

ACTIVIDAD ANTITUMORAL Y TOXICIDAD DE (+)-CURCUFENOL Y DE CURCUDIOL AISLADOS DE LA ESPONJA MARINA *DIDISCUS OXEATA*

Ahmed M. Salama*, Claudia Fonseca, Laura Renjifo

* Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia, A. A. 14490 Bogotá, D.C., Colombia.

* E-mail: ahmedsa@ciencias.ciencias.unal.edu.co

RESUMEN

El extracto metamólico, el extracto clorofórmico, el curcufenol y el curcudiol obtenidos de la esponja fueron evaluados frente a *Artemia salina* obteniéndose una concentración letal media de 0.54, 5.57, 3.10 y 0.70 µg/mL, respectivamente. También se probó su actividad antitumoral mediante el bioensayo de tumorigénesis inducida por *Agrobacterium tumefaciens* en disco de zanahoria, produciéndose inhibición en concentraciones mayores de 60 µg/mL.

Palabras claves: Actividad antitumoral - Toxicidad - Curcufenol - Curcudiol - *Didiscus oxeata*.

SUMMARY

ANTITUMOR ACTIVITY AND TOXICITY OF CURCUPHENOL AND CURCUDIOL ISOLATED FROM THE MARINE SPONGE *Didiscus oxeata*.

Two pure compounds were isolated by column chromatography from the chloroformic and methanolic extracts of the marine sponge *Didiscus oxeata* and were identified by spectroscopic methods as the sesquiterpenes (+)-Curcuphenol and Curcudiol. The methanolic, chloroformic extracts, (+)-Curcuphenol and Curcudiol showed L C₅₀ of 0.54, 5.57, 3.10 and 0.70 µg/Ml in *Artemia salina*

larvae respectively. The same extracts and isolated compounds presented antitumour activity in concentrations major than 60 µg/mL by the method of *Agrobacterium tumefaciens* in carrot disc.

Key words: Antitumor activity - Toxicity - Curcuphenol - Curcudiol - *Didiscus oxeata*.

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas los principios activos aislados de diferentes especies de esponjas marinas han dado una respuesta favorable frente a la evaluación de actividades farmacológicas tales como la actividad analgésica presentada por los derivados heterocíclicos denominados Hennoxazoles A-D de la esponja *Polyfibrospongia* sp (1), la actividad antitumoral representada, entre otros, por el péptido Jaspamida aislado de la esponja *Hemiaspilla minor* (2), actividad antiviral como por ejemplo los sulfatos esteroidales Halistanol F - G aislados de la esponja marina *Pseudoaxinissa digitata* (3), antifúngica como la que poseen los alcaloides Hamacanthinas A y B (4) y el péptido Neosiphoniamolido (5) y la antiinflamatoria presentada por el sesterterpeno Luffarielólido procedente de la esponja *Luffariella* sp (6).

PARTE EXPERIMENTAL

Materiales y métodos

Recolección e identificación de la esponja

La esponja marina fue recolectada en la Ensenada Granate (Punta Aguja) en la Bahía de Santa

Recibido para evaluación:
Aprobado para publicación:

Marzo de 2000
Mayo de 2000

Marta (Colombia) a una profundidad de 12 - 15 m por el Doctor Sven Zea y posteriormente clasificada en el Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras "José Benito Vives De Andreis" (INVE-MAR) como *Didiscus oxeata*; la esponja fue empa-cada, rotulada y congelada para su envío a Santafé de Bogotá D.C y se conservó refrigerada hasta su empleo.

Extracción y fraccionamiento

956g de la esponja congelada, se cortó en trozos y se extrajo con metanol por medio de agitación mecánica a temperatura ambiente hasta agotamiento. Luego se filtró y se concentró en el rotavapor a una temperatura de 40°C. Se obtuvo un residuo viscoso de color caramelo, con olor característico que pesó 17.6g. La esponja residual (386g) se extrajo con cloroformo hasta agotamiento, por medio de agitación manual a temperatura ambiente, luego se concentró en el rotavapor a 40°C y se obtuvo un sólido color caramelo oscuro que pesó 55.6g.

Aislamiento de compuestos puros del extracto cloroformico por cromatografía en columna

Se saturaron 3g del extracto cloroformico en 3g de sílica gel G-60 para cromatografía en columna y se colocaron en una columna de vidrio previamente empacada con una suspensión de la misma sílica (75 g), con dimensiones de 60 X 2.5 cm.

La elución se comenzó con benceno seguida de mezclas con polaridad creciente de benceno-acetato de etilo y finalizando con acetato de etilo. La columna fue controlada por cromatografía en capa delgada, empleando como fase móvil el sistema solvente Benceno:Acetato de Etilo (85:15) y revelando con vainillina al 1% p/v en ácido ortofosfórico al 10% v/v en etanol al 96% y calentando posteriormente a 110°C durante 10 minutos. Se recogieron 404 fracciones de 10 mL cada una, las cuales se reunieron en doce grupos de acuerdo al control por CCD, con un rendimiento de 2.31 g. El control por cromatografía en capa delgada mostró que el grupo de fracciones 23-30 (693 mg) contiene una sustancia principal con R_f

0.77, mientras el grupo de fracciones 250-288 (211 mg) contiene otra sustancia R_f 0.14, las cuales fueron purificadas por cromatografía en capa delgada preparativa en la misma fase móvil anteriormente mencionada. La pureza de ambas sustancias obtenidas fue confirmada por CCD en varios sistemas solventes, entre ellos: Ciclohexano-Acetato de Etilo (70:30), Ciclohexano-Acetato de Etilo (50:50), Ciclohexano-Acetona (97:3) y Ciclohexano-Isopropanol (97:3) mostrando en cada caso la presencia de un sólo compuesto que fueron denominados como DO1 (R_f 0.77) y DO2 (R_f 0.14).

Aislamiento y purificación de los compuestos DO1 y DO2 del extracto metanólico

Por comprobación cromatográfica (CCD) se confirmó la presencia de los compuestos DO1 y DO2 en ambos extractos cloroformico y metanólico. Con fines de obtener mayor cantidad de los compuestos se pesaron 9g del extracto metanólico y se procedió al aislamiento y purificación por medio de Cromatografía en Capa Delgada preparativa (CCDP) empleando sílica gel HF₂₅₄ en el sistema ciclohexano: acetato de etilo (70:30). De esta forma se obtuvieron 55 mg del compuesto DO1 y 113 mg del compuesto DO2. El compuesto DO2 (113 mg) fue purificado por cromatografía en columna 20 X 1.0 cm, 4.0 g de sílica gel para columna y eluyendo con Benceno. Se recogieron 119 fracciones de 5 mL cada una y de acuerdo con el control por CCD (Ciclohexano-Acetato de Etilo 70:30) se obtuvieron 69 mg del compuesto DO2, en un estado puro, de las fracciones N° 87 a 119.

Identificación de los compuestos

Compuesto DO1 ((+)-Curcufenol) I

Es un líquido aceitoso de color naranja, soluble en cloroformo, Benceno, Acetato de Etilo; ν_{\max} (película) cm^{-1} : 3343 (OH), 2958 (CH_2 , CH_3), 1619 ($\text{C}=\text{C}$), 1584, 1517 y 1506 ($\text{C}=\text{C}$ aromático), 808 y 855 (deformación C-H); rmn^1H (CDCl_3 , 90 MHz) δ 7.04 (1H, d, $J=7.5$ Hz, H12), 6.70 (1H, d, $J=7.5$ Hz, H11), 6.57 (1H, s, H9), 5.13 (1H, t, H3), 5.03 (1H, s, OH), 3.00 (1H, sexteto, $J=7.0$ Hz, H6), 2.25 (3H, s, H13), 1.69 (3H, s, H15), 1.53 (3H,

s,H1), 1.23 (3H,d, J=7.5 Hz, H14); em m/z (% int.) rel.) 218 (25.6), 203 (3.5), 161 (11.6), 135 (100.0), 121 (25.6), 94 (15.1).

Compuesto DO2 (Curculiol) II

Líquido aceitoso de color amarillo pálido soluble en Cloroformo y Acetato de Etilo. Ir v max (película) cm^{-1} 3367 (OH), 2961 (CH_2 , CH_3), 1618,1584 y 1518 ($\text{C}=\text{C}$ aromático), 807 (deformación C-H); $\text{rmn } ^1\text{H}$ (CDCl_3 , 90 MHz) δ 7.04 (1H, d, J=8 Hz, H12), 6.71 (1H, d, J=8.5 Hz, H11), 6.58 (1H, s, H9), 3.06 (1H, m, H6), 2.28 (3H, s, H13), 1.23 (3H, d, J=6 Hz, H14), 1.19 (6H, s, H1 y H15). $\text{rmn } ^{13}\text{C}$ (CDCl_3 , 90 MHz) ppm 153.2 (C8), 136.2 (C 10), 130.7 (C 7), 126.8 (C 12), 121.4 (C11), 116.4 (C 9), 71.7 (C 2), 43.3 (C 3), 37.7 (C 5), 31.1 (C 6), 29.4 (C 15), 28.6 (C 1), 22.1 (C 4), 21.0 (C 14), 20.8 (C 13); em m/z (% int. rel.) 236 (1.3), 221 (3.0), 218 (31.2), 203 (5.0), 175 (2.1), 135 (100.0), 121 (12.3), 94 (6.1).

Bioensayos

Determinación de la CL_{50}

Para el bioensayo de letalidad empleando *Artemia salina* (7) se utilizaron los extractos metanólico y clorofórmico al igual que los compuestos aislados (+)-Curcufenol y Curculiol.

Para llevar a cabo el ensayo se preparó una solución stock de 1000 $\mu\text{g/mL}$, de los extractos y compuestos, utilizando DMSO al 0.17 % en agua v/v a partir de la cual se obtuvieron las diluciones posteriormente mencionadas. Se adicionó 1 mL de cada dilución en un tubo de ensayo, se transfirieron 10 nauplios tomados con una pipeta pasteur y se completó a volumen de 5 mL con solución salina al 0.9 %, obteniendo concentraciones finales de 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.78, 0.39, 0.19 y 0.097 $\mu\text{g/mL}$. El blanco del bioensayo se realizó tomando el mismo número de nauplios y suspendiéndolos en 5 mL de solución salina al 0.9 %, para los controles se utilizó una solución de DMSO al 0.17 % en agua v/v. Las larvas se dejaron en contacto con las sustancias en estudio durante 24 horas con luz artificial. Al cabo de este tiempo se hizo el conteo de los nauplios muertos en cada dilución con la ayuda de una lupa. Para los

extractos crudos y el Curculiol el ensayo se realizó por triplicado mientras que para el (+)-Curcufenol se realizaron cinco réplicas.

Los datos obtenidos se sometieron a tratamiento estadístico mediante el empleo de Probits, lo cual se hizo en un programa de computador diseñado especialmente para la determinación de la Concentración Letal 50.

Actividad Antitumoral

Previamente a la actividad antitumoral se evaluó la capacidad de los extractos y compuestos de inhibir el crecimiento del microorganismo *Agrobacterium tumefaciens* (cepa B6). Luego de observar que no existía inhibición por parte de las sustancias se procedió a realizar el bioensayo en discos de papa (8) y en discos de zanahoria.

Debido a los resultados de los ensayos en discos de papa que mostraron deterioro de los discos por varios factores no completamente determinados, entre ellos: humedad, el tipo de papa, insecticidas empleados en la fumigación, etc., se decidió emplear la técnica del disco de zanahoria para la comprobación de la actividad antitumoral, escogiendo aquellos parámetros (tipo de zanahoria, humedad, temperatura, concentración del inóculo, entre otros) que permitieron obtener los mejores resultados.

Basándonos en los ensayos preliminares se seleccionaron las siguientes concentraciones 120, 60, 30, 15, 7.5 y 3.75 $\mu\text{g/mL}$ tanto para los extractos como para los compuestos (+)-Curcufenol y Curculiol y se empleó el siguiente protocolo:

1. Se lavó las zanahorias frescas con agua destilada, empleando variedad común debido a que la llamada mini - zanahoria por su excesivo contenido de humedad favorecía el crecimiento de gusanos.
2. Se desecharon los extremos y se cortaron discos de 0.5 cm de espesor empleando técnica aséptica.
3. Se colocaron los discos (tres por caja) en cajas de Petri cuyo soporte es papel filtro impregnado con 1 mL de agua estéril ya que al emplear mas agua los discos se dañan al cabo de aproximadamente 5 días; los discos se humedecen debido a

que la zanahoria se deshidrata fácilmente lo cual disminuye el crecimiento de los tumores.

4. Para la preparación de los extractos y compuestos: se pesaron 3.6 mg de cada uno disolviéndolos en 3 mL de DMSO. Estas soluciones fueron filtradas a través de filtros Sartorius de 0.22 μm y recibidos en un tubo de ensayo estéril. Se midieron los volúmenes necesarios para obtener las concentraciones seleccionadas previamente (120, 60, 30, 15, 7.5 y 3.75 $\mu\text{g/mL}$) y se completó a volumen hasta 2 mL con agua estéril. Se adicionaron 2 mL del caldo que contenía *Agrobacterium tumefaciens* al 1 % (48 horas de crecimiento) y de forma inmediata se inocularon los discos con 100 μL de cada una de las soluciones anteriores.

5. Se incubaron las cajas (tres réplicas por cada sustancia) a temperatura ambiente (18 °C) debido a que los discos no pierden humedad fácilmente como sucede a 28 °C.

6. Se realizó conteo de los tumores a los 10, 25 y 30 días y los resultados se expresan de forma semicuantitativa dependiendo de la comparación frente al control de la siguiente forma: Cantidad máxima de tumores o sea igual al control (+++), cantidad moderada frente al control (++). Cantidad inferior o casi nula frente al control (+) y no crecimiento de tumores (NC), lo que representa Actividad Antitumoral.

RESULTADOS

Identificación del Compuesto DO1 ((+)-Curcufenol), I

Por cromatografía en columna del extracto clorofórmico se obtuvo un compuesto líquido aceitoso de color naranja que dio solamente una mancha con R_f 0.77 en CCD, Benceno: Acetato de Etilo (85:15), revelando con vainillina-ácido ortofosfórico y posterior calentamiento a 110 °C por 10 minutos. El espectro de masas de alta resolución presenta el pico del ion molecular a m/z 218 que sugiere una fórmula química $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}$, lo que coincide para un compuesto tipo sesquiterpénico.

El espectro infrarrojo muestra una banda ancha y fuerte en 3443 cm^{-1} que puede asignarse a un grupo OH que está confirmado por los picos m/z 148, 135, 121 y 94 en el espectro de masas. El espectro $\text{rmn } ^1\text{H}$ muestra tres señales singlete, representando cada una tres protones (grupo metilo), a δ 2.26, 1.69, 1.53 y una señal doblete δ 1.23, $J=7.8$ Hz para otros tres protones que corresponden al cuarto metilo que acopla con un protón gemelo que muestra una señal multiplete a δ 3.00 ppm por su acoplamiento con otros dos protones del siguiente átomo de carbono. El espectro de infrarrojo muestra una señal a 1619 cm^{-1} para un doble enlace con un protón olefínico que se puede confirmar por una señal triplete δ 5.13 ppm, en el espectro de $\text{rmn } ^1\text{H}$. El espectro de IR muestra bandas a 1584, 1517 y 1506 cm^{-1} para un anillo aromático que se confirma por los picos m/z 148, 135, 121 y 94 en el espectro de masas y por una señal singlete para un protón δ 6.57, una señal doblete para un protón δ 6.70 $J=8$ Hz y otra señal doblete a δ 7.04 $J=7.5$ Hz en el espectro $\text{rmn } ^1\text{H}$ que indica la presencia de un anillo aromático trisustituído en las posiciones 1, 2 y 4, con una cadena alifática en la posición 1 con un doble enlace terminal bisustituído con dos grupos metilo que se confirman por las señales singlete δ 1.69 y 1.53 cada una para tres protones. Con base en lo anterior el compuesto denominado DO 1 se identifica como (+)-Curcufenol (I), Figura 1.

La identificación del compuesto se confirma por la concordancia de los datos encontrados en el presente trabajo y los reportados en la literatura (9, 10).

Identificación del Compuesto DO2 (Curcudiol) II

El compuesto puro denominado DO2 que es un líquido aceitoso de color amarillo pálido el cual reveló una sola mancha de color naranja (R_f 0.14), en el sistema Benceno : Acetato de etilo (85:15), revelando con vainillina-ácido ortofosfórico. El espectro de masas presentó el pico del ion molecular a m/z 236 que sugiere una fórmula condensada $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_2$, lo que está de acuerdo con

lo esperado para un compuesto tipo sesquiterpeno, confirmado por las quince señales del espectro de rmn^{13}C . El espectro infrarrojo presenta una banda a 3367 cm^{-1} que corresponde a grupos OH, esto se confirma con el pico m/z 218, del espectro de masas, el cual se obtiene por la pérdida de una molécula de agua a partir del ion molecular m/z 236. El espectro rmn^1H presenta dos señales singlete: una a δ 1.19 que integra para seis protones que corresponden a los metilos de los carbonos 1 y 15 y otra señal δ 2.28 para tres protones que corresponden a un metilo sobre un anillo aromático (C13). La señal doblete δ 1.23 $J=6.0\text{ Hz}$ para tres protones que corresponde al cuarto grupo metilo (C 14), que acopla con un proton gemelo que a su vez acopla con otros dos protones del siguiente átomo de carbono (C5), dando una señal multiplete δ 3.06. Además el espectro infrarrojo muestra unas bandas a 1584 y 1518 cm^{-1} que corresponden a vibraciones $\text{C}=\text{C}$ en un anillo aromático y una banda a 807 cm^{-1} que muestra la trisustitución 1, 2, 4 en dicho anillo aromático. La aromaticidad se confirmó por las señales a δ 7.04 (1H,d, $J=8\text{ Hz}$), 6.71 (1H, d, $J=8.5\text{ Hz}$), 6.57 (1H, s) y por los fragmentos de espectro de masas a m/z 135, 121 y 94. Los datos espectroscópicos nos sugieren un compuesto aromático trisustituído (posiciones 1, 2, 4) con una cadena alifática en la posición 1, la cual posee dos grupos metilo terminales y un grupo hidroxilo.

Con base en lo anterior y lo reportado en la literatura (10) se estableció que la identidad del compuesto DO 2 corresponde al Curcudiol (II), Figura 1.

Esta es la primera vez que se reporta el aislamiento del Curcudiol, de la esponja marina *Didiscus oxeata*, que puede tener importancia quimiotaxonómica.

Bioensayos

Concentración Letal 50

Con los datos obtenidos, se aplicó el análisis estadístico por Probits utilizando el programa sistematizado ya mencionado en la parte experimental. Los resultados se encuentran consignados en la Tabla 1.

Las concentraciones letales medias halladas para los extractos metanólico y clorofórmico (5.57 y $0.54\text{ }\mu\text{g/mL}$), respectivamente, guardan una relación de (10:1). La toxicidad mayor del extracto clorofórmico pudo deberse a la presencia de varios compuestos capaces de potenciar la actividad y aumentar la toxicidad sobre las larvas de *A. salina*; a diferencia del extracto metanólico que mostró contener pocos compuestos.

En cuanto a los compuestos aislados, la CL_{50} del Curcudiol ($0.69\text{ }\mu\text{g/mL}$) es unas 4.5 veces menor que la del (+)-Curcufenol ($3.19\text{ }\mu\text{g/mL}$) lo que indica que el primer compuesto es más tóxico que el segundo. Una razón aparente para explicar

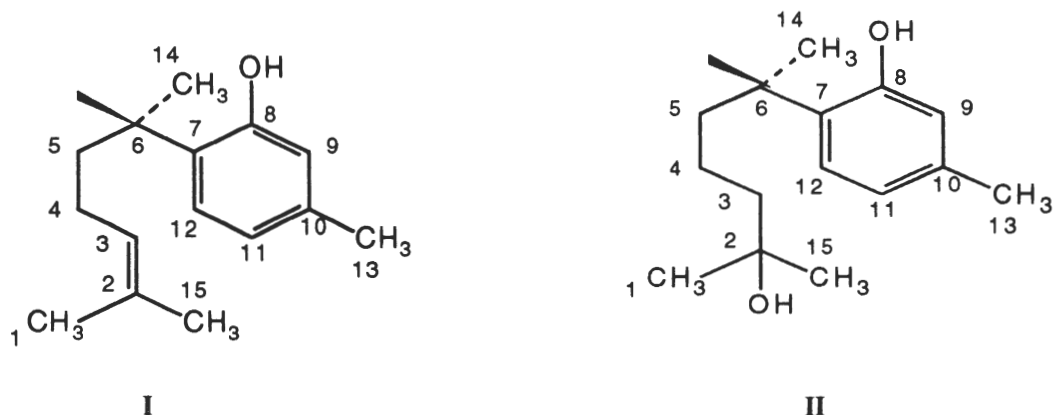


Figura 1. Estructura química de las sustancias aisladas.

este resultado puede ser la mayor solubilidad del primero, lo cual lo haría más disponible para afectar al organismo de prueba (*A. salina*).

Como observación global se puede decir que los dos compuestos aislados, si bien están presentes en

ambos extractos, son mucho más tóxicos en forma individual que el extracto metanólico pero parece existir cierto sinergismo que explicaría la toxicidad del extracto clorofórmico.

Tabla 1. Concentración letal media de los extractos y compuestos aislados

| Extractos o compuestos analizados | CL ₅₀ (µg/mL) | Intervalos de confianza (95%) |
|-----------------------------------|--------------------------|-------------------------------|
| Extracto Metanólico | 5.57 | 1.21 - 11.61 |
| Extracto Clorofórmico | 0.54 | 0.19 - 1.12 |
| (+)-Curcufenol | 3.19 | 1.53 - 4.85 |
| Curcudiol | 0.69 | 0.03 - 6.06 |

Actividad Antitumoral

Los tumores formados a los 10 días fueron apenas apreciables, por esta razón se realizaron observaciones a los 25 y 30 días al cabo de los cuales están desarrollados lo que permite establecer la comparación cualitativa con los controles y blancos.

En el caso del extracto clorofórmico se presentó inhibición en concentraciones mayores de 60 µg/mL, la cual fue la respuesta más alta de las cuatro sustancias evaluadas, mientras se observó que la actividad continúa de manera decreciente, en el mismo rango de concentraciones ensayadas de la siguiente forma: Extracto clorofórmico, Curcudiol, Extracto metanólico y (+)-Curcufenol. A concentraciones inferiores de 60 µg/mL no se presentó inhibición en ninguno de los cuatro casos lo que demuestra linealidad entre la dosis y la respuesta.

Estos resultados se corroboran con los obtenidos en el bioensayo de *A. salina* y se justifican de la misma manera. Es decir el curcudiol que es un compuesto más polar que el (+)-curcufenol mostró ser más tóxico (CL₅₀ menor), por su polaridad y además es más activo biológicamente. El extracto clorofórmico es más tóxico y más activo biológicamente por su alto contenido de curcudiol y curcufenol y otros compuestos que el extracto metanólico. Los resultados están de acuerdo con las ac-

tividades antitumorales reportadas para el (+)-Curcufenol en líneas celulares P-388 (10).

Como observación global de los resultados obtenidos en los bioensayos realizados puede decirse que tanto los extractos clorofórmico y metanólico como los compuestos aislados (+)-Curcufenol y Curcudiol mostraron una actividad biológica alta debido a las bajas concentraciones utilizadas para obtener resultados apreciables, razón por la cual pueden considerarse como candidatos para el desarrollo de otros ensayos con el fin de tener futuros medicamentos empleados en la quimioterapia del cáncer.

Agradecimientos

Agradecemos el Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia y Colciencias por sus apoyos financieros del presente trabajo a través del proyecto "Metabolitos de esponjas marinas de interés químico, quimio-taxonómico y farmacológico" dirigido por la profesora Carmenza Duque del Departamento de Química.

BIBLIOGRAFÍA

1. T. Ichiba, W. Y. Yoshida, P. J. Sheuer, T. Higa, D.G. Gravalos, Hennoxazoles: Bioactive bisoxazoles from a marine sponge. *J. Am. Chem.* **113**, No. 8, 3173 (1991). Citado en ASFA Base de datos SIDES, Hemeroteca Nacional Universitaria, Santafé de Bogotá.
2. I. Fabian, I. Shur, I. Bleiberg, A. Rudi, Y. Kashman, M. Lishner, Growth modulation and differentiation of acute myeloid leukemia cells by jaspamide. *Exp. Hemat.* **23**, No. 7, 583 (1995). Citado en BA Base de datos SIDES, Hemeroteca Nacional Universitaria, Santafé de Bogotá.
3. G. Bifulco, I. Bruno, L. Micale, R. Riccio, Novel HIV-inhibitory halistanol sulfates F-G from a marine sponge *Pseudoaxinissa digitata*. *J. Nat. Prod.* **57**, No. 1, 164 (1994). Citado en ASFA Base de datos SIDES, Hemeroteca Nacional Universitaria, Santafé de Bogotá.
4. S. P. Gunasekera, P. J. McCarthy, M. Kelly-Borges, Hamacanthins A and B, new antifungal bis indole alkaloids from the deep water marine sponge, *Hamacantha* sp. *J. Nat. Prod.* **57**, No. 10, 1437 (1994). Citado en ASFA Base de datos SIDES, Hemeroteca Nacional Universitaria, Santafé de Bogotá.
5. M. V. D'Auria, I. G. Paloma, I. Minale, A. Zampella, C. Debitus, A novel cytotoxic macrolide, superstolide B, related to superstoolide A, from the New Caledonian marine sponge *Neosiphonia superstes*. *J. Nat. Prod.* **57**, 1595 (1994). Citado en ASFA Base de datos SIDES, Hemeroteca Nacional Universitaria, Santafé de Bogotá.
6. K. F. Albizati, T. Holman, D. J. Faulkner, K. B. Glaser, R. S. Jacobs, Luffarillolide, an anti-inflammatory sesterterpene from the marine sponge *Luffariella* sp.. *Experientia* **43**, No. 8, 949 (1987). Citado en ASFA Base de datos SIDES, Hemeroteca Nacional Universitaria, Santafé de Bogotá.
7. A. M. Salama, A. P. Hinestroza, M. del Pilar Chaves, Fito y bioanálisis de algunas plantas utilizadas en la medicina popular con posible actividad biológica. *Revista Colomb. Cienc. Quim. Farmac.* No. **25**, 44 (1996).
8. C. Guzman, S. Velazquez, "Estudio preliminar de la actividad antitumoral por el método del disco de papa de varias plantas utilizadas en la medicina popular", Tesis Química Farmacéutica, Universidad Nacional de Colombia, 1994.
9. C. Duque, S. Zea, J. De Silvestri, A. Calderon, A. Medina, Actividad biológica vs. composición química del extracto clorofórmico de la esponja marina *Didiscus oxeata*. *Rev. Col. Quim.* **17**, No. 1-2, 39 (1988).
10. A. E. Wright, S. A. Pomponi, O. J. McConell, S. Kohmoto, J. McCarthy, (+)-Curcuphenol and (+)-Curcudiol, sesquiterpenes phenols from shallow and deep water collections of the marine sponge *Didiscus flavus*. *J. Nat. Prod.* **50**, No. 5, 976 (1987).