

Curso 2006/07
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS/9
I.S.B.N.: 978-84-7756-745-5

PATRICIA G. CRUZ LÓPEZ

**Estudio de toxinas y otros metabolitos
secundarios de origen marino**

Directores

**MANUEL NORTE MARTÍN
JOSÉ JAVIER FERNÁNDEZ CASTRO
ANTONIO M. HERNÁNDEZ DARANA**



SOPORTES AUDIOVISUALES E INFORMÁTICOS
Serie Tesis Doctorales

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María Luisa Souto Suárez, la persona con la que di mis primeros pasos en el laboratorio y que siempre ha tenido buenos gestos conmigo. Gracias Mari.

A D. Santiago Fraga y al Dr. José Franco del Instituto Español de Oceanografía de Vigo por cedernos las células de *Prorocentrum belizeanum* y por la colaboración en la realización de la espectrometría de masas, respectivamente.

A Amaya Ferrero Gutierrez por sus útiles consejos sobre la proteína PP1.

Al Dr. Gavín Sazatornil porque en algún momento se le ocurrió comprar la licencia del programa que me ha permitido realizar una buena parte de este trabajo.

Al Dr. Matías López por facilitarnos los datos cristalográficos del AO.

A los Dres. Cirilo Pérez y Carmen Rosa Fagundo por su contribución al agradable ambiente de trabajo.

A mis compañeras/os de laboratorio que se han convertido en mis **amigas/os**. Gracias a ustedes los momentos difíciles se han transformado en agradables recuerdos y las cuestas arriba las han convertido en un camino apacible. Laura Vázquez, Claudia Pérez, Laurette Nordström, Martín Febles, Francisco Cen, José Napolitano, Yaiza García, Tamara Vilches y Humberto Domínguez. Ya sea en el mundo de la investigación o fuera mantendremos nuestra amistad.

A todas mis amistades que desde fuera del grupo de trabajo me han comprendido y mostrado su apoyo, entendiendo que en muchas ocasiones el laboratorio me quitara ese tiempo tan preciado que podría haberles dedicado. Muchas gracias por estar ahí.

Al ICIC (Instituto Canario de Investigación del Cáncer) por el apoyo económico que me permitió realizar este trabajo.

*A mi familia y
a Fran, por su cariño
y apoyo incondicional.*

ABREVIATURAS

AB: Ácido Belizeánico

AEO: Ácido 19-*epi*-Okadaico

AO: Ácido Okadaico

AOA: Ácido Okadaico Agregado

AOC: Ácido Okadaico Complejado

ASA: Accesible Surface Area

AT: Acyltransferase

COSY: COrrelation SpectroscopY

COSY-DQF: Double Quantum Filtered-COSY

CFP: Ciguatera Fish Poisoning

DH: DeHydratasa

DSP: Diarrhetic Shellfish Poisoning

DTX: Dinophysis ToXin

ER: EnoylReductase

FDP: Fluorescein DiPhosphate

FMNR: Full Matrix Newton Raphson

GB/SA: Generalized Born/Surface Area

HMBC: Heteronuclear Multiple Bond Correlation

HSQC: Heteronuclear Single Quantum Correlatin

IR: Infrarrojo

ISPA: Isolated Spin-Pair Aproximation

MCMM: Monte Carlo Multiple Minimun

MD: Molecular Dynamic

MMFF: Merck Molecular Force Field

NAMFIS: NMR Analysis of Molecular Flexibility in Solution

NOE: Nuclear Overhauser Effect

NOESY: Nuclear Overhauser Enhancement SpectroscopY

NSP: Neurotoxic Shellfish Poisoning

PDB: Protein Data Bank

PKs: Protein Kinases

PKS: PoliKetide Synthase

PPs: Protein Phosphatases

PP1: Protein Phosphatase type-1

PP2A: Protein Phosphatase type-2A

P.: *Prorocentrum*

PSPs: Protein Serine/Threonine Phosphatases

PTPs: Protein Tyrosine Phosphatases

KR: β -Ketoacylreductasa

KS: β -Ketoacylsynthase

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

RMN^{1H}: RMN de Hidrógeno

RMN^{13C}: RMN de carbono

ROE: Rotating-frame Overhauser Effect

ROESY: Rotating-frame Overhauser Enhancement SpectroscopY

RMSD: Root Mean Square Desviation

SD: Stochastic Dynamic

STC: Structural Thermodynamics Calculation.

TCA: TriCarboxilic Acid

TNCG: Truncated Newton Conjugated Gradient

TOCSY: TOtal Correlation SpectroscopY

ÍNDICE

I.- INTRODUCCIÓN	1
I.1.- LAS MICROALGAS	1
I.2.- METABOLITOS SECUNDARIOS DE MICROALGAS MARINAS	7
I.2.1.- Metabolitos de los Dinoflagelados (<i>Pyrrhophyta</i>)	8
I.2.1.a.- <i>Poliéteres fusionados</i>	8
I-2-1.b.- <i>Macrociclos</i>	13
I-2-1.c.- <i>Poliéteres lineales</i>	16
I-3.- ÁCIDO OKADAICO Y SU ACTIVIDAD	20
II.- <u>ESTUDIO DEL DINOFLAGELADO <i>PROROCENTRUM BELIZEANUM</i></u>	25
II.1.- ANTECEDENTES	25
II.2.- CONDICIONES PARA EL CULTIVO DEL	30
<i>P. BELIZEANUM</i>	
II.2.1.- Medio de cultivo	30
II.2.2.- Ambiente físico artificial	32
II.3.- DESARROLLO DE LO CULTIVOS ARTIFICIALES DE	33
<i>PROROCENTRUM BELIZEANUM</i>	
II.4.- RECOLECCION Y EXTRACCIÓN	36
II.5.- SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA	38
II.6.- ESTUDIO DE ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL	40
DEL ÉSTER C-10	
II.3.- ESTUDIO DE ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DEL	
COMPUESTO DTX-5c	50
III.- <u>ESTUDIO DEL ÁCIDO 19-<i>epi</i>-OKADAICO</u>	63
III.1.- ESTUDIO DE ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL	63
DEL ÁCIDO 19-<i>epi</i>-OKADAICO	

III.2.- ANÁLISIS CONFORMACIONAL DEL ÁCIDO 19-<i>epi</i>-OKADAICO	80
III.2.1.- Obtención de Restricciones Experimentales aplicando RMN	80
III.2.1.a.- <i>Determinación de distancias interprotónicas a partir del experimento ROESY</i>	81
III.2.1.b.- <i>Determinación de restricciones de torsión a partir de las constantes de acoplamiento</i>	85
III.2.2.- Modelización del Ácido 19-<i>epi</i>-O utilizando Restricciones Experimentales	86
III.2.2.a.- <i>Realización de Búsquedas Conformacionales</i>	86
III.2.2.b.- <i>Estudios de Dinámica molecular con el confórmero del Ácido 19-<i>epi</i>-Okadaico</i>	93
III.3.- ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE PROTEÍNAS FOSFATASAS PP1 Y PP2A	102
III.4.- ANÁLISIS TEÓRICO DE LA TERMODINÁMICA DE FORMACIÓN PARA EL COMPLEJO PP1-LIGANDO	107
III.4.1.- Determinación de la constante de disociación	107
III.4.1.a.- <i>Cálculo de ΔH</i>	108
III.4.1.b.- <i>Cálculo de ΔS</i>	110
III.4.2.- Cálculo de Parámetros Termodinámicos del Complejo PP1-AO	113
III.4.2.- Cálculo de Parámetros Termodinámicos del Complejo PP1-19-<i>epi</i>-Okadaico	118
<u>IV. ESTUDIO DEL ÁCIDO BELIZEÁNICO</u>	123
IV.1- ESTUDIO DE ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DEL ÁCIDO BELIZEÁNICO	123
IV.2.- ESTUDIO CONFORMACIONAL DEL ÁCIDO BELIZEÁNICO	138
IV.2.1.- Búsqueda conformacional del Ácido Belizeánico	138

	<i>Índice</i>
IV.2.2.- Obtención de datos experimentales a partir de la RMN	139
IV.2.2.a.- <i>Determinación de distancias interprotónicas a partir del experimento ROESY</i>	140
IV.2.2.b.- <i>Determinación de restricciones de torsión a partir de las constantes de acoplamiento</i>	142
IV.2.3.- Análisis de los resultados de modelización a partir de los datos de RMN	143
IV.2.3.a.- <i>Selección de estructuras de acuerdo a los ángulos de torsión</i>	144
IV.2.3.b.- <i>Aplicación de restricciones antidistancia</i>	145
IV.2.3.c.- <i>Aplicación de las restricciones de distancia</i>	146
IV.2.4.- Estudios de Dinámica molecular con los conformeros resultantes para los isómeros 16S*19S*, 16S*19R*, 16R*19S* y 16R*19R*	148
IV.2.5.- Análisis de los Resultados	157
IV.3.- PROPUESTA BIOSINTÉTICA PARA EL ÁCIDO BELIZEÁNICO	163
<u>V.- AUTO-ASOCIACIONES DEL ÁCIDO OKADAICO</u>	173
V.1.- ANTECEDENTES	173
V.2.- AISLAMIENTO DEL ÁCIDO OKADAICO EN ESTADO AGREGADO	175
V.3.- PROPUESTA ESTRUCTURAL CORRESPONDIENTE AL TETRÁMERO	178
<u>VI.- PARTE EXPERIMENTAL</u>	185
VI.1.- TÉCNICAS EXPERIMENTALES GENERALES	185
VI.1.1.- Técnicas Espectroscópicas	185
VI.1.1.a.- <i>Resonancia Magnética Nuclear</i>	185

VI.1.1.b.- <i>Infrarrojo</i>	185
VI.1.1.c.- <i>Rotación óptica</i>	185
VI.1.1.d.- <i>Espectrometría de Masas</i>	185
VI.1.2.- Técnicas Cromatográficas	186
VI.1.2.a.- <i>Cromatografía de gel-filtración</i>	186
VI.1.2.b.- <i>Cromatografía en columna de media presión</i>	186
VI.1.2.c.- <i>Cromatografía de alta eficacia (HPLC)</i>	186
VI.1.2.d.- <i>Cromatografía en capa fina (TLC)</i>	187
VI.1.3.- Técnicas de Cultivo	187
VI.1.3.a.- <i>Esterilización de material y medios de cultivo</i>	187
VI.1.3.b.- <i>Recolección de las células</i>	188
VI.2.- ESTUDIO DEL DINOFLAGELADO <i>PROROCENTRUM</i>	188
<i>BELIZEANUM</i>	
VI.2.1.- Condiciones de Cultivo	188
VI.2.1.a.- <i>Medio de Cultivo</i>	188
VI.2.1.b.- <i>Temperatura</i>	190
VI.2.1.c.- <i>Intensidad lumínica y fotoperiodo</i>	190
VI.2.1.d.- <i>Necesidad extra de aireación</i>	190
VI.2.2.- Mantenimiento y Crecimiento de las Células	190
VI.2.2.a.- <i>Mantenimiento</i>	191
VI.2.2.b.- <i>Crecimiento</i>	191
VI.2.3.- Recolección y Extracción de las Células	193
VI.2.4.- Marcha Cromatográfica del Extracto	195
VI.2.2.a.- <i>Estudio de la fracción B₁</i>	197
VI.2.2.b.- <i>Estudio de la fracción B₂</i>	197
VI.2.2c.- <i>Estudio de la fracción B₃</i>	197
VI.2.5.- Datos Físicos de los Compuesto Aislados	198
VI.2.5.a.- <i>Diol éster C₁₀ del Ácido Okadaico</i>	199
VI.2.5.b.- <i>DTX-5c</i>	200

VI.2.5.c.- <i>Ácido 19-epi-Okadaico</i>	201
VI.2.5.d.- <i>Ácido belizeánico</i>	202
VI.3.- ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE PP1 Y PP2A	203
VI.3.1.- Preparación de las Disoluciones Stock	203
VI.3.1.a.- <i>Ácido 19-epi-Okadaico y Ácido Okadaico</i>	203
VI.3.2.b.- <i>Tampón de Reacción</i>	203
VI.3.2.c.- <i>Proteína Fosfatasa tipo 1 (PP1)</i>	203
VI.3.2.d.- <i>Proteína Fosfatasa tipo 2A (PP2A)</i>	204
VI.3.2.e.- <i>Cloruro de Manganeso</i>	204
VI.3.2.f.- <i>Fluoresceína difosfato (FDP)</i>	204
VI.3.2.- Ensayo de inhibición de fosfatasas	204
VI.4.- MÉTODOS COMPUTACIONALES	206
VI.4.1.- Espectroscopía de RMN	206
VI.4.2.- Modelos de Inicio	206
VI.4.3.- Mecánica Molecular	207
VI.4.3.a.- <i>Búsquedas conformacionales</i>	207
VI.4.3.b.- <i>Minimizaciones</i>	207
VI.4.3.c.- <i>Simulaciones dinámicas</i>	208
VI.5- CÁLCULOS TERMODINÁMICOS PARA LOS COMPLEJOS AO-PP1 Y EAO-PP1	208

I.- INTRODUCCIÓN

I.1.- LAS MICROALGAS

I.2.- METABOLITOS SECUNDARIOS DE MICROALGAS MARINAS

I.2.1.- Metabolitos de los Dinoflagelados (*Pyrrhophyta*)

I-3.- ÁCIDO OKADAICO Y SU ACTIVIDAD

I.- INTRODUCCIÓN

I.1.-LAS MICROALGAS

El 70% de la superficie terrestre se encuentra cubierta por agua, proporcionando las condiciones adecuadas para el crecimiento de más de 10 millones de especies marinas. De esta manera, el entorno marino contiene aproximadamente el 80% de las especies vegetales y animales que hay en la Tierra, lo cual convierte a los océanos en una importante fuente de sustancias químicas con estructuras únicas.^{1,2,3}

Entre este amplio número de especies podemos encontrar macro y microorganismos, siendo éstos últimos los que forman la mayor parte del plancton. Si se tiene en cuenta la naturaleza del plancton se puede dividir en zooplancton y fitoplancton. Aquí nos centraremos en el fitoplancton, que es como se conoce a las microalgas, especies mayoritarias en los océanos (**Figura I.1**). Muchos de estos organismos se caracterizan por ser fotosintéticos, produciendo el 50% del oxígeno terrestre, así como grandes cantidades de biomasa que sirven de alimento al zooplancton. Otra característica por la que son bien conocidas las microalgas desde el punto de vista químico es por la producción de novedosos y complejos metabolitos secundarios.⁴

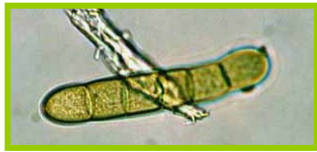
Las microalgas presentan un inmenso rango de diversidad tanto genética, pudiendo existir como células aisladas, colonias o filamentos, como de producción química, lo que complica su clasificación, es más, dependiendo del autor ésta puede variar considerablemente. Así nos encontramos con clasificaciones basadas en: la obtención de energía, las fuentes de carbono utilizadas, la estructura celular, la composición química de los organismos, así como en la presencia o ausencia de células móviles flageladas.

¹ Jha, R. K.; Zi-rong, X. *Mar. Drugs.*, **2004**, 2, 123-146.

² Simmons, T. L.; Andrianasolo, E.; McPhail, K.; Flatt, P.; Gerwick, W. H. *Mol. Cancer Ther.*, **2005**, 2, 333-342.

³ Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Munro, M. H. G.; Northcote, P. T.; Prinsep, M. R. *Nat. Prod. Rep.*, **2006**, 23, 26-78.

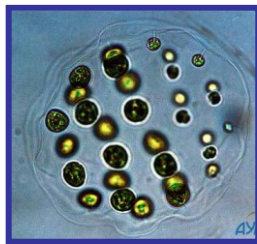
⁴ Shimizu, Y. En: *Drugs from the Sea*, Fusetani, N., Ed. Karger, Basel, **2000**, 30-45.



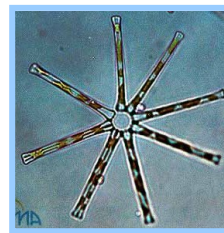
Cyanophyta



Euglenophyta



Chlorophyta



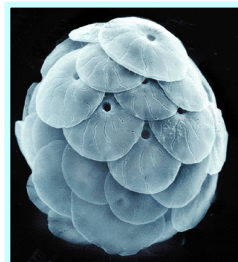
Chrysophyta



Cryptophyta



Dinophyta



Haptophyta



Glaucophyta

Figura I.1.- Ejemplos de microalgas marinas.

Dependiendo de la **fuerza de energía** utilizada por los microorganismos nos podemos encontrar con una gran variedad de procesos metabólicos. Los más importantes son dos, aquellos en los que la fuente de energía es un compuesto químico y aquellos en los que lo es la luz. Los organismos que usan los compuestos químicos se llaman *quimiotrofos*, mientras que los que toman como fuente de energía la luz son los *fitótrofos*. Los *quimiotrofos* pueden ser de dos tipos, *quimioorganotrofos* si usan compuestos orgánicos o *quimiolitotrofos* si lo que usan son los compuestos inorgánicos.

Otro modo de clasificar a los organismos es teniendo en cuenta la **fuerza a partir de la cual obtienen el carbono** necesario para su supervivencia. En este caso se pueden dividir en dos grandes grupos, *autótrofos* y *heterótrofos*. Los *autótrofos* usan compuestos químicos inorgánicos o luz como fuente de energía, son capaces de crecer en ausencia de materiales orgánicos y usan el dióxido de carbono como única fuente de carbono para sintetizar el material celular, mientras que, los *heterótrofos* obtienen el carbono de compuestos orgánicos.

Ahora bien, existen microalgas que crecen en presencia de CO₂ y luz sólo cuando tienen una fuente adicional de carbono orgánico, las que usan sustratos exógenos como fuente de carbono y energía, y otras que crecen normalmente con luz y CO₂. Estas últimas podrían usar una fuente de carbono orgánico adicional para acelerar el crecimiento. Según esto, **combinando los dos criterios vistos anteriormente**, nos encontramos con la siguiente clasificación:

- *Fotoautótrofos*: Para sintetizar el material celular utilizan como fuente de energía la luz, y el carbono lo obtienen a partir del CO₂.
- *Auxotrofos*: Necesitan por lo menos un factor de crecimiento orgánico en baja concentración, que en principio no es usado como fuente de carbono o energía.
- *Mixotrofos*: Crecen con luz en presencia de CO₂ y necesitan por lo menos un sustrato orgánico que es fotometabolizado durante el crecimiento.
- *Heterótrofos*: Utilizan uno o más sustratos orgánicos como fuente de energía y carbono, aunque en alguna ocasión es necesario el CO₂. Normalmente estas células pueden crecer en total oscuridad.
- *Fagótrofos*: Obtienen el material orgánico a partir de otras especies.

Por otro lado, las algas se pueden clasificar de forma general en dos grandes grupos si nos fijamos en su **estructura celular**: las *procariotas* y las *eucariotas*, que a su vez están repartidas en dos y en diez divisiones, respectivamente (**Tabla I.1**). Todas estas divisiones están formadas por una única clase excepto la de *Chrysophyta* y la de *Chlorophyta*, constituidos por cuatro y tres clases distintas respectivamente.

Los criterios más importantes empleados para distinguir estas divisiones son bioquímicos y se basan en los pigmentos, sustancias de reserva y composición química de las paredes celulares, aunque otra característica también tenida en cuenta es la presencia o ausencia de células móviles flageladas. En la **Tabla I.1** se pueden observar las principales características químicas distintivas.

CRITERIOS		Pigmentos	Sustancias de reserva	Dotación flagelar	Pared celular
DIVISIONES Y CLASES		Clorofilas Carotinoídes Xantofilas	Crisolaminarina Almidón Almidón de florideas Paramilo	1 flagelo 2 flagelos	Celulosa Pectina Ácido algínico Manana Mureína
Procariotas	Cyanophyta <i>Cyanophyceae</i>	a β +	+ + - -	- -	+ + - - +
	Prochlorophyta <i>Prochlorophyceae</i>	a,b - -	- + - -		- - - - +
Eucariotas	Euglenophyta <i>Euglenophyceae</i>	a,b β +	- - - +	+ +	- - - - -
	Cryptophyta <i>Cryptophyceae</i>	a,c α +	- + - -	- +	- - - - -
	Glaucophyta <i>Glaucophyceae</i>	a β +	- - + -	- +	- - - - -
	Dinophyta (Pyrrhophyta) <i>Dinophyceae</i>	a,c β +	- + - -	- +	+ + - - -
	Haptophyta (Prymnesiophyta) <i>Haptophyceae</i>	a,c β +	+ - - +	- +	+ - - - -
	Chrysophyta <i>Chloromonadophyceae</i>	a,c β +	+ - - -	- +	+ + - - -
	<i>Xanthophyceae</i>	a,c β +	+ - - -	- +	+ - - - -
	<i>Chrysophyceae</i>	a,c α,β +	+ - - -	+ +	+ + - - -
	<i>Bacillariophyceae</i>	a,c α,β +	+ - - -	+ -	+ + - - -
	Phaeophyta* <i>Phaeophyceae</i>	a,c α,β +	+ - - -	- -	+ - + - -
	Rhodophyta <i>Rhodophyceae</i>	a β +	- - + -	- -	+ + - + -
	Chlorarachniophyta <i>Chlorarachniophyceae</i>	a,b - +	- - - -	+ -	- - - - -
	Chlorophyta <i>Chlorophyceae</i>	a,b α,β +	- + - -	- +	+ + - + -
<i>Zygnematophyceae</i>	a,b β +	- + - -	- +	+ + - - -	
<i>Charophyceae*</i>	a,b β +	- + - -	- -	+ + - - -	

* En estas clases no encontramos microalgas.

Tabla I.1.- Principales características de las clases de algas.

Todos estos organismos se encuentran relacionados filogenéticamente⁵ (**Figura I.2**) aunque los taxonomistas suelen diferir en algunas clasificaciones. Por un lado están los microorganismos pertenecientes a la división de *Cyanophyta*, que en general se cree que son el origen de la mayoría de las algas fotosintéticas, y que en muchas ocasiones han sido considerados como bacterias y no como algas debido a su naturaleza procariótica. Sin embargo, resulta que son fotosintéticos y comparten muchas características eucarióticas. Por otro lado, no hay conformidad en si incluir a las microalgas en el reino animal o vegetal, ya que no todas tienen actividad fotosintética y otras que sí la tienen son heterótrofas. Tal es así, que para estas especies que se encuentran entre los dos reinos se ha propuesto uno nuevo, el de los *Protistas*. En éste nos podemos encontrar con organismos eucariotas tanto autótrofos como heterótrofos y mayoritariamente unicelulares, cubriendo una gran parte de las microalgas.

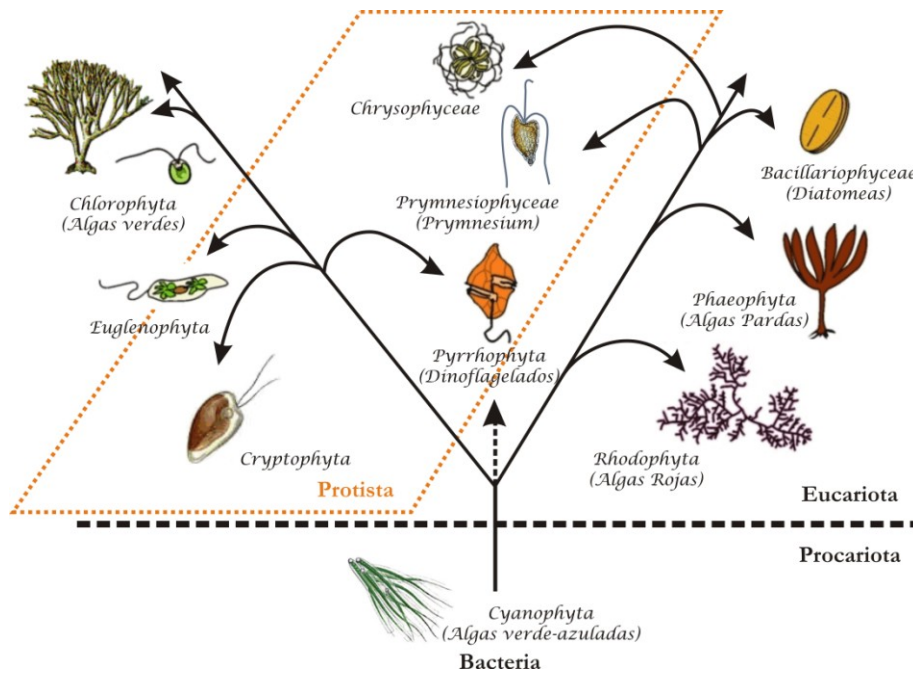


Figura I.2.- Relaciones filogenéticas de las microalgas.

⁵ Shimizu Y. *Chem Rev.*, **1993**, 93, 1685-1698.

I.2.- METABOLITOS SECUNDARIOS DE MICROALGAS MARINAS

El medio marino se caracteriza porque sus organismos producen compuestos bioactivos poseedores de estructuras novedosas respecto de las producidas por los organismos terrestres.^{1,6} Además, aunque inicialmente un gran número de estas estructuras novedosas se aislaron de invertebrados como esponjas, tunicados o moluscos, posteriormente se observó que los productores reales de muchas de ellas eran microorganismos. Esto se debe a que en unos casos los invertebrados se alimentan por filtración y, en otros, son simbioses o epífitos de los macroorganismos. Este es el caso de las toxinas cabeza de serie de algunos de los distintos tipos de mareas rojas⁷: Saxitoxina (PSP, Paralytic Shellfish Poisoning), Acido Okadaico (DSP, Diarrhetic Shellfish Poisoning) y Ciguatoxina (CFP, Ciguatera Fish Poisoning), que recibieron el nombre de la almeja, esponja y molusco con el que inicialmente se relacionó el fenómeno tóxico. Esto no es necesariamente así, en el grupo de las Brevetoxinas (NSP, Neurotoxic Shellfish Poisoning), cuyo efecto era la muerte masiva de peces, el origen fue correctamente establecido desde un principio en *Ptychodiscus brevis*, aunque posteriormente este organismo se identificó como *Karenia brevis*. Estos microorganismos no sólo generan sustancias tóxicas, sino que también producen sustancias farmacológicamente activas como es el caso del Dolostatin 10,⁸ un potente anticancerígeno, o la Zooxantelatoxina⁹, que presenta actividad vasoconstrictora.

⁶ Moore, B. S. *Nat. Prod. Rep.*, **2005**, 22, 580-593.

⁷ Daranas, A. H.; Norte, M.; Fernández, J. J. *Toxicon*, **2001**, 39, 1101-1132.

⁸ Luesch, H.; Moore, R. E.; Paul, V. J.; Mooberry, S. L.; Corbet, T. H. *J. Nat. Prod.*, **2001**, 64, 907-910.

⁹ Nakamura, H.; Asari, T.; Fujimaki, K.; Maruyama, K.; Mural, A. *Tetrahedron Letters*, **1995**, 36, 7255-7258.

I.2.1.- Metabolitos de los Dinoflagelados (*Pyrrhophyta*)

Los dinoflagelados, fotosintéticos y heterótrofos, son el segundo grupo más abundante del fitoplancton después de las diatomeas. Aunque hasta el momento se han identificado más de 4000 especies, sólo una pequeña parte de ellos, alrededor de un 2%, están involucrados en los afloramientos tóxicos relacionados con mareas rojas. De entre estos, resulta llamativo que aproximadamente 30 especies de este género son capaces de biosintetizar policétidos con estructuras complejas de poliéter,^{10,11} muchos de ellos bioactivos.

En función de su estructura,¹⁰ los poliéteres sintetizados por los dinoflagelados se pueden dividir en tres grupos; poliéteres fusionados, macrociclos y poliéteres lineales. Estos tipos de moléculas se comentarán brevemente a continuación, resaltando las moléculas más significativas dentro de cada uno de los grupos.

I.2.1.a.-Poliéteres fusionados

Estos compuestos se caracterizan por estar formados por anillos éter fusionados por uniones tipo *trans*. La **Tabla I.2** muestra ejemplos representativos de este grupo, resaltando la Brevetoxina B,¹² por ser la primera estructura de este tipo conocida, y la Maitotoxina,¹³ que es el producto natural no polimérico de mayor tamaño aislado hasta el momento.

¹⁰ Rein, K. S.; Borrone J. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, **1999**, *124*, 117-131.

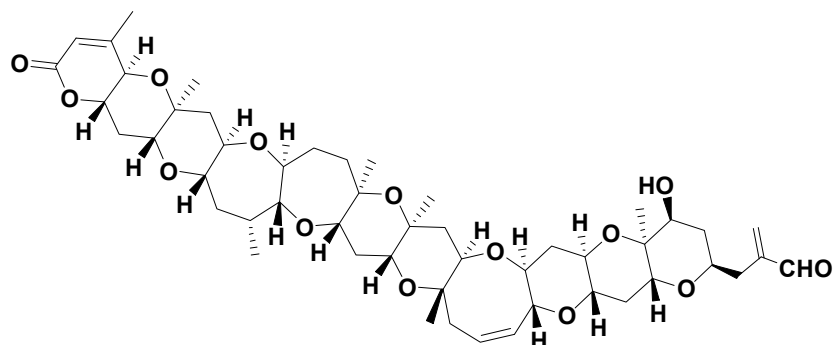
¹¹ Kobayashi, J.; Isuibashi, M. En: *Comprehensive Natural Products Chemistry*.

¹² Lin, Y.Y.; Risk, M. *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**, *103*, 6773-75.

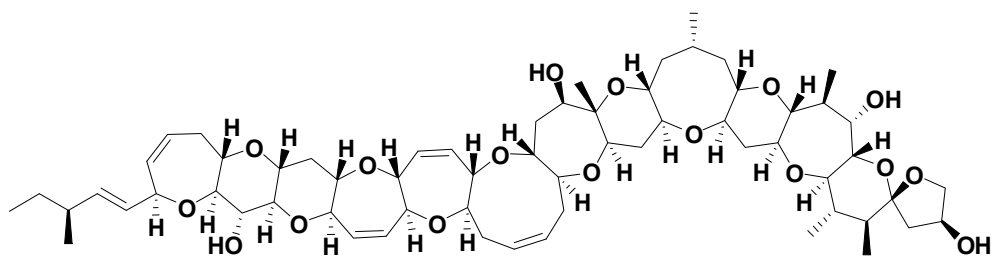
¹³ Murata, M.; Naoki, H.; Iwashita, T.; Matsunaga, S.; Sasaki, M.; Akihiro Yokoyama, A.; Yasumoto, T. *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 2060-2062.

Compuesto	Organismo	Actividad	Intoxicación
Brevetoxina, 1	<i>Karenia brevis</i> (<i>Ptychodiscus brevis</i>) <i>Gymnodinium breve</i>	Interacciona con canales de Na ⁺ dependientes de Voltaje	NSP
Ciguatoxina, 2	<i>Gambierdiscus toxicus</i>		CFP
Gambierol, 3	<i>Gambierdiscus toxicus</i>	Interacciona con canales de K ⁺ dependiente de voltaje	CFP
Yessotoxina, 4	<i>Protoceratium reticulatum</i> <i>Lingulodinium polyedrum</i>	Acción sobre la fosfodiesterasa	DSP
Maitotoxina, 5	<i>Gambierdiscus toxicus</i>	Aumenta [Ca ²⁺] intracelular por canales de cationes no selectivos.	CFP

Tabla I.2.- Ejemplos de poliéteres fusionados



1 Brevetoxina B^{14,15,16}



Ciguatoxina^{17,18,19,20}

¹⁴ Nakanishi, K. *Toxicon*, **1985**, 23, 473-479.

¹⁵ Pierce, R.H.; Henry, M.S.; Blum, P.C.; Hamel, S.L.; Kirkpatrick, B.; Cheng, Y.S.; Zhou, Y.; Irvin, C.M.; Naar, J.; Weidner, A.; Fleming, L.E.; Backer, L.C.; Baden, D.G. *Harmful Algae*, **2005**, 4, 965-972.

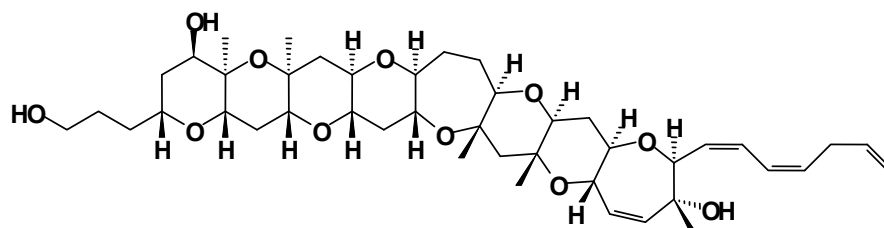
¹⁶ Purkerson-Parker, S. L.; Fieber, L. A.; Rein, K. S.; Podona, T.; Baden, D. G. *Chemistry & Biology*, **2000**, 7, 385-393.

¹⁷ Murata, M.; Legrand, A. M.; Ishibashi, Y.; Yasumoto, T. *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, 111, 8929-8931.

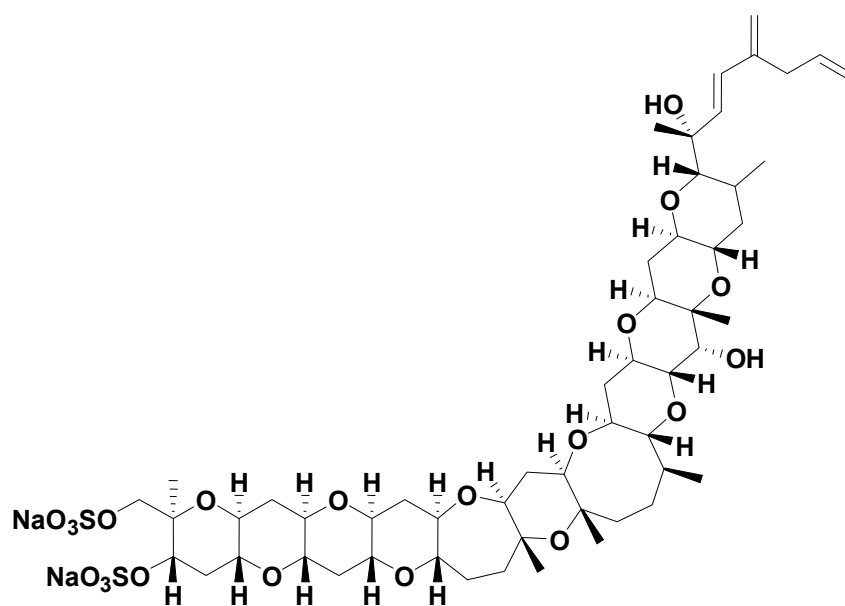
¹⁸ Murata, M.; Legrand, A. M.; Ishibashi, Y.; Fukui, M.; Yasumoto, T. *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, 112, 4380-4386.

¹⁹ Bidard, J.-N.; Vijverberg, H. P. M.; Frelin, C.; Chungue, E.; Legrand, A.-M.; Bagnis, R.; Lazdunski, M. *J. Biol. Chem.*, **1984**, 259, 8353-8357.

²⁰ Wong, C.-K.; Hung, P.; Lee, K. L. H.; Kam, K.-M. *Toxicon*, **2005**, 46, 563-571.



3 Gambierol^{21,22,23}



4 Yessotoxina^{24,25,26}

²¹ Satake, M.; Murata, M.; Yasumoto, T. *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 361-362.

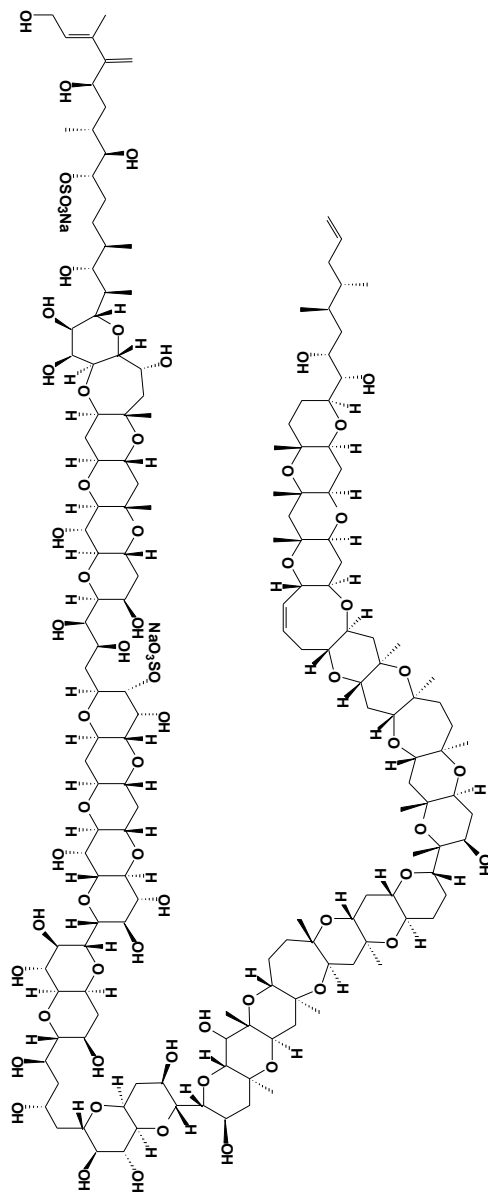
²² Morohashi, A.; Satake, M.; Yasumoto, T. *Tetrahedron Lett.*, **1998**, *39*, 97-100.

²³ Ghiaroni, V.; Sasaki, M.; Fuwa, H.; Rossini, G. P.; Scalera, G.; Yasumoto, T.; Pietra, P.; Bigiani, A. *Toxicological Sciences*, **2005**, *85*, 657-665.

²⁴ Murata, M.; Kumagai, M.; Lee, J. S.; Yasumoto, T. *Tetrahedron Lett.*, **1987**, *28*, 5869-5872.

²⁵ Miles, C. O.; Samdal, I. A.; Aasen, J. A. G.; Jensen, D. J.; Quilliam, M. A.; Petersen, D.; Briggs, L. M.; Wilkins, A. L.; Rise, F.; Cooney, J. M.; MacKenzie, A. L. *Harmful Algae*, **2005**, *4*, 1075-1091.

²⁶ Alfonso, A.; de la Rosa, L.; Vieytes, M. R.; Yasumoto, T.; Botana, L. M. *Biochemical Pharmacology*, **2003**, *65*, 193-208.



5 Maitotoxin^{27,28}

²⁷ Murata, M.; Yasumoto, T. *Nat. Prod. Rep.*, **2000**, *17*, 293–314.

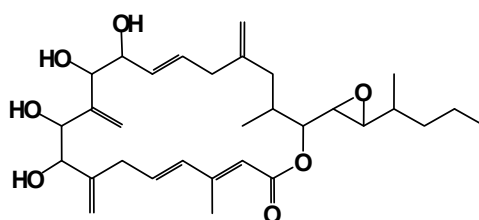
²⁸ Lundy, P. M.; Nelson, P.; Mi, L.; Frew, R.; Minaker, S.; Vair, C.; Sawyer, T. W. *European Journal of Pharmacology*, **2004**, *487*, 17–28.

I-2-1.b.- Macroциclos

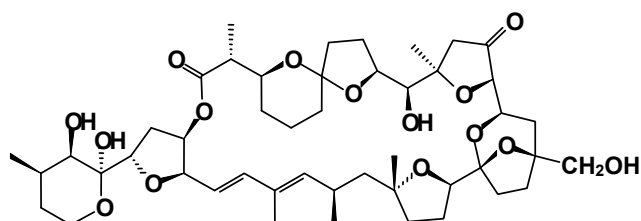
Dentro de este grupo de compuestos se incluyen tanto los macrólidos como los no macrólidos, siendo estos últimos similares a los antibióticos producidos por hongos terrestres del género *Streptomyces*. En este conjunto de compuestos cabe destacar a las Anfidinolidas, que presentan actividades prometedoras contra líneas celulares de cáncer de colon. El resto se encuentra relacionado con distintas actividades así como con intoxicaciones de tipo DSP y NSP, como se indica en la **Tabla I.3**.

Compuesto	Organismo	Actividad	Intoxicación
Anfidinolidas, 6	<i>Amphidinium sp.</i>	Anticancerígeno: leucemia L1210, cáncer de colon y carcinoma de epidermis KB.	—
Pectenotoxinas, 7	<i>Dinophysis fortii</i> <i>D. acuta</i> <i>D. acuminata</i> <i>D. caudata</i>	Daños hepáticos.	DSP
Goniodomin, 8	<i>Goniodoma sp.</i> <i>G. pseudogoniaulax</i>	Reorganiza el citoesqueleto. Antifúngico: <i>Candida albicans</i> , <i>C. mortierella</i> y <i>C. ramannianus</i> .	—
Espirolido, 9	<i>Alexandrium</i> <i>ostenfeldi</i>	Antagonista del receptor muscarínico de acetilcolina. Activador de canales Ca tipo L.	—
Gymnodimina, 10	<i>Prorocentrum lima</i>	Sensibiliza células de neuroblastoma tipo Neuro 2A frente a otras toxinas	NSP
Prorocentrolidos, 11	<i>Prorocentrum</i> <i>maculosum</i>		DSP
Zooxantelatoxina, 12	<i>Symbiodinium sp.</i>	Actividad vasoconstrictora	—

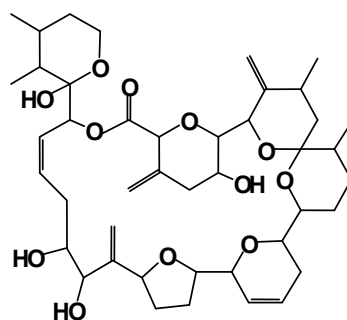
Tabla I.3.- Ejemplos de macroциclos.



6 Anfidinolida A^{29,30}



7 Pectenotoxina 1^{31,32,33}



8 Goniiodomin A^{34,35}

²⁹ Kobayashi, J.; Ishibashi, M.; Nakamura, H.; Ohizumi, Y.; Kasei, M. *Tetrahedron Lett.*, **1986**, *27*, 5755-5758.

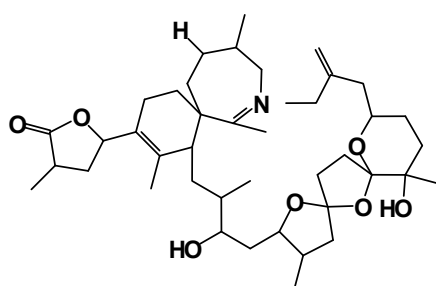
³⁰ Tsuda, M.; Kariya, Y.; Iwamoto, R.; Fukushi, E.; Kawabata, J.; Kobayashi, J. *Mar. Drugs*, **2005**, *3*, 1-8.

³¹ Draisci, R.; Lucentini, L.; Giannetti, L.; Boria, P.; Poletti, R. *Toxicon*, **1996**, *34*, 923-935.

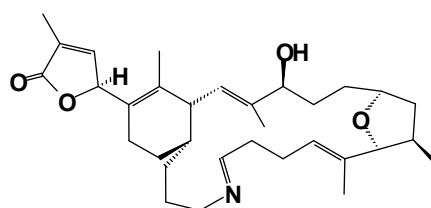
³² Burgessa, V.; Shaw, G. *Environment International*, **2001**, *27*, 275-283.

³³ Spector, I.; Braet, F.; Shochet, N. R.; Bubb, M. R. *Microscopy Research and Technique*, **1999**, *47*, 18-37.

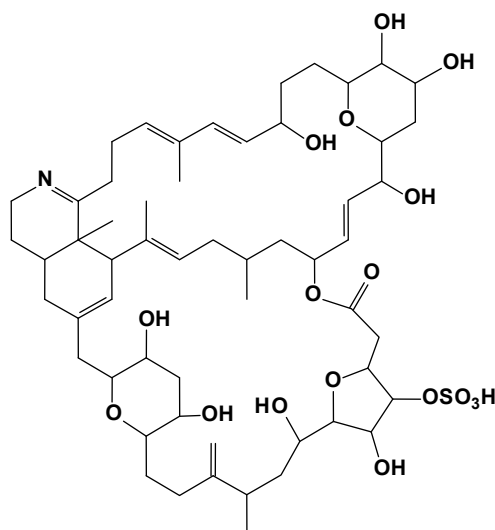
³⁴ Murakami, M.; Makabe, K.; Yamaguchi, K.; Konosu, S. *Tetrahedron Lett.*, **1988**, *29*, 1149-1152.



9 Espirolido B^{36,37}



10 Gymnodimina^{38,39,40}



11 Prorocentrolido B^{41,42}

³⁵ Hsia, M. H.; Morton, S. L.; Smith, L. L.; Beauchesne, K. R.; Huncik, K. M.; Moeller, P. D. R. *Harmful Algae*, **2006**, *5*, 290–299.

³⁶ Hu, T.; Curtis, J. M.; Walter, J. A.; Wright, J. L.C. *Tetrahedron Lett.*, **1996**, *37*, 7671–7674.

³⁷ Ciminiello, P.; Dell'Aversano, C.; Fattorusso, E.; Magno, S.; Tartaglione, L.; Cangini, M.; Pompei, M.; Guerrini, F.; Boni, L.; Pistocchi, R. *Toxicon*, **2006**, *47*, 597–604.

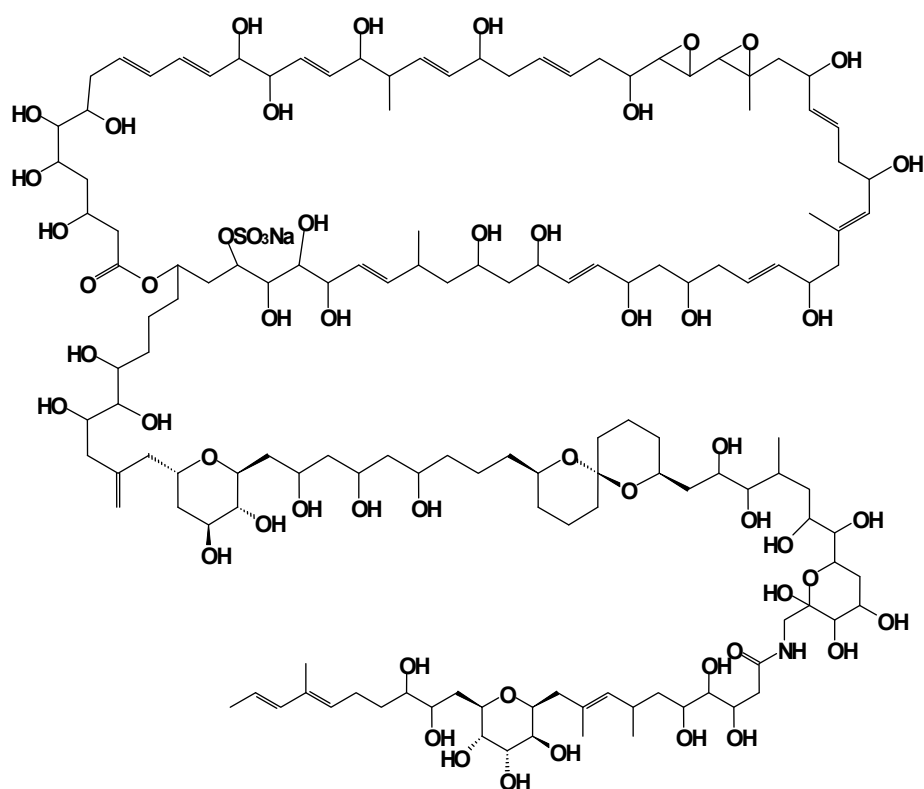
³⁸ Sekia, T.; Satake, M.; Mackenzie, L.; Kasparb, H. F.; Yasumoto, T. *Tetrahedron Lett.*, **1995**, *36*, 7093–7096.

³⁹ Miles, C. O.; Wilkins, A. L.; Stirling, D. J.; Mackenzie, L. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 4838–4840.

⁴⁰ Draganow, M.; Trzoss, M.; Brimble, M. A.; Cameron, R.; Beuzenberg, V.; Holland, P.; Mountfort, D. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **2005**, *20*, 305–312.

⁴¹ Torigoe, K.; Murata, M.; Yasumoto, T. *J. Am. Chem.*, **1988**, *110*, 7877–7878.

⁴² Hu, T.; de Freitas, A. S. W.; Curtis, J. M.; Oshima, Y.; Walter, J. A.; Wright, J. L. C. *J. Nat. Prod.*, **1996**, *59*, 1010–1014.



12 Zoosantelatoxina B^{9,43}

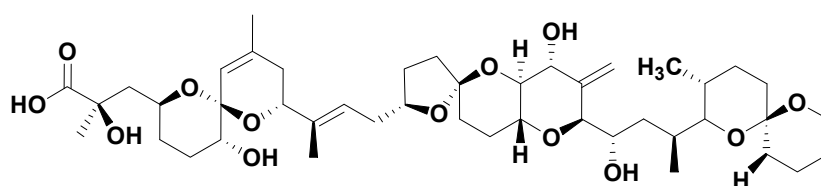
I-2-1.c.- Poliéteres lineales

Se trata de moléculas que contienen cadenas polihidroxladas y anillos éter, fundamentalmente aislados aunque en ocasiones aparecen fusionados o formado sistemas espiro. Por lo tanto, atendiendo a estas características nos encontramos con distintos tipos de compuestos (**Tabla I.4**) como son el Ácido Okadaico (AO) y Dinophysistoxinas (DTXs), Anfidinoles, Cooliotoxina, Azaspirácidos y Palitoxina, siendo esta ultima molécula una de las toxinas más potentes aislada de una fuente natural.

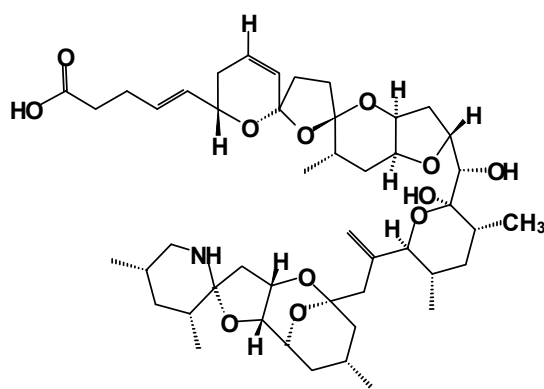
⁴³ Onodera, K.; Nakamura, H.; Oba, Y.; Ohizumi, Y.; Ojika, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10406-10411.

Compuesto	Organismo	Actividad	Intoxicación
Ácido Okadaico, 13 Dinophysistoxina, 14	<i>Prorocentrum arenarium</i> <i>P. belizeanum</i> <i>P. concavum</i> <i>P. faustiae</i> <i>P. hoffmanianum</i> <i>P. lima</i> <i>P. maculosum</i> <i>Dinophysis acuminata</i> <i>D. acuta</i> <i>D. fortii</i> <i>D. mitra</i> <i>D. norvegica</i> <i>D. rotundata</i> <i>D. sacculus</i> <i>D. tripos</i>	Inhibición de las proteínas fosfatasa Tipo 1 (PP1) y Tipo 2 (PP2A)	DSP
Azaspirácidos, 15	<i>Protoberidinium sp</i>	Disminuye [F actina], rompe estructura del citoesqueleto y aumenta [Ca ²⁺] en linfocitos.	AZP
Prorocentin, 16	<i>Prorocentrum lima</i>	Inhibidor de adenocarcinoma de colon y melanoma humano. Antimicrobiano.	—
Palitoxina, 17	<i>Ostreopsis siamensis</i> <i>O. ovifrons</i>	Interconvierte bombas Na ⁺ , K ⁺ en canales de cationes no selectivos y actividad hemolítica.	CFP*
Anfidinolos, 18	<i>Amphidinium klebsii</i>	Disruptor de membrana, hemolítico y antifúngico.	—
*Realmente la intoxicación producida por la Palitoxina se conoce como cluetoxismo pero está muy relacionada con la ciguatera.			

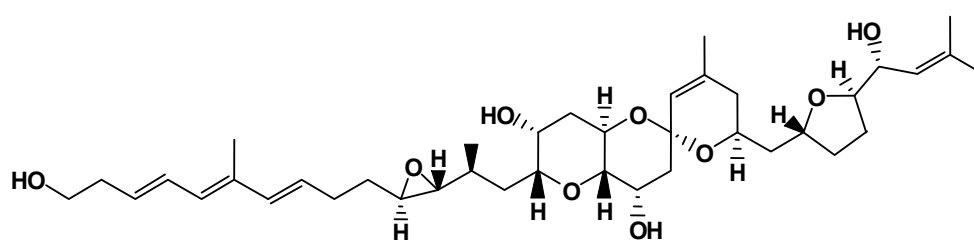
Tabla I.4.- Ejemplos de poliéteres lineales.



13 Ácido Okadaico^{44,45,46,47}



15 Azaspirácido^{48,49,50}



16 Proocentiniol⁵¹

⁴⁴ Schmitz, F.J.; Prasad, R. S. *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**, *103*, 2467-2469.

⁴⁵ Tachibana, K.; Scheuer, P. J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**, *103*, 2469-2471.

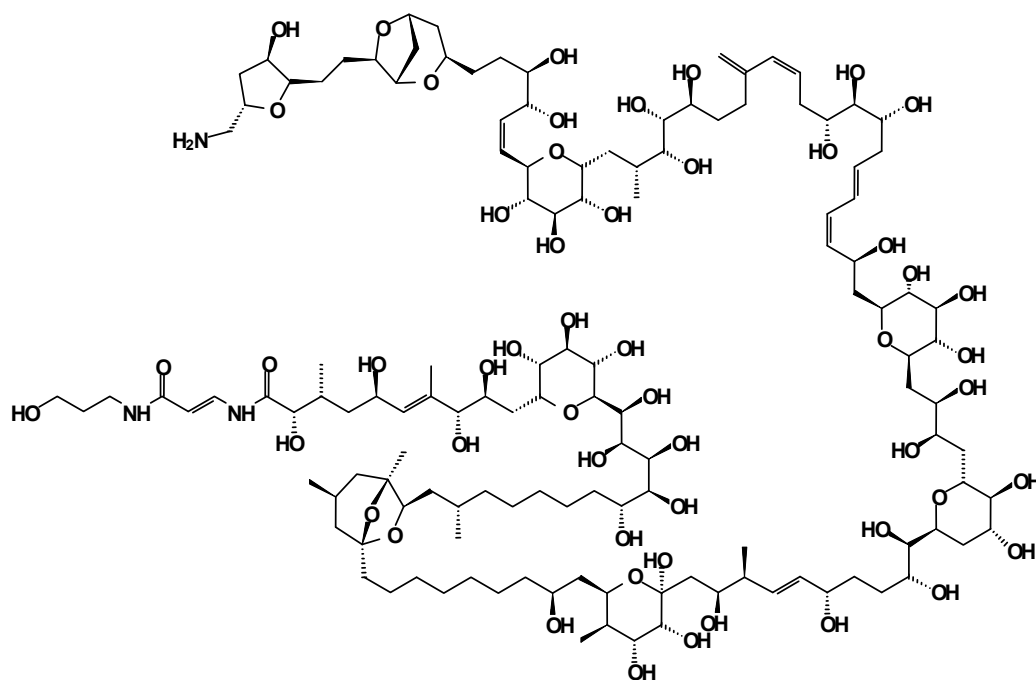
⁴⁶ Suzuki, T.; Beuzenberg, V.; Mackenzie, L.; Quilliam, M. A. *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.*, **2004**, *18*, 1131-1138.

⁴⁷ Boudreaux, R. T. M.; Hoskina, D. W. *International Immunopharmacology*, **2005**, *5*, 1507-1518.

⁴⁸ Satake, M.; Ofuji, K.; Naoki, H.; James, K. J.; Furey, A.; McMahon, T.; Silke, J.; Yasumoto, T. *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 9967-9968.

⁴⁹ James, K. J.; Sáez, M. J. F.; Furey, A.; Lehane, M. *Food Additives and Contaminants*, **2004**, *21*, 879-892.

⁵⁰ Román, Y.; Alfonso, A.; Louzao, M. C.; de la Rosa, L. A.; Leira, F.; Vieites, J. M.; Vieytes, M. R.; Ofujid, K.; Satake, M.; Yasumoto, T.; Botana, L. M. *Cellular Signalling*, **2002**, *14*, 703-716.



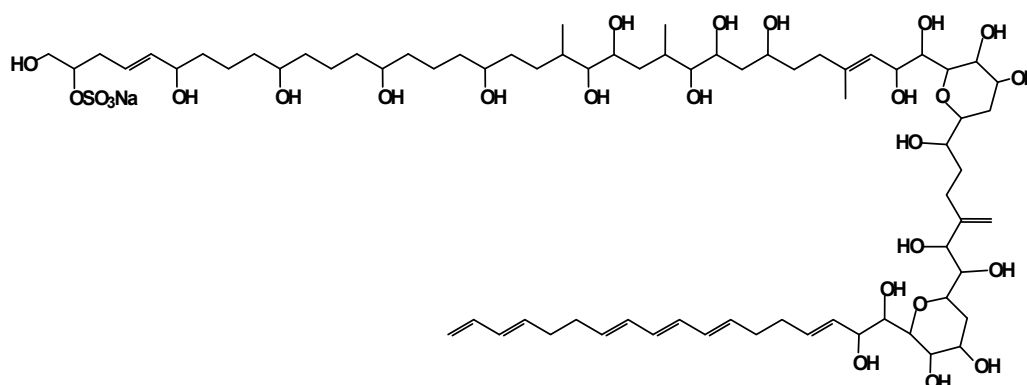
17 Palitoxina^{52,53,54}

⁵¹ Lu, C. K.; Chou, H.N.; Lee, C. K.; Lee, T.H. *Org. Lett.*, **2005**, *7*, 3893-3896.

⁵² Moore, R. E., Bartolini, G. *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**, *103*, 2491-94.

⁵³ Ukena, T; Satake, M.; Usami, M.; Oshima, Y.; Naoki, H.; Fujita, T.; Kan, Y.; Yasumoto, T. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2001**, *65*, 2585-2588.

⁵⁴ Zeliadt, N. A.; Warmka, J.K.; V. Wattenberg, E. V. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **2003**, *192*, 212-221.



18 Anfidinol^{55,56,57}

Dado que el trabajo de esta tesis se basa en el estudio de una especie del género *Prorocentrum*, caracterizado por sintetizar AO como metabolito cabeza de serie de otros compuestos, centraremos nuestra atención en este grupo.

I-3.- ÁCIDO OKADAICO Y SU ACTIVIDAD

El AO se aisló por primera vez en el año 1981 simultáneamente de dos esponjas, *Halicondria okadai*, esponja negra del Pacífico, y *Halicondria melanodocia*,⁴⁵ esponja del Caribe. Sin embargo, fue posteriormente con el aislamiento de las Dinophysistoxinas (DTXs) cuando se observó que los organismos productores de este tipo de moléculas eran dinoflagelados de los géneros *Prorocentrum*⁵⁸ y *Dinophysis*.⁵⁹ Este grupo de toxinas son las responsables de las

⁵⁵ Satake, M.; Murata, M.; Yasumoto, T. *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, *113*, 9859-9861.

⁵⁶ Morsy, N.; Matsuoka, S.; Houdai, T.; Matsumori, N.; Adachi, S.; Murata, M.; Iwashita, T.; Fujita, T. *Tetrahedron*, **2005**, *61*, 8606-8610.

⁵⁷ Houdai, T.; Matsuoka, S.; Matsumori, N.; Murata, M. *Biochimica et Biophysica Acta*, **2004**, *1667*, 91-100.

⁵⁸ Murakami, Y.; Oshima, Y.; Yasumoto, T. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **1982**, *48*, 69-72.

mareas rojas del tipo DSP, lo que ha supuesto a lo largo de estos últimos años un gran problema para el ecosistema y la industria pesquera. Esto se debe a que estas toxinas entran en la cadena trófica a través de los moluscos bivalvos que se alimentan de los dinoflagelados productores causando intoxicaciones en humanos a través del consumo de los mismos. Los síntomas más característicos de una intoxicación DSP son diarrea, náuseas, vómitos, cefaleas y dolor abdominal.⁷

Por otro lado, este grupo de compuestos se caracteriza por su capacidad como inhibidores selectivos de las proteínas fosfatasa del tipo 1 (PP1) y 2A (PP2A), por lo que el AO se ha utilizado en muchísimos trabajos publicados sobre el papel de las fosfatasas en los procesos celulares.⁶⁰

Los procesos de fosforilación están considerados como la modificación más importante después de la traducción de proteínas. Además ha sido demostrado que ocurre en una amplia variedad de organismos, desde bacterias a mamíferos, controlando y regulando múltiples funciones celulares como el crecimiento y muerte, diferenciación, metabolismo y señales de transducción. Las reacciones de fosforilación-defosforilación que tienen lugar en los procesos celulares dependen de dos tipos de enzimas: las proteínas kinasas (PKs), que catalizan la transferencia de grupos fosfatos del ATP a las proteínas y las proteínas fosfatasas (PPs), que catalizan la hidrólisis de los grupos fosfatos de las proteínas fosforiladas. Nos centraremos en las PPs,⁶¹ ya que son la diana del AO y algunos de sus derivados. Las PPs se pueden clasificar en dos grupos de acuerdo a su especificidad hacia los residuos aminoácidos sobre los que actúa, PSPs específicas para restos Serina-Treonina y PTPs que lo son para residuos Tirosina. Dentro de las PSPs nos podemos encontrar con dos grupos

⁵⁹ Yasumoto, T.; Murata, M.; Oshima, Y.; Sano, M. *Tetrahedron*, **1985**, *41*, 1019-1025.

⁶⁰ Fernández, J. J.; Cadenas, M. L.; Souto, M. L.; Trujillo, M. M.; Norte, M. *Current Medicinal Chemistry*, **2002**, *9*, 229-262.

⁶¹ McCluskey, A.; Sim, A. T. R.; Sakoff, J. A. *J. Med. Chem.*, **2002**, *45*, 1151-1175.

mayoritarios de proteínas, la PP1, específica para la subunidad β de las PKs y la PP2A, que presenta afinidad por la subunidad α .

Existen un gran número de enfermedades que están relacionadas con desajustes en el equilibrio de la actividad de fosforilación-defosforilación y dado que PP1 y PP2A regulan el 90% de las reacciones de las PSPs, los inhibidores selectivos de las mismas se han convertido en importantes herramientas farmacológicas para estudiar los procesos celulares regulados por estas proteínas. Entre otros se encuentran el ciclo celular, la muerte celular por apoptosis, el desarrollo de tumores, la contracción del músculo liso y ciertos desordenes neurológicos, metabólicos y respiratorios.

El AO, inhibidor selectivo de PP1 y PP2A, es de muchísima utilidad en el estudio de estos procesos ya que, a diferencia de los otros, presenta mayor selectividad frente a la PP2A.⁶² Los valores de las medidas de inhibición publicados para el AO pueden diferir de unos autores a otros, lo cual se puede deber a diferentes razones: al tipo de fuente de donde se extraiga la proteína, al ión o iones utilizados en los tampones y/o al sustrato empleado. Los valores de IC_{50} se encuentran entre 10-100 nM para la PP1 y entre 0.02-0.2 para la PP2A.

En cualquier caso, para tener un control efectivo de estos procesos resulta esencial conocer el modo de acción de los inhibidores, lo que está íntimamente relacionado con la estructura del complejo inhibidor-enzima. Hasta el momento se han realizado diversos trabajos para profundizar en el estudio de las interacciones entre estas proteínas y el ligando, llegándose a obtener cristales de los complejos de la PP1 con la Caliculina A,⁶³ la MCLR (microcistina-LR),⁶⁴ el AO^{65,66} y más recientemente

⁶² Boudreau, R. T. M.; Hoskin, D. W. *International Immunopharmacology*, **2005**, *5*, 1507–1518.

⁶³ Kita, A.; Matsunaga, S.; Takai, A.; Kataiwa, H.; Wakimoto, T.; Fuestani, N.; Isobe, M.; Miki, K. *Structure*, **2002**, *10*, 715-724.

⁶⁴ Goldberg, J.; Huang, H.-b.; Kwon, Y.-G.; Greengard, P.; Nairn, A. C.; Kuriyan, J. *Nature*, **1995**, *376*, 745-53.

con la motuporina.⁶⁷ Aunque aún no se han conseguido cristales del complejo con la PP2A, que es la proteína por la que el AO muestra una mayor afinidad, la información obtenida del estudio cristalográfico del complejo PP1-AO es de gran importancia para proponer modelos de interacción PP2A-AO. Como se muestra en la **Figura I.3**, del complejo AO-PP1, parece ser que las interacciones más importantes son las que tienen lugar entre el doble anillo espiro (C-30→C-38) y los residuos Ile-130 y Trp-206, las interacciones hidrofóbicas entre la región C-4→C-16 y los aminoácidos Phe-276 y Val-250, así como los puentes de hidrógeno entre el carbonilo del grupo carboxilo con Tyr-272, y los grupos hidroxilo C-2 y C-24 con Arg-96 y Arg-221, respectivamente.

Es importante señalar que la conformación que adopta el AO en el cristal del complejo con la proteína es muy similar a la que presenta el AO en estado sólido,^{45,68} y también con la que muestra en disolución.^{69,70} Por lo tanto, aunque lo realmente importante es el complejo formado entre la proteína y el ligando, el conocer las conformaciones de posibles ligandos en disolución es de gran ayuda, ya que esto junto con ensayos de actividad sobre las proteínas de interés contribuye a tener detallada información acerca de las relaciones estructura-actividad.

⁶⁵ Maynes, J. T.; Bateman, K. S.; Cherney, M. M.; Das, A. K.; Luu, H. A.; Holmes, C. F. B.; James, M. N. G. *J. Biol. Chem.*, **2001**, *276*, 44078-44082.

⁶⁶ Terrak, M.; Kerff, F.; Langsetmo, K.; Tao, T.; Dominguez, R. *Nature*, **2004**, *429*, 780-784.

⁶⁷ Maynes, J. T.; Luu, H. A.; Cherney, M. M.; Andersen, R. J.; Williams, D.; Holmes, C. F. B.; James, M. N. G. *J. Mol. Biol.*, **2006**, *356*, 111-120.

⁶⁸ Estructura de rayos-X obtenida en nuestro laboratorio por el profesor Dr. D. Matías López. Resultados aún sin publicar.

⁶⁹ Matsumori, N.; Murata, M.; Tachibana, K. *Tetrahedron*, **1995**, *51*, 12229-12238.

⁷⁰ Norte, M.; González, R.; Fernández, J. J.; Rico, M. *Tetrahedron*, **1991**, *47*, 7437-7446.

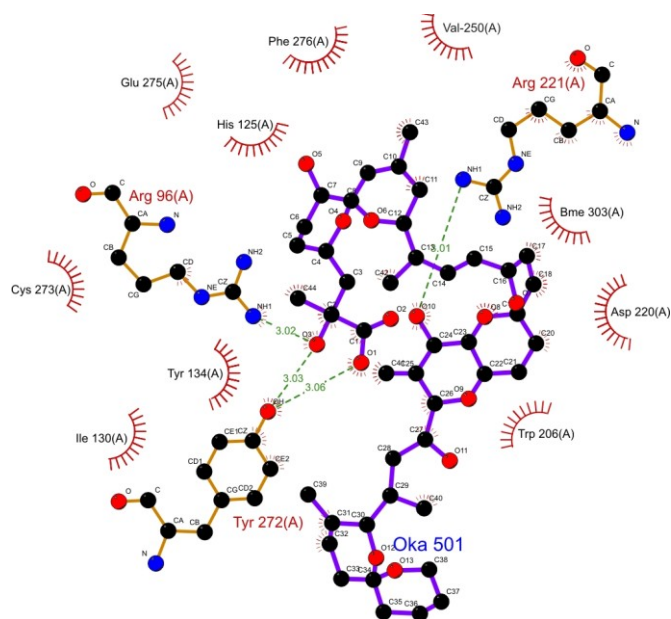
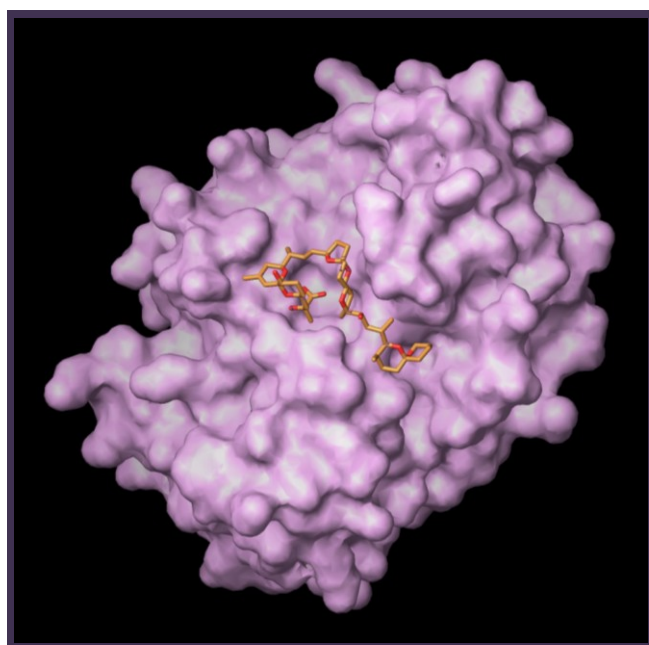


Figura I.3.- Complejo PP1-AO y sus interacciones.⁷¹

⁷¹ <http://www.rcsb.org/pdb/explore/biologyAndChemistry.do> (Procheck).

II.- ESTUDIO DEL DINOFLAGELADO *PROROCENTRUM BELIZEANUM*

II.1.- ANTECEDENTES

II.2.- CONDICIONES PARA EL CULTIVO DEL *P. BELIZEANUM*

II.2.1.- Medio de cultivo

II.2.2.- Ambiente físico artificial

**II.3.- DESARROLLO DE LOS CULTIVOS ARTIFICIALES DE
*PROROCENTRUM BELIZEANUM***

II.4.- RECOLECCION Y EXTRACCIÓN

II.5.- SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA

II.6.- ESTUDIO DE ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DEL ÉSTER C-10

**II.3.- ESTUDIO DE ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DEL COMPUESTO
DTX-5c**

II.- ESTUDIO DEL DINOFLAGELADO *PROROCENTRUM BELIZEANUM*

II.1.- ANTECEDENTES

Las microalgas marinas del género *Prorocentrum* son organismos bentónicos que pueden medir entre 15 y 100 µm, siendo una de sus características más importante la presencia de dos flagelos. Dentro de este género nos podemos encontrar con un amplio número de especies, y aunque una búsqueda en la base de datos resulta en aproximadamente 89 especies muchas de ellas son iguales entre sí, quedndo el número real de especies identificadas alrededor de 30.⁷²

La mayor parte de estos organismos se caracterizan por la producción de poliéteres tipo AO y (DTX) Dinofisistoxinas^{73,74,75} (**Figura II.1**), aunque es cierto que no sintetizan únicamente esta clase de metabolitos, ya que junto a ellos nos podemos encontrar con macrólidos^{42,76,77} (**Figura II.2**) y con otro tipo de poliéteres lineales como es el caso del prorocentin⁵¹ (**Figura II.3**) aislado recientemente de un cepa de *P. lima*. Todos estos compuestos comparten un mismo origen biosintético, la ruta de los policétidos.^{5,6}

Debido a la variedad de estructuras que se pueden encontrar dentro de este género de dinoflagelados así como a las potentes actividades biológicas se ha suscitado en los últimos años un interés creciente por el estudio de este tipo de organismos.

⁷² <http://www.algaebase.org>

⁷³ Hu, T.; Curtis, J. M.; Walter, J. A.; Wright, J. L. C., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1995**, 597-599.

⁷⁴ Hu, T.; Curtis, J. M.; Walter, J. A.; McLachlan, J. L.; Wright, J. L. C. *Tetrahedron lett.*, **1995**, 51, 9273-9276.

⁷⁵ Yasumoto, T.; Murata, T.; Oshima, T.; Sano, M.; Matsumoto, G. K.; Clardy, J. *Tetrahedron*, **1985**, 41, 1019-1025.

⁷⁶ Hu, T.; Curtis, J. M.; Walter, J. A.; Wright, J. L. C. *Tetrahedron Llett.*, **1999**, 40, 3977-3980.

⁷⁷ Lu, C.-K.; Lee, G.-H.; Hwang R.; Chou, H.-N. *Tetrahedron Lett.*, **2001**, 42, 1713-1716.

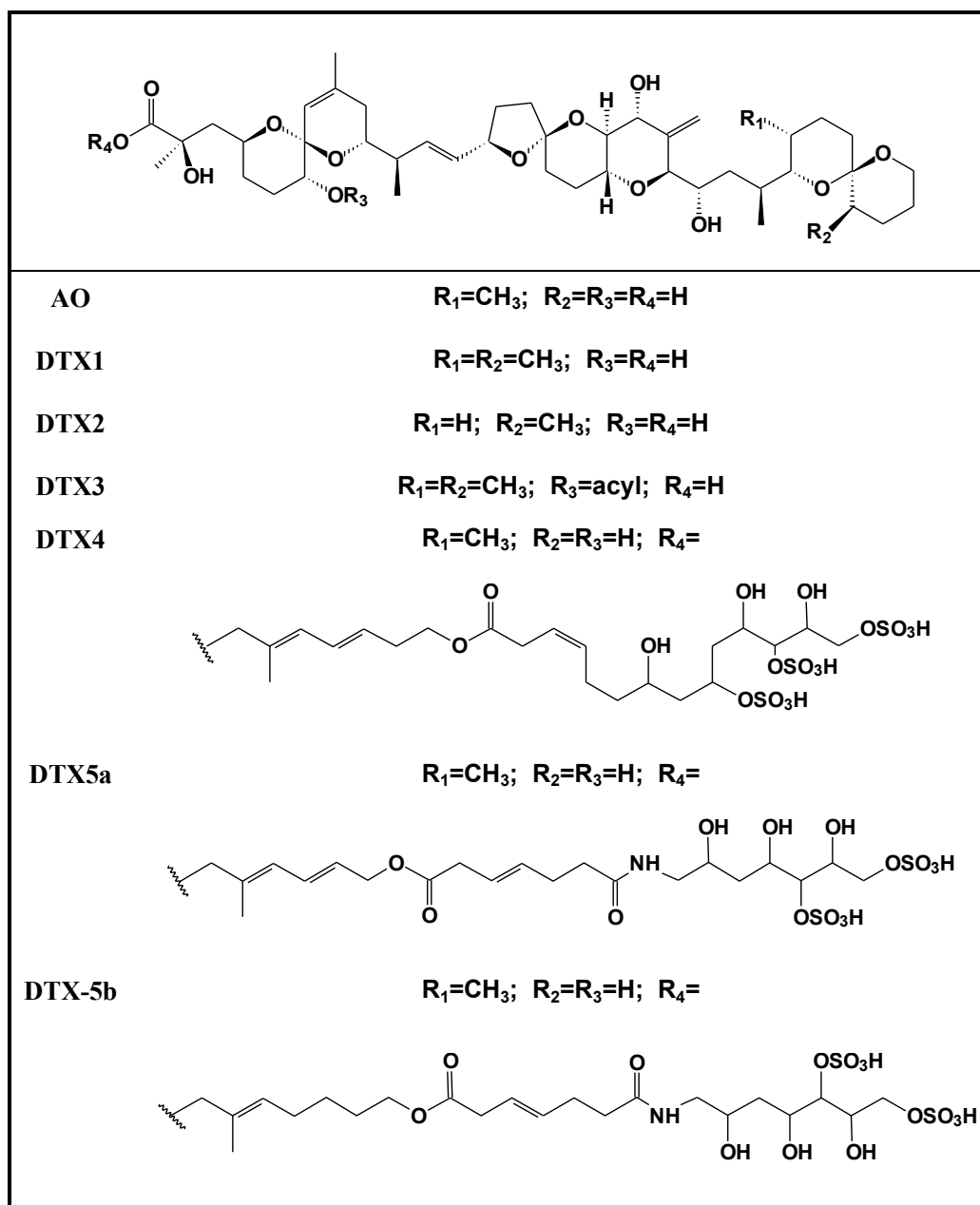


Figura II.1.- Ejemplos de derivados del AO.

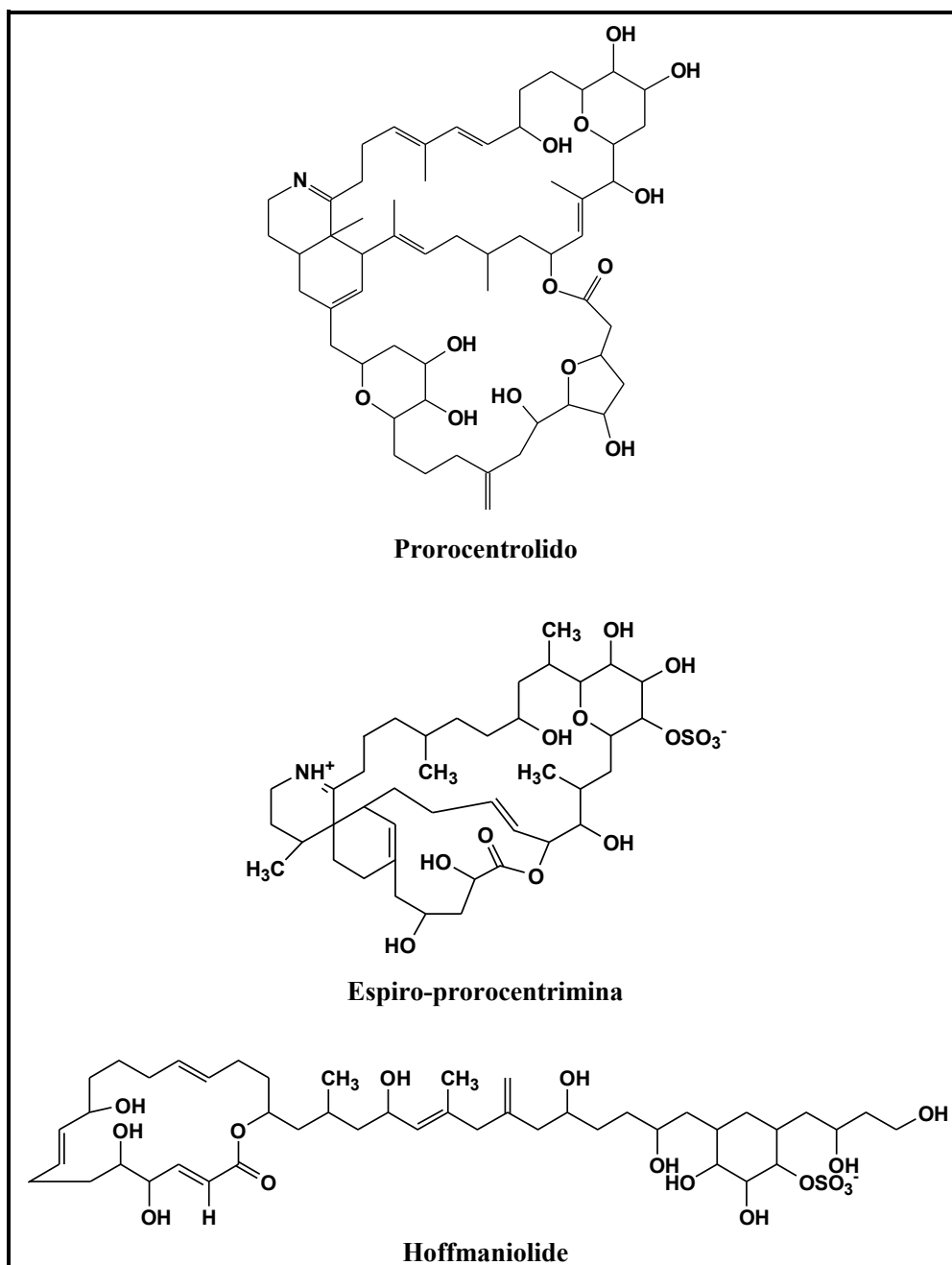
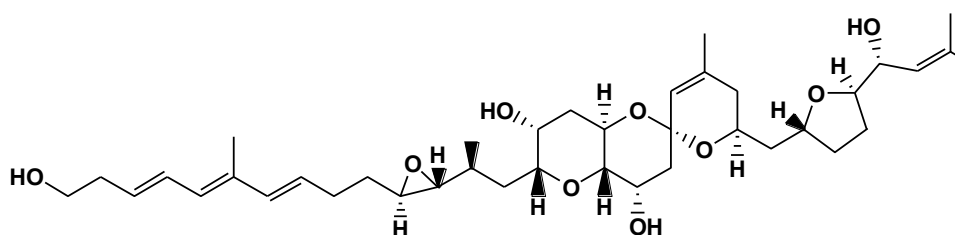


Figura II.2.- Ejemplos de macrólidos.



Prorocentín

Figura II.3.- Ejemplo de polieter lineal.

Durante los últimos años, en nuestro laboratorio se ha trabajado con distintas cepas de *P. lima*,^{78,79,80} de las que junto con el AO se han aislado diferentes derivados esterificados del mismo. En esta tesis nos interesamos en el *P. belizeanum*, ya que se trata de una microalga poco estudiada hasta el momento y que presenta un perfil tóxico distinto al observado en otras especies de *Prorocentrum*.

El *P. belizeanum* (**Figura II.4**) fue identificado por primera vez en Belice, en el año 1993 por María Faust,⁸¹ pero fue más tarde, en el año 1998, cuando Morton y col.⁸² detectaron la presencia en estas células de AO y DTX-1 a través de un estudio HPLC-Masas, hecho éste, corroborado posteriormente por Hummert y col.⁸³

⁷⁸ Suárez-Gómez, B.; Souto, M. L.; Norte, M.; Fernández, J. J. *J. Nat. Prod.*, **2001**, *64*, 1363-1364.

⁷⁹ Fernández, J. J.; Suárez-Gómez, B.; Souto, M. L.; Norte, M. *J. Nat. Prod.*, **2003**, *66*, 1294-1296.

⁸⁰ Suárez-Gómez, B.; Souto, M. L.; Cruz, P. G.; Fernández, J. J., Norte, M. *J. Nat. Prod.*, **2005**, *68*, 596-599.

⁸¹ Faust, M. A. *J. Phycol.*, **1993**, *29*, 100-107.

⁸² Morton, S.L.; Peter, D. R. M.; Young, K. A. y Lanoue, B. *Toxicon*, **1998**, *36*, 201-206.

⁸³ Hummert, C.; Kastrup, S.; Reichelt, M.; Luckas, B. *Chromatographia*, **2000**, *51*, 397-407.

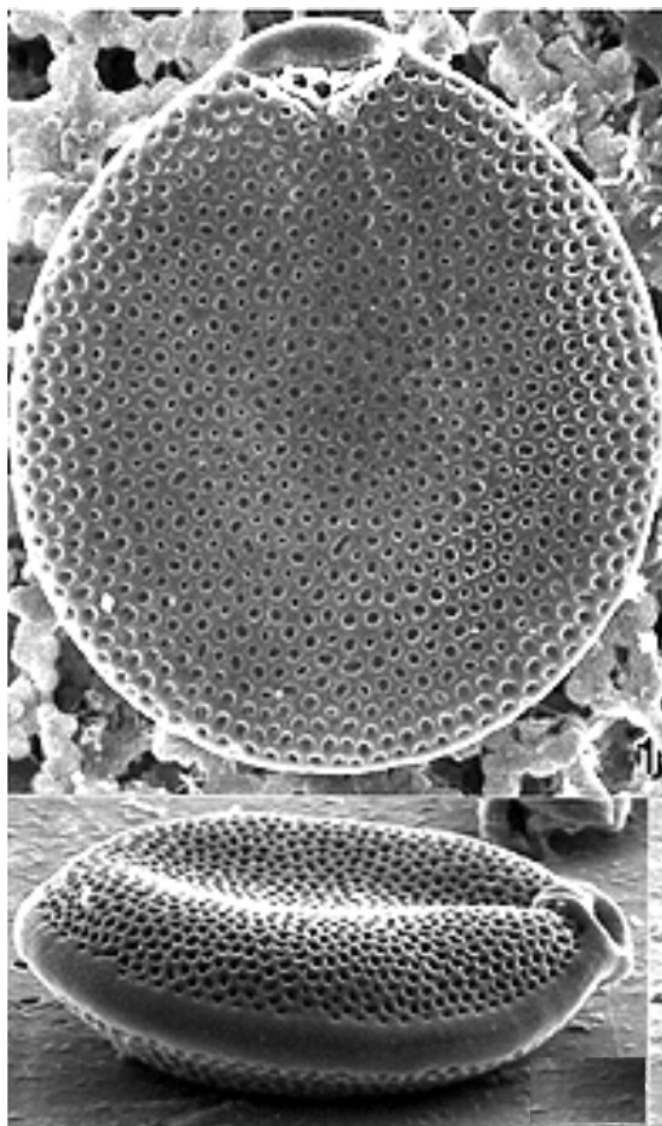


Figura II.4.- Fotografía de *P. belizeanum*. Ana Faust⁸⁴

Clasificación: *Reino:* Protista *Subreino:* Biciliata *Infrareino:* Alveolata *División:* Myzozoa *Clase:* Dinophyceae *Orden:* Prorocentrales *Familia:* Prorocentraceae
Género: Prorocentrum *Especie:* belizeanum.

⁸⁴ Faust, M. A.; Gullede, R. A. en: <http://www.nmnh.si.edu/botany/projects/dinoflag/index.htm>.

Para llevar a cabo este trabajo nos cedieron una muestra de células del dinoflagelado *P. belizeanum* de la colección de microalgas del IEO Vigo (Instituto Español de Oceanografía de Vigo) por cortesía de D. Santiago Fraga. La muestra contenía 3 ml con aproximadamente 7000 células/ml de un cultivo clónico almacenado en medio L1.

II.2.- CONDICIONES PARA EL CULTIVO DEL *P. BELIZEANUM*

El primer paso, imprescindible, para poder realizar el estudio fitoquímico del dinoflagelado consiste en desarrollar en el laboratorio el cultivo del *P. belizeanum*, para lo que se establecieron las condiciones adecuadas de cultivo. Los factores que se controlaron fueron, la composición del medio de cultivo, el ambiente físico artificial, el aporte de CO₂ y el pH. Todos estos factores se comentan brevemente a continuación.

II.2.1.- Medio de cultivo

Sin lugar a dudas, el aspecto más importante a la hora de cultivar de forma artificial cualquier especie de dinoflagelado es la elección del medio de cultivo adecuado, ya que éste debe satisfacer los requerimientos nutricionales del organismo y permitir que se desarrolle y complete todo su ciclo biológico. Con este fin, se utilizó el medio Guillard-K⁸⁵ (**Tabla II.1**), que es una modificación del medio f/2 descrito por Guillard,⁸⁶ ya que es el más específico y mejor caracterizado para especies flageladas,²⁹ así como por haber sido utilizado con anterioridad por Morton y col.⁸² en el cultivo del mismo organismo.

⁸⁵ Keller, M.D.; Selvin, R.C.; Claus, W.; Guillard, R.R.L. *J. Phycol.*, **1987**, *23*, 633-638.

⁸⁶ Guillard, R.R.L. Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates. En: *Culture of Marine Invertebrate Animals*. Smith, W.L.; Chanley M.H. (Eds.), Plenum Press, N. Y., **1975**, pp. 29-60.

II.- Estudio del dinoflagelado Prorocentrum belizeanum

Para preparar el medio se añadió un 5% de agua destilada a la cantidad deseada de agua de mar, con el fin contrarrestar el aumento de salinidad debido a la posterior adición de los nutrientes, y se esterilizó la mezcla haciéndola pasar por una serie de filtros con distintos tamaños de poros (1 μm , 0.45 μm y 0.22 μm). A continuación se añadieron a la mezcla los correspondientes nutrientes a partir de disoluciones “stock” (1000X), a razón de 1 ml por litro de cultivo. Todo esto se realizó en condiciones asépticas, utilizando una campana de flujo laminar.

Aditivos	Concentración final en el medio (M)	Disolución “Stock” (g/l agua destilada)
1.-Nutrientes mayoritarios		
NaNO ₃	8.83×10^{-4}	75.05
NaH ₂ PO ₄	1×10^{-5}	1.38
Na ₂ SiO ₃ .9H ₂ O*	1.07×10^{-5}	30.0
2.-Metales traza		
FeEDTA	1.46×10^{-5}	4.3
MnCl ₂ .4H ₂ O	9×10^{-7}	0.18
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8×10^{-8}	0.02
CoCl ₂ .6H ₂ O	5×10^{-8}	0.01
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	3×10^{-8}	7×10^{-3}
CuSO ₄ .5H ₂ O	1×10^{-8}	2.5×10^{-3}
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	9×10^{-5}	33.6
3.-Vitaminas		
Tiamina.HCl	3×10^{-7}	0.1
Biotina	2.1×10^{-9}	5.1×10^{-4}
B ₁₂	3.7×10^{-10}	5.0×10^{-4}
4.-Otros aditivos		
TRIS	1×10^{-3}	121.14
NH ₄ Cl	5×10^{-5}	2.68
H ₂ SeO ₃	1×10^{-8}	1.3×10^{-3}
* Sólo se usa en el caso de que se realicen cultivos de diatomeas		

Tabla II.1.- Composición del medio Guillard K.

II.2.2.- Ambiente físico artificial

Otro factor que se debe controlar para el correcto desarrollo celular son las condiciones ambientales, por lo tanto con este fin se controlaron para nuestro microorganismo, la temperatura, la intensidad lumínica y los ciclos de luz.

La **temperatura** idónea para realizar el cultivo suele ser una similar a la del medio natural donde prolifera el organismo. En el caso del *P. belizeanum*, las aguas de las que procede son templadas manteniendo un promedio entorno a los 26 °C, sin embargo, el cultivo se desarrolló a 23 °C ya que se ha observado que este cambio de temperatura no afecta al perfil tóxico del microorganismo y porque compartía cámara de cultivo con otros microorganismos.

Con respecto a la **intensidad y periodos de luz**, es recomendable mantener un periodo de oscuridad que simule los ciclos día-noche naturales, ya que éste suele favorecer los ritmos celulares. En nuestro caso el fotoperiodo que se aplicó consistió en 16 horas de luz y 8 de oscuridad, y la luz empleada en los periodos de simulación de día fue generada por tubos fluorescentes de neón con una intensidad lumínica de aproximadamente $160 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-2}$,⁸⁷ equivalente al 10% de la existente en la superficie del agua de mar a pleno sol.

Debido a que el **requerimiento de CO₂** de nuestro organismo es pequeño, fue suficiente para que las células se abastecieran de CO₂ la cámara de aire que queda en los recipientes de cultivo (un tercio del volumen total).

No fue necesario el **ajuste del pH** más allá del que proporciona el medio, como se comprobó al monitorizar los cultivos una vez finalizada la adición de nutrientes, ya que el medio Guillard-K utilizado incluía una disolución tampón de tris (2-amino-2(hidroximetil)-1,3-propanodiol), que fijó el pH en un valor de 7.0.

⁸⁷Quilliam, Marine Biology, 1999, 134, 541-549.

II.3.-DESARROLLO DE LOS CULTIVOS ARTIFICIALES DE PROROCENTRUM BELIZEANUM

El mantenimiento de las células se realizó a pequeña escala en erlenmeyers de 50 ml o en tubos de ensayo de 20 ml, a partir de los cuales se obtuvo el inóculo para pasar a volúmenes superiores.

Por lo tanto, debido a que el interés es el de hacer crecer el cultivo para obtener grandes cantidades de biomasa, se realizó el escalado de los cultivos aumentando paulatinamente los volúmenes en las diferentes etapas del ciclo de cultivo, para lo cual se realizaron trasvases de células a recipientes mayores. De este modo se obtuvo un cultivo a gran escala que permitió disponer de suficiente cantidad de biomasa para llevar a cabo el posterior estudio de la producción de los metabolitos secundarios de la microalga.

El cultivo se comenzó con una primera etapa donde los tubos o erlemeyers de mantenimiento se replicaron a un estadio similar, en este caso en erlenmeyers de 50 ml que contienen 25 ml de medio Guillard-K, y fueron inoculados con 5 ml del cultivo de la microalga. Los trasvases se realizaron en la fase de crecimiento exponencial de las células y la densidad del inóculo fue de aproximadamente 7000 células/ml. (**Figura II.5**).

Posteriormente, se prepararon erlenmeyers de 250 ml conteniendo 120 ml de medio, los cuales se inocularon con 30 ml de cultivo cada uno. Una vez alcanzado el máximo de crecimiento, éstos sirvieron de inóculo para la siguiente etapa que se realizó en erlenmeyers de 5 l que contenían aproximadamente 2.3 l de medio (**Figura II.6**).



Figura II.5.- Diferentes escalas de cultivo correspondientes a los primeros estadios de cultivo, erlenmeyers de 50 y 250 ml.



Figura II.6.- Cultivo en erlenmeyers de 5 l.

Finalmente, la última etapa del cultivo se realizó en recipientes de 60 l que contenían 40 l de medio, y cada uno se inoculó con el contenido de uno de los recipientes de la etapa anterior (**Figura I.12**). Todos los trasvases indicados se llevaron a cabo con los inóculos en la fase exponencial del crecimiento.

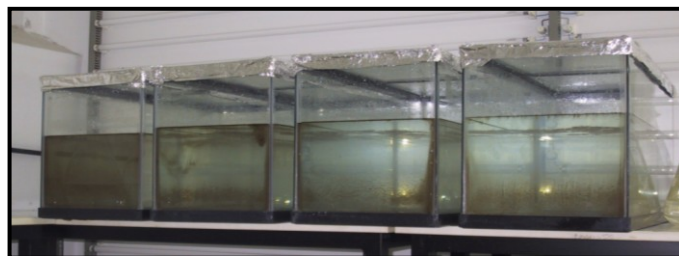
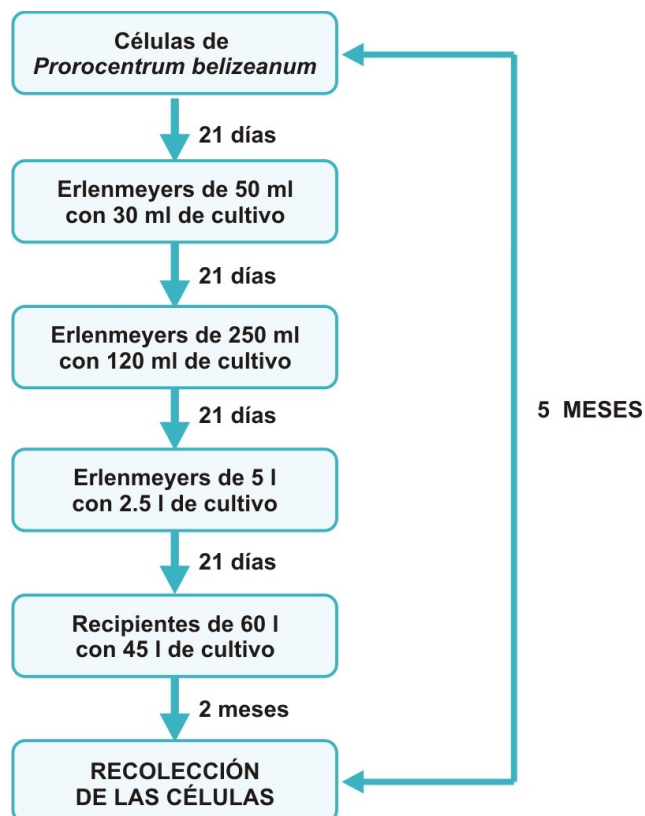


Figura II.7.- Cultivo en recipientes de 60 litros.

II.- Estudio del dinoflagelado Prorocentrum belizeanum

Siguiendo el procedimiento descrito, se realizaron cultivos con un volumen total de 1020 litros, lo que permitió obtener suficiente biomasa para proceder al estudio fitoquímico. El tiempo entre cada trasvase fue de aproximadamente 21 días para los primeros estadios, mientras que para la recolección a partir de los recipientes de 60 litros se dejaron pasar 2 meses, ya que es el tiempo estimado para que cultivos de organismos de este género presenten una producción óptima de toxinas.⁸⁷ El ciclo de cultivo se describe en el **Esquema II.1**.

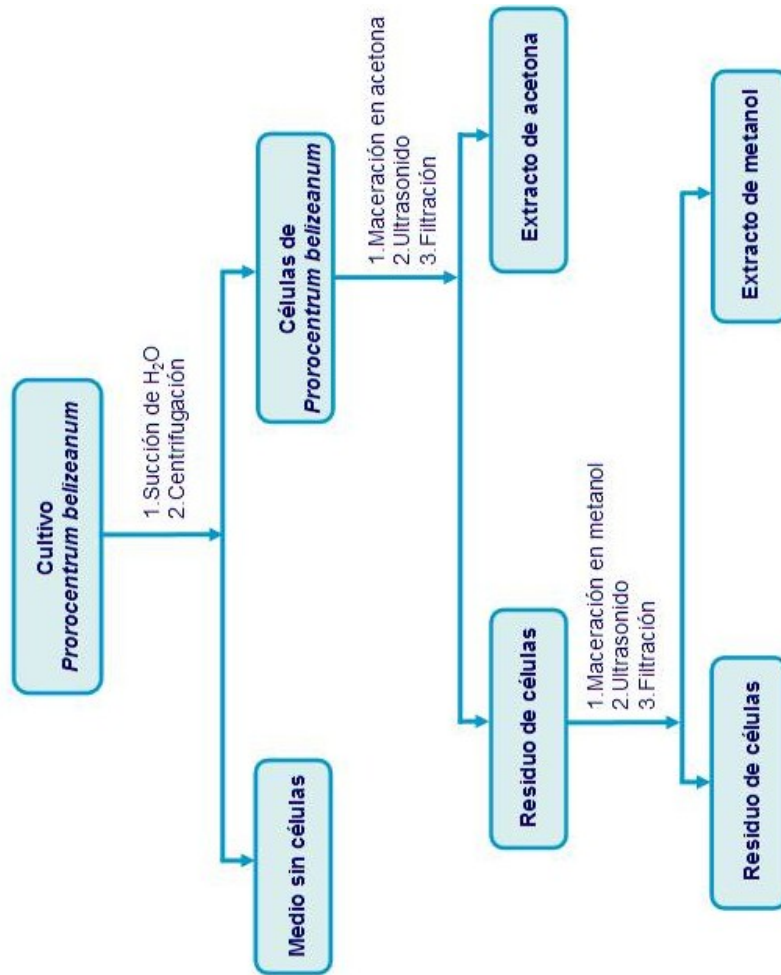


Esquema II.1.- Etapas del ciclo de cultivo.

II.4.- RECOLECCION Y EXTRACCIÓN

P. belizeanum es un organismo bentónico, característica que facilitó el proceso de recolección de la microalga, debido a que se fija en el fondo y paredes de los tanques. El proceso de recolección se llevó a cabo de la siguiente manera: primero se succionó la mayor parte del agua de mar contenida en los tanques. Y en segundo lugar se separaron los restos del medio de cultivo que quedaron con las células, centrifugándolas a una velocidad de 7000 r.p.m. y manteniendo la temperatura entre 5 y 10° C. De este modo fue posible obtener un residuo de células libre de medio (**Esquema II.2**).

Las células así obtenidas se sometieron a maceración en acetona en un baño de ultrasonido que aseguró la ruptura completa de las mismas, y permitió una extracción más eficaz de los metabolitos. Este proceso se repitió sucesivas veces hasta que no se observó color en el disolvente. El residuo de células resultante se sometió al mismo proceso con metanol como disolvente hasta agotamiento. En cada caso el residuo celular se separó del disolvente mediante filtración a través de una placa de vidrio, y la ulterior evaporación del disolvente nos llevó a dos extractos, un extracto de acetona de 22.1 g, y otro de metanol de 16.0 g., que tuvieron que ser nuevamente filtrados debido a la presencia de un precipitado blanquecino formado por sales, que dificultaba el manejo del extracto. El proceso se resume en el **Esquema II.2**.



Esquema II.2.- Proceso de recolección y extracción.

II.5.- SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA

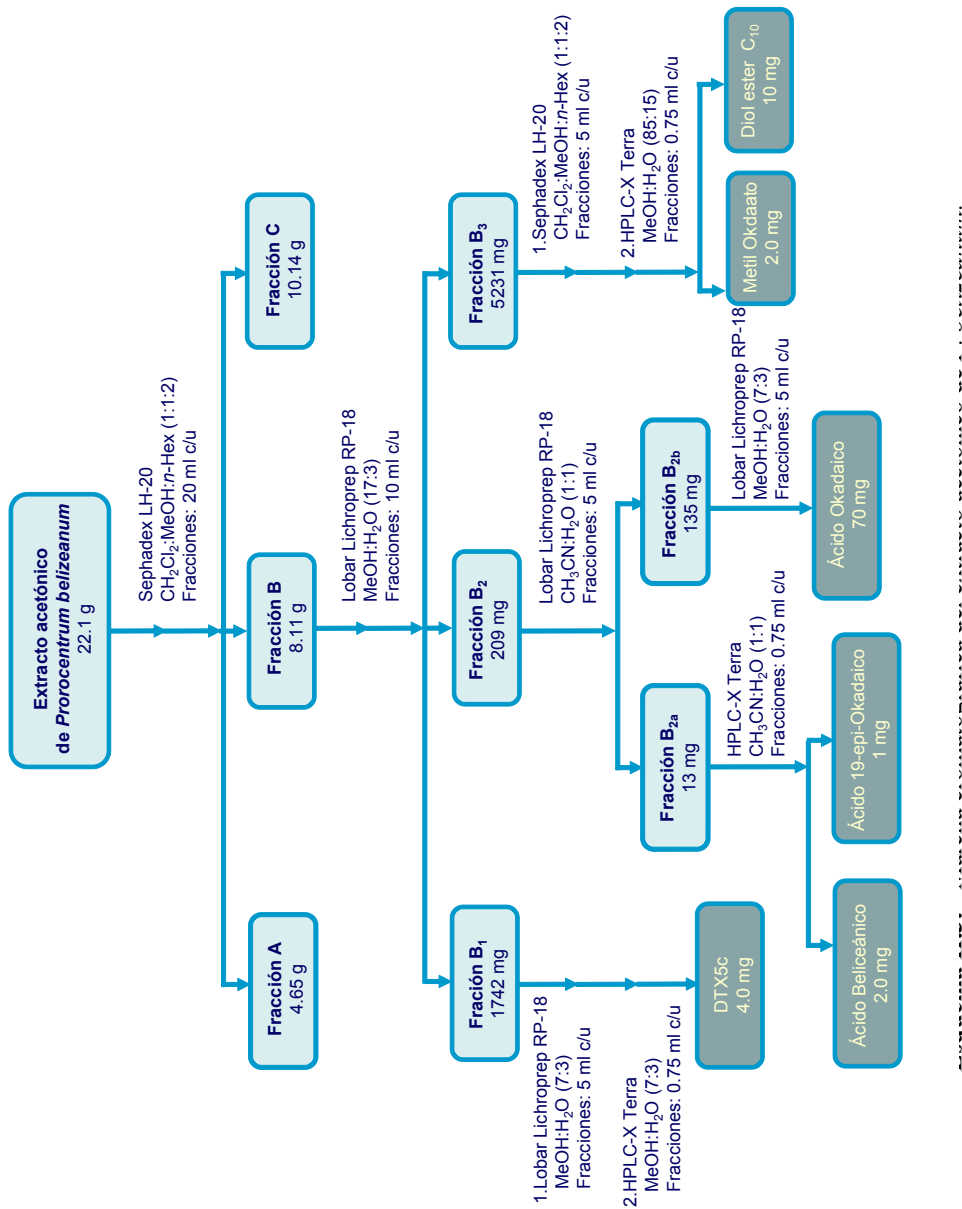
En esta memoria se recoge el estudio de metabolitos secundarios a partir del extracto de acetona (22.1 g), para ello fue necesaria la puesta a punto de una marcha cromatográfica utilizando distintas fases estacionarias.

En primer lugar se realizó una separación por exclusión, utilizando como fase estacionaria Sephadex LH-20 y como fase móvil la mezcla de Cloroformo:Metanol:*n*-Hexano en las proporciones 1:1:2. Este primer paso permitió eliminar una gran cantidad de clorofilas, aunque fue necesario repetirlo sucesivas veces hasta su casi completa eliminación. De este proceso se obtuvieron tres fracciones que se sometieron a ensayos farmacológicos, siendo la denominada **fracción B** la que presentó una mayor actividad, al tiempo que las placas de TLC nos indicaron la presencia del ácido okadaico, por lo que centramos en ella los estudios posteriores.

A continuación, la **fracción B** se sometió de forma consecutiva a cromatografías de media presión en fase reversa. En este caso fue necesario probar con distintas mezclas de eluyentes hasta conseguir las condiciones óptimas de separación. Finalmente, fue posible aislar como producto mayoritario el **Ácido Okadaico** (AO), 70 mg, con mezclas de MeOH:H₂O (17:3) y CH₃CN:H₂O (1:1).

La última etapa fue la de purificación de los metabolitos minoritarios a través de sucesivas cromatografías de alta eficacia (HPLC) en fase reversa, pudiéndose separar e identificar **DTX-5c**, 4.0 mg, **Ácido Belizeánico** (AB), 2.0 mg, **Ácido 19-epi-Okadaico** (AEO), 1.0 mg, **Diol éster C₁₀ del AO** (10 mg), y el ya conocido **Metil-okadaato**⁷⁹ (2.0 mg). Las condiciones de purificación utilizadas se reúnen en el **Esquema II.3**.

II.- Estudio del dinoflagelado *Prorocentrum belizeanum*

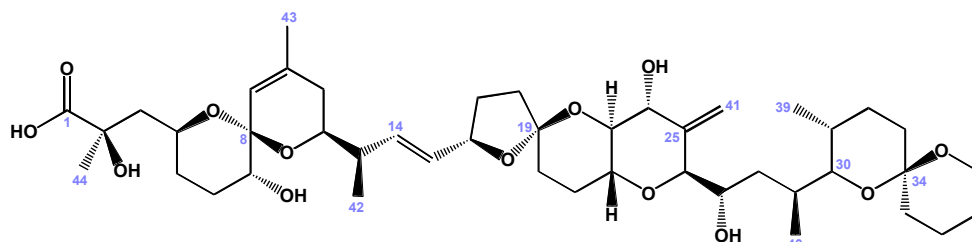


II.6.- ESTUDIO DE ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DEL ESTER C-10

La fórmula molecular de este nuevo compuesto fue establecida como $C_{54}H_{82}O_{14}$ de acuerdo con su espectro de masas FAB (*Fast Atom Bombardment*) de alta resolución, m/z 977.5602 [$C_{54}H_{82}O_{14}+Na$]⁺, donde se observó el fraccionamiento correspondiente al diol $C_{10}H_{15}O_2$ (m/z 167.1014). El espectro de infrarrojo (IR) mostró una banda intensa a 1732 cm^{-1} característico del carbonilo de un grupo éster.

La comparación de los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de protón y de carbono del AO y del nuevo compuesto permitió establecer que éste contenía todas las señales correspondientes al AO además de un grupo de señales nuevas (**Figuras II.8 y II.9**). Esta información se pudo corroborar con el experimento HSQC, donde se establecieron las correlaciones protón-carbono de los 16 metinos (tres vinílicos), 16 metilenos (uno olefínico) y 5 metilos (uno vinílico) del AO, así como con las correlaciones características en el HMBC de los 7 carbonos cuaternarios. Junto a este grupo de señales, claramente identificadas, aparecieron 14 nuevas señales de protón correspondientes a 2 metinos vinílicos y 6 metilenos (según el HSQC dos olefínicos) además de dos nuevos carbonos cuaternarios en el HMBC. Como referencia, los desplazamientos químicos de RMN de protón y carbono del AO en $CDCl_3$ se muestran en la **Tabla II.2**.

II.- Estudio del dinoflagelado *Prorocentrum belizeanum*



Carbono	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Carbono	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
1	176.7		23	76.5	3.35
2	77.2		24	71.1	4.07
3	42.6	2.12/1.62	25	144.7	
4	69.3	3.96	26	84.9	3.90
5	31.6	1.72/1.31	27	64.7	4.04
6	32.8	1.83/1.79	28	35.3	1.28/0.95
7	71.5	3.34	29	31.1	1.91
8	96.5		30	75.0	3.25
9	121.5	5.29	31	27.4	1.75
10	139.4		32	26.6	1.96/1.86
11	33.2	1.91/1.87	33	30.3	1.52/1.34
12	71.5	3.35	34	95.6	
13	42.2	2.21	35	25.4	1.48/1.31
14	136.3	5.63	36	18.7	1.84/1.51
15	131.4	5.42	37	35.9	1.61/1.39
16	79.1	4.51	38	60.3	3.62/3.53
17	30.6	2.14/1.54	39	10.7	0.88
18	37.3	2.04/1.80	40	16.2	1.01
19	105.7		41	112.5	5.39/5.02
20	26.4	1.47/1.32	42	15.9	0.97
21	27.1	1.81/1.72	43	23.1	1.73
22	69.7	3.57	44	27.3	1.36

Tabla II.2.- Desplazamientos químicos de protón y carbono-13 del AO en CDCl_3 .

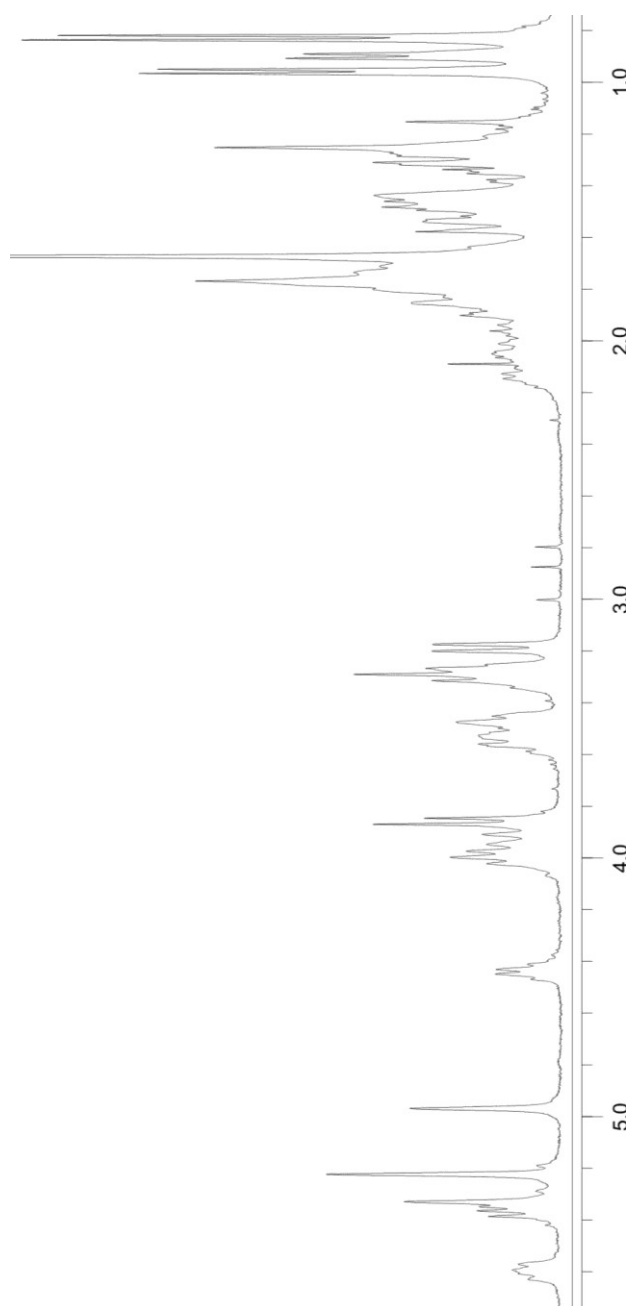


Figura II.8.- Espectro de RMN^1H del AO en CDCl_3 .

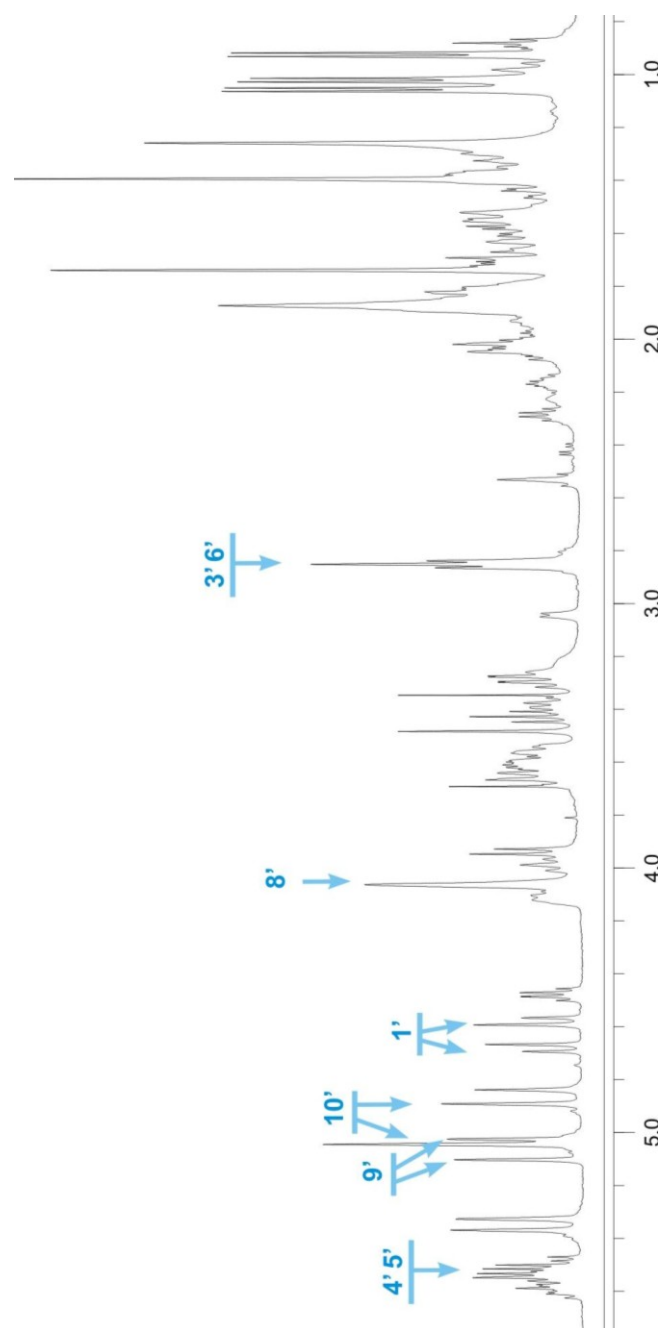


Figura II.9.- Espectro de RMN¹H del diol éster del AO en CDCl₃.

Una vez analizados los datos de RMN del AO y del diol ester C₁₀ del AO resulta relativamente fácil observar cuales son las señales correspondientes a los nuevos protones. De esta forma, aparecen señales pertenecientes a los protones vinílicos de un doble enlace Z ($J = 8.0$ Hz), H-4' (δ_H 5.56) y H-5' (δ_H 5.60), que en el experimento COSY se correlacionaron con los metilenos alílicos H₂-3' (δ_H 2.86) y H₂-6' (δ_H 2.85), respectivamente (**Figura II.10**). También aparecen señales que se corresponden con las de dos metilenos vinílicos H₂-9' (δ_H 5.10 y 5.02) y H₂-10' (δ_H 5.05 y 4.89), y las de dos metilenos unidos a heteroátomo H₂-1' (δ_H 4.68 y 4.58) y H₂-8' (δ_H 3.93).) Todas ellas fueron correlacionadas con las correspondientes a las de sus carbonos a través del experimento HSQC; C-1' (67.5), C-3' 31.3), C-4' 128.0), C-5' 129.2), C-6' (31.3), C-8' (64.8), C-9' (113.7) y C-10' (110.7). (**Figura II.11**).

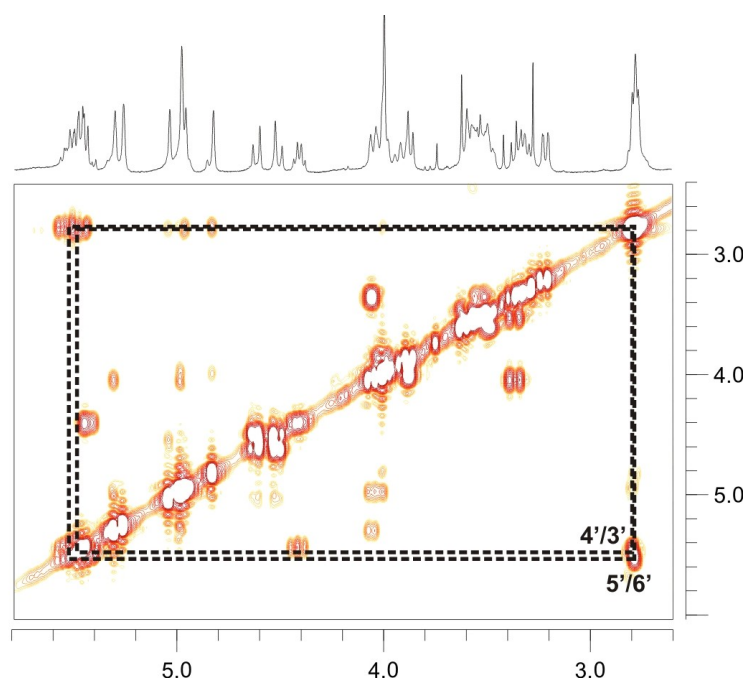


Figura II.10.- Corte del espectro COSY para el fragmento C-3'→C-6'.⁸⁸

⁸⁸ Para señalar las correlaciones se ha optado por indicar en primer lugar el protón que primero aparece en la diagonal (derecha → izquierda) y después con el que presenta correlación.

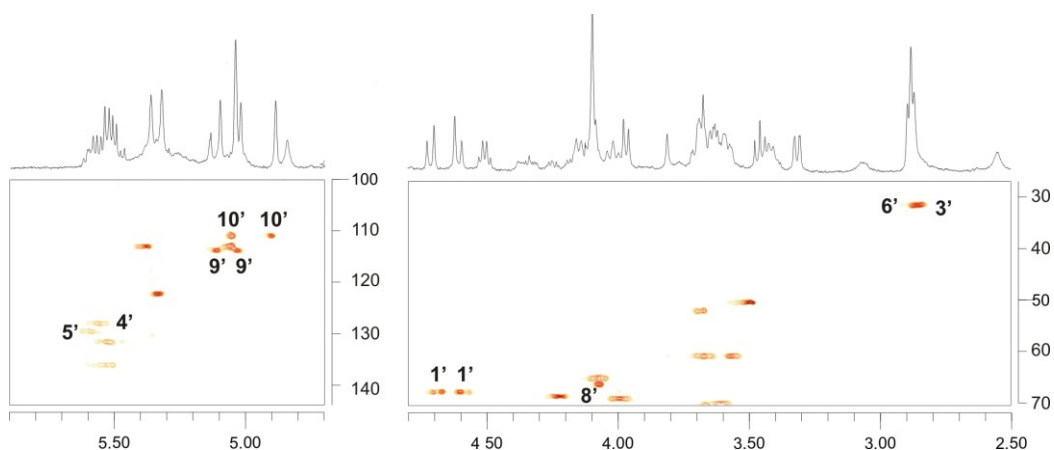


Figura II.11.- Sección del espectro HSQC para el fragmento C-1'→C-10'.

La estructura del fragmento fue finalmente establecida a través de las correlaciones observadas en el HMBC para los carbonos cuaternarios olefínicos. Así, el carbono centrado a δ_C 142.4 fue identificado como C-2' por sus correlaciones con los protones del metileno unido a heteroátomo H₂-1' y con el alílico H₂-3'. Del mismo modo, el carbono cuaternario a δ_C 147.9 fue identificado como C-7' por sus correlaciones con el metileno alílico H₂-6' y con el metileno unido a heteroátomo H₂-8'. Todo ello establece la estructura del fragmento como la dada en la **Figura II.13**, en la que aparece unido con el resto de la molécula a través de la señal de correlación entre el carbono carbonílico C-1 (δ_C 176.3) y los protones H₂-1' (δ_H 4.68 y 4.58) de uno de los extremos del fragmento. (**Figura II.12**).

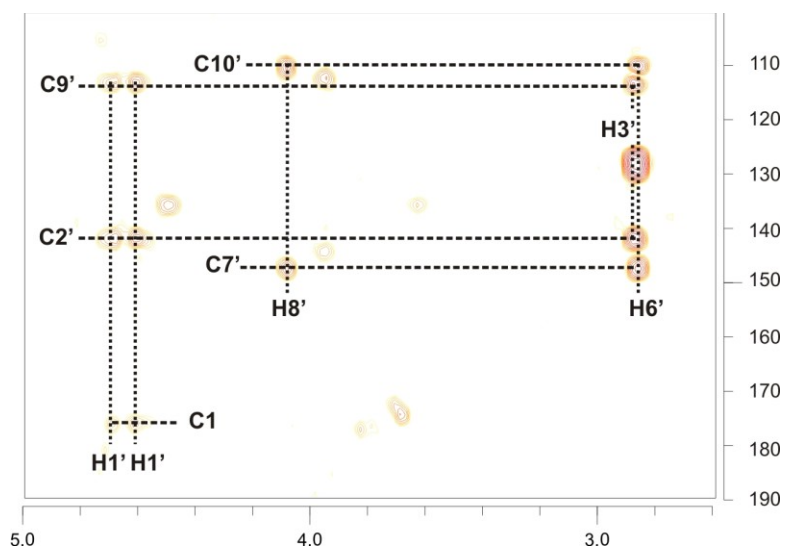


Figura II.12.- Espectro de HMBC del fragmento C-1'→C-10'.

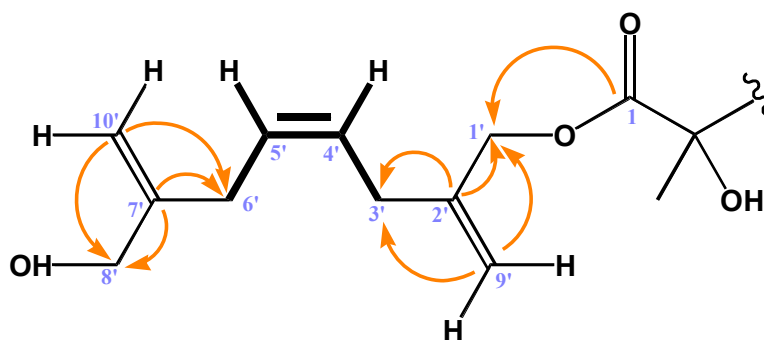


Figura II.13.- Correlaciones de HMBC más significativas del fragmento C-1'→C-10'
 Secuencia: C-1 (δ_C 176.3) → H₂-1' (δ_H 4.68 y 4.58, δ_C 67.5) ← C-2' (δ_C 142.4) →
 H₂-9' (δ_H 5.10 y 5.02, δ_C 113.7), H₂-3' (δ_H 2.86, δ_C 31.3) → H-4' (δ_H 5.56, δ_C
 128.8) → H-5' (δ_H 5.60, δ_C 129.2) → H₂-6' (δ_H 2.85, δ_C 31.3) ← C-7' (δ_C 147.9) → H₂-
 8' (δ_H 4.06, δ_C 64.8), H₂-10' (δ_H 5.05 y 4.89, δ_C 110.7)

II.- Estudio del dinoflagelado Prorocentrum belizeanum

En el experimento ROESY se observaron señales de correlación que fueron idénticas a las correspondientes al AO, por lo que concluimos que la conformación del éster es muy similar a la del AO. (**Figura II.14, Tabla II.3**).

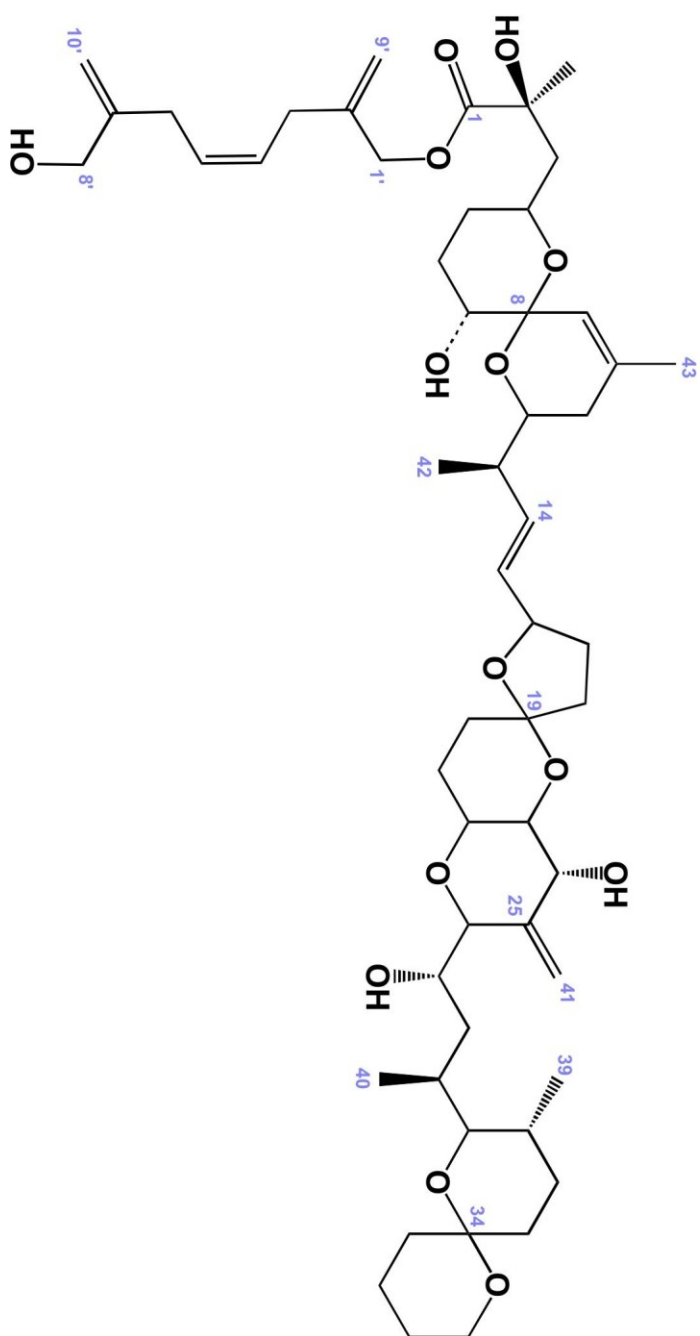


Figura II.14.- Estructura del diol ester C₁₀ del AO.

Carbono	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Carbono	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Carbono	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
1	176.3		19	106.0		37	25.3	1.56/1.53
2	75.8		20	30.0	1.42/1.37	38	60.7	3.68/3.55
3	44.2	2.03/1.70	21	28.0	1.81/1.74	39	11.0	0.92
4	68.7	3.99	22	70.3	3.60	40	16.5	1.06
5	32.0	1.72/1.35	23	77.4	3.43	41	112.7	5.37/5.05
6	27.7	1.82/1.78	24	71.3	4.12	42	16.2	1.02
7	72.0	3.39	25	143.9		43	23.2	1.73
8	71.6		26	85.3	3.94	44	27.8	1.41
9	122.3	5.34	27	66.3	4.05	1'	67.5	4.68/4.58
10	138.7		28	35.5	1.33/0.97	2'	142.4	
11	33.3	1.88/1.86	29	31.5	1.94	3'	31.3	2.86
12	71.2	3.57	30	75.2	3.30	4'	128.0	5.56
13	42.3	2.28	31	28.0	1.80	5'	129.2	5.60
14	135.7	5.54	32	27.0	2.02/1.87	6'	31.3	2.85
15	131.3	5.51	33	31.0	1.54/1.40	7'	147.9	
16	79.5	4.48	34	96.3		8'	64.8	4.06
17	31.0	2.16/1.60	35	36.2	1.65/1.45	9'	113.7	5.10/5.02
18	37.3	2.05/1.87	36	19.0	1.88/1.55	10'	110.7	5.05/4.89

Tabla II.3.- Datos de RMN¹H y RMN¹³C para el diol éster C₁₀ del AO en CDCl₃.

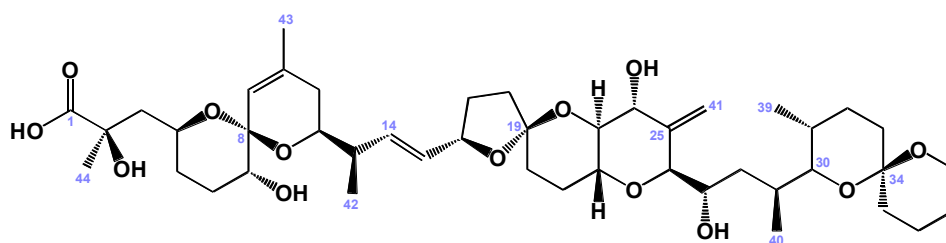
II.7.- ESTUDIO DE ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DEL COMPUESTO DTX-5c

De acuerdo con la marcha cromatográfica descrita anteriormente, la purificación final de DTX-5c se llevó a cabo en una columna de fase reversa HPLC-X Terra usando la mezcla de MeOH-H₂O (7:3) como eluyente. El compuesto fue aislado como un sólido amorfo de color amarillo, presentando en el espectro de IR una banda intensa a 1650 cm⁻¹ característica de un grupo amida, y otra debida a grupos sulfato a 1235 cm⁻¹. La presencia de grupos sulfato y amida se confirmó por el espectro de masas FAB que mostró un ión molecular a *m/z* 1498.5851, correspondiente a la fórmula molecular [C₆₈H₁₀₃NO₂₇S₂Na₃]⁺. Por otro lado, un análisis MS-MS en modo negativo correspondiente a este ión molecular dio el siguiente fraccionamiento: 1430 → 1350 → 1270 → 1110 → 803, lo que parecía indicar que el nuevo compuesto era un derivado del éster C₁₀ de acuerdo con la presencia de los fragmentos del AO (827) y del diol éster C₁₀ del AO (977) en la secuencia anteriormente citada. Además, el análisis del espectro de MS-MS, pone de manifiesto dos pérdidas secuenciales de 119 Da correspondientes a OSO₃Na, que nos confirma la presencia de dos grupos sulfato en la molécula.

Esta hipótesis es consistente con los datos observados en la RMN, ya que si se comparan los datos de RMN de protón del diol éster C₁₀ del AO con los correspondientes a la DTX-5c se puede observar que todas las señales del primero están contenidas en el espectro de la nueva molécula (**Figuras II.15 y II.16**). La principal diferencia se corresponde con la señal del hidroximetileno terminal H₂-8', que se encuentra desplazada a campos más bajos en el nuevo compuesto (δ_H 3.93 vs δ_H 4.52), lo que es indicativo de que este metileno está unido a un nuevo grupo éster. La comparación de ambos espectros nos permitió identificar las nuevas señales correspondientes a la cadena del nuevo éster.

II.- Estudio del dinoflagelado Prorocentrum belizeanum

Dada la solubilidad de este nuevo compuesto, insoluble en CDCl_3 , fue necesario tomar los datos de RMN en CD_3OD , razón por la cual reasignamos los desplazamientos químicos de RMN de protón y carbono-13 del AO en CD_3OD , tal y como mostramos en la **Tabla II.4.**



Carbono	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Carbono	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
1	182.2		23	78.1	3.28
2	76.0		24	71.8	3.92
3	46.1	1.79/1.52	25	146.7	
4	68.2	3.92	26	86.2	3.80
5	33.1	1.72/1.16	27	65.8	3.94
6	28.2	1.82/1.51	28	36.3	1.28/0.82
7	73.2	3.22	29	32.0	1.78
8	97.1		30	76.7	3.13
9	123.5	5.13	31	28.5	1.69
10	138.8		32	27.5	1.88/1.25
11	33.1	1.90/1.69	33	30.6	1.22
12	71.4	3.71	34	96.5	
13	42.9	2.20	35	36.6	1.49/1.26
14	137.2	5.81	36	19.4	1.79/1.40
15	131.9	5.34	37	26.1	1.37
16	80.2	4.52	38	60.9	3.57/3.39
17	31.0	2.08/1.43	39	10.6	0.79
18	37.7	1.88/1.72	40	16.6	0.91
19	106.5		41	112.6	5.25/4.91
20	33.4	1.84/1.72	42	16.9	0.98
21	27.5	1.90/1.75	43	22.9	1.59
22	71.1	3.50	44	27.5	1.16

Tabla II.4.- Desplazamientos químicos de protón y carbono-13 del AO en CD_3OD .

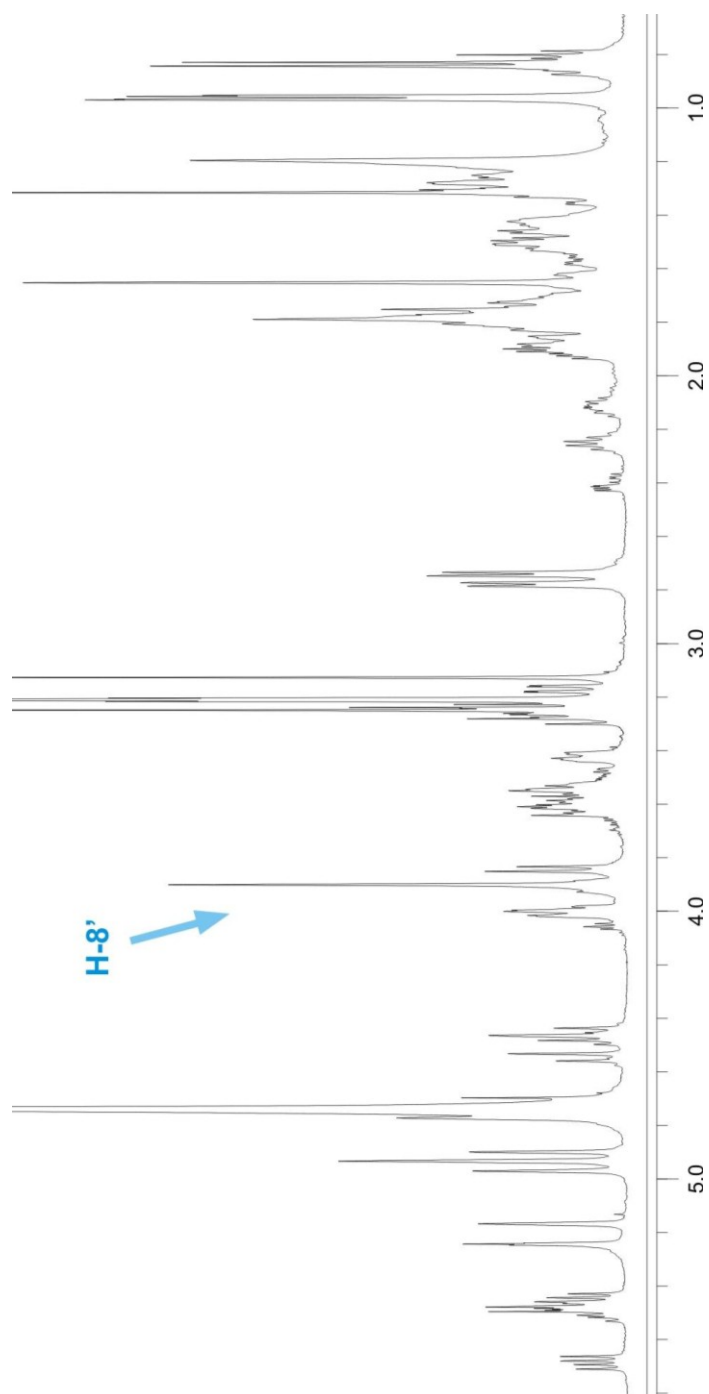


Figura II.15.- Espectro de RMN^1H del diol ester C_{10} del AO en CD_3OD .

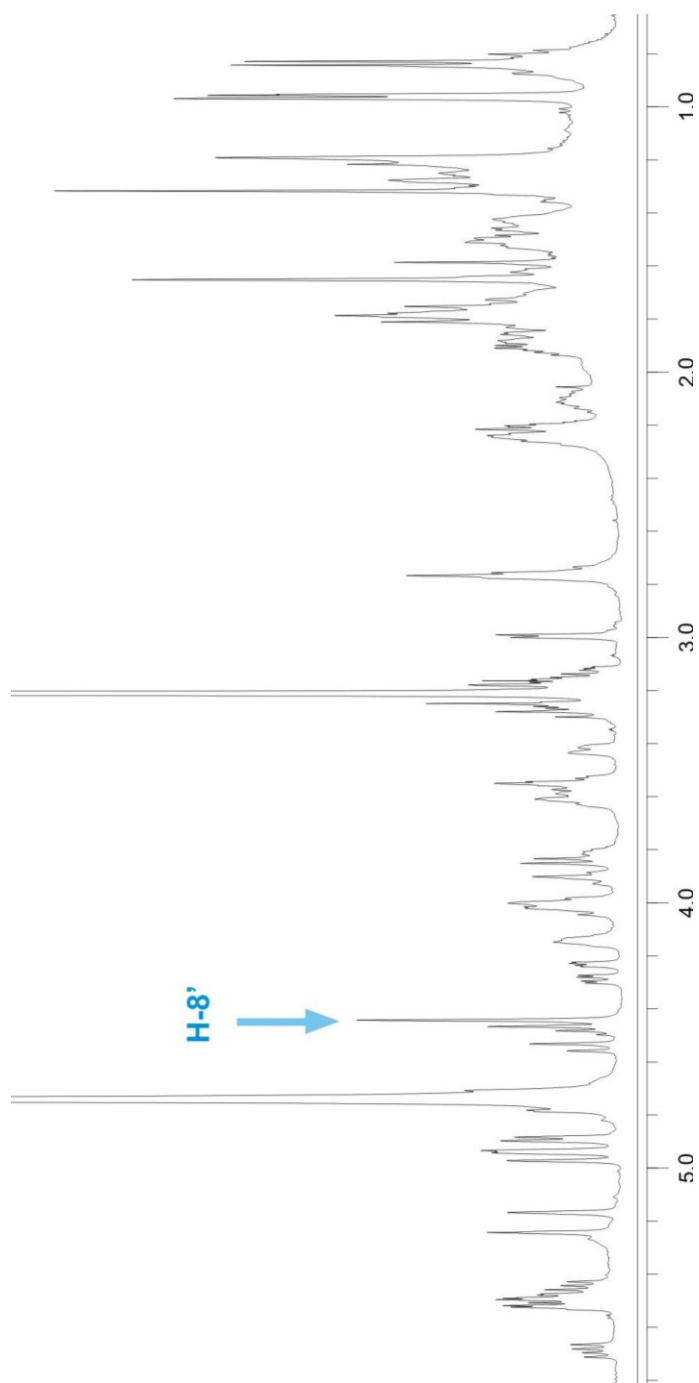


Figura II.16.- Espectro de RMN¹H de DTX-5c en CD₃OD.

En el experimento HSQC se observó que las señales nuevas correspondían a 6 metinos (dos vinílicos) y 6 metilenos (dos alílicos), mientras que a su vez, el HMBC nos señaló la presencia de dos nuevos carbonos cuaternarios. Además, las correlaciones establecidas en el experimento COSY nos indicaron claramente la presencia de dos fragmentos independientes, el que denominamos **A** (C-2''→C-6'') y el **B** (C-8''→C-14'').

El **fragmento A** se construyó a partir de las señales vinílicas H-3'' (δ_H 5.61) y H-4'' (δ_H 5.63), que están formando un doble enlace *E* ($J = 15.4$ Hz). Ello nos permite correlacionar H-3'' con los protones H₂-2'' (δ_H 3.08), mientras que H-4'' correlaciona con el metileno H₂-5'' (δ_H 2.33) que, a su vez, se correlaciona con el metileno H₂-6'' (δ_H 2.29) completando la secuencia de este fragmento. (**Figura II.17**).

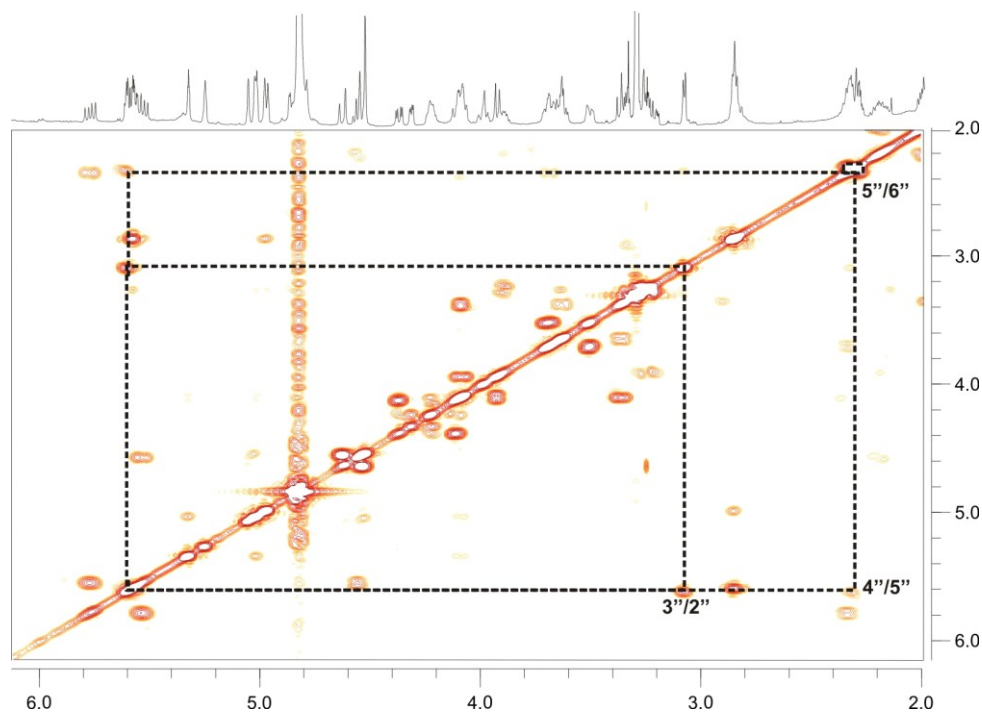
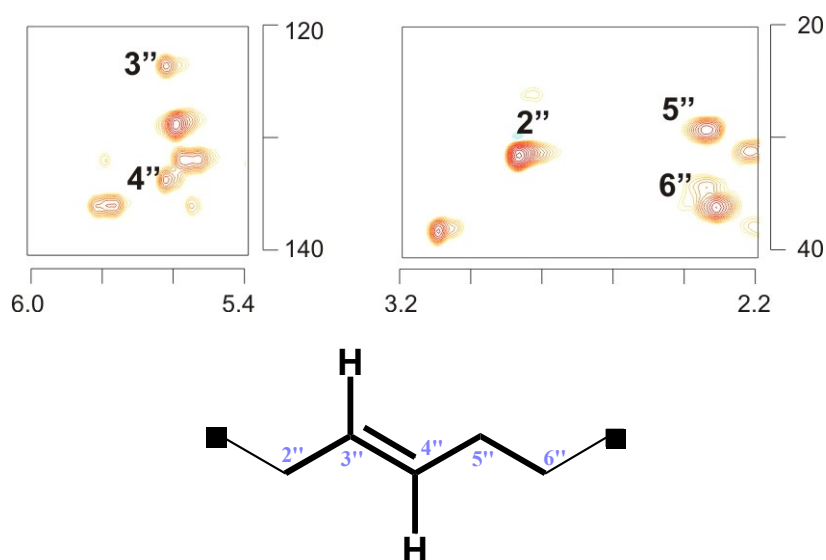


Figura II.17.- Sección del espectro COSY para el fragmento C-2''→C-6''.

II.- Estudio del dinoflagelado *Prorocentrum belizeanum*

Los desplazamientos de carbono correspondientes a estas señales se establecieron utilizando el experimento HSQC (**Figura II.18**) que corrobora la existencia de dos metinos vinílicos C-3'' (δ_C 123.7) y C-4'' (δ_C 133.7), al igual que la de los tres metilenos, dos de ellos vecinales a grupos carbonilo C-2'' (δ_C 38.1) y C-6'' (δ_C 36.0) y el tercero alílico, C-5'' (δ_C 29.0).



H₂-2'' (δ_H 3.08, δ_C 38.1) ← **H-3''** (δ_H 5.61, δ_C 123.7) → **H-4''** (δ_H 5.63, δ_C 133.7) → **H₂-5''** (δ_H 2.33, δ_C 29.0); → **H₂-6''** (δ_H 2.29, δ_C 36.0)

Figura II.18.- Secciones del espectro HSQC y esqueleto del fragmento C-3''→C-6''. En negrita se muestran las conexiones del COSY.

La secuencia correspondiente al **fragmento B** se estableció comenzando por una primera correlación entre el metileno H₂-8'' (δ_H 3.26) y el protón H-9'' (δ_H 3.90) que a su vez aparece conectado con los dos protones del metileno H₂-10'' (δ_H 1.94 y 1.73). Estos protones metinólicos diastereotópicos muestran una segunda correlación con el metino H-11'' (δ_H 4.24) que a su vez se pudo correlacionar con el metino H-12''

(δ_H 4.33). Las correlaciones para establecer la secuencia de H-12'' \rightarrow H-14'' no eran observables claramente en el experimento COSY por lo que recurrimos a un experimento TOCSY-1D, de manera que la excitación selectiva del protón del metileno H₂-14'' centrado a δ_H 4.38 nos llevó a los metinos H-13'' (δ_H 4.22) y H-12'', lo que permitió cerrar esta secuencia. (Figura II.19 y II.20).

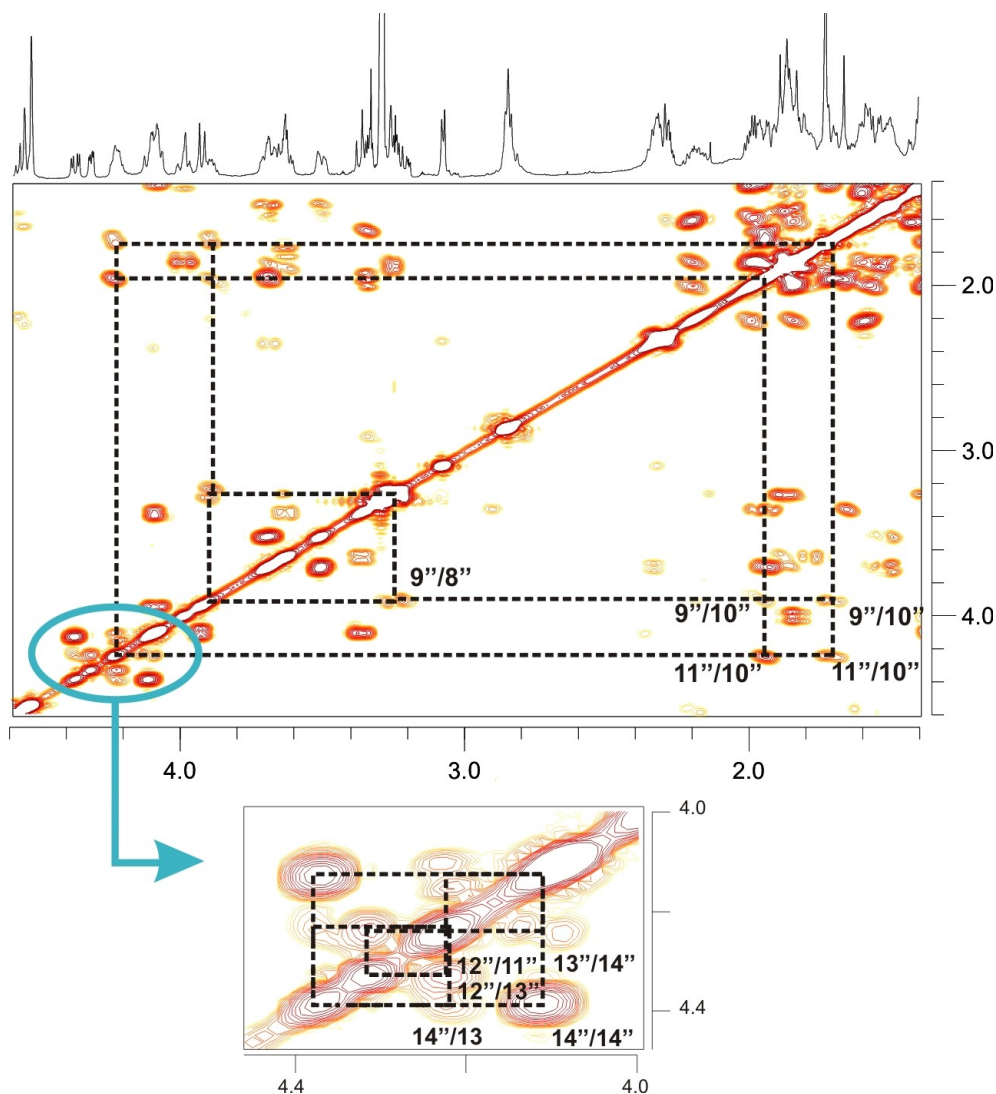


Figura II.19.- Sección del espectro COSY para el fragmento C-8'' \rightarrow C-14''.

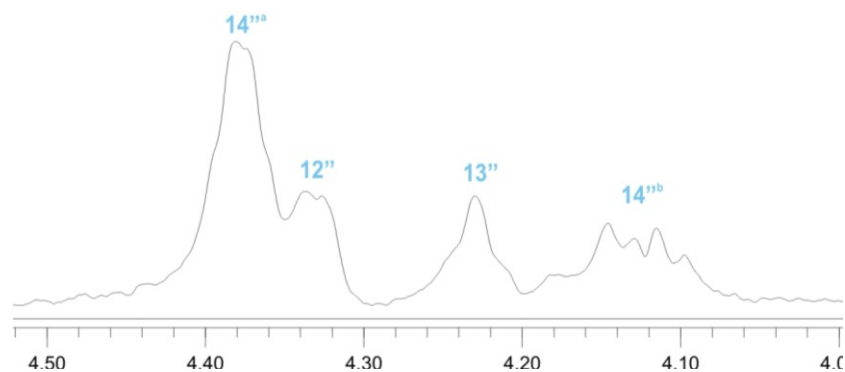
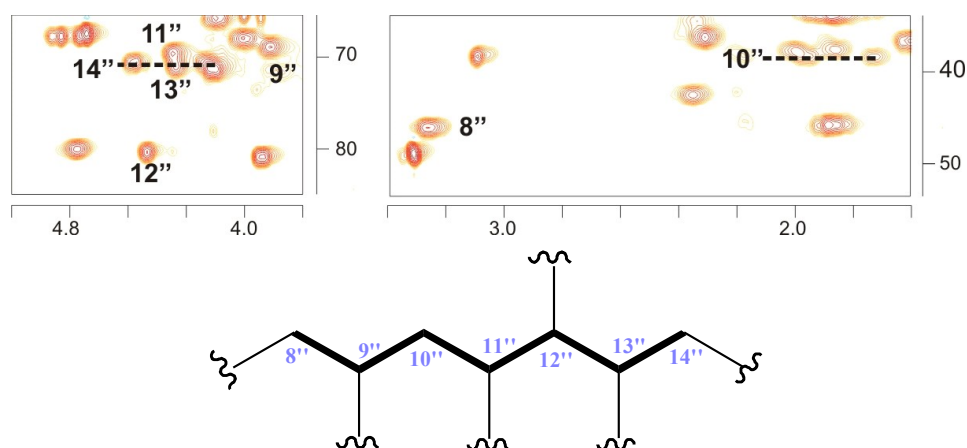


Figura II.20.- TOCSY-1D con excitación selectiva sobre H-14'' (δ_H 4.38).

Las señales de protón de este fragmento fueron correlacionadas con las correspondientes de carbono en el experimento HSQC, confirmando la presencia de 3 metilenos: C-8'' (δ_C 45.8), C-10'' (δ_C 38.1), C-14'' (δ_C 70.7) y de 4 metinos: C-9'' (δ_C 69.0), C-11'' (δ_C 69.7), C-12'' (δ_C 80.3) y C-13'' (δ_C 71.1). (**Figura II.21**).



H₂-8'' (δ_H 3.26, δ_C 45.8) → **H-9''** (δ_H 3.90, δ_C 69.0) → **H₂-10''** (δ_H 1.94 y 1.73, δ_C 38.1) → **H-11''** (δ_H 4.24, δ_C 69.7) **H-12''** (δ_H 4.33, δ_C 80.3) → **H-13''** (δ_H 4.22, δ_C 71.1) → **H₂-14''** (δ_H 4.38 y 4.12, δ_C 70.7).

Figura II.21.- Sección del espectro HSQC y esqueleto del fragmento C-8''→C-14''. En negrita se muestra la secuencia obtenida en el experimento COSY y TOCSY-1D.

El análisis de los desplazamientos químicos de las señales de estos fragmentos establece la naturaleza hidrocarbonada del **fragmento A** y la presencia de todos los nuevos heteroátomos en el **fragmento B**.

En efecto, el análisis de los desplazamientos químicos correspondientes al **fragmento B** nos indican lo siguiente: que el metileno C-8'' (δ_C 45.8 y δ_H 3.26) debe estar unido al nitrógeno de un grupo amida, cuya presencia fue sugerida por la absorción observada en IR. Así como que el metino C-12'' (δ_H 4.33, δ_C 80.3) y el metileno C-14'' (δ_H 4.38 y 4.12, δ_C 70.1), cuyos desplazamientos químicos aparecen a campos más bajos que los correspondientes a metinos y metilenos con grupos hidroxilo, son aquellos sobre los que se sitúan los grupos sulfato. En consecuencia, sobre los metinos C-9'' (δ_H 3.90, δ_C 69.0), C-11'' (δ_H 4.24, δ_C 69.7) y C-13'' (δ_H 4.22, δ_C 71.1) deben situarse los grupos hidroxilo.

Una vez identificados los nuevos fragmentos de la molécula su estructura se confirmó a través de las señales de correlación presentes en el HMBC. Además, las señales de los carbonos cuaternarios correspondientes a los carbonilos C-1'' (δ_C 172.4) y C-7'' (δ_C 175.2), nos permitieron establecer las conexiones entre estos fragmentos y el esqueleto del C₁₀ diol-éster. En efecto, el carbonilo C-1'' (δ_C 172.4) está correlacionado con los metilenos H₂-8' (δ_H 4.52) y H₂-2'' (δ_H 3.08), conectando el C₁₀ diol-éster con el **fragmento A**, que a su vez se unió al **fragmento B** a través de las correlaciones observadas entre el carbonilo C-7'' (δ_C 175.2) y los metilenos H₂-8'' (δ_H 3.26) y H₂-6'' (δ_H 2.29). De este modo se pudo establecer la estructura plana del fragmento del nuevo compuesto como la dada en la **Figura II.22**, donde se encuentran ilustradas las conectividades.

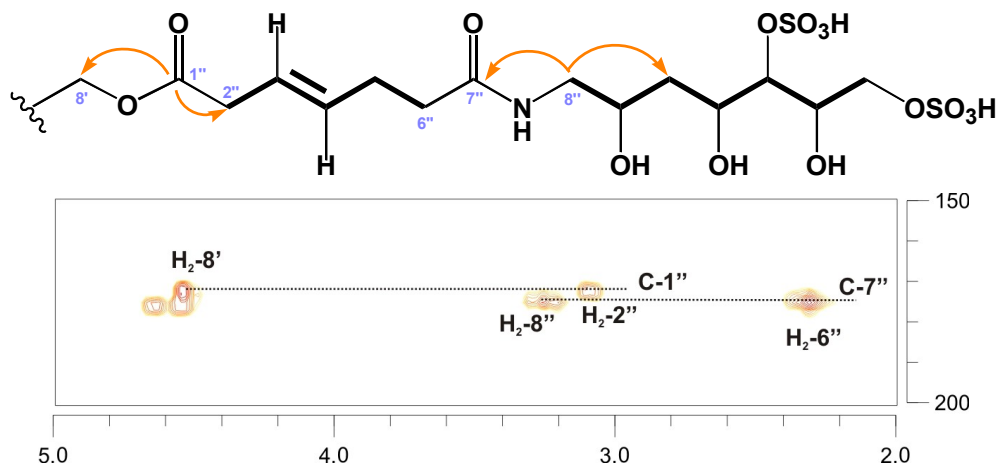


Figura II.22.- Sección del espectro HMBC y estructura del fragmento C-8'→C-14'' con las correlaciones. En negrita se muestran las secuencias obtenidas con el experimento COSY y TOCSY-1D.

La comparación de los datos obtenidos en el experimento ROESY del nuevo compuesto con aquellos observados para el diol-éster nos indica que, tanto la configuración relativa de los centros quirales comunes como la geometría de los dobles enlaces se mantiene inalterada. Por otro lado, el doble enlace nuevo, entre C-3'' y C-4'', debe encontrarse con una configuración *E* en concordancia con una constante de acoplamiento $J_{3'',4''} = 15.4$ Hz.

En lo referente a las configuraciones relativas de los nuevos centros quirales presentes en el fragmento **B**, C-9'', C-11'', C-12'' y C-13'', el solapamiento de las señales correspondientes al experimento RMN¹H nos impidió medir las constantes de acoplamiento $^3J_{H-H}$. Por lo que se realizó el experimento COSY-DQF y HSQC-TOCSY para medir $^3J_{H-H}$ y $^3J_{C-H}$, respectivamente, pero debido a la poca cantidad de muestra y a su degradación no se pudieron medir estas constantes, y en consecuencia, proponer una configuración relativa. Sin embargo, el experimento ROESY nos muestra ROE del protón H-9'' con los protones H-11'' y H-12''. Si suponemos que este fragmento no presenta libre rotación debido a la diastereotopía observada en los

metilenos C-10'' y C-14'', los roes observados sólo serían explicables con una configuración relativa para los centros C-9'', C-11'', C-12'' y C-13'' como (9''R*, 11''S*, 12''R* y 13''S*). En la **Figura II.23** se muestran los ROEs comentados.

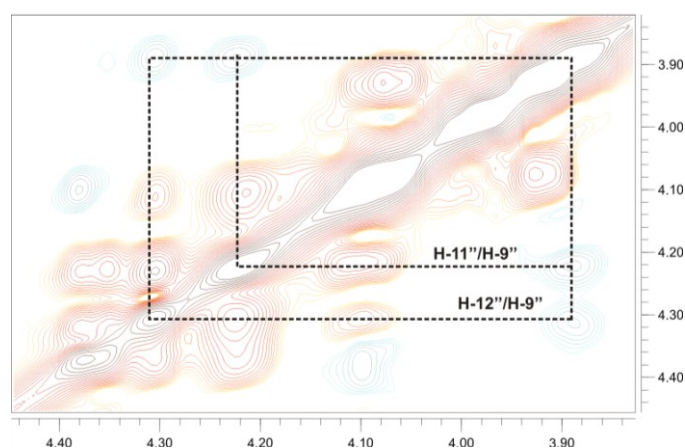


Figura II.23.- Espectro de ROESY del fragmento C-9'' → C-14''.

Como resultado del estudio estructural llevado a cabo se propone para este nuevo metabolito,⁸⁹ DTX-5c, la estructura mostrada en la **Figura II.24**, cuyos desplazamientos de protón y carbonos se muestran en la **Tabla II.5**. Se trata del cuarto ejemplo de éster sulfatado aislado de un dinoflagelado del género *Prorocentrum*. Hasta el momento las toxinas conocidas de este tipo, DTX4,⁹⁰ DTX5a y DTX5b,⁹¹ se habían aislado del *P. maculosum*, con fragmentos diol-éster C₈, C₈ y C₉ respectivamente. La principal diferencia entre todos estos compuestos radica en la cadena del éster, lo cual es indicativo de que este tipo de microalgas sintetizan fragmentos comunes en distintas especies. En nuestro caso, *P. belizeanum* produce fundamentalmente el diol-éster C₁₀. Este tipo de toxinas se encuentran clasificadas dentro de un grupo conocido como toxinas DSP solubles en agua.

⁸⁹ Cruz, P. ; Daranas, A. H.; Fernández, J. J.; Souto, M. L.; Norte, M. *Toxicon*, **2006**, *47*, 920-924.

⁹⁰ Hu, T.; Curtis, J. M.; Walter, J. A.; Wright, J. L. C. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1995**, 597-599.

⁹¹ Hu, T.; Curtis, J. M.; Walter, J. A.; McLachlan, J. L.; Wright, J. L. C. *Tetrahedron Lett.*, **1995**, *36*, 9273-9276.

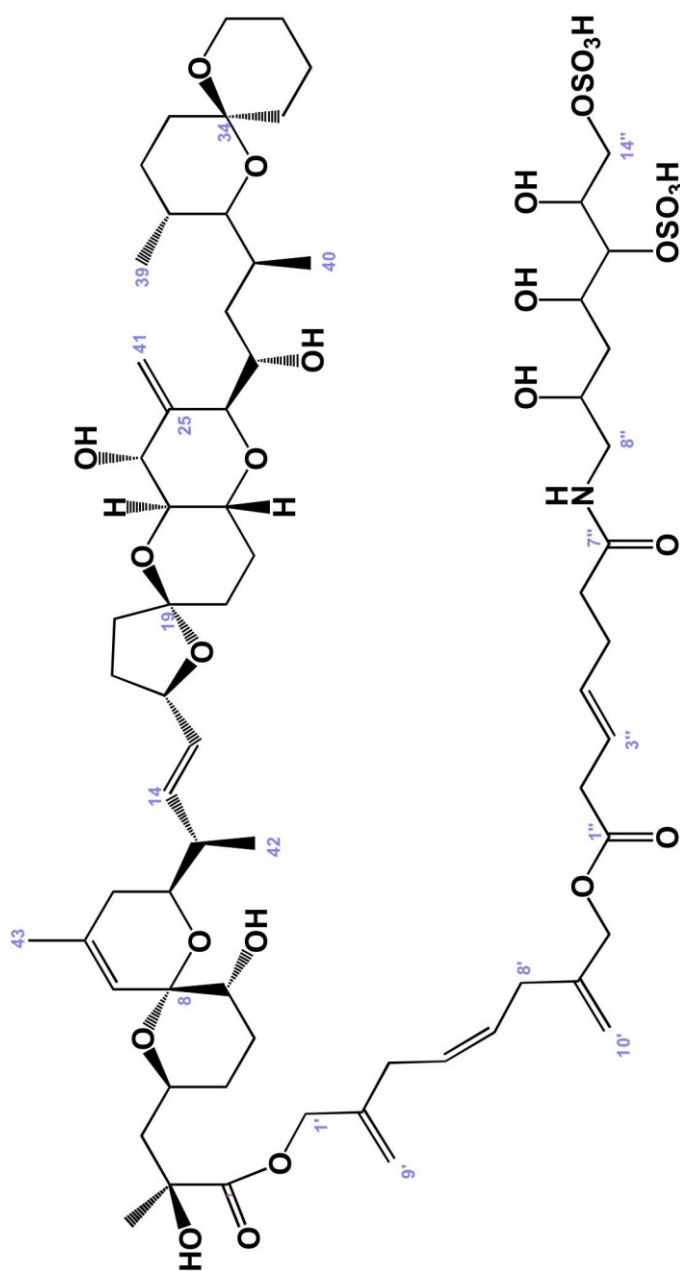


Figura II.24.- Estructura de DTX-5c.

Carbono	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Carbono	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Carbono	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
1	176.2		24	71.1	4.10	3'	31.8	2.86/2.86
2	74.9		25	146.2		4'	128.8	5.59
3	45.8	1.89/1.81	26	85.9	3.92	5'	128.8	5.59
4	67.6	4.00	27	65.5	4.08	6'	31.8	2.83/2.83
5	32.5	1.73/1.36	28	36.7	1.36/0.94	7'	148.1	
6	26.9	1.89/1.66	29	31.8	1.87	8'	66.9	4.52
7	72.5	3.34	30	76.1	3.26	9'	112.6	5.06/4.99
8	97.4		31	28.3	1.80	10'	109.8	5.01/4.87
9	123.2	5.26	32	26.9	2.00/1.80	1''	172.4	
10	138.7		33	30.4	1.36/1.36	2''	38.1	3.08/3.08
11	32.5	1.99/1.89	34	95.6		3''	123.2	5.61
12	71.8	3.69	35	36.7	1.59/1.43	4''	133.7	5.63
13	42.3	2.35	36	19.1	1.87/1.52	5''	29.0	2.33/2.33
14	135.8	5.78	37	26.2	1.50/1.38	6''	36.0	2.29/2.29
15	131.6	5.54	38	60.6	3.70/3.52	7''	175.2	
16	79.6	4.57	39	10.0	0.93	N-H		4.08
17	31.1	2.21/1.57	40	16.3	1.05	8''	45.8	3.26/3.26
18	37.4	1.99/1.85	41	111.9	5.33/5.01	9''	69.0	3.90
19	106.8		42	16.3	1.05	10''	38.1	1.94/1.73
20	33.2	1.92/1.87	43	22.6	1.73	11''	69.7	4.24
21	26.9	1.98/1.85	44	25.4	1.42	12''	80.3	4.33
22	70.4	3.64	1'	67.6	4.62/4.52	13''	71.1	4.22
23	77.5	3.36	2'	142.4		14''	70.7	4.38/4.12

Tabla II.5.- Datos de RMN¹H y RMN¹³C para DTX-5c en CD₃OD.

III.- ESTUDIO DEL ÁCIDO 19-*epi*-OKADAICO

III.1.- ESTUDIO DE ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DEL ÁCIDO 19-*epi*-OKADAICO

III.2.- ANÁLISIS CONFORMACIONAL DEL ÁCIDO 19-*epi*-OKADAICO

III.2.1.- Obtención de Restricciones Experimentales aplicando RMN

III.2.2.- Modelización del Ácido 19-*epi*-O utilizando
Restricciones Experimentales

III.3.- ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE PROTEÍNAS FOSFATASAS PP1 Y PP2

III.4.- ANÁLISIS TEÓRICO DE LA TERMODINÁMICA DE FORMACIÓN PARA EL COMPLEJO PP1-LIGANDO

III.4.1.- Determinación de la constante de disociación

III.4.2.- Cálculo de Parámetros Termodinámicos del Complejo PP1-AO

III.4.2.- Cálculo de Parámetros Termodinámicos del Complejo
PP1-19-*epi*-Okadaico

III.- ESTUDