^{13}C RMN (125 MHz, MeCN-d_3) (Tabla X, Anexo 12) presentó dos señales características para carbonos de carbonilos a 172.1 y 197.5 ppm. Debido a las señales de los protones aromáticos (125.2 y 126.7 ppm) en el espectro HMBC fue posible

observar carbonos aromáticos a 130.7, 133.8, 151.1 y 157.1, así como la relación con los dos carbonos más desplazados a campo bajo (Fig. 9a) Con la información anterior se pueden deducir tres semi-estructuras de la molécula (Fig. 9).

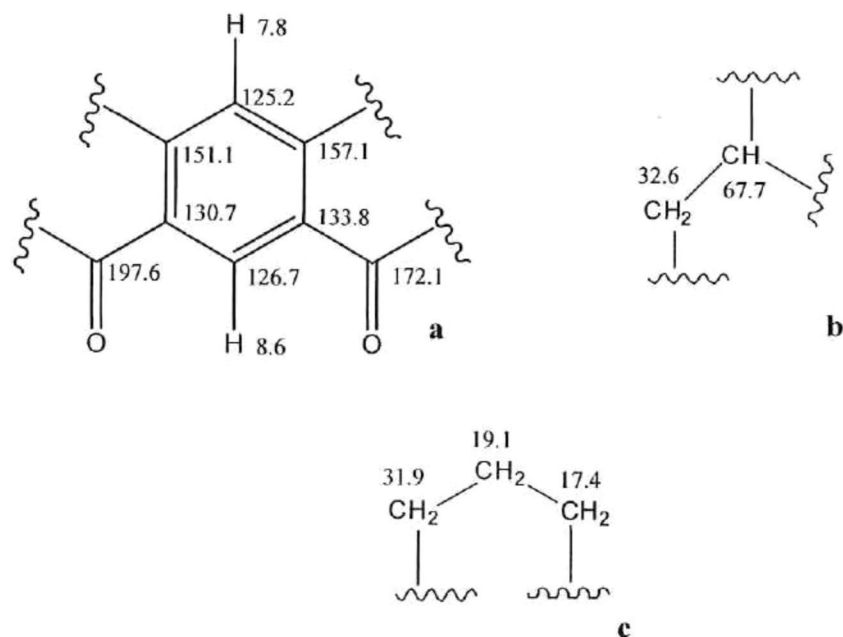


Figura 9. Semi-estructuras del compuesto aislado de la fracción 9.

Con la finalidad de ampliar la información con respecto a las uniones de los fragmentos del compuesto se observó a mayor detalle el espectro ^1H - ^{13}C HMBC RMN para observar las correlaciones entre 2 y 3 enlaces de distancia (Tabla X, Anexo 15). De acuerdo a estos resultados, el carbono en 67.7 interacciona con los carbonos en 130.7 y 151.1 pm, así como son los protones en 7.8, 2.8 y 2.35 ppm, lo que sugiere que las dos semiestructura observadas en la figura 9 (a y b) están interaccionando. A su vez, esto indicó que los carbonos antes mencionados forman un anillo de seis miembros. Los protones del carbón en 17.3 ppm muestra una marcada correlación con el protón del carbón a 145.8 ppm, así como éste interacciona con los carbonos a 144.8 y 148.1 ppm.

Finalmente, esta estructura interacciona con el carbono a 31.9 ppm, el cual a su vez está correlacionado con el carbono aromático a 157.1 ppm. También se observa la interacción del grupo metilo con los carbonos en 157.1, 148.1 y 37.8. Otra información que se obtuvo fue la correlación NOESY (Anexo 16), la cual nos mostró una correlación entre el grupo metilo y el protón de 7.8 ppm; que a su vez mostró una fuerte correlación con el protón a 4.9 ppm. Además de otras interacciones que refuerzan la nueva estructura relativa del compuesto (Tabla X, Fig. 10)

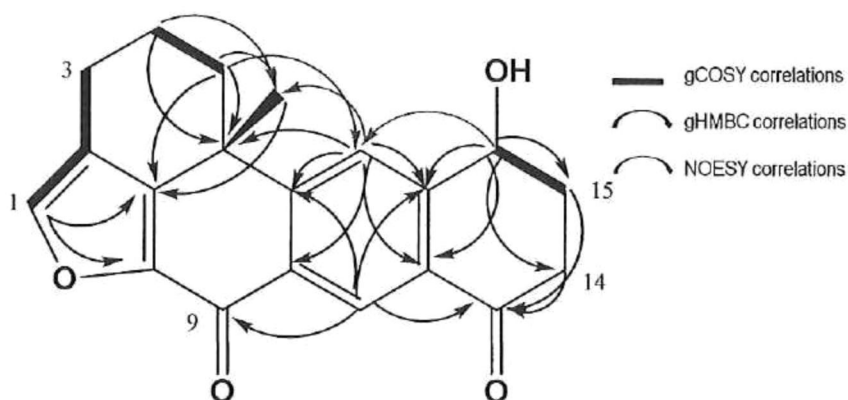


Figura 10. Estructura propuesta del compuesto 9 con base a las correlaciones observadas en los espectros.

Analizando la información la molécula tiene una masa molecular de 322.1291, de los cuales 240 una corresponden a 20 carbonos, 17 una a 17 hidrógenos y 32 una a 2 oxígenos de los carbonilos observados. De esta manera, faltarían 33 unidades, las cuales corresponderían a 2 oxígenos y un protón, el cual sugiere la presencia de un grupo hidroxilo, el cual era sugerido en el espectro de infrarrojo, de esta manera la fórmula molecular sugerida desde el principio se ajusta a la nueva estructura obtenida ($C_{20}H_{18}O_4$). Esta fórmula presenta 12 grados de insaturación, los cuales concuerdan con la estructura propuesta (Fig. 10). Al revisar las bases de datos, SciFinder y MarinLit de la Universidad

de Hawai'i, no se encontró molécula alguna que tuviera el peso molecular y la estructura propuesta.

Para la obtención de la configuración absoluta del compuesto se decidió realizar la reacción de Mosher, la cual está basada en el uso del efecto diamagnético por la introducción de un anillo bencénico para asignar la estereoquímica de un compuesto orgánico quiral por la comparación de los datos de RMN de los derivados de éster MTPA. En dicho experimento con base solamente a la preparación de un solo éter (derivado R) y a la comparación de los dos espectros de protones ^1H RMN tomados a 2 diferentes temperaturas, fue posible observar los cambios químicos de las señales del protón que se encuentra en la interacción con la formación del éster, así como los protones vecinos. Además de que se realizó un espectro TOCSY para observar de una manera más clara las relaciones entre los protones (Anexos 18, 19, 20 y 21).

Cabe mencionar que las diferencias en las que se basa dicho experimento, se encuentran restando los cambios químicos a la mayor temperatura, en este caso 20°C menos la menor temperatura (-20°C) y comparados con el esquema publicado por Seco y colaboradores en 2004 (Fig. 11). Con base a lo anterior se obtuvieron valores negativos de un lado de la molécula y positivos del otro lado, de esta manera, fue posible determinar que posición se encontraba el grupo hidroxilo (Fig. 12).

A pesar de poder obtener la configuración absoluta del grupo hidroxilo, no fue posible obtener la estereoquímica absoluta del grupo metilo; a pesar de ello, la estructura de la molécula queda confirmada y con nombre que correspondería según la UIQPA es de: 11-hidroxi-12b-metil-2, 3, 10,11-tetrahidro-1*H*-tetrafenol [5,4-*bc*] furan-6,8(9*H*, 12*bH*)-diona (Fig. 13). Esta estructura es muy parecida al compuesto 13,14,15,16-Tetrahidroxestoquinol reportada previamente por Schmitz *et al.* (1988), con la diferencia que el compuesto reportado por estos autores tiene dos grupos hidroxilos.

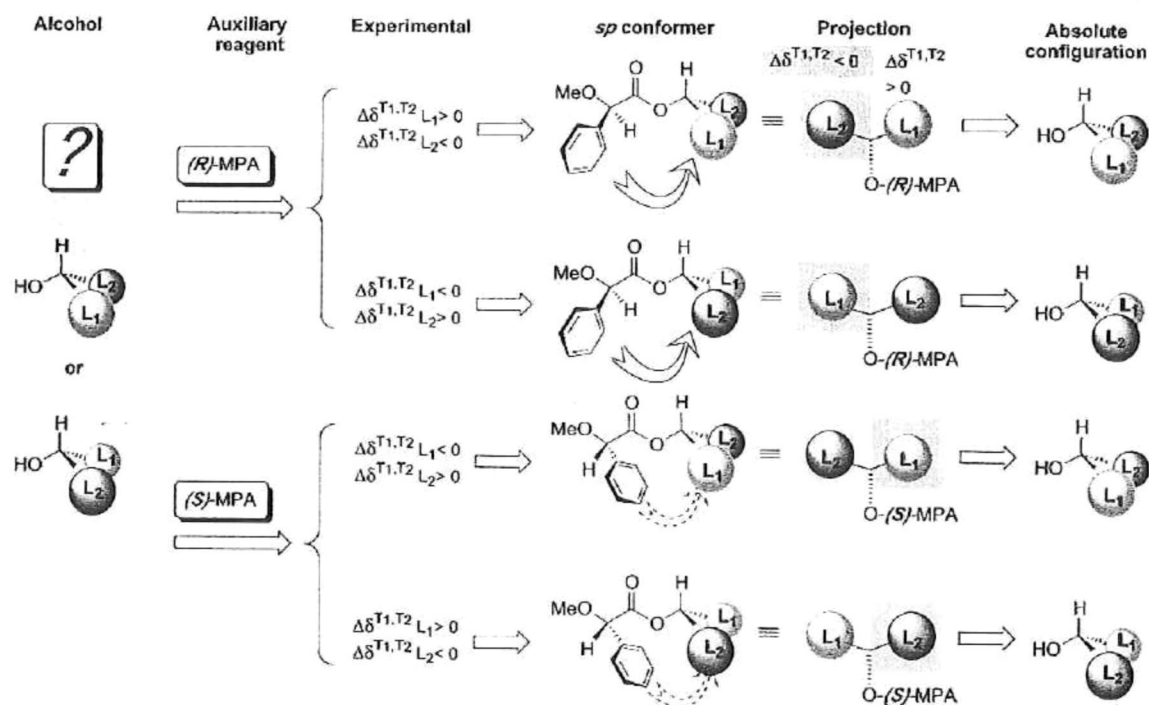


Figura 11. Diagrama para deducir la absoluta configuración de un alcohol con base al experimento de $\Delta\delta^{T_1, T_2}$ en las señales para MPA ésteres, R o S.

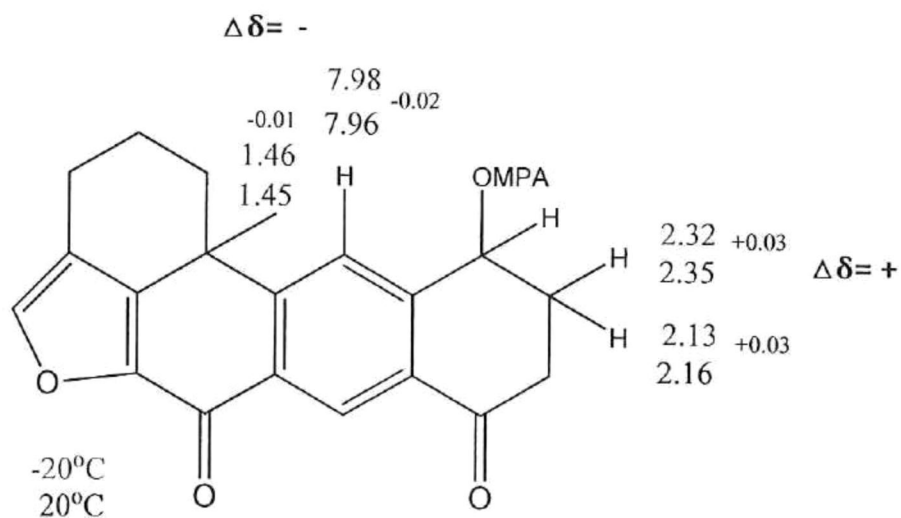


Figura 12. Valores obtenidos después de los espectros de ^1H RMN para determinar la estereoquímica absoluta del grupo hidroxilo en el compuesto 9.

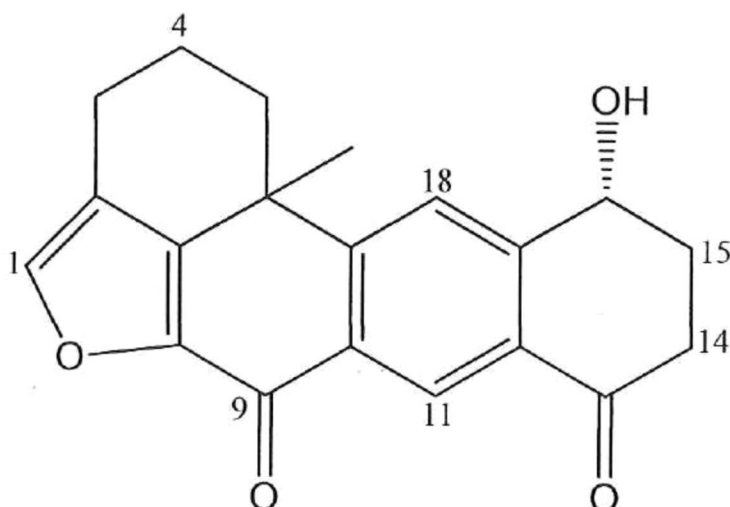


Figura 13. Estructura del compuesto 11-hidroxi-12b-metil-2, 3, 10,11-tetrahydro-1H-tetrafenol [5,4-bc] furan-6,8(9H, 12bH)-diona, purificado de la fracción 9.

Cabe mencionar que cuando se realizó la reacción Mosher para este compuesto se obtuvieron 2 productos, los cuales presentaban el mismo peso molecular (470 uma); por lo que se sospechó que la muestra original se trataba de una mezcla de diastereoisómeros. Debido a dicho resultado, se decidió realizar un espectro de dicroísmo circular (CD spectra), que es comúnmente utilizado para distinguir estereoisómeros. Con dicho experimento se observó que los dos posibles diastereoisómeros son el mismo compuesto (322 uma), ya que su espectro CD mostró un mismo comportamiento; ya que si se hubiera presentado una mezcla de diastereoisómeros, estos hubieran presentado un espectro CD en imagen de espejo (Fig. 14).

La molécula fue analizada para probar su actividad citotóxica (SRB), así como su actividad contra la inhibición de la enzima BACE-1, obteniéndose IC_{50} mayores de $50\mu\text{g mL}^{-1}$ para ambos bioensayos.

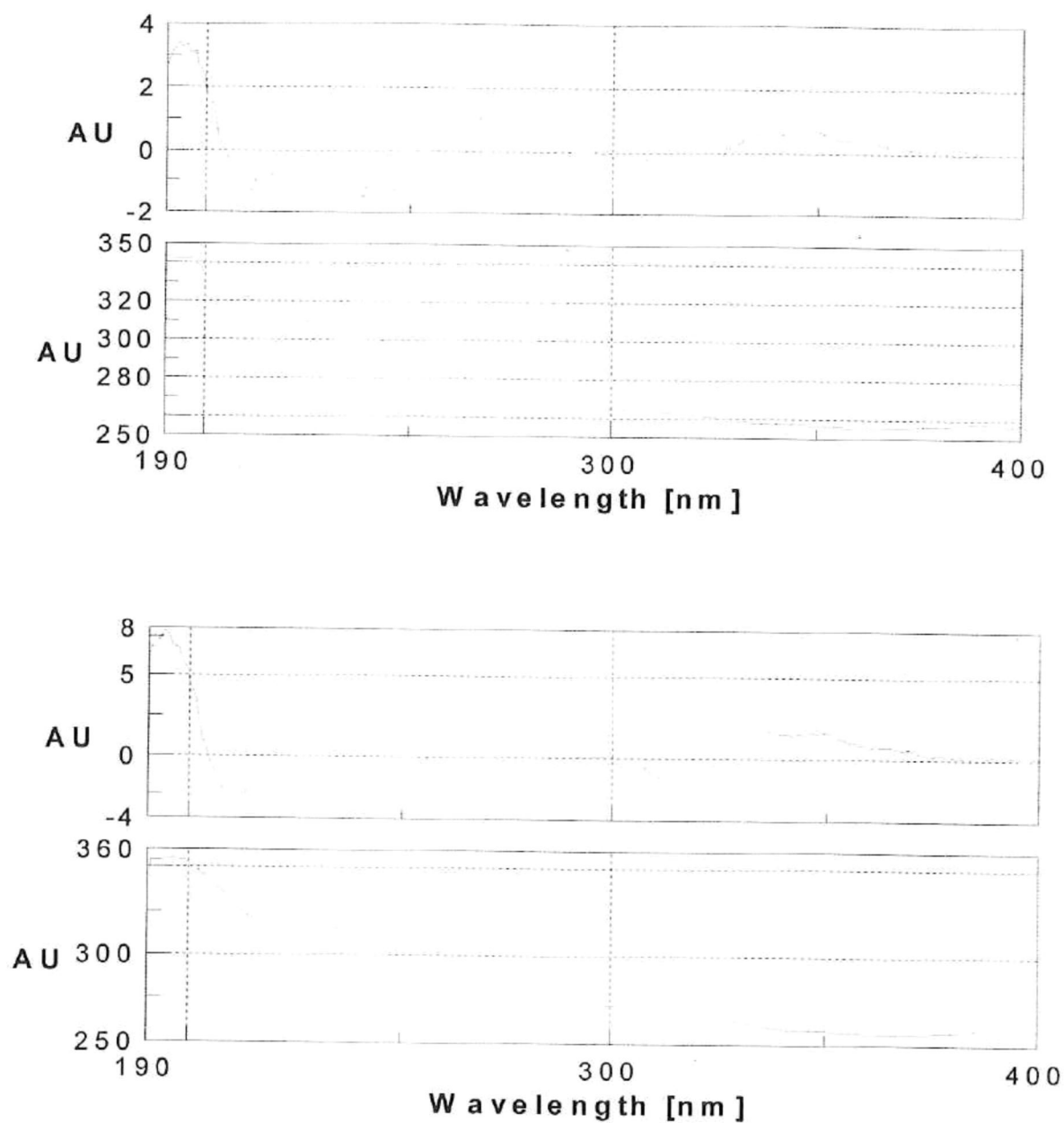


Figura 14. Espectro de dicroísmo circular de los dos materiales de inicio recuperados después de la reacción (322 uma).

Tabla X. Asignaciones de ^{13}C y ^1H RMN para el compuesto 11-hidroxi-12b-metil-2, 3, 10,11-tetrahydro-1*H*-tetrafenol [5,4-*bc*] furan-6,8(9*H*, 12*bH*)-diona de la fracción 9, hechas con base en los experimentos de HSQC, HMBC y COSY. s=singulete, t=tripleto, dd=doble de dobles, m=multiplete, dt=doble de triples, ddd=triple de dobles, br=ancha, ppm=partes por millón, *J*=constante de acoplamiento, Hz=unidades Hertz.

Carbón #	^{13}C δ (ppm)	^1H δ ppm (J, Hz)	HSQC	COSY	HMBC	NOESY
1	145.8	7.6 t (1.3)	C	H-3	C-8, C-7	-
2	122.8	-	C		H-3	-
3	17.3	2.83 m, 2.6 m	CH ₂	H-1	-	-
4	19.0	2.25 m, 2.1 m	CH ₂	H-5	-	H-20
5	31.9	2.5 dt (13, 3.6), 1.65 ddd (13, 13, 4.3)	CH ₂	H-4	C-19, C-7	H-18, H20
6	37.8	-	C	-	H-4, H-5	-
7	148.1	-	C	-	-	-
8	144.8	-	C	-	-	-
9	172.1	-	C	-	H-11, H-18	-
10	133.8	-	C	-	-	-
11	126.6	8.65 s	CH	-	C-17, C-19, C- 9, C-13	-
12	130.7	-	C	-	-	-
13	197.5	-	C	-	H-11, H-18, H-14, H-15	-
14	36.2	2.8 dd (6.3, 4.4) 2.64 m	CH ₂	-	-	-
15	32.6	2.35 m, 2.07 m	CH ₂	H-16	-	-
16	67.7	4.97 dd (9.0, 4.1)	CH	H-15	H-15, H-14, H-18, C-12, C-17	H-18
17	151.1	-	C	-	H-18, H-11	-
18	125.1	7.88 s	CH	-	C-17, C-19 C-12, C-10 C-6, H-16	H-20, H16, H-5
19	157.1	-	C	-	-	-
20	32.4	1.5 s	CH ₃	-	C-19, C- 7, C-6	H-18, H20 H-5, H-4

Fracción No. 10

De esta fracción se obtuvieron 5.2 mg mediante HPLC fase reversa, utilizando como fase móvil 55% MeOH: H₂O con 0.1% de HCOOH a un flujo de 3mLmin⁻¹ por 40 minutos. En dicha separación se obtuvieron tres fracciones, en la cual en la primera fracción se obtuvo la mayor cantidad recuperada de un compuesto, aunque de manera impura, por la cual fue purificada nuevamente en las mismas condiciones, para así obtener 1.6 mg del compuesto cristalino de color amarillo. Con ayuda del espectro de masas y observando las señales de resonancia protónica, fue posible elucidar el compuesto, cuyo ión molecular (M⁺H) se reveló a 424.0826 uma con un error de 5 ppm (Anexo 23) y cuyas señales de ¹H RMN coincidían con las reportadas por Schmitz en 1988, siendo el compuesto Adociaquinona A con fórmula molecular C₂₂H₁₇O₆NS (Fig. 15; Anexo 22). Presentando longitudes de máxima absorción en el UV a λ_{max} 294 nm y 248 nm. Las señales en el espectro de IR mostraron absorciones para aminas secundarias y aromáticos, carbonilos y dobles enlaces a ν_{max} 3392 (br), 1699, 1652 cm⁻¹, respectivamente.

Debido a que esta fracción presentaba un porcentaje de inhibición contra la cepa MRSA del 97%, se determinó la concentración inhibitoria de dicho compuesto, mostrando un IC₅₀ de 9.47 μg/mL⁻¹. Cabe mencionar que el control positivo de dichos bioensayos es la Vancomicina, la cual reporta un IC₅₀ de 1.18 μg/mL⁻¹ contra MRSA.

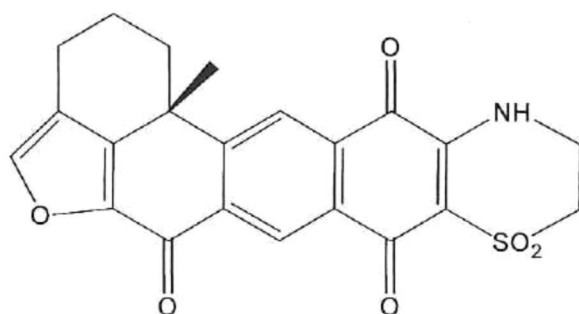


Figura 15. Estructura del compuesto Adociaquinona A.

Fracción No. 11

La fracción 11 fue purificada por medio de HPLC fase reversa con una fase móvil 55% MeOH:H₂O con 0.1% de HCOOH a un flujo de 3mLmin⁻¹ por 40 minutos. Aplicando dicho método se obtuvieron 3 mg del compuesto cristalino de color amarillo, para el cual se obtuvo la fórmula molecular C₂₂H₁₇O₆NS, determinada mediante el espectro de masas de alta resolución, con el cual se obtuvo un ión a m/z 424.0815 con un error de 2.4 ppm, que correspondió al fragmento [M⁺H] (Anexo 25). Debido a que presentó el mismo peso molecular que el compuesto aislado de la fracción 10 y con espectros de resonancia muy similares (Anexo 24), fue así como se dedujo que se trataba de un isómero del compuesto Adociaquinona A, resultando ser el compuesto Adociaquinona B (Fig. 16), el cual fue aislado por Schmitz y colaboradores en 1988.

Cabe mencionar que la estereoquímica absoluta y síntesis, tanto de Adociaquinona A como B fue reportada hasta 1995 por Harada y colaboradores. Dicho compuesto presentó longitudes de máxima absorción en el UV a λ_{\max} en MeOH de 333 nm y 294 nm. El espectro de IR presentó absorciones para grupos de aminas aromáticas a 3392 (br), y grupos carbonilos, dobles enlaces a 1699 y 1652 cm⁻¹, respectivamente.

De la misma manera que la fracción 10, se realizó un IC₅₀ del compuesto puro obteniendo un valor de 4.23 µgmL⁻¹ contra la cepa MRSA.

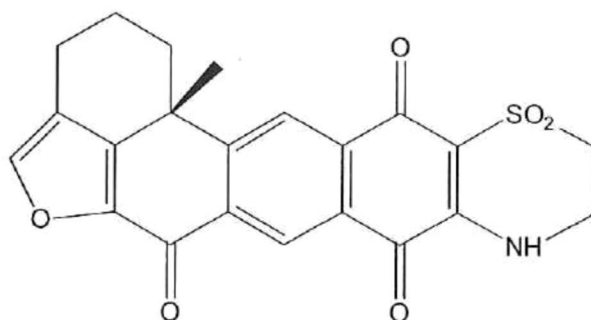


Figura 16. Estructura del compuesto Adociaquinona B.

Cabe mencionar que se ha reportado que este compuesto ha presentado actividad citotóxica con un IC_{50} de $2.4 \mu\text{g mL}^{-1}$ contra leucemia linfocítica (P388) (Schmitz y Bloor, 1988). Concepción y colaboradores (1995) reportaron la actividad inhibitoria es este compuesto contra la enzima topoisomerasa I.

Tanto Adociaquinona A como B han sido reportadas con actividad citotóxica contra P388, HCT (leucemia), KB16 (carcinoma nasofaringeal) y HEP-3B (carcinoma hepatocelular) y contra el ensayo Cdc25B, la cual tiene un papel en la regulación del ciclo celular (Cao *et al*, 2005).

Contour-Galcera (2007) describe al compuesto Adociaquinone B como un potente inhibidor (70nM) de las fosfatasas CDC25B recombinante humano que son las responsables de regular la progresión del ciclo celular y desempeñan un papel central en el control de respuesta de daños al ADN. Por lo que su inhibición representa una terapia promisoría para la oncología.

Fracción No. 13

La fracción 13 (3.1mg) fue purificada mediante HPLC fase reversa, utilizando como fase móvil 55% MeCN:H₂O con 0.1% de HCOOH a un flujo de 3mLmin⁻¹ por 40 minutos. De esta manera fue aislado un compuesto puro (2mg) de color amarillo pálido, cuya fórmula molecular es C₂₀H₁₈O₄, 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 [M⁺H] m/z (obsd) 323.1287 con un error de 1.1 ppm, con un patrón de fragmentación de M⁺H, 2M⁺H y 3M⁺H (Anexo 33). Su rotación específica mostró un valor de $[\alpha]_D^{23} = -2.4$ (c, 0.1g/100mL, MeOH) y presentó longitudes de máxima absorción en el UV a λ_{\max} 270 nm MeOH (log $\epsilon = 8.23$), a 319 nm (log $\epsilon = 7.98$). Por otro lado, el espectro de IR mostró absorciones para grupos hidroxilos, insaturaciones, alcanos, carbonilos, éteres a ν_{\max} 3396, 1683, 1668, 1575, 1318 cm⁻¹ (Anexo 26). Como se observa, la masa molecular es la misma que la observada en el compuesto aislado de la fracción 9, por lo que se asumió que se trataba de un isómero.

Las señales presentadas en el espectro de protones ¹H y RMN (500 MHz, MeCN-d₃) (Tabla XI, Anexo 27), fueron básicamente las mismas que las del compuesto 9 (Tabla X), en donde las diferencias más significativas fueron el desplazamiento de dos señales que integraron para un protón y que son características de protones aromáticos. Estas señales anteriormente se presentaron en 8.6 y 7.8 ppm, en esta ocasión las señales fueron a 8.4 y 8.1 ppm, con lo cual se observa que la primera señal se desplazó a campo alto, a diferencia de la segunda señal que se desplazó a campo bajo. Considerando que se trata de un isómero del compuesto 9, la única diferencia sería la posición del grupo hidroxilo que estuviera modificando dicho arreglo. De la misma manera, se presentó a δ 1.46 ppm, otro singulete característico del grupo metilo. Se observó una señal doble de

dobles a δ 4.96 con constantes de acoplamiento (J) de 8.5 y 4.0 Hz, donde de la misma manera que en el compuesto 9, se acopló al carbono a 67.4 ppm, sugiriendo que era el carbono que estaba ligado al grupo hidroxilo. De esta manera, se decidió correr un espectro 2D ROESY (Anexo 32), en el cual se observó la correlación entre el protón, 4.96 ppm y el protón a 8.4 ppm, sugiriendo que en este caso el grupo hidroxilo se encontraba en distinta posición al compuesto 9, ya que esta vez no se encontró la correlación con el grupo metilo (1.46 ppm). A diferencia de observarse dicha correlación entre el protón a 8.12 ppm y el grupo metilo; confirmando así la posición del grupo hidroxilo.

En esta ocasión el análisis de 2D ^1H RMN HMBC (Tabla XI, Anexo 31) presentó las correlaciones necesarias para la determinación de la estructura, al igual que en el compuesto anterior. De la misma manera, por medio de la determinación simultánea de los espectros ^{13}C RMN, el espectro 2D ^1H - ^{13}C HSQC RMN (Anexo 30), se determinó que la molécula contenía un total de 20 carbonos, observándose la presencia de 10 carbonos cuaternarios, 5 metilenos, 4 metinos y un grupo metilo. Asimismo se observaron las señales para los carbonos de carbonilos a 198.7 y 172.2 ppm (Fig. 17; Anexo 13).

Cabe mencionar que de igual manera que en el compuesto 9, se realizó la reacción Mosher's, pero en esta ocasión, la reacción no se logró de manera satisfactoria, no obteniendo los productos esperados, por lo cual con base a los resultados obtenidos, se propone la estructura con el nombre UIQPA de 8-hidroxi-12b-metil-2,3,9,10-tetrahidro-1*H*-tetrafenol[5,4-*bc*]furan-6,11(8*H*,12*bH*)-diona, aunque no se cuenta con la estereoquímica absoluta del mismo (Fig. 18).

Al realizar las pruebas de bioactividad de esta estructura se encontró una débil actividad citotóxica (SRB) y contra BACE-1, con IC_{50} mayores de $50\mu\text{g mL}^{-1}$.

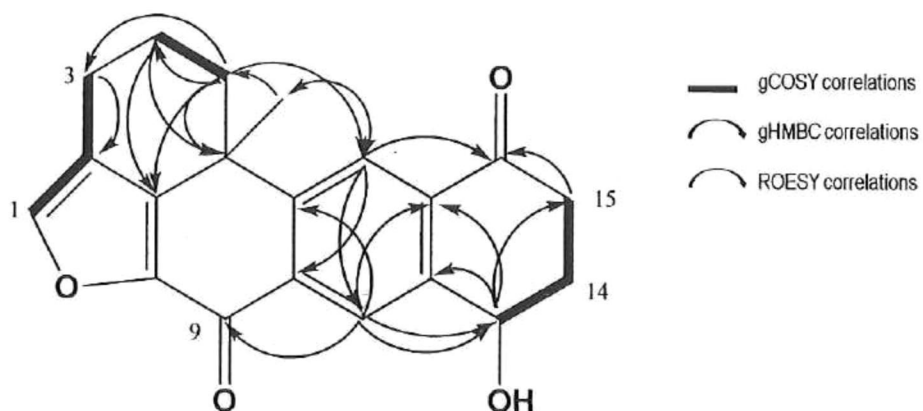


Figura 17. Estructura propuesta para el compuesto 13 con base a las correlaciones observadas en los espectros.

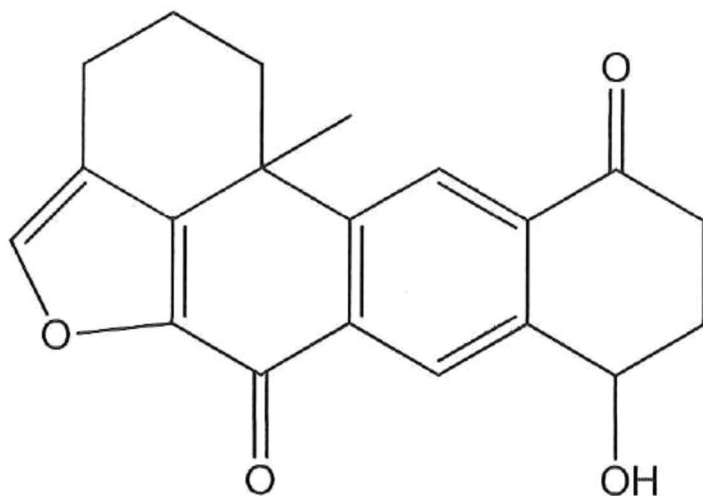


Figura 18. Estructura del compuesto 8-hidroxi-12b-metil-2,3,9,10-tetrahydro-1H-tetrafenol[5,4-bc]furan-6,11(8H,12bH)-diona, purificado de la fracción 13.

Tabla XI. Asignaciones de ^{13}C y ^1H RMN para el compuesto -hidroxi-12b-metil-2,3,9,10-tetrahydro-1*H*-tetrafenol[5,4-*bc*]furan-6,11(8*H*,12*bH*)-diona de la fracción 13, hechas con base en los experimentos de HSQC, HMBC y COSY. s=singulete, t=tripleto, dd=doble de dobles, m=multiplete, dt=doble de triples, ddd=triple de dobles, br=ancha, ppm=partes por millón, J=constante de acoplamiento, Hz=unidades Hertz.

Carbón #	^{13}C δ (ppm)	^1H δ ppm (J, Hz)	HSQC	COSY	HMBC	ROESY
1	146.0	7.62 t (1.4)	CH	H-3	-	-
2	122.8	-	C	-	-	-
3	17.4	2.58 m, 2.82 m	CH ₂	-	C-2	-
4	19.0	2.07 m, 2.25 m	CH ₂	H-5	H-5, C-6, C-7	-
5	31.9	2.54 m, 1.62 ddd (13, 13, 4.3)	CH ₂	H-4	H-3, C-6, C-7	H-18
6	37.4	-	C	-	-	-
7	149.0	-	C	-	-	-
8	145.2	-	C	-	-	-
9	172.2	-	C	-	-	-
10	138.27	-	C	-	-	-
11	127.5	8.4 s	CH	-	C-17, C-19, C-9, H-13	H-13
12	145.9	-	C	-	-	-
13	67.4	4.96 dd (8.5, 4)	CH	H-14	H-15, H-11, C-17, C-12	-
14	32.6	2.09 m, 2.34 m	CH ₂	H-15	-	-
15	36.3	2.84 m, 2.64 m	CH ₂	H-14	H-14, H-13, C-16	-
16	198.7	-	C	-	-	-
17	134.3	-	C	-	-	-
18	124.0	8.12 s	CH	-	H-11, C-10, C-12, C-16	H-20
19	151.6	-	C	-	-	-
20	32.3	1.46 s	CH ₃	-	-	H-18, H-5

Extracción con Metanol

En la extracción de la esponja realizada con 100% MeOH se obtuvieron 5.63 gramos, a los cuales se les realizó una partición líquido líquido con BuOH y H₂O 1:2, de la cual se obtuvieron 1.34 gramos de la fracción orgánica. Posteriormente se realizó una cromatografía flash C8 utilizando Silica gel Premium Rf. 60A (40-75µm) utilizando como eluyente 50, 65, 80 y 100% MeOH:H₂O. También se realizaron lavados con 100% IsoOH y 100% DCM para asegurar que todos los compuestos de la muestra fueron obtenidos. Cabe mencionar que en los lavados con 100% MeOH, se obtuvieron tres fracciones, debido a la separación de tres bandas en la columna (100%-1, 100%-2 y 100%-3). Una vez obtenida cada fracción se realizó nuevamente el bioensayo antimicrobiano para observar cual fracción era la que presentaba mayor porcentaje de inhibición contra la cepa MRSA (Tabla XII).

Tabla XII. Extracción con metanol, fracciones y porcentajes de bioactividad contra la cepa MRSA.

Fracción	Peso (mg)	%Actividad (MRSA)
Agua	4,620	38
Butanol	1,340	100
50% Metanol	251	60
65% Metanol	89	99
80% Metanol	102.2	78
100% Metanol	208.6	8
100%-2 Metanol	160.1	11
100%-3 Metanol	32.7	10
100% Isopropanol	271.5	5
100% Diclorometano	129.8	1

Guiados por la bioactividad de las fracciones, se decidió trabajar con las fracciones de 65% y 80% MeOH, las cuales fueron separadas por medio de HPLC fase reversa utilizando para la fracción de 65% MeOH un gradiente de 30-50% MeCN:H₂O con 0.1% de HCOOH por 40 minutos a un flujo de 3ml min⁻¹. Se obtuvieron 10 subfracciones, las cuales fueron analizadas mediante espectrometría de masas, para observar la gama de masas moleculares encontradas en dicha fracción, de la misma manera, cada una de las fracciones se probó contra la cepa MRSA, para así poder encontrar los compuestos responsables de dicha bioactividad (Tabla XIII).

Tabla XIII. Subfracciones de la muestra de 65% metanol y porcentajes de bioactividad contra la cepa MRSA.

Fracción	Peso (mg)	%Actividad (MRSA)
1	4.3	49
2	6.4	72
3	3.2	84
4	5.1	100
5	2.8	98
6	3.7	100
7	10.6	53
8	16.7	20
9	14.8	67

Como se observa en la Tabla XIII, las fracciones con mayor porcentaje de bioactividad son la 4, 5 y 6, por lo cual se decidió observar cuales eran las masas presentes en dichas fracciones, observándose un ión molecular de 424 uma, la cual es la

misma masa reportada para los compuestos Adociaquinones A y B, que anteriormente fueron los responsables de la bioactividad contra MRSA.

De la misma manera, se decidió separar la muestra de 80% MeOH, obteniéndose 9 subfracciones, utilizando la misma columna pero con un gradiente de 40-60% MeCN:H₂O con 0.1% de HCOOH, durante 40 minutos con un flujo de 3mL/min. Posteriormente dichas subfracciones se volvieron a analizar contra la cepa MRSA (Tabla XIV).

Tabla XIV. Subfracciones de la muestra de 80% metanol y porcentajes de bioactividad contra la cepa MRSA.

Fracción	Peso (mg)	%Actividad (MRSA)
1	3.2	36
2	6.8	47
3	3.2	82
4	5.2	98
5	1.4	98
6	5.5	100
7	7.1	100
8	14.5	59

Como se observa en la Tabla XVI, las fracciones que presentaron un mayor porcentaje de actividad contra la cepa MRSA fueron la 4, 5, 6 y 7; por lo que se decidió correr el espectro de masas de dichas fracciones, para observar la gama de compuestos presentes. En dichas fracciones se observaron iones moleculares (M⁺H) de 334, 348, 412,

427 y 458. Los cuales son pesos moleculares que pudieran estar relacionados con la misma familia de compuestos de Xestoquinonas e Hidroquinonas. Dichas fracciones siguen en estudio para su purificación.

En el caso del compuesto con peso molecular de 333.09, una vez obtenido el espectro de resonancia protónica (Anexo 34), se observaron señales que estaban relacionadas con los compuestos Adociaquinonas, pero con un peso molecular antes no reportado en las bases de datos SciFinder y MarinLit, por lo que se decidió obtener los espectros en dos dimensiones para la elucidación estructural. Lamentablemente no se pudo realizar dicho experimento, ya que al parecer el compuesto se degradó, observándose dobles señales en la repetición de dicho espectro, corroborándose con el espectro de masas, al observar que el compuesto ya no se encontraba puro, sino era una mezcla de dos compuestos.

7. DISCUSIONES GENERALES

Del extracto de acetato de etilo de la esponja marina de Indonesia *Xestospongia* sp. se encontraron compuestos de estructuras quinonas e hidroquinonas, los cuales en su mayoría ya habían sido encontrados en la esponja *Adocia* sp. (*Haliclona* sp.) por Schmitz y colaboradores en 1988. Posteriormente en 1992 y 1993 por Kobayashi y Alvi, respectivamente, se encontró la misma familia de compuestos en esponjas del género *Xestospongia* sp.

Cabe mencionar que las esponjas de la familia *Xestospongia* han mostrado tener una gran variedad de actividades farmacológicas. Esto a su vez, está relacionado con el tipo de solventes que se utilizan para la extracción. Por ejemplo, extracciones con EtOH, con particiones con MeCN y hexano permiten la obtención de compuestos de tipo alcaloide como las Aragusponginas, las cuales han mostrado actividad citotóxica, antifungal y propiedades antimalariales (Orabi *et al*, 2002).

Para este mismo género de esponja con extracciones con MeOH con particiones de acetato de etilo y H₂O se han obtenido compuestos de tipo esteroides, llamados Xestokeroides, los cuales han mostrado actividad citotóxica contra células de leucemia, además de antimicrobianos contra *Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutea* y *Bacillus subtilis* (Kobayashi *et al*, 1993). De la misma forma de extracción se han obtenido también metabolitos de tipo poliacetilenos, que han mostrado actividades antifungales, citotóxicas y antivirales (Kobayashi *et al*, 1994). Con lo cual queda demostrado que de una misma especie se pueden aislar diferentes tipos de estructuras químicas, los cuales a su vez presentan diferentes formas de acción en diferentes bioensayos.

Como se mencionó anteriormente, los compuestos aislados en este trabajo pertenecen a la familia de Xestoquinonas y halenaquinonas, los cuales son policétidos que han sido aislados de las esponjas del Pacífico *Xestospongia sapra*, *Xestospongia exigua* y *Xestospongia cf. carbonaria* (Maddaford *et al*, 1996).

En el caso de la esponja con la que se trabajó en esta tesis, se encontró ser del género *Xestospongia* sp. sin poder identificarla a nivel de especie. Aunque en la identificación realizada presenta tener características muy similares a la especie descrita por Desqueyroux-Faundez en 1987 llamada *Xestospongia subtriangularis*, originalmente descrita para el Caribe.

Se han encontrado compuestos de estructuras similares a la familia de las Xestoquinonas, como lo son los monoterpenos y alisiaquinonas aislados del género *Xestospongia* que han mostrado actividad micromolar en bioensayos enzimáticos contra la malaria. Tales compuestos fueron obtenidos en extracciones realizadas en MeOH, EtOH y DCM (Desoubbzdanne *et al*, 2008). De igual manera se han extraído las isoquinolinequinonas que han mostrado actividad micromolar contra líneas celulares de cáncer de colon y pulmón (Amnuoypol *et al*, 2004).

Con base en las actividades observadas para los compuestos obtenidos en este trabajo y las reportadas anteriormente, se puede decir que las xestoquinonas y halenoquinonas presentan un amplio espectro de actividad contra distintos bioensayos. Sin embargo, esta diversidad de actividad no se encuentra limitada a los resultados obtenidos hasta el momento. Es importante considerar que el método de extracción y la disponibilidad de bioensayos a probar son factores decisivos para considerar la actividad de un compuesto.

8. CONCLUSIONES

La esponja *Xestospongia* sp. recolectada de Indonesia representa una especie con actividad potencial contra la inhibición de la enzima β -secretasa y contra el patógeno MRSA.

Los 7 compuestos puros obtenidos presentaron estructuras de hidroquinonas y xestoquinonas.

Cinco de los compuestos obtenidos ya habían sido reportados y nombrados como Xestosaprol A, 3,13-Dideoxo-1,2,-14,-15-tetrahydro-3, 13-dihidroihalenaquinona, 13,14,15,16-Tetrahiroxestoquinol y Adociaquinona A y B.

Las Adociaquinonas A y B presentaron una actividad antibiótica contra la cepa MRSA con un valor de IC_{50} de $9.47 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $4.23 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

Los 2 compuestos nuevos con pesos moleculares de 322 uma, fueron elucidados como: 11-hidroxi-12b-metil-2,3,10,11-tetrahydro-1*H*-tetrafenol[5,4-*bc*]furano-6,8(9*H*,12*bH*)-diona y 8-hidroxi-12b-metil-2,3,9,10-tetrahydro-1*H*-tetrafenol[5,4-*bc*]furan-6,11(8*H*,12*bH*)-diona.

Los compuestos nuevos presentaron una actividad mínima inhibitoria mayor a $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ contra la enzima BACE-1 y citotóxica contra cáncer de ovario.

Las fracciones aisladas de la extracción de Metanol presentaron una actividad antibiótica importante contra la cepa MRSA a concentraciones menores de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$.

9. REFERENCIAS

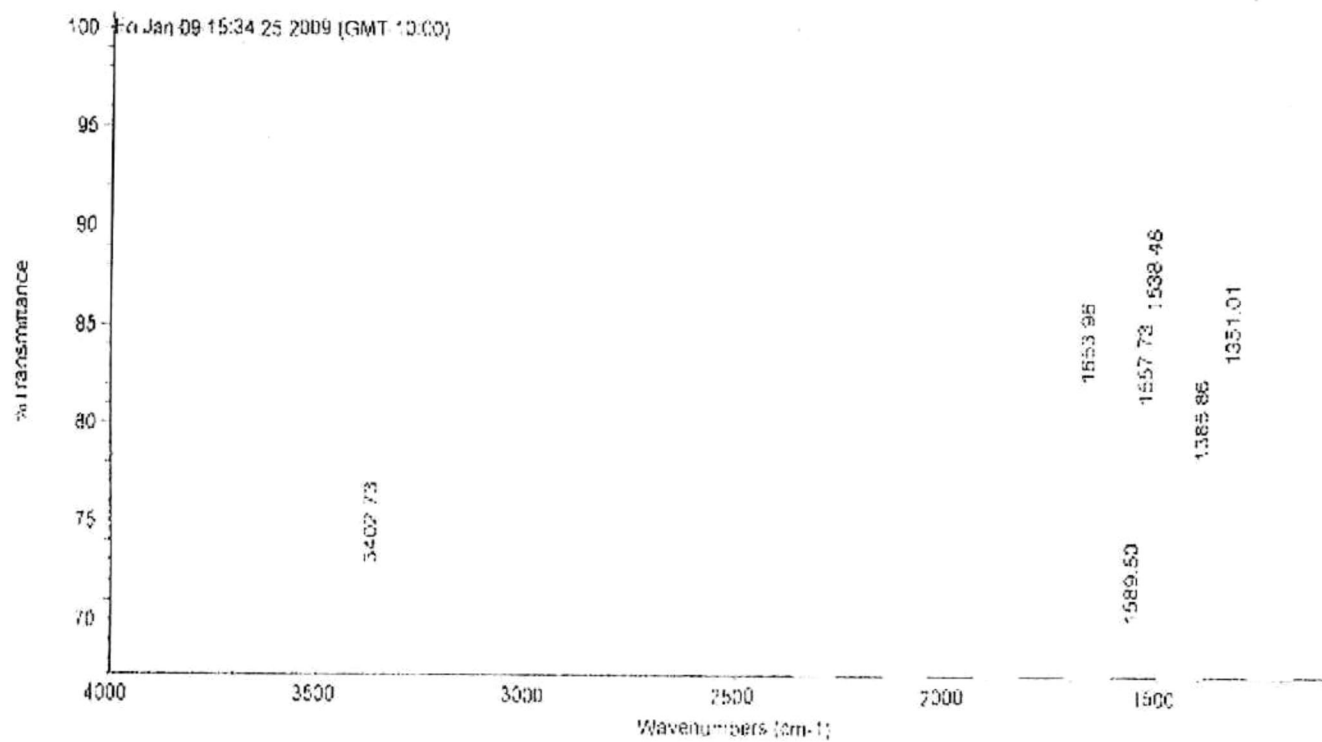
- Alvi, K. A., J. Rodríguez, M. C. Díaz, r. Moretti, R. S. Wilhelm, R. H. Lee, D. L. Slate, P. Crews. 1993. Protein tyrosine kinase inhibitory properties of planar polycyclics obtained from the marine sponge *Xestospongia* cf. *carbonaria* and from total synthesis. *Journal of Organic Chemistry*. Vol. 58:4871-4880.
- Amnuoyopol, S., K. Suwanborirux, s. Pummangura, A. Kubo, C. Tanaka y N. Saito. 2004. Chemistry of Renieramycins. Part 5. Structure elucidation of renieramycin-type derivatives O, Q, R, and S from Thai marine sponge *Xestospongia* species pretreated with potassium cyanide. 2004. *Journal of Natural Products*. Vol. 67: 1023-1028.
- Bae, M., T. Tsuji, K. Kondo, T. Hirase, M. Ishibashi, H. Shigemori y J. Kobayashi. 1993. Inhibition of mammalian topoisomerase I by Xestoquinone and Halenaquinone. *Bioscience. Biotechnology. Biochemistry*. Vol. 57(2):330-331.
- Bergmann, W., y R. J. Feeney. 1951. Contributions to the study of marine products. XXXII. The nucleosides of sponges. I. *Journal of Organic Chemistry*. Vol. 16 (6). 981-987.
- Blunt, J. W., B. R. Copp, W. P. Hu, M. H. G. Munro, P. T. Northcote y M. R. Prinsep. 2008. *Marine natural products*. The Royal Society of Chemistry. Vol. 25, 35-94.
- Butler, M. M., W. A. LaMarr, K. A. Foster, M. H. Barnes, D. J. Skow, P. T. Lyden, L. M. Kustigian, C. Zhi, N. C. Brown, G. E. Wright, T. L. Bowlin. 2007. Antibacterial activity and mechanism of action of a novel anilinouracil-fluoroquinolone hybrid compound. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. Vol. 51(1):119-127.
- Cao, S., C. Foster, M. Brisson, J. S. Lazo, D. G. I. Kingston. 2005. Halenaquinone and xestoquinone derivatives, inhibitors of Cdc25B phosphatase from a *Xestospongia* sp. *Biorganic and medicinal chemistry*. Vol. 13: 999-1003.
- Concepción, G. P., T. A. Foderaro, G. S. Eldredge, E. Lobkovsky, J. Clardy, L. R. Barrows y C. M. Ireland. 1995. Topoisomerase II-mediated DNA cleavage by Adocia and Xestoquinone from the Philippine sponge *Xestospongia* sp. *Journal of medical chemistry*. Vol. 38:4803-4807.

- Contour-Galceran, M.O., A. Sidhu, G. Prévost, D. Bigg, B. Ducommun. 2007. What's new on CDC25 phosphatase inhibitors. *Pharmacology & Therapeutics*. Vol. 115: 1-12.
- Dai, J., J. I. Jiménez, M. Kelly, S. Barnes, P. Lorenzo, P. Williams. 2008. Dictazoline A and B, Bisspiroimidazolidinones from the marine sponge *Smenospongia cerebriformis*. *Journal of Natural Products*. Vol. 71(7):1287-1290.
- Desoubbzdanne, D., L. Marcourt, R. Raux, S. Chevalley, D. Dorin, C. Doerig, A. Valentin, F. Ausseil y C. Debitus. 2008. Alisiaquinones and Alisiaquinol, Dual inhibitors of Plasmodium falciparum enzyme targets from a new Caledonian deep water sponge. *Journal of Natural Products*. Vol. 71. 1189-1192.
- Gandy, S. 2005. The role of cerebral amyloid B accumulation in common forms of Alzheimer disease. *The Journal of Clinical Investigation*. Vol. 115(5):1121-1129.
- Harada, N. T. Sugioka, T. Soutome, N. Hiyoshi, H. Uda, T. Kuriki. 1995. Synthesis and absolute stereochemistry of (+)-Adociaquinones A and B. *Tetrahedron: Asymetry*. Vol. 6(2): 375-376.
- Jakob-Roetne, R. y H. Jacobsen. 2009. Alzheimer's Disease: From pathology to therapeutic approaches. *Reviews. Medicinal Chemistry. Angewandte. Chemistry International Editorial*. Vol. 48: 2-32.
- Kobayashi, M., N. Shimizu, Y. Kyogoku, I. Kitagawa. 1985. Halenaquinol and Halenaquinol sulfate, pentacyclic hydroquinones from the Okinawan marine sponge *Xestospongia sapra*. *Chemistry Pharmaceutical Bulletin*. Vol. 33 (3): 1305-1308.
- Kobayashi, J., T. Hirase, H. Shigemori y M. Ishibashi. 1992. New pentacyclic compounds from the Okinawan marine sponge *Xestospongia sapra*. *Journal of Natural Products*. Vol. 55(7):994-998.
- Kobayashi, J., K. Ishida, K. Naitoh, H. Shigemori. 1993. Xestokerols A, B y C, new C₂₉ steroids with cyclopropane ring from the Okinawan marine sponge *Xestospongia* sp. *Journal of Natural Products*. Vol. 56(8): 1350-1355.
- Kobayashi, J., K. Naitoh, K. Ishida, H. Shigemori y M. Ishibashi. 1994. Nepheliosyne A, new C₄₇ acetylenic acid from Okinawan marine sponge *Xestospongia* sp. *Journal of Natural Products*. Vol. 57 (9): 1300-1303.

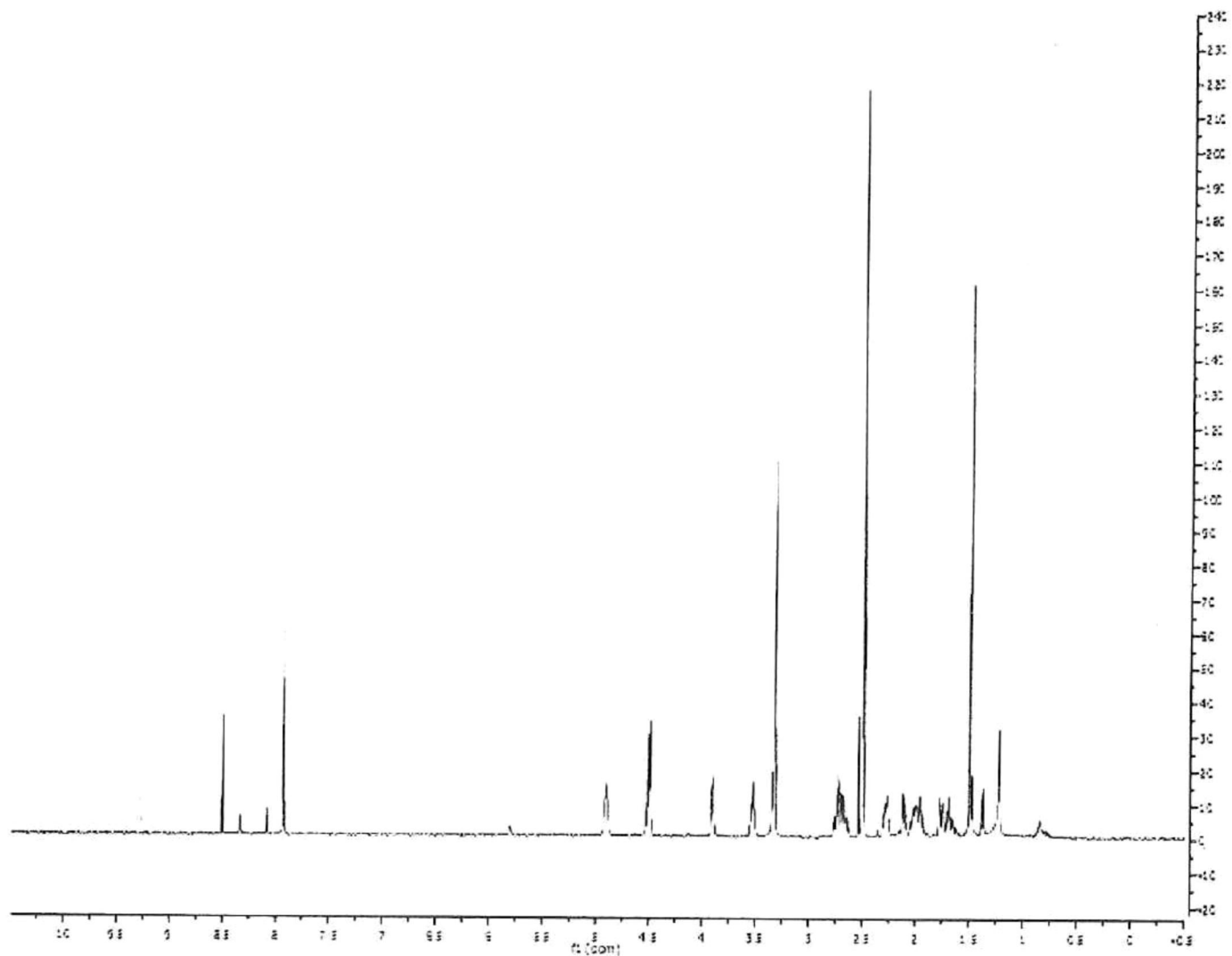
- Lee, R. H., D. L. State, R. Moretti, K. A. Alvi y P. Crews. 1992. Marine sponge polyketide inhibitors protein tyrosine kinase. *Biochemical and biophysical research communications*. Vol. 184 (2): 765-772.
- Leiva, S., M. Yañez S., L. Zaror C., H. Rodríguez S., H. García-Quintana. 2004. Actividad antimicrobiana de actinomicetes aislados desde ambientes acuáticos del sur de Chile. *Revista Médica Chile*. Vol. 132: 151-159.
- Maddaford, S. P., N. G. Andersen, W. A. 1996. Total synthesis of (+)-Xestoquinone using a asymmetric palladium-catalyzed polyene cyclization. *Journal of American Chemical Society*. Vol. 118:10766-10773.
- Mayer, A. M.S., A. D. Rodríguez, R. G. S. Berlinck, M. T. Hamann. 2007. Marine pharmacology in 2003-4: Marine compounds with Anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antifungal, antiinflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanism of action. *Biochemistry Physiological, Toxicology Pharmacology*. Vol. 145(4):553-581.
- Molinski, T. F., D. S. Dalisay, S. L. Lievens y J. P. Saludes. 2009. Drug development from marine natural products. *Nature reviews*. Vol. 8, 69-85.
- Müller, W. E. G., H. C. Schröder, M. Wiens, S. Perovic-Ottstadt, R. Batel e I. M. Müller. 2004. Traditional and modern biomedical prospecting: Part II-the Benefits. Approaches for a sustainable exploitation of biodiversity (Secondary metabolites and biomaterials from sponges). *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. Vol. 1(2):133-144.
- Nakamura, M., T. Kakuda, J. Qi, M. Hirata, T. Shintani, Y. Yoshioka, T. Okamoto, Y. Oba, H. Nakamura y M. Ojika. 2005. Novel relationship between the antifungal activity and cytotoxicity of marine-derived metabolite Xestoquinone and its family. *Bioscience. Biotechnology. Biochemistry*. Vol. 69(9):1749-1752.
- Naqvi, T., A. Lim, R. Rouhani, R. Singh y R. M. Eglen. 2004. B Galactosidase enzyme fragment complementation as a high-throughput screening protease technology. *Journal of Biomolecular Screening*. Vol. 9(5):398-408.
- Newman, D. J. y G. M. Cragg. 2007. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*. Vol. 70(3):461-477.

- Orabi, K. Y., K. A. El Sayed, M. T. Hamann, D. C. Dunbar, M. S. Al-Said, T. Higa y M. Kelly. 2002. Araguspongines K and L, New bioactive bis-1-oxaquinolizidine N-oxide alkaloids from red sea specimens of *Xestospongia exigua*. *Journal of Natural Products*. Vol. 65:1782-1785.
- Piel, J., D. Hui, G. Wen, D. Butzke, M. Platzner, N. Fusetani, S. Matsunaga. 2004. Antitumor polyketide biosynthesis by an uncultivated bacterial symbiont of the marine sponge *Theonella swinhoei*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Vol. 101(46):162.
- Prieto Davó, A. 2000. Aislamiento y purificación de compuestos bioactivos de la esponja marina *Geodia* sp. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Marinas. Universidad Autónoma de Baja California. México. 27pp.
- Quinn, R. J., R. P. Gregson, A. F. Cook, A. F. Bartlett. 1980. Isolation and synthesis of 1-methylisoguinasine, a potent pharmacologically active constituent from the marine sponge *Tedania digitata*. *Tetrahedron Letters*. Vol. 21: 567-568.
- Roll, D. M., P. J. Scheuer. 1983. Halenaquinone, a pentacyclic polyketide from a marine sponge. *American Chemical Society*. Vol. 105: 6177-6178.
- Sánchez Nava, A. T. 2006. Aislamiento y determinación estructural de compuestos provenientes de la esponja marina *Sphaciospongia confoederata*. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Marinas. Universidad Autónoma de Baja California. México. 52 pp.
- Seco, J. M., E. Quinoa y R. Riguera. 2004. The assignment of absolute configuration by NMR. *Chemistry Reviews*. Vol. 104: 17-117.
- Schmitz, F. J., S. J. Bloor. 1988. Xesto- and Halenaquinone derivatives from a sponge *Adocia* sp. from Truk Lagoon. *Journal of Organic Chemistry*. Vol. 53: 3922-3925.
- Stachel, S. J., C. A. Coburn, T. G. Steele, K. G. Jones, E. F. Loutzenhiser, A. R. Gregro, H. A. Rajapakse, M. T. Lai, M. C. Crouthamel, M. Xu, K. Tugusheva, J. E. Lineberger, B. L. Pietrak, A. S. Espeseth, X. P. Shi, E. C. Dodson, M. K. Holloway, S. Munshi, A. J. Simon, L. Kuo, J. P. Vacca. 2004. Structure-based design of potent and selective cell-permeable inhibitors of Human B-Secretase (BACE-1). *Journal of Medical Chemistry*. Vol. 47: 6447-6450.
- Taylor, M. W., R. Radaz, D. Steger, M. Wagner. 2007. Sponge-Associated microorganisms: Evolution, ecology, and biotechnological potential. *Microbiology and molecular biology reviews*. Vol. 71(2):295-347.

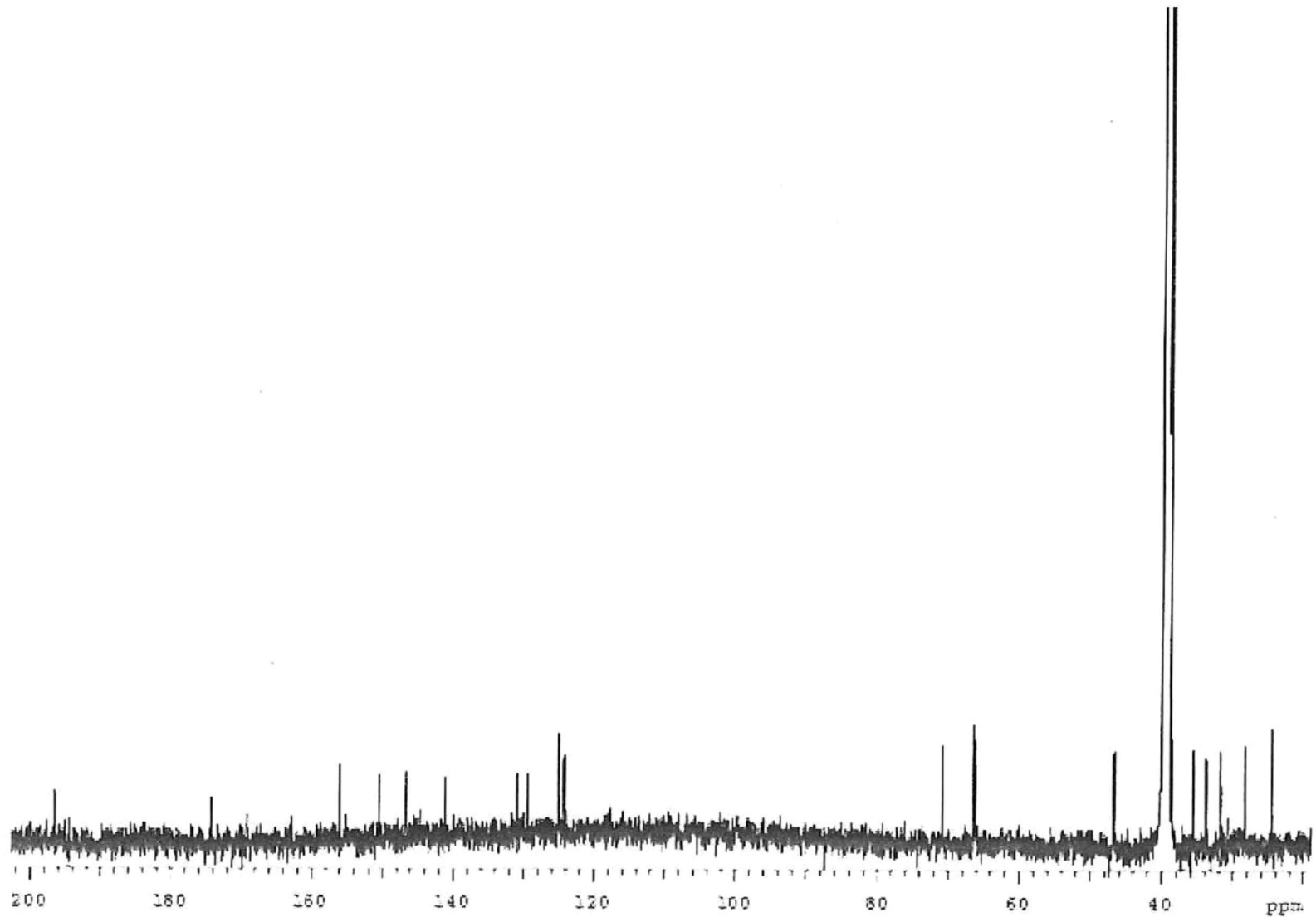
ANEXOS



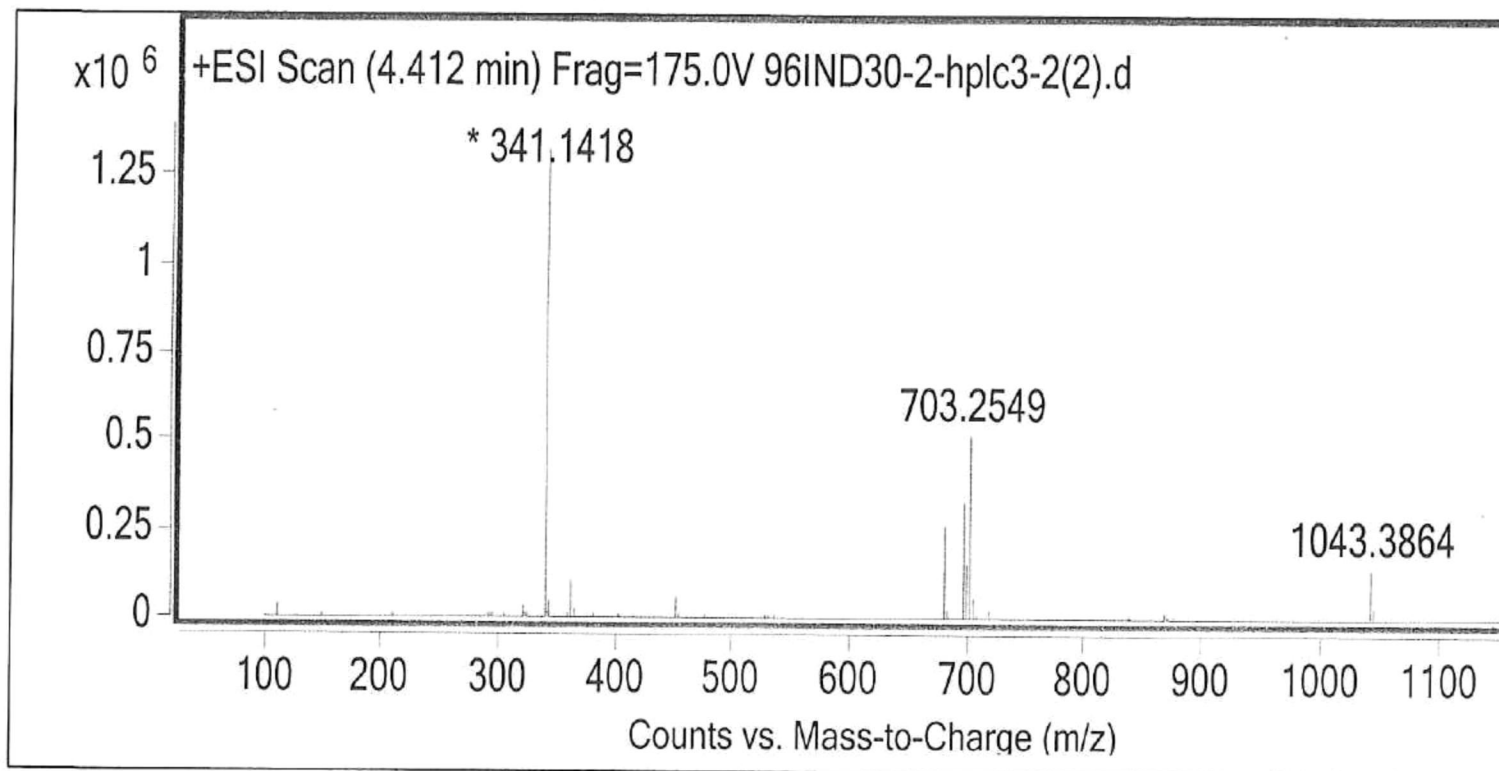
Anexo 1. Espectro de Infrarrojo del compuesto Xestosaprol A.



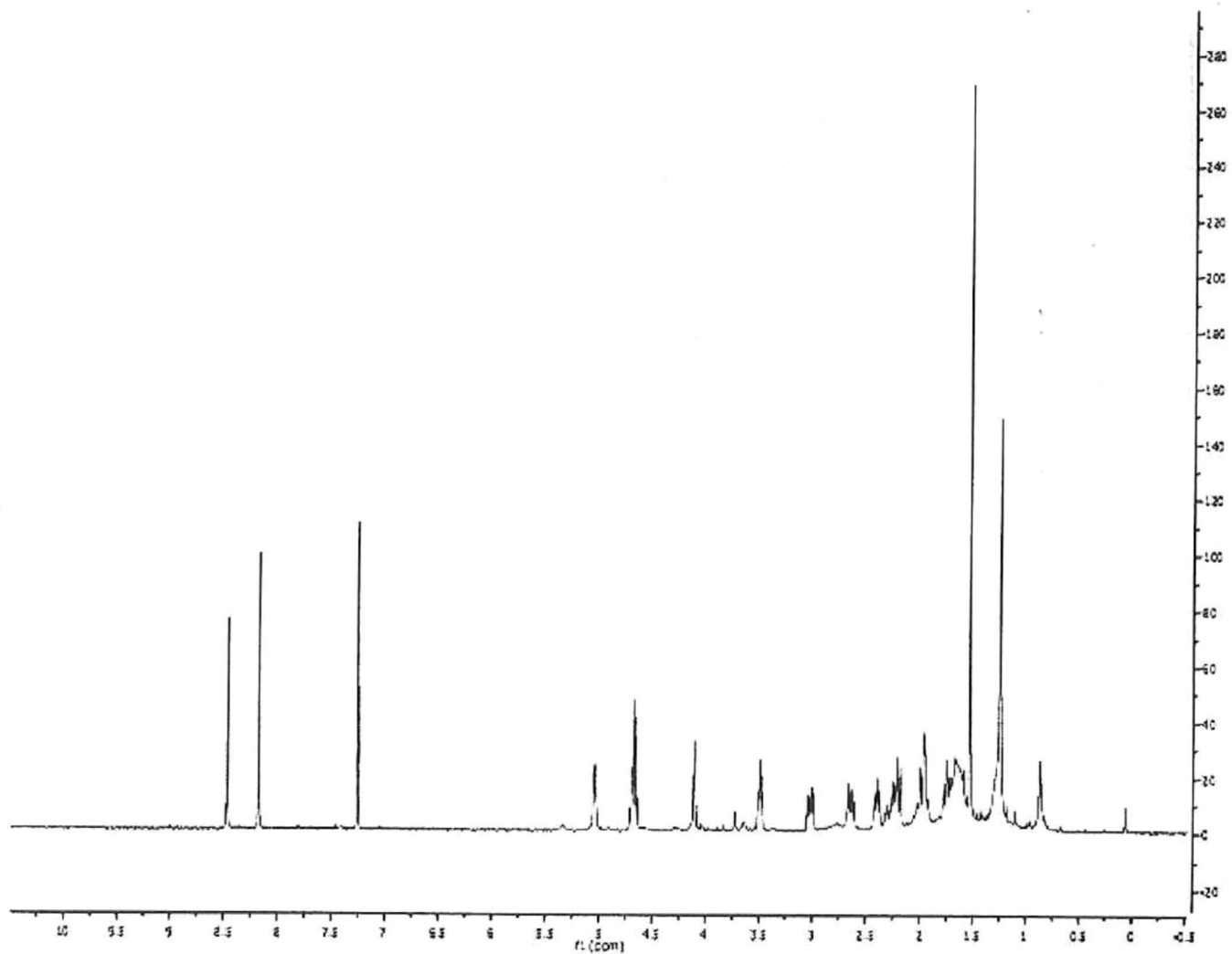
Anexo 2. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear protónica ^1H (RMN) del compuesto Xestosaprol (500 MHz), $\text{DMSO-}d_6$.



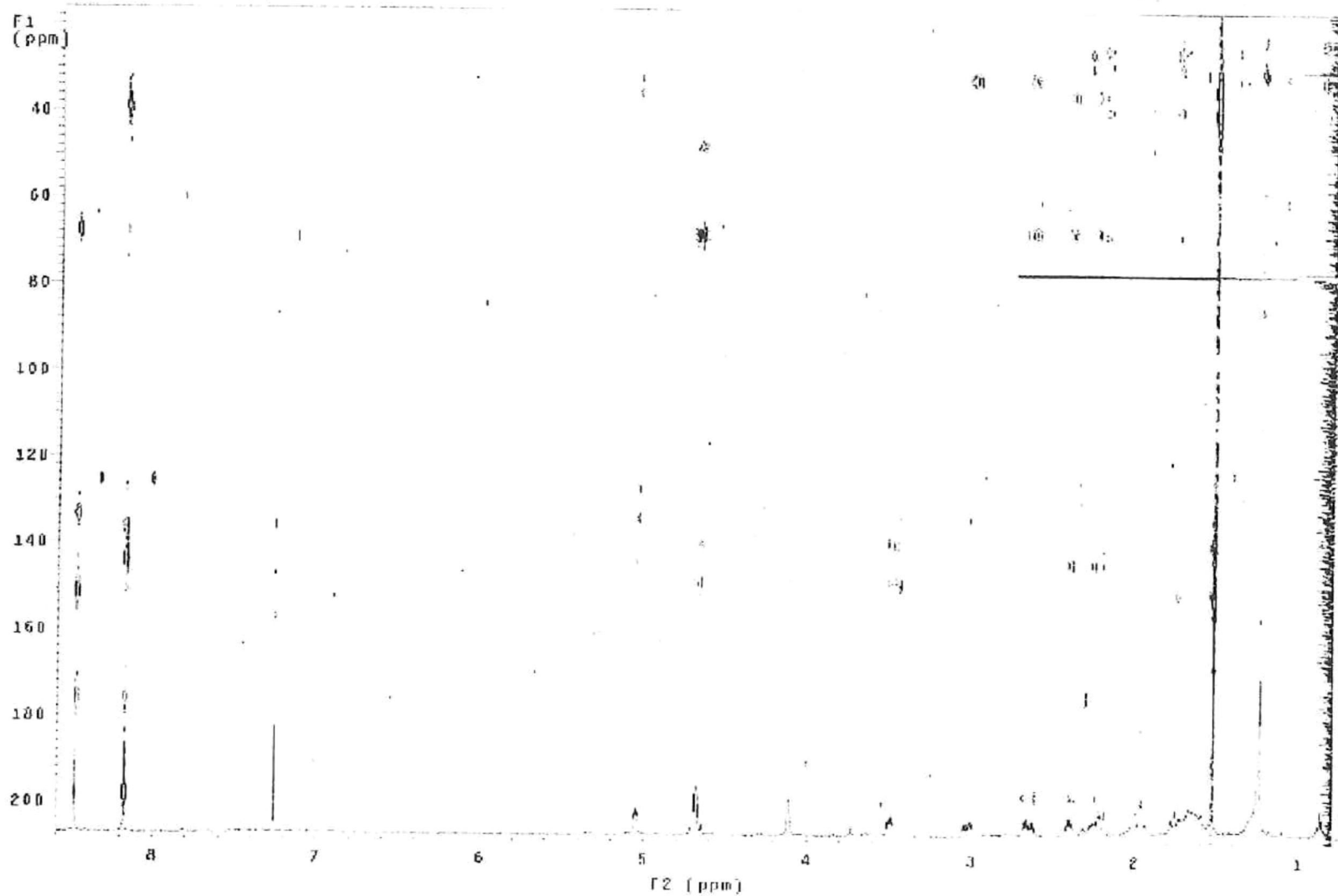
Anexo 3. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear carbono 13 ^{13}C (RMN) del compuesto Xestosaprol a 125 MHz, DMSO_{d6} .



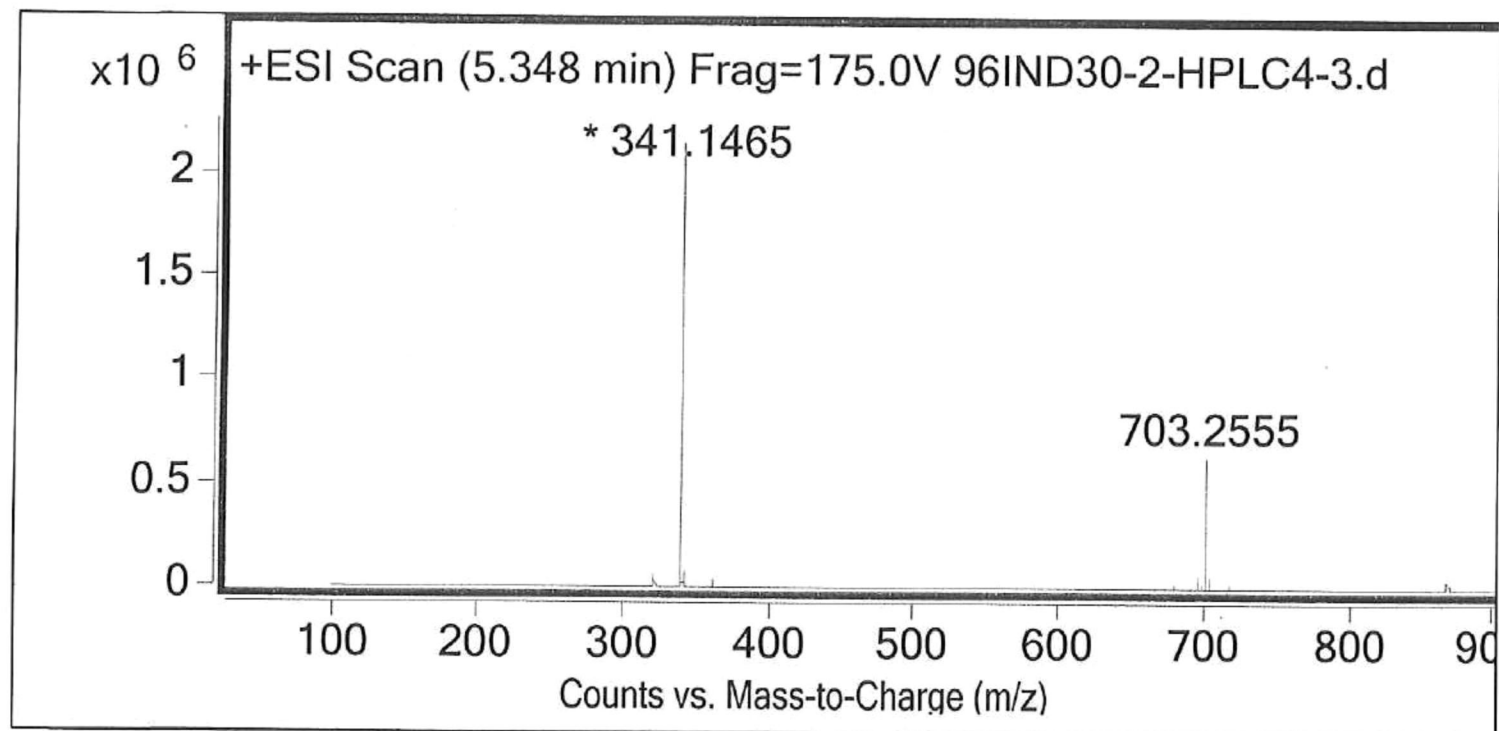
Anexo 4. Espectro de Masas de alta resolución ESI-TOF del compuesto Xestosaprol en CD₃OD.



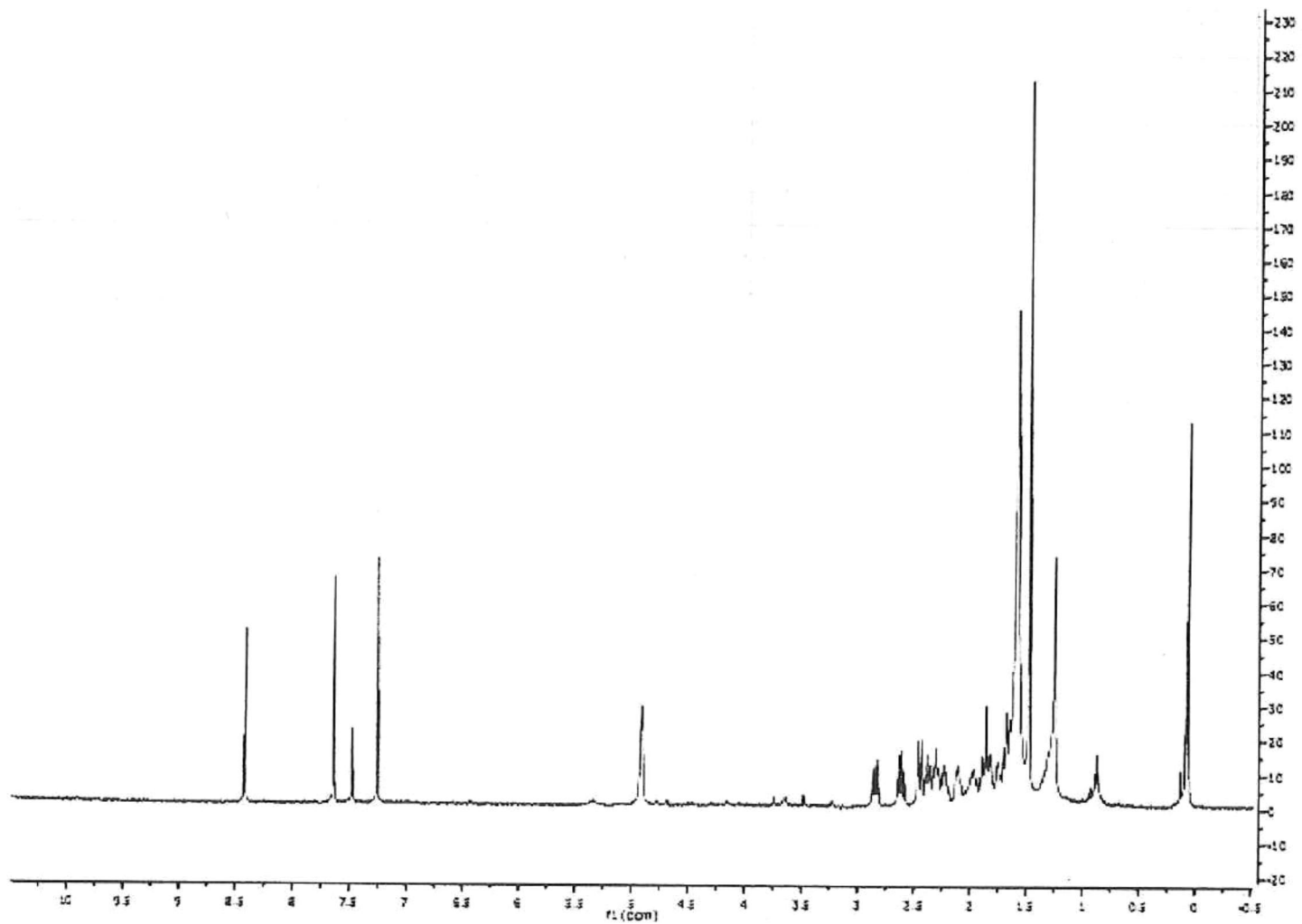
Anexo 5. Espectro de Resonancia Magnética protónica: ^1H (RMN) del compuesto 3,13-Dideoxo-1,2,14,15-tetrahidro-3,13-dihydroxyhalenaquinona a 500 MHz en CDCl_3 .



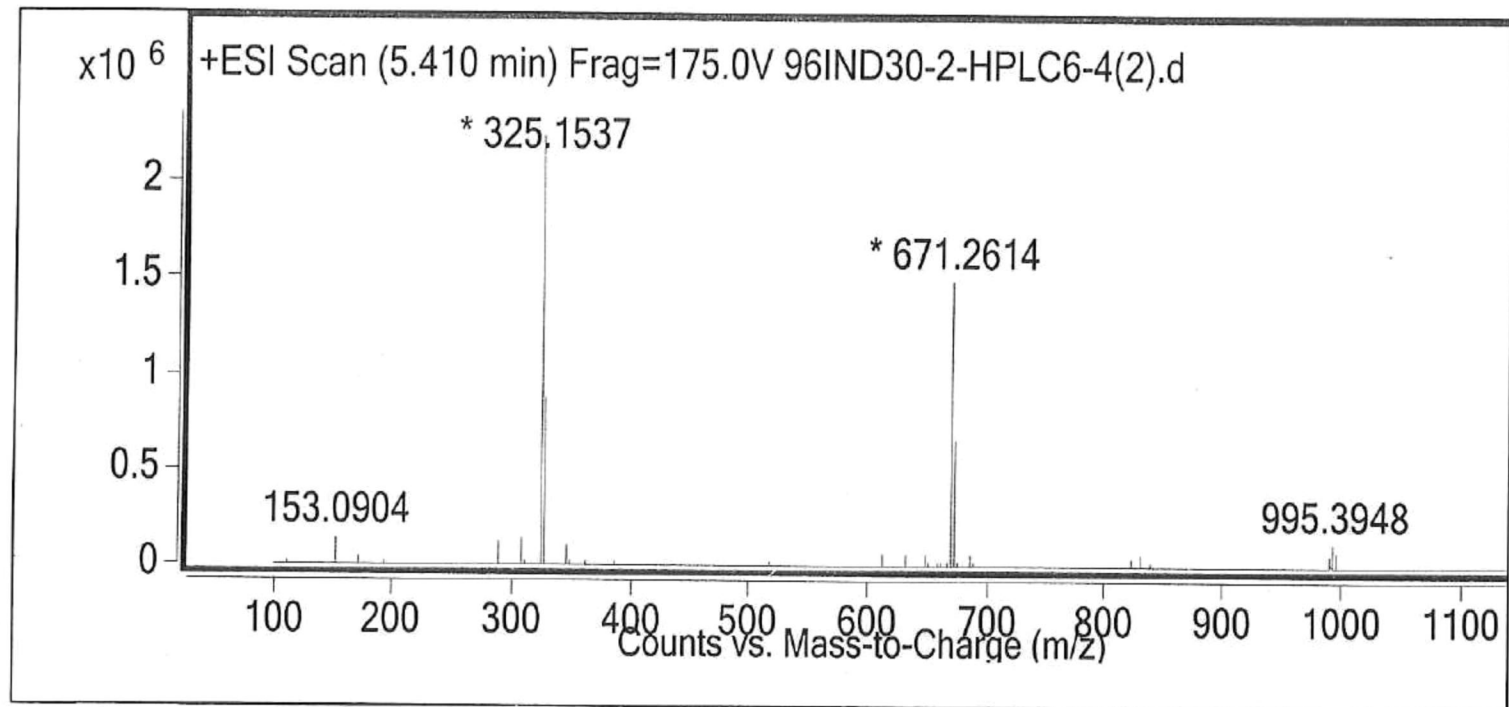
Anexo 6. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear bidimensional:2D ^1H - ^{13}C RMN (HMBC) del compuestos 3,13-Dideoxo-1,2,14,15-tetrahidro-3,13-dihydroxyhalenaquinona a 500 MHz en CDCl_3 .



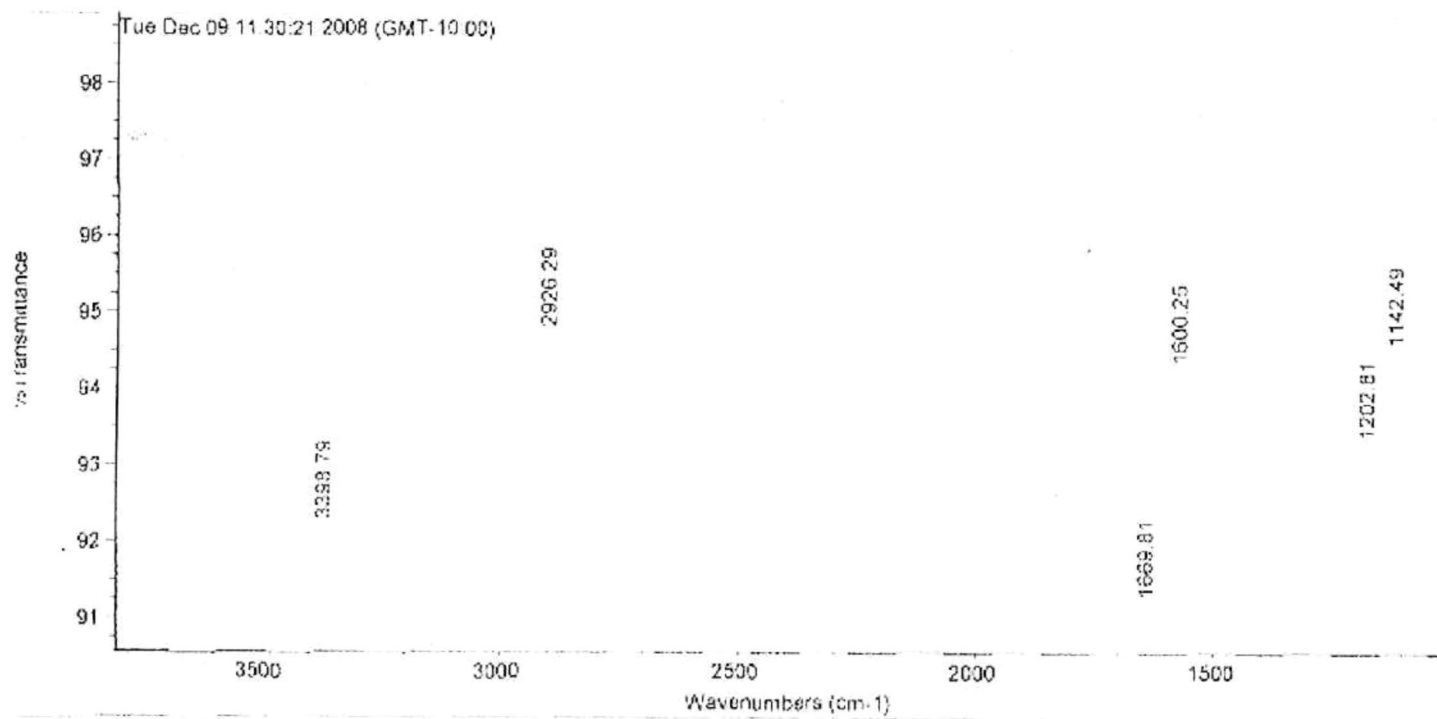
Anexo 7. Espectro de Masas de alta resolución ESI-TOF del compuesto 3,13-Dideoxo-1,2,14,15-tetrahidro-3,13 dihydroxyhalenaquinona en CD₃OD.



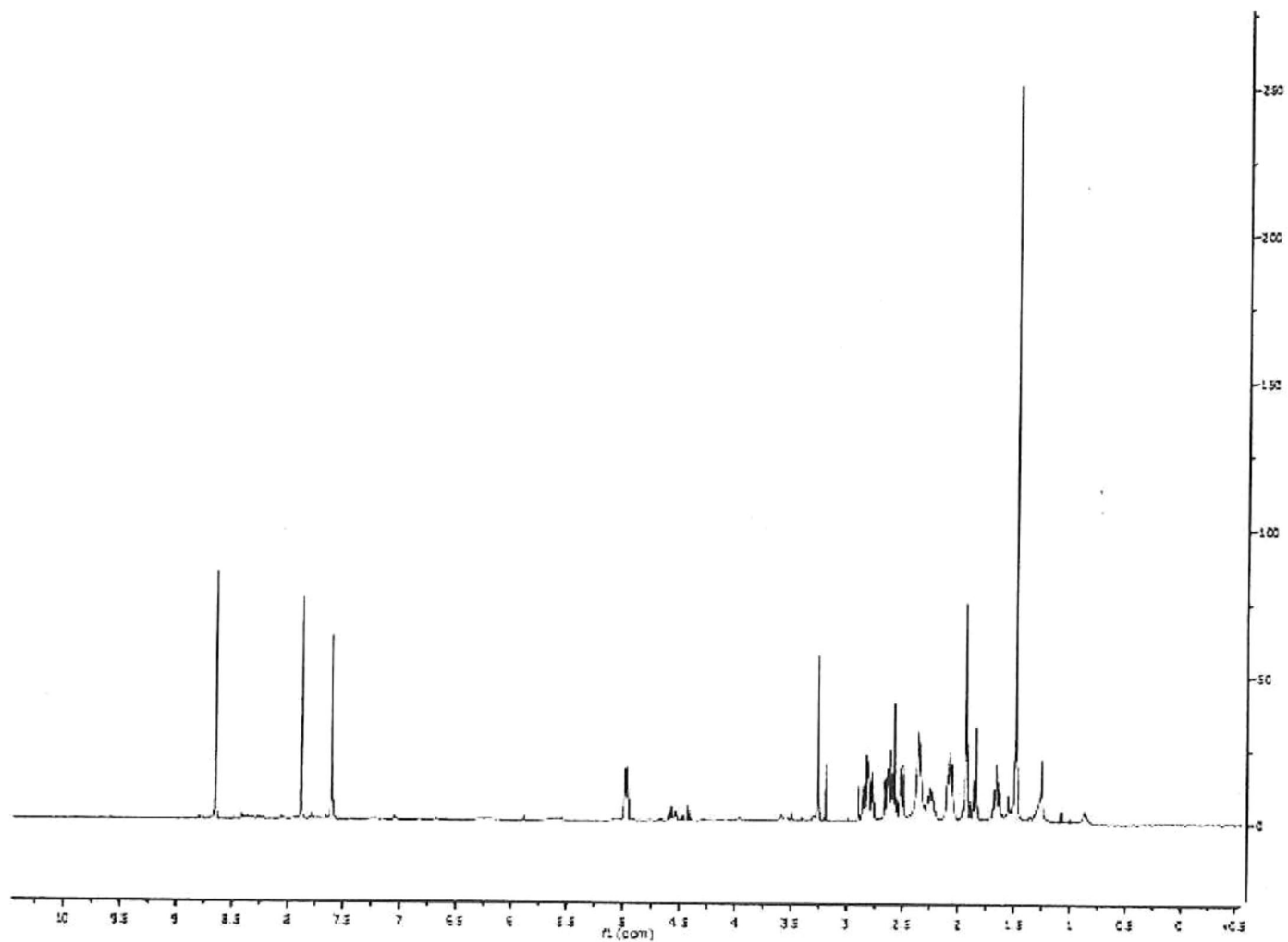
Anexo 8. Espectro de Resonancia Magnética protónica: ^1H (RMN) del compuesto 13,14,15,16-Tetrahidroestoquinol a 500 MHz en CDCl_3 .



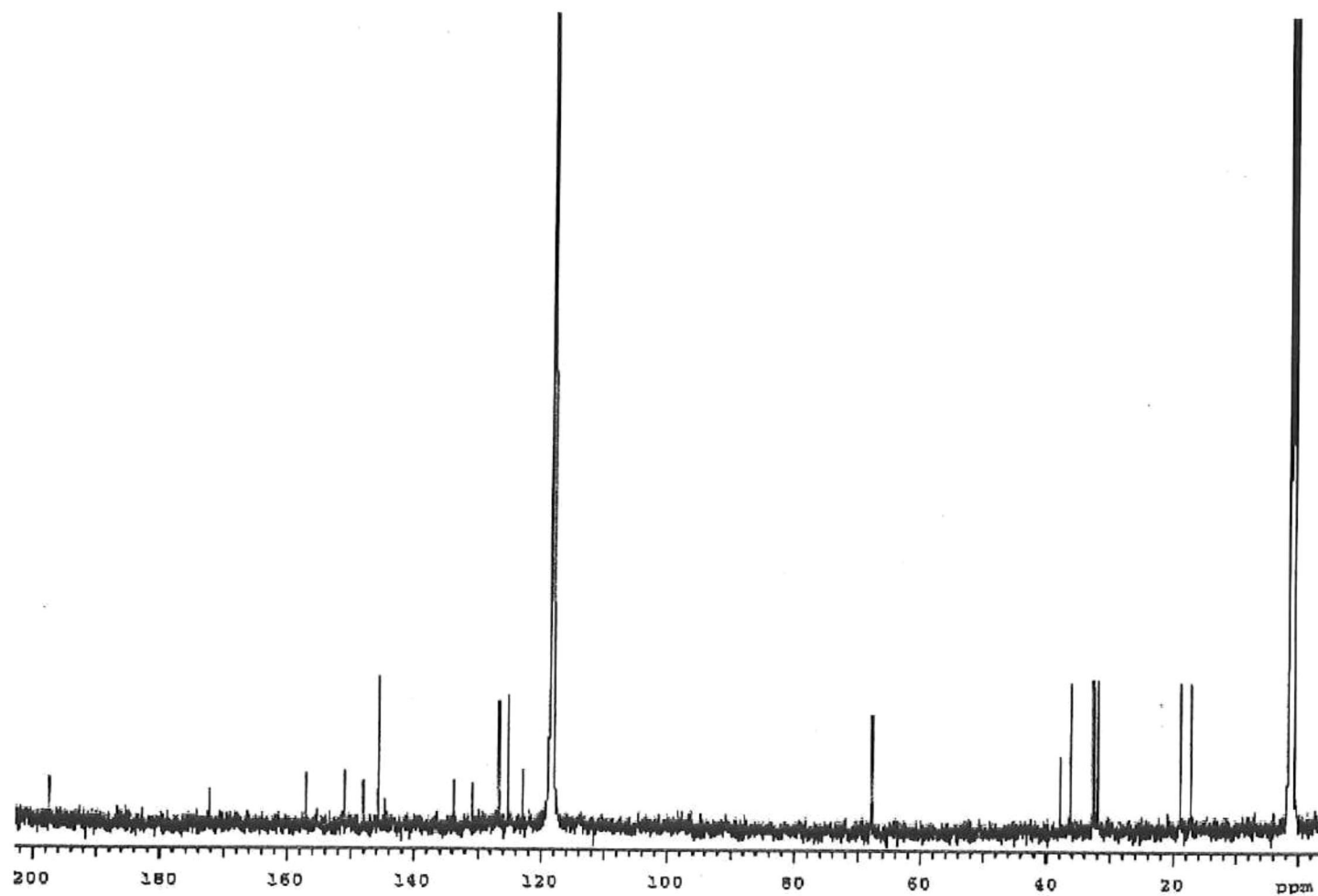
Anexo 9. Espectro de Masas de alta resolución ESI-TOF del compuesto 13,14,15,16-Tetrahidroximoquinol.



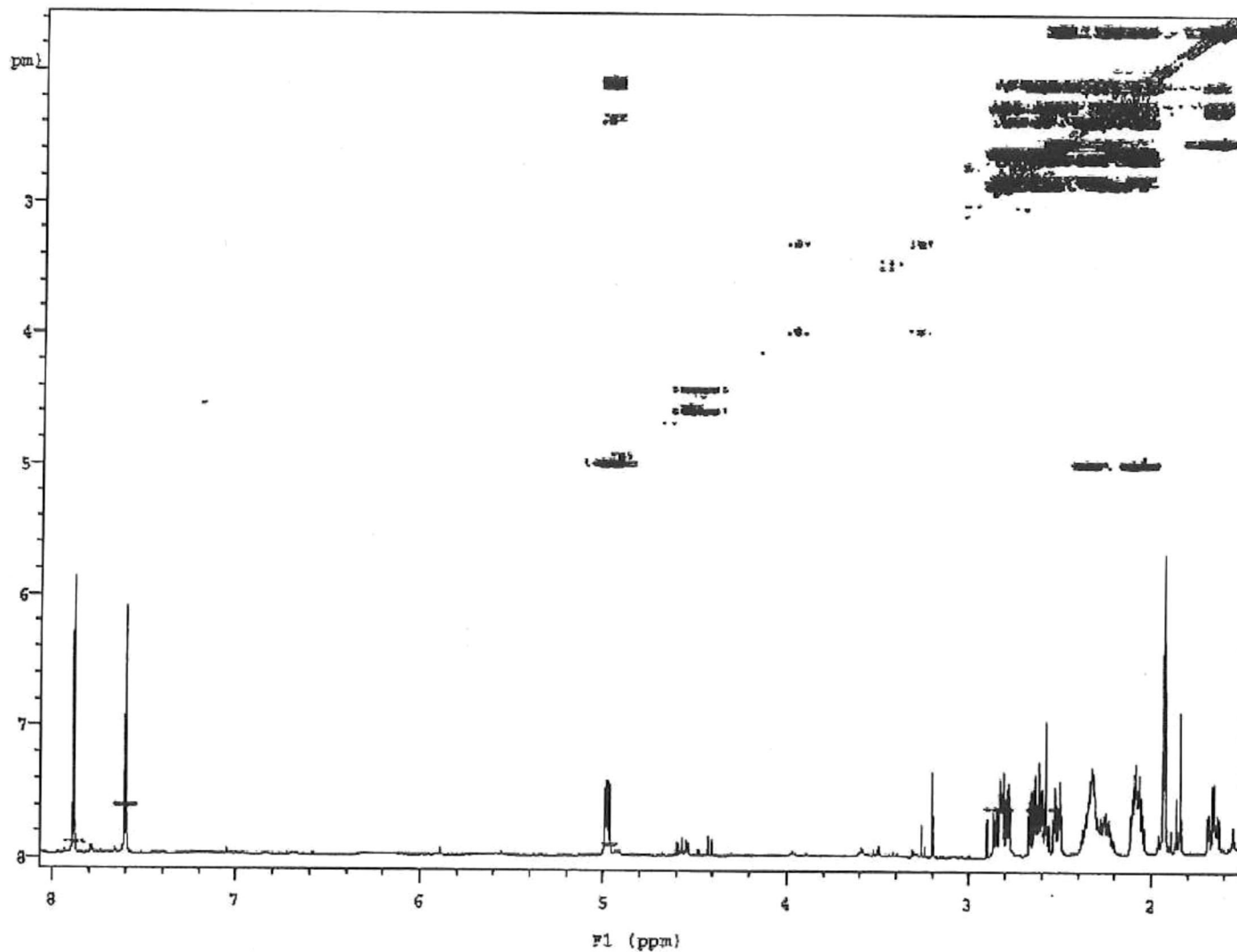
Anexo 10. Espectro de Infrarrojo del compuesto 11-hidroxi-12b-metil-2,3,10,11-tetrahidro-1*H*-tetrafenol[5,4-*bc*]furan-6,8(9*H*,12*bH*)-diona.



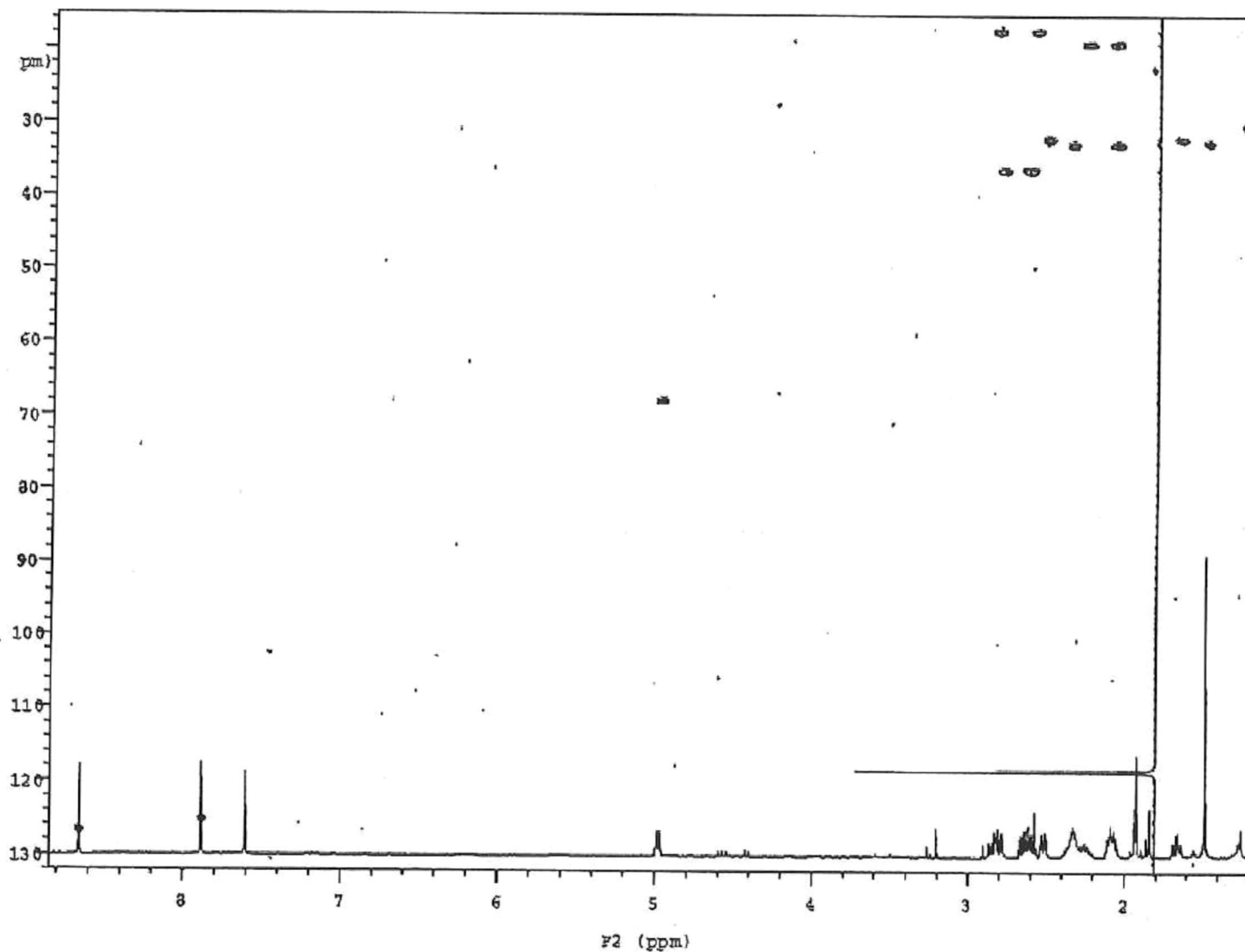
Anexo 11. Espectro de Resonancia Magnética protónica: ¹H (RMN) del compuesto 11-hidroxi-12b-metil-2,3,10,11-tetrahydro-1H-tetrafenol[5,4-bc]furan-6,8(9H,12bH)-diona a 500 MHz en MeCN-d₃.



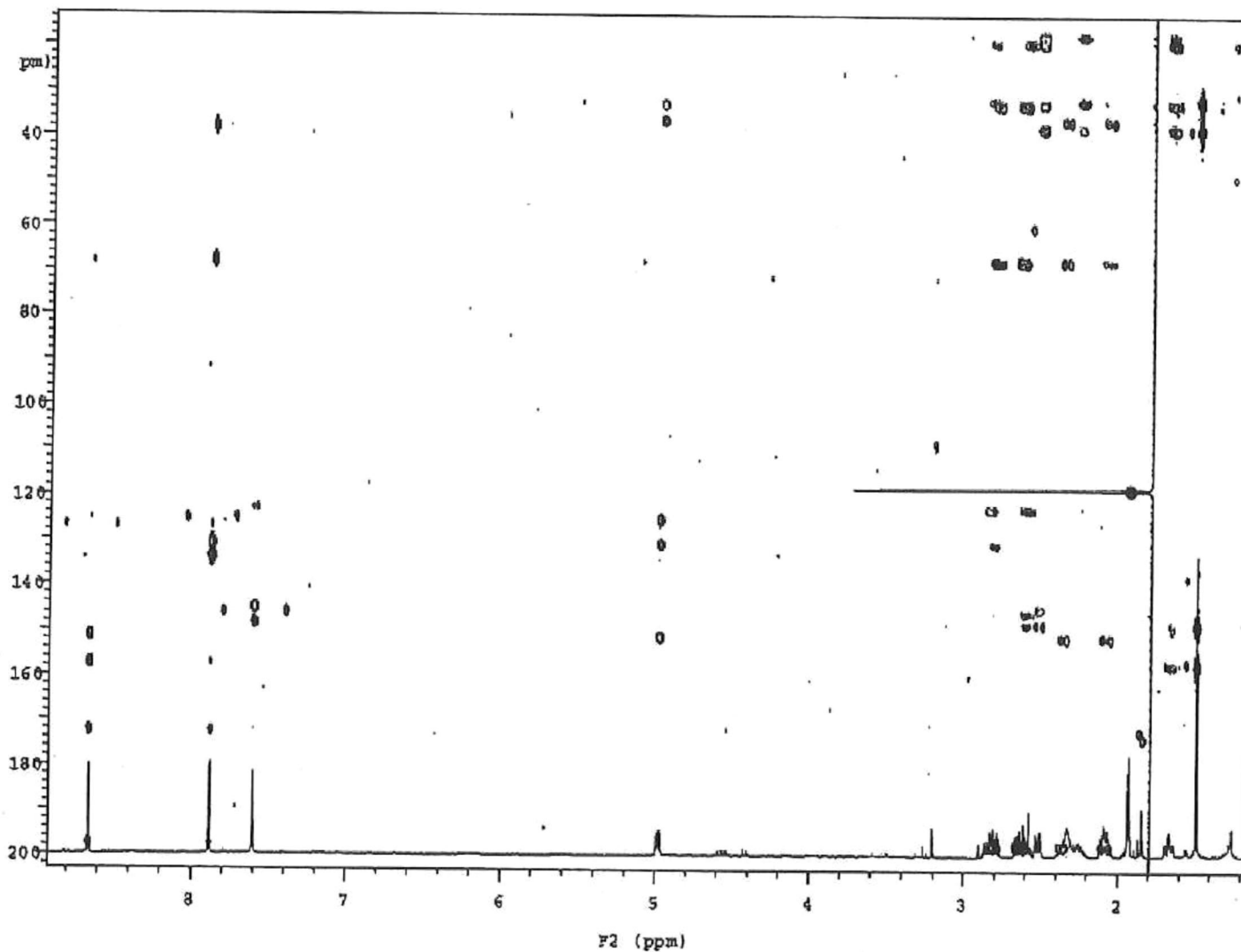
Anexo 12. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear carbono ^{13}C (RMN) del compuesto 11-hidroxi-12b-metil-2,3,10,11-tetrahydro-1H-tetrafenol[5,4-bc]furan-6,8(9H,12bH)-diona a 125 MHz en MeCN-d₃.



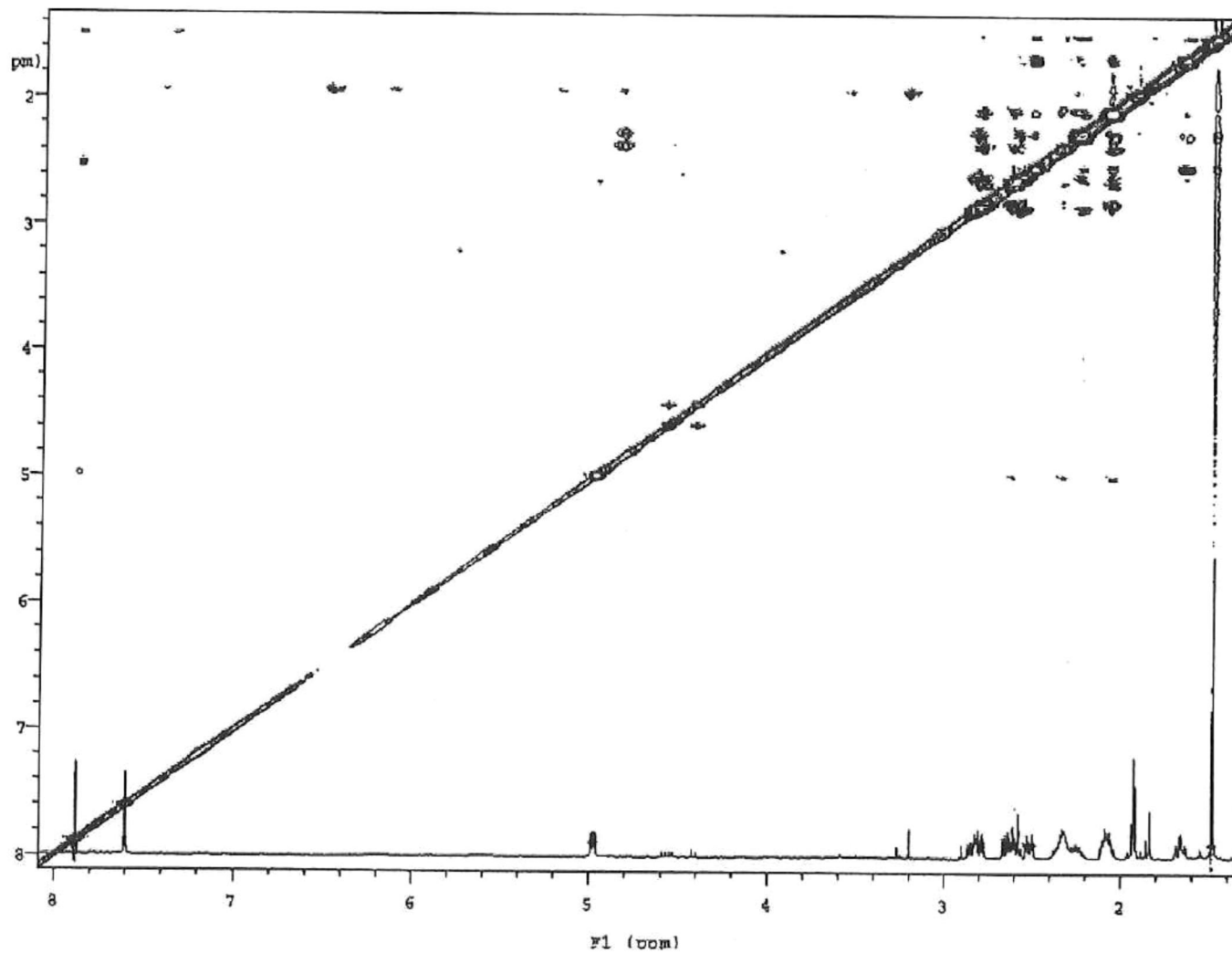
Anexo 13. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear bidimensional: 2D ^1H - ^{13}C RMN (COSY) del compuesto 11-hidroxi-12b-metil-2,3,10,11-tetrahidro-1*H*-tetrafenol[5,4-*bc*]furan-6,8(9*H*,12*bH*)-diona a 500 MHz en MeCN- d_3 .



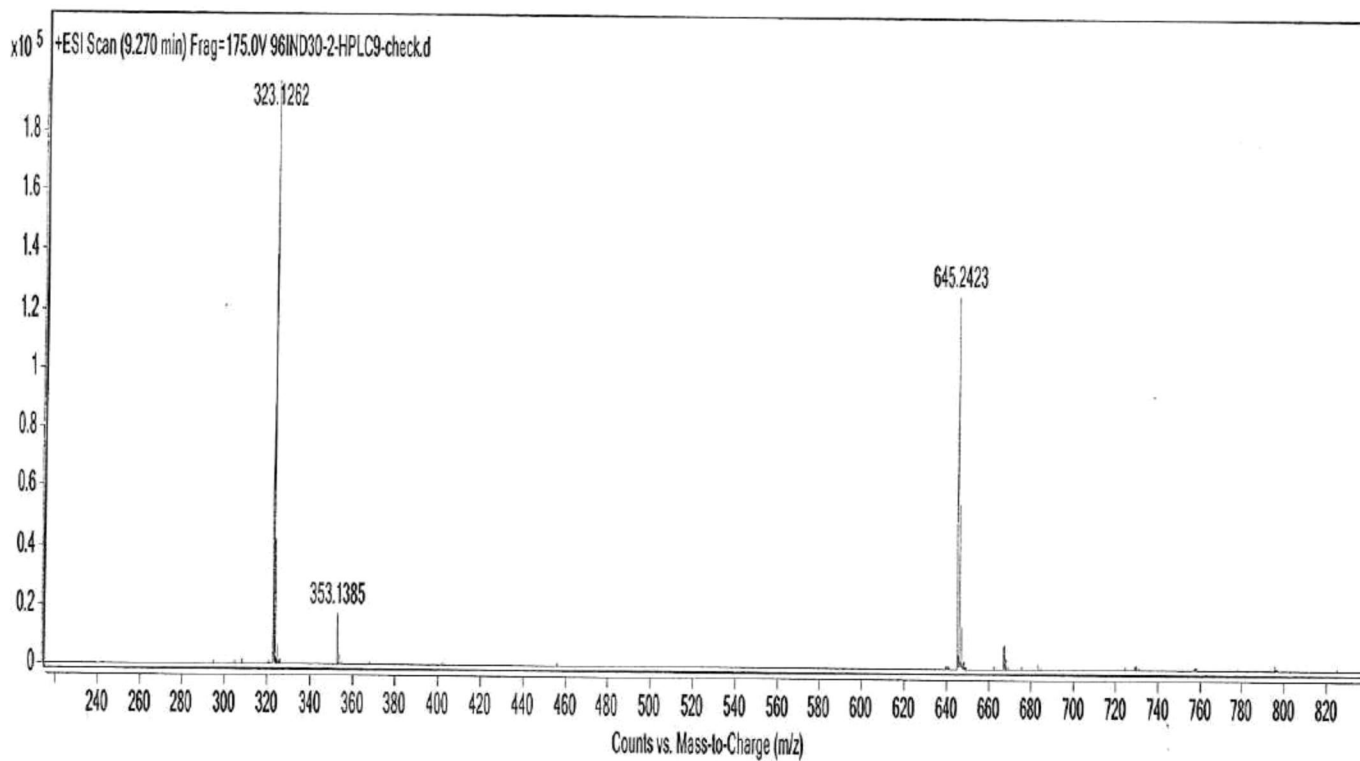
Anexo 14. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear bidimensional: 2D ^1H - ^{13}C RMN (HSQC) del compuesto 11-hidroxi-12b-metil-2,3,10,11-tetrahydro-1H-tetrafenol[5,4-*bc*]furan-6,8(9H,12bH)-diona a 500 MHz en MeCN- d_3 .



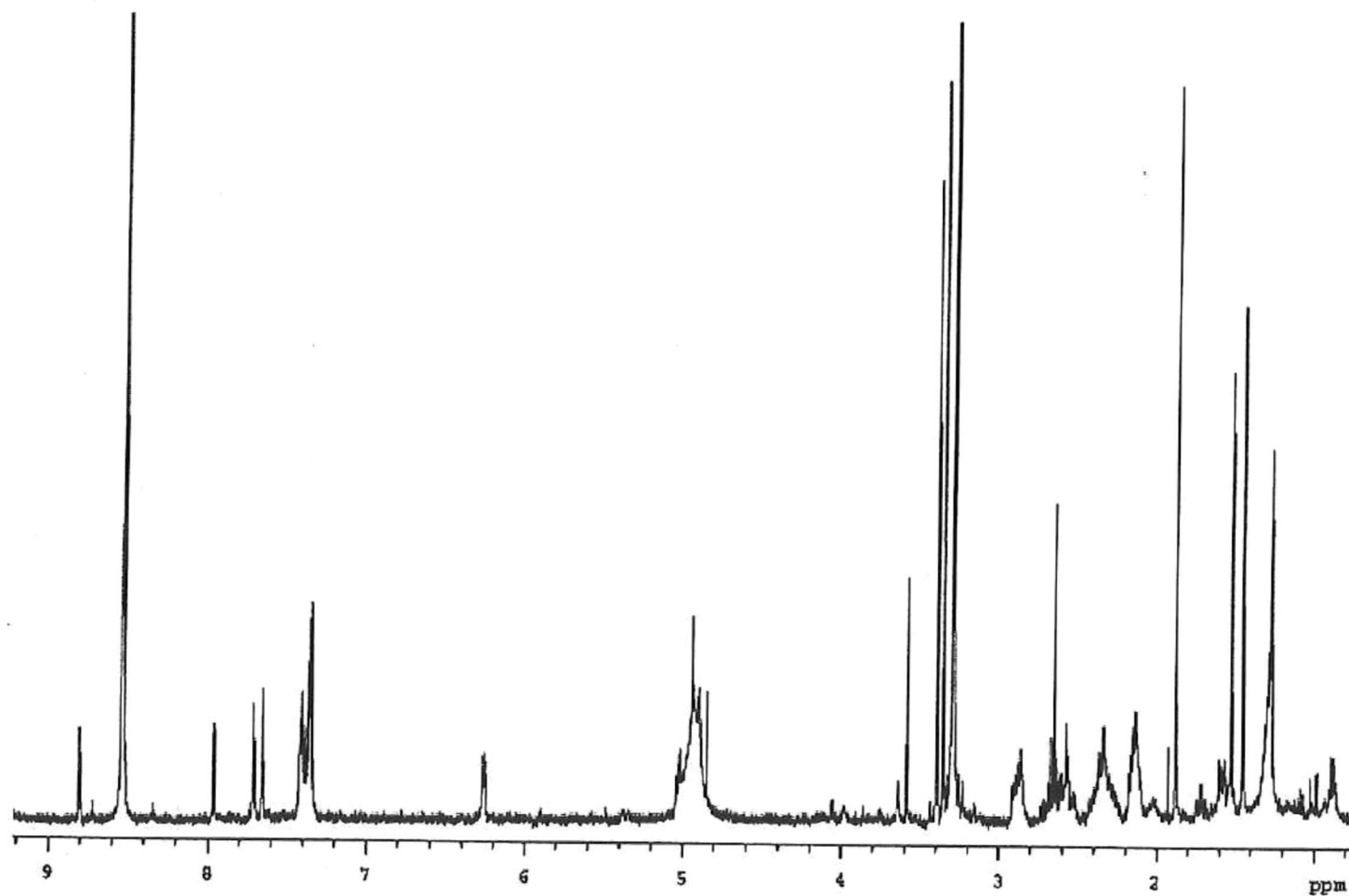
Anexo 15. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear bidimensional: 2D ^1H - ^{13}C RMN (HMBC) del compuesto 11-hidroxi-12b-metil-2,3,10,11-tetrahidro-1*H*-tetrafenol[5,4-*bc*]furan-6,8(9*H*,12*bH*)-diona a 500 MHz en MeCN- d_3 .



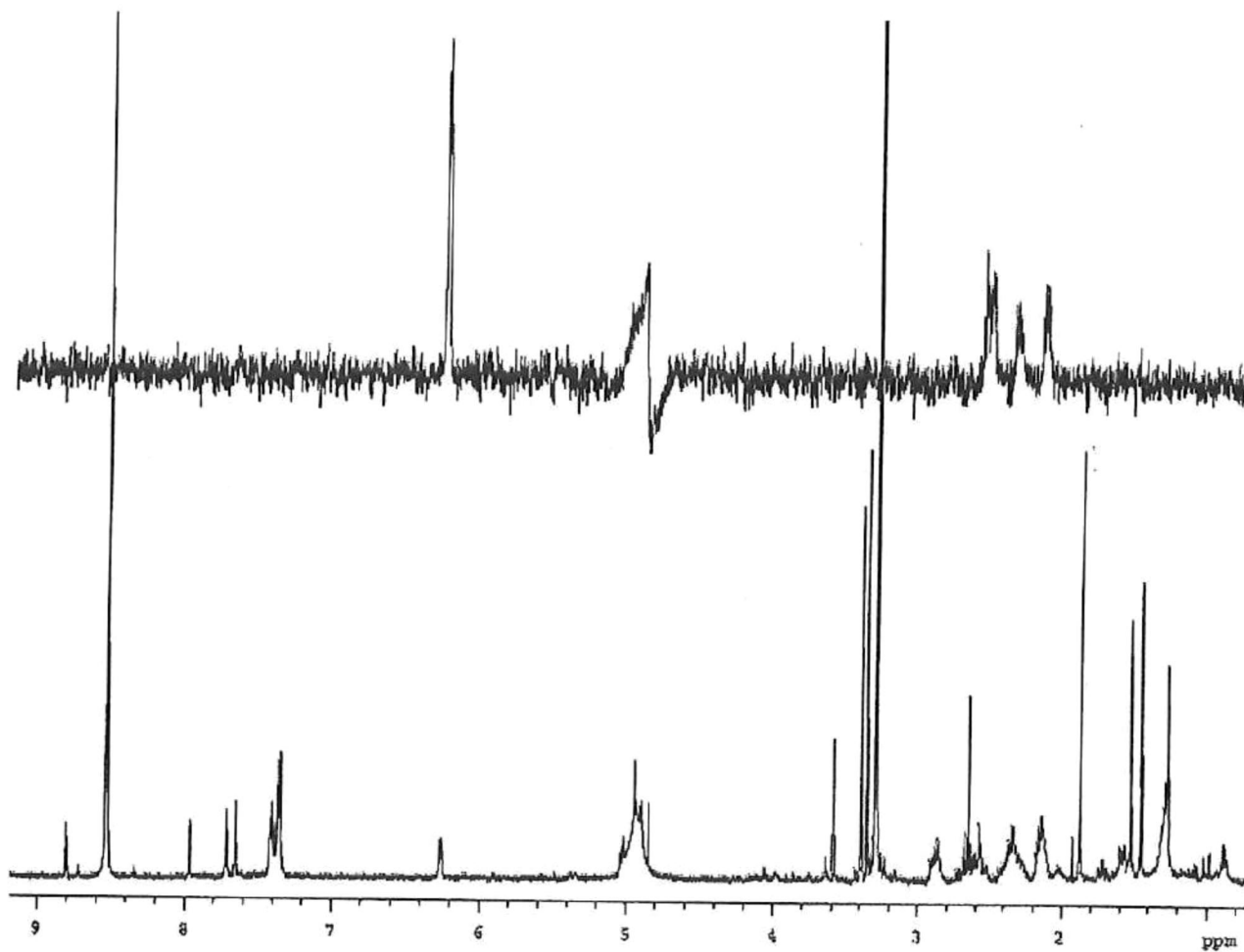
Anexo 16. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear bidimensional: 2D ^1H - ^{13}C RMN (NOESY) del compuesto 11-hidroxi-12b-metil-2,3,10,11-tetrahidro-1*H*-tetrafenol[5,4-*bc*]furan-6,8(9*H*,12*bH*)-diona a 500 MHz en MeCN- d_3 .



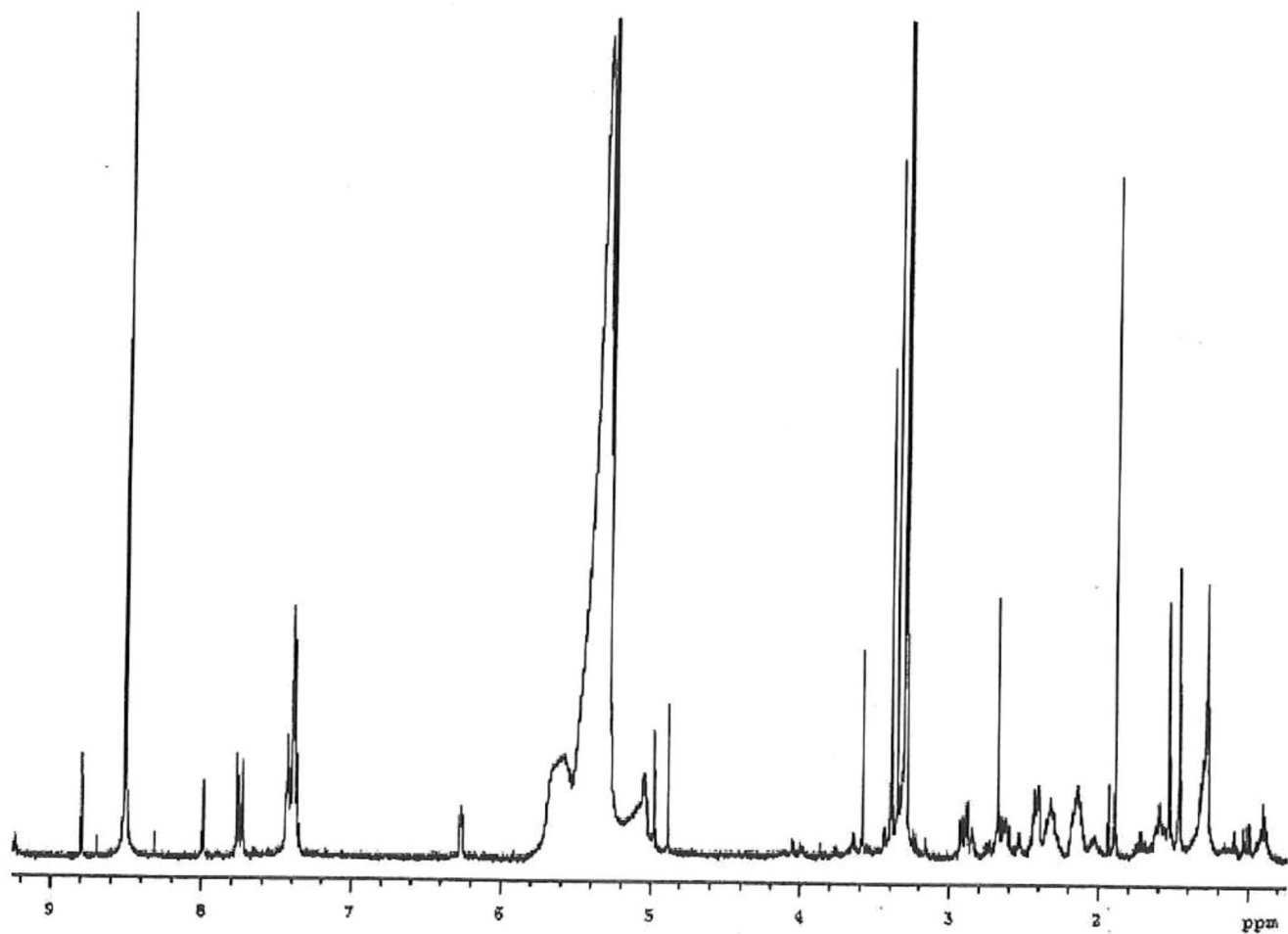
Anexo 17. Espectro de Masas de alta resolución ESI-TOF del compuesto 11-hidroxi-12b-metil-2,3,10,11-tetrahidro-1*H*-tetrafenol[5,4-*bc*]furan-6,8(9*H*,12*bH*)-diona.



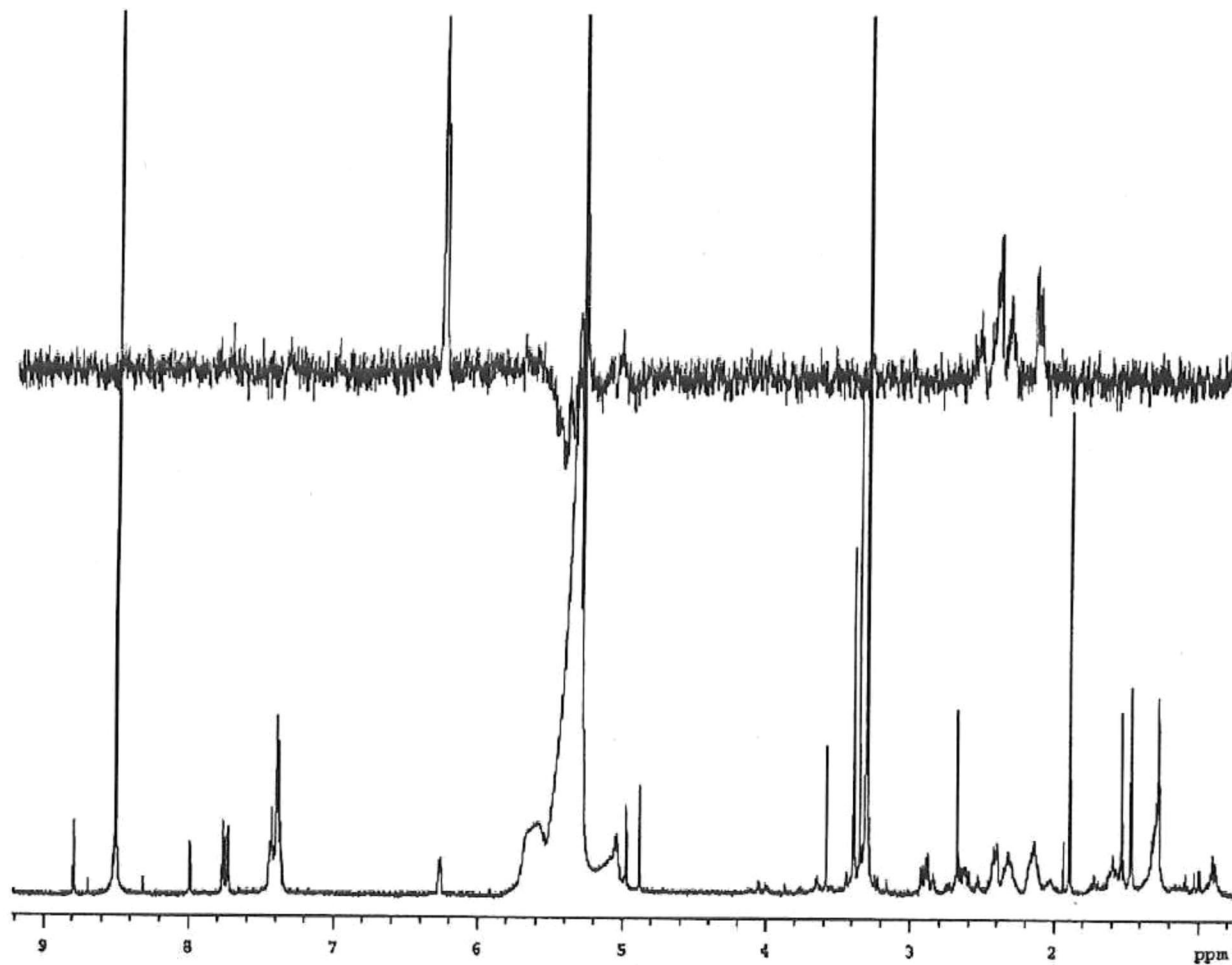
Anexo 18. Espectro de Resonancia Magnética protónica: ¹H (RMN) del producto de la reacción Mosher's del compuesto 11-hidroxi-12b-metil-2,3,10,11-tetrahidro-1*H*-tetrafenol[5,4-*bc*]furan-6,8(9*H*,12*bH*)-diona a 500 MHz en CD₃OD a 20° C.



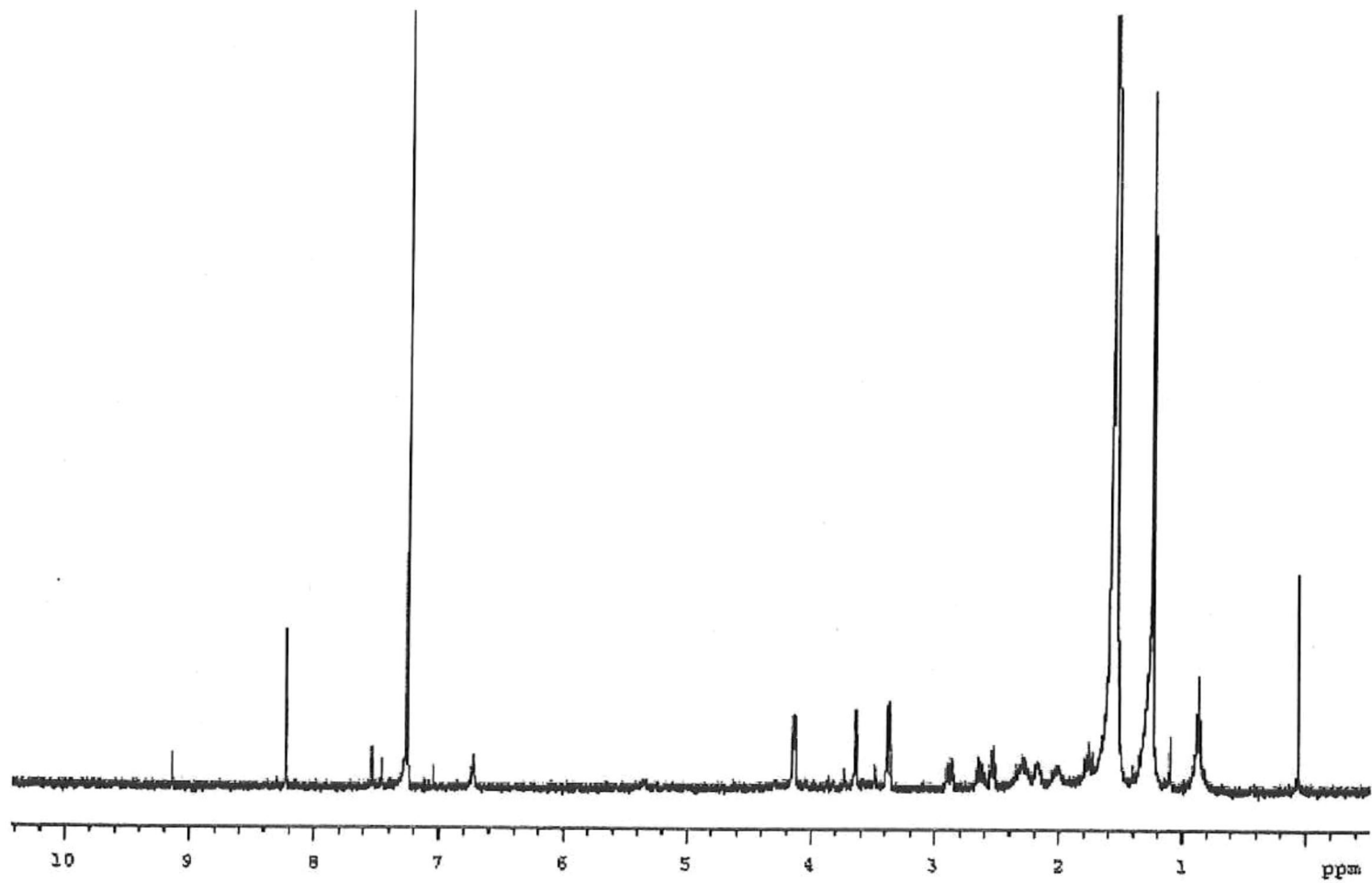
Anexo 19. Espectro de Resonancia Magnética protónica: ^1H (RMN) y TOCSY del producto de la reacción Mosher's del compuesto 11-hidroxi-12b-metil-2,3,10,11-tetrahidro-1*H*-tetrafenol[5,4-*bc*]furan-6,8(9*H*,12*bH*)-diona a 500 MHz en CD_3OD a 20° C.



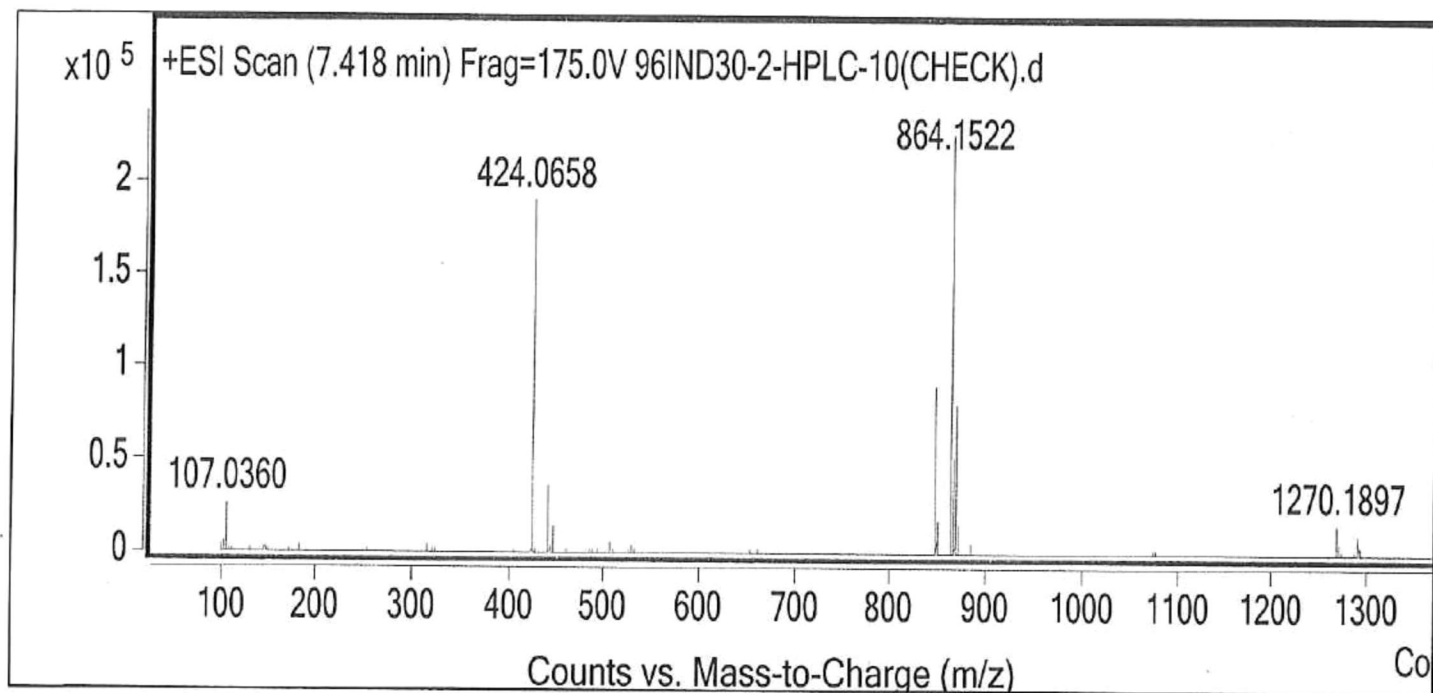
Anexo 20. Espectro de Resonancia Magnética protónica: ¹H (RMN) del producto de la reacción Mosher's del compuesto 11-hidroxi-12b-metil-2,3,10,11-tetrahydro-1H-tetrafenol[5,4-bc]furan-6,8(9H,12bH)-diona a 500 MHz en CD₃OD a -20° C.



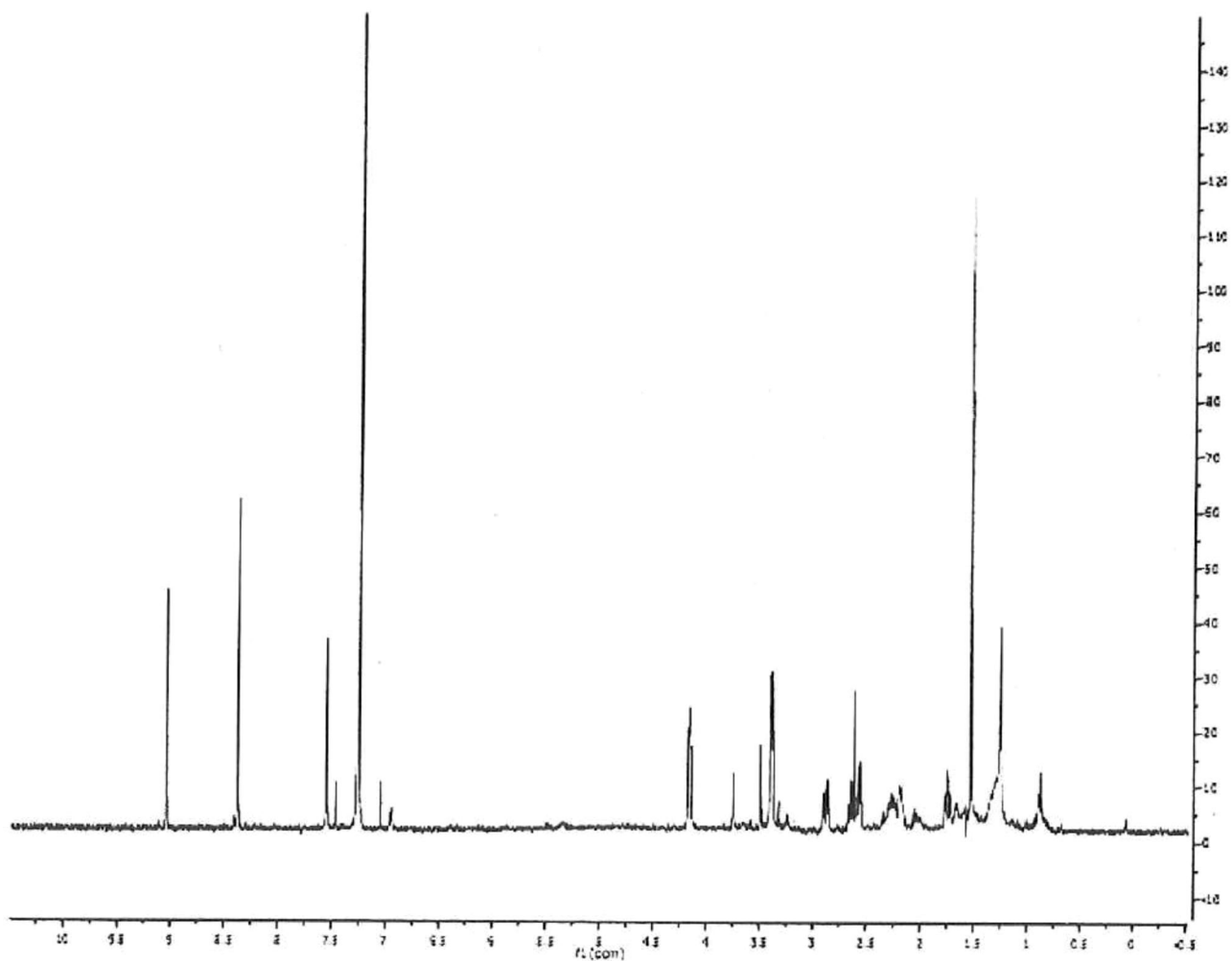
Anexo 21. Espectro de Resonancia Magnética protónica: ^1H (RMN) y TOCSY del producto de la reacción Mosher's del compuesto 11-hidroxi-12b-metil-2,3,10,11-tetrahidro-1*H*-tetrafenol[5,4-*bc*]furan-6,8(9*H*,12*bH*)-diona a 500 MHz en CD_3OD a -20°C .



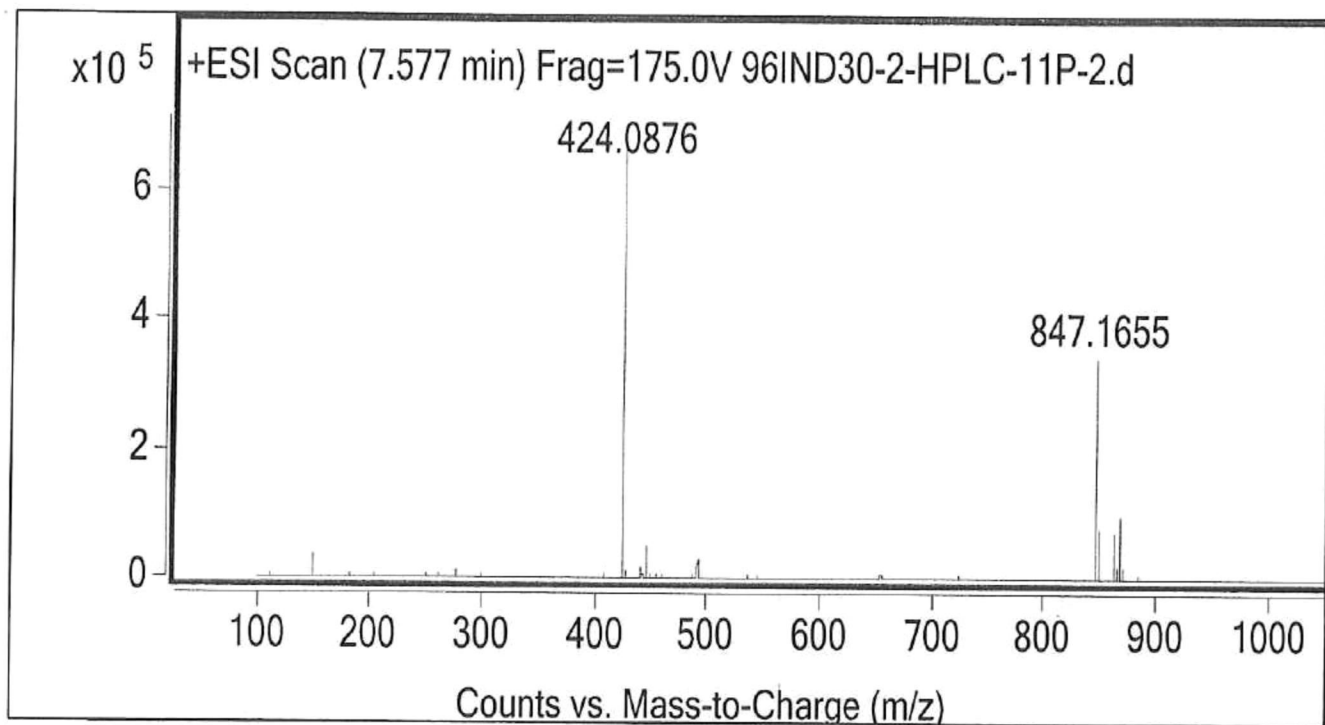
Anexo 22. Espectro de Resonancia Magnética protónica: ^1H (RMN) del compuesto Adociaquinona A, 500 MHz en CDCl_3 .



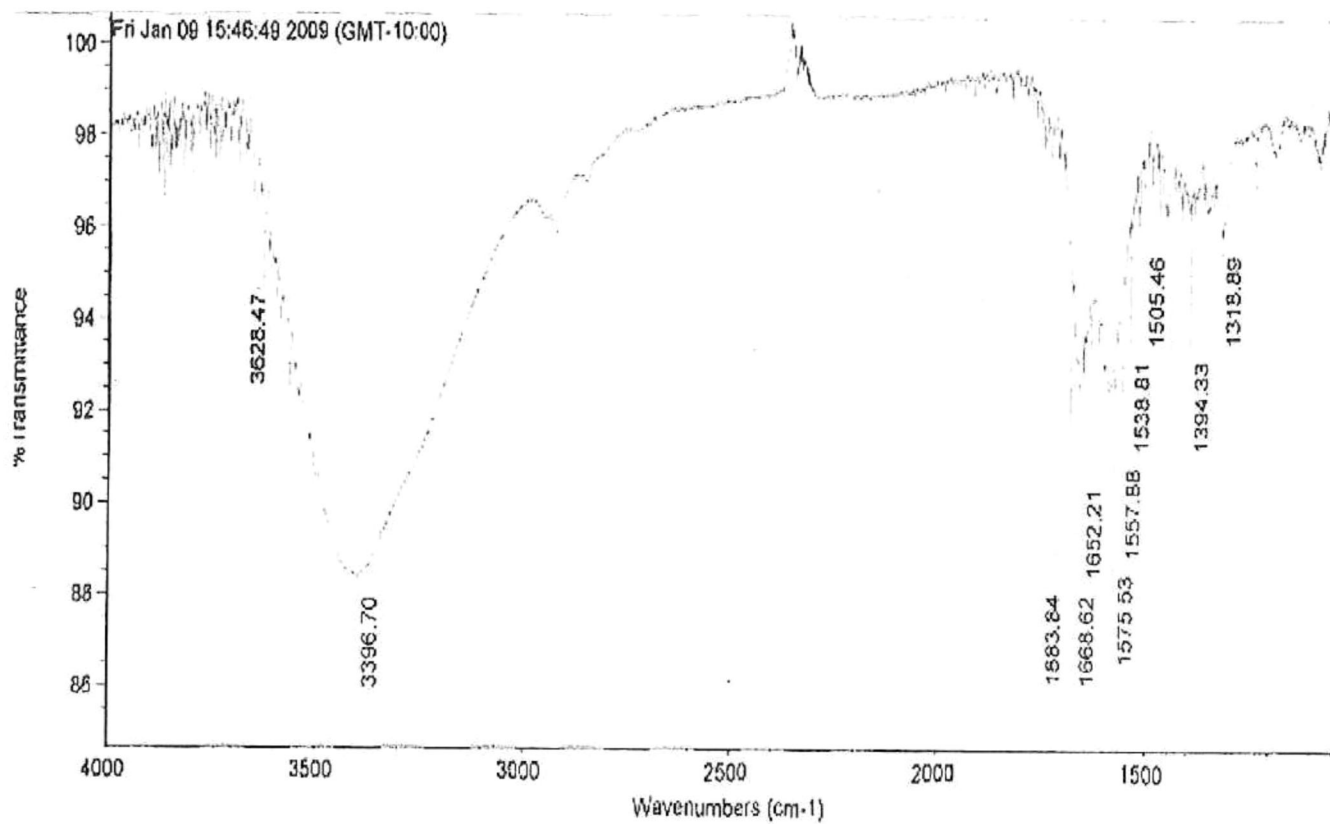
Anexo 23. Espectro de Masas de alta resolución ESI-TOF del compuesto Adociaquinona A.



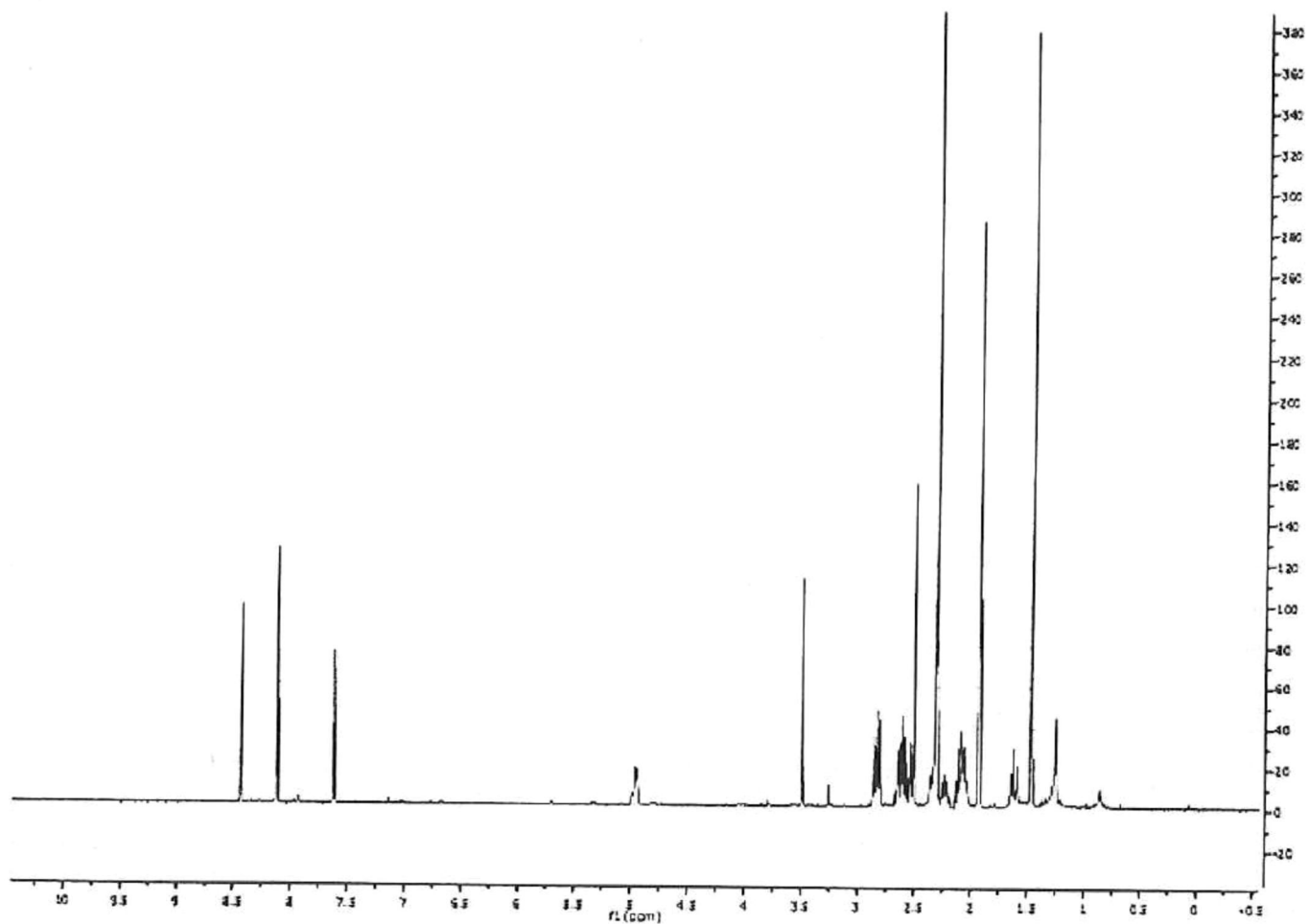
Anexo 24. Espectro de Resonancia Magnética protónica: ^1H (RMN) del compuesto Adociaquinona B, 500 MHz en CDCl_3 .



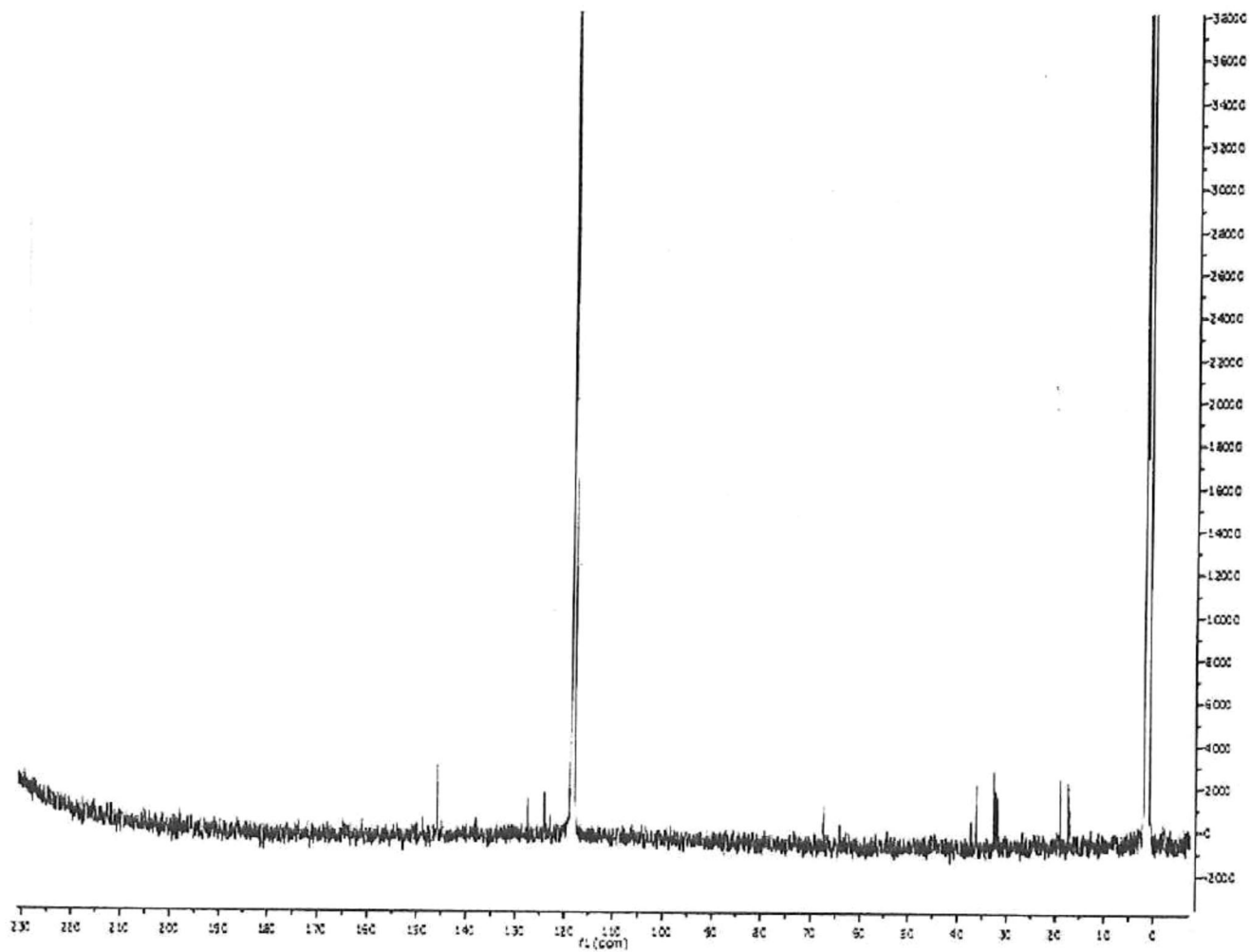
Anexo 25. Espectro de Masas de alta resolución ESI-TOF del compuesto Adociaquinona B.



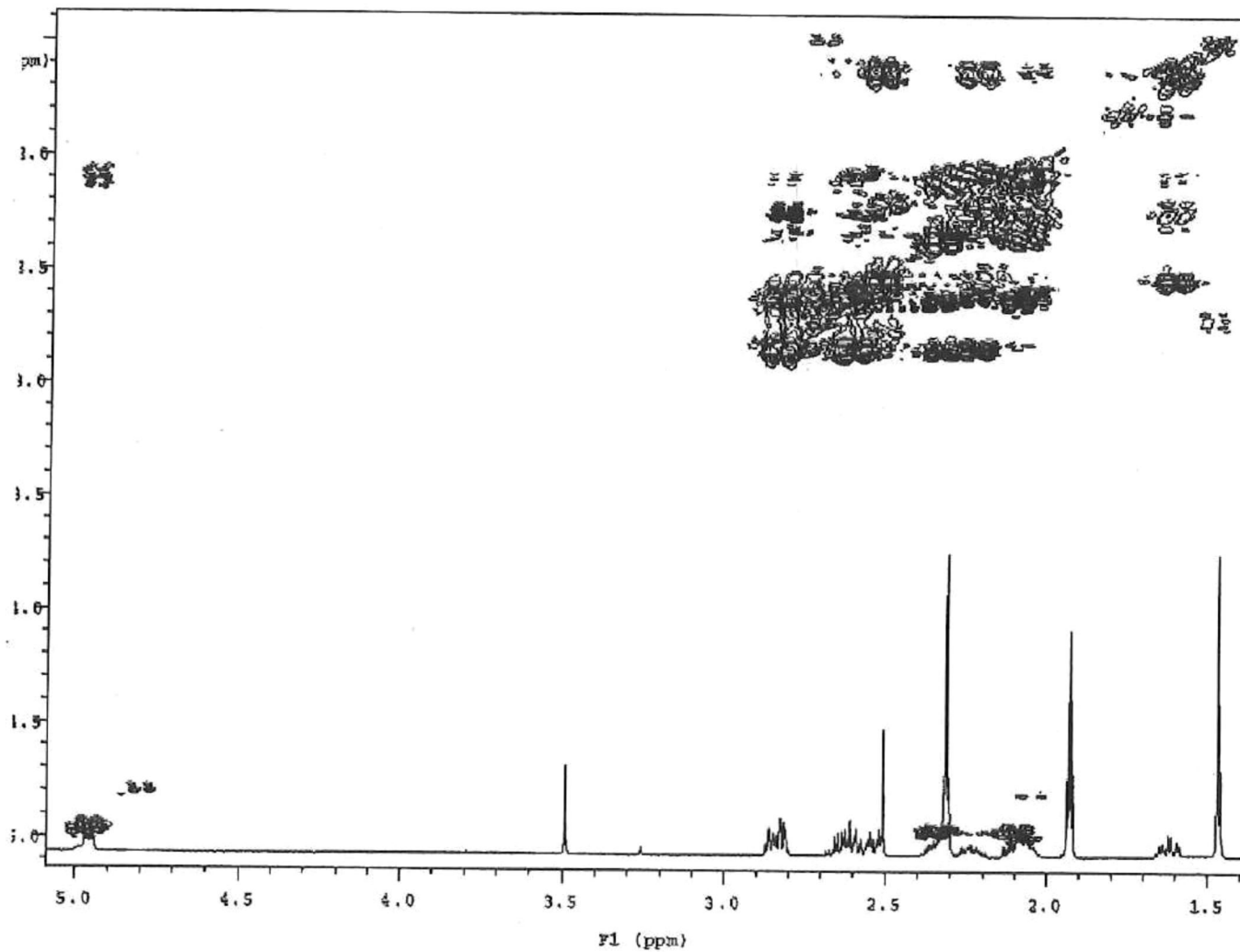
Anexo 26. Espectro de Infrarrojo del compuesto 8-hidroxi-12b-metil-2,3,9,10-tetrahidro-1*H*-tetrafenol[5,4-*bc*]furan-6,11(8*H*,12*bH*)-diona.



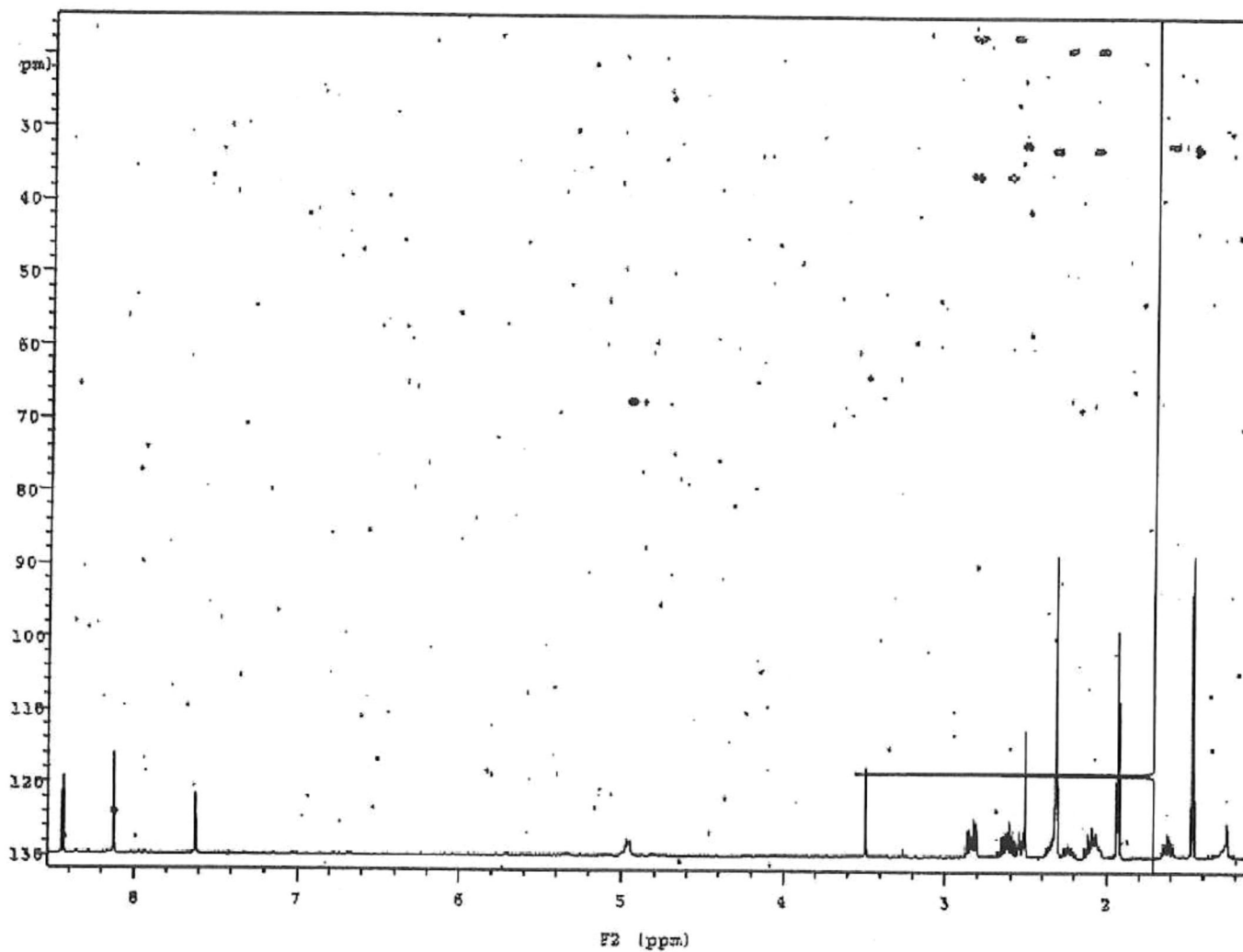
Anexo 27. Espectro de Resonancia Magnética protónica: ¹H (RMN) del compuesto 8-hidroxi-12b-metil-2,3,9,10-tetrahydro-1H-tetrafenol[5,4-bc]furan-6,11(8H,12bH)-diona a 500 MHz en MeCN-d₃.



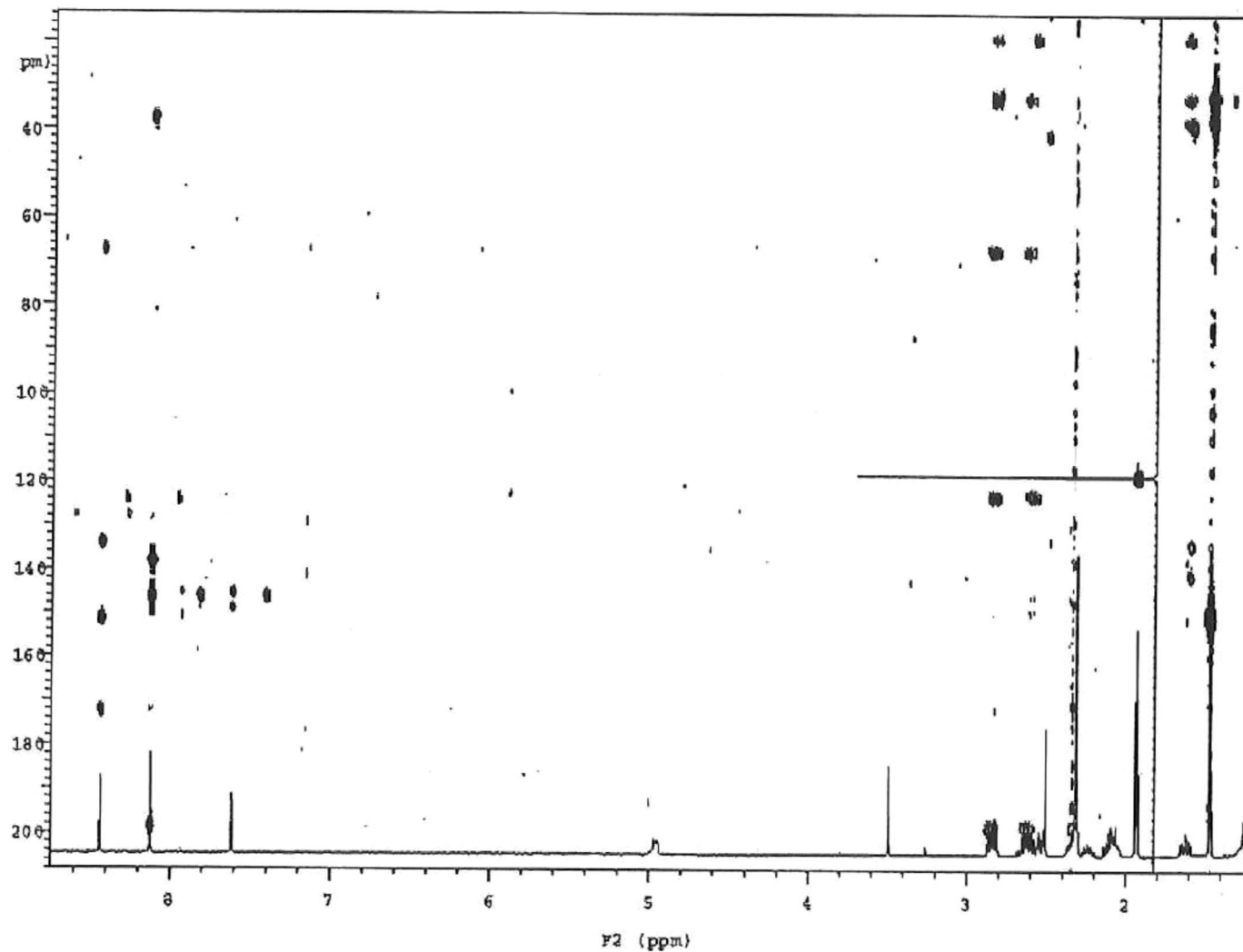
Anexo 28. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear carbono ^{13}C (RMN) del compuesto 8-hidroxi-12b-metil-2,3,9,10-tetrahydro-1H-tetrafenol[5,4-*bc*]furan-6,11(8H,12bH)-diona a 125 MHz en MeCN-d_3 .



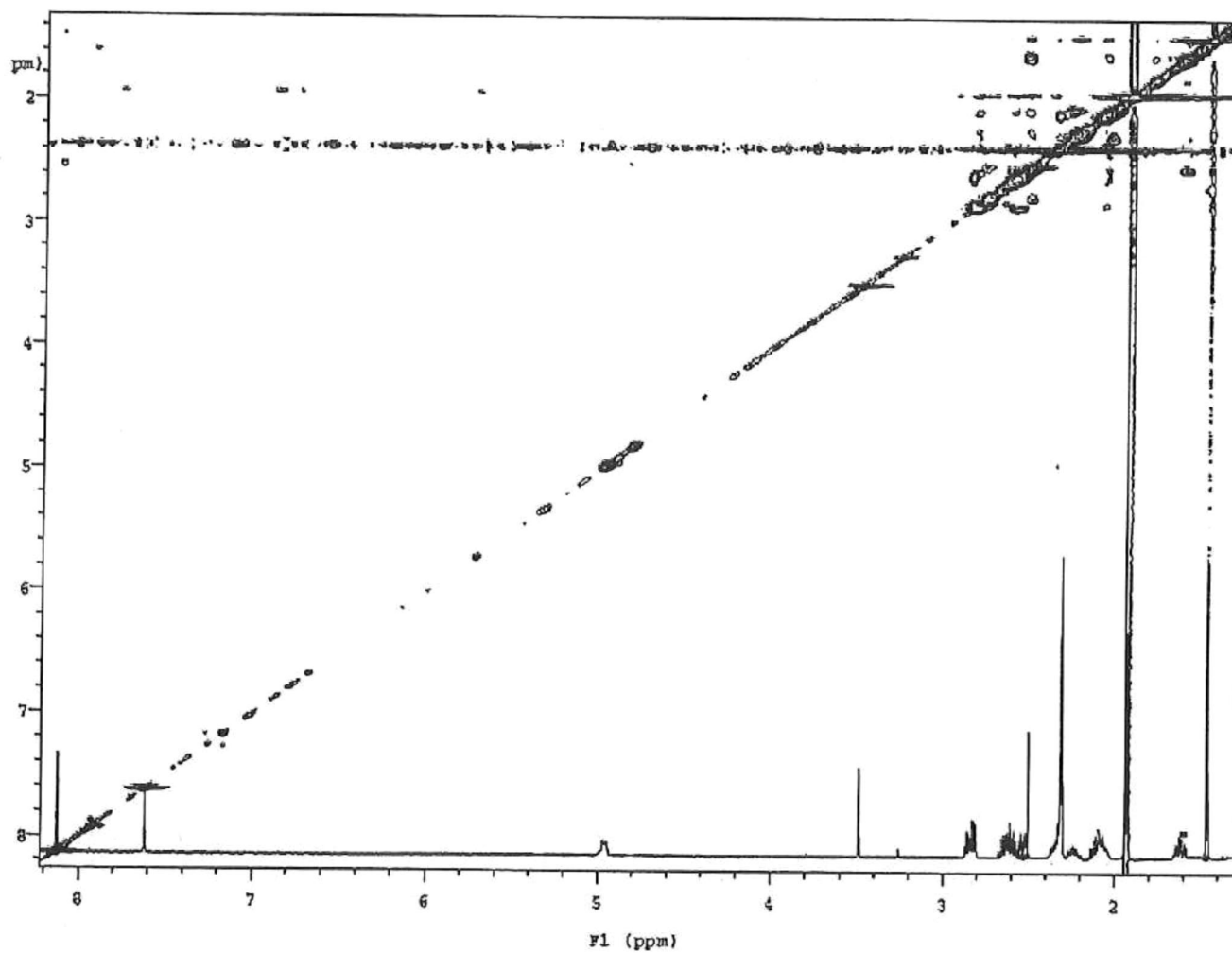
Anexo 29. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear bidimensional: 2D ^1H - ^{13}C RMN (COSY) del compuesto 8-hidroxi-12b-metil-2,3,9,10-tetrahydro-1*H*-tetrafenol[5,4-*bc*]furan-6,11(8*H*,12*bH*)-diona a 500 MHz en MeCN- d_3 .



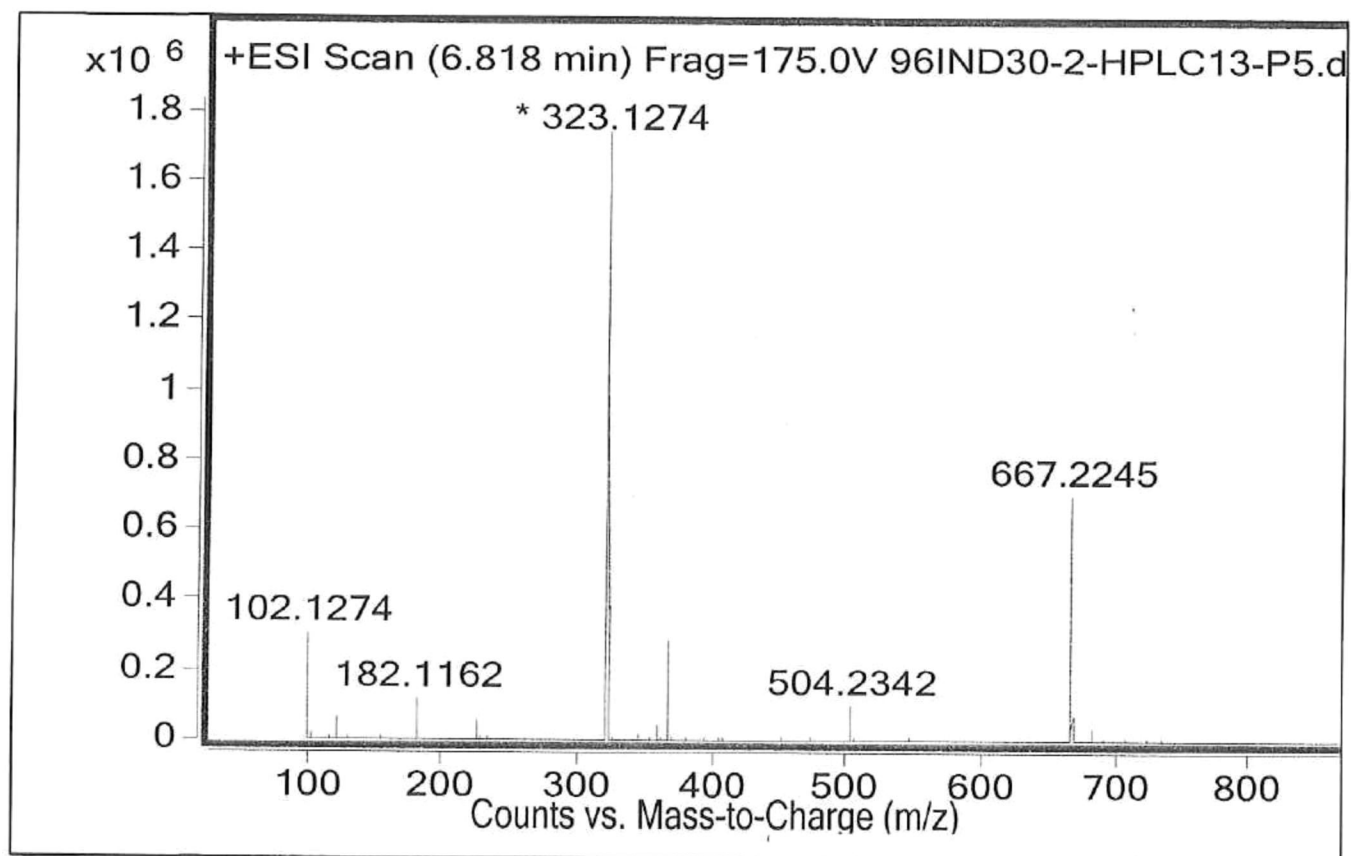
Anexo 30. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear bidimensional: 2D ^1H - ^{13}C RMN (HSQC) del compuesto 8-hidroxi-12b-metil-2,3,9,10-tetrahydro-1*H*-tetrafenol[5,4-*bc*]furan-6,11(8*H*,12*bH*)-diona a 500 MHz en MeCN- d_3 .



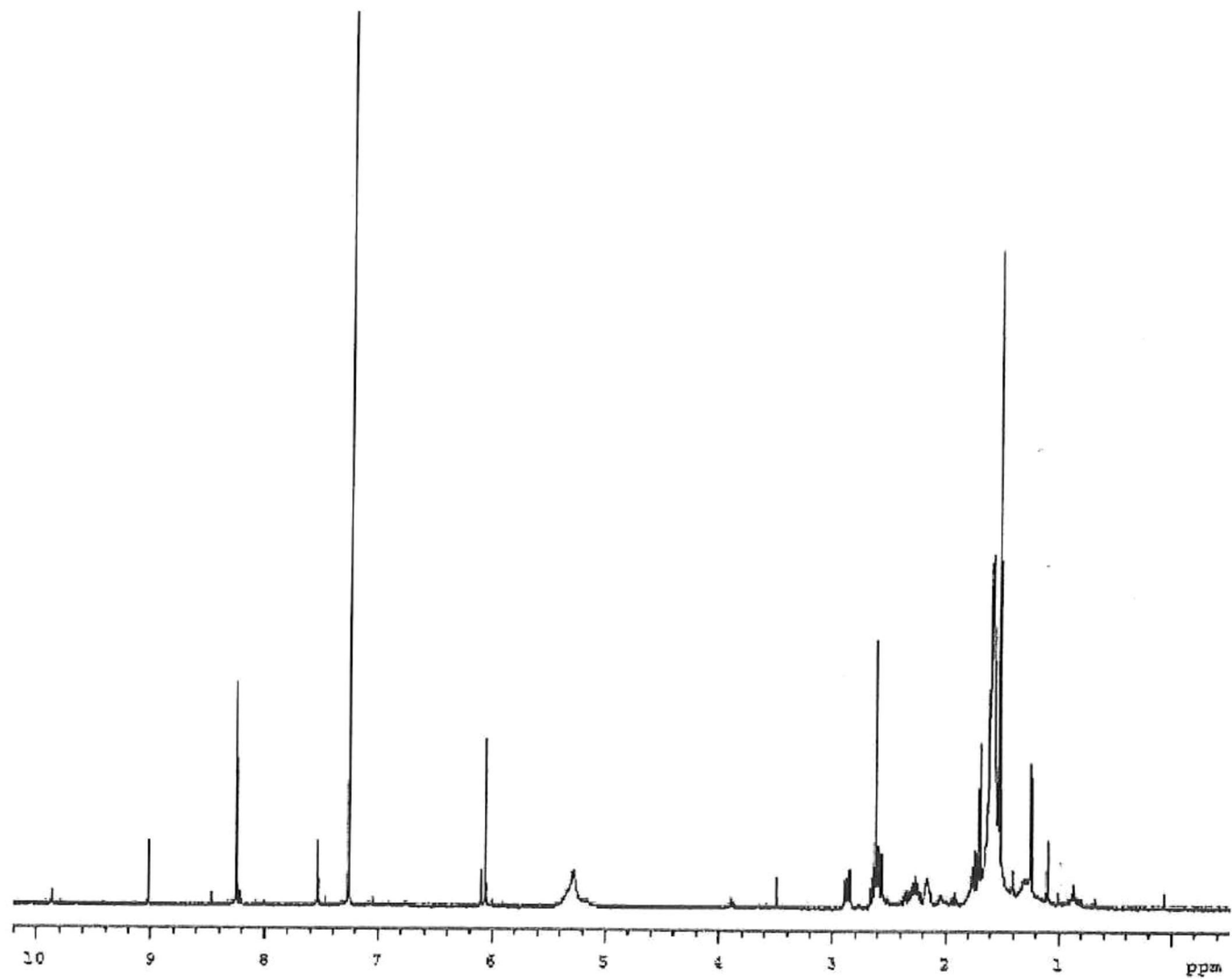
Anexo 31. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear bidimensional: 2D ^1H - ^{13}C RMN (HMBC) del compuesto 8-hidroxi-12b-metil-2,3,9,10-tetrahydro-1*H*-tetrafenol[5,4-*bc*]furan-6,11(8*H*,12*bH*)-diona a 500 MHz en MeCN- d_3 .



Anexo 32. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear bidimensional: 2D ^1H - ^{13}C RMN (ROESY) del compuesto 11-hidroxi-12b-metil-2,3,10,11-tetrahydro-1*H*-tetrafenol[5,4-*bc*]furan-6,8(9*H*,12*bH*)-diona a 500 MHz en MeCN- d_3 .



Anexo 33. Espectro de Masas de alta resolución ESI-TOF del compuesto 8-hidroxi-12b-metil-2,3,9,10-tetrahidro-1*H*-tetrafenol[5,4-*bc*]furan-6,11(8*H*,12*bH*)-diona.



Anexo 34. Espectro de Resonancia Magnética protónica: ^1H (RMN) del compuesto con peso molecular 333 a 500 MHz en CDCl_3 .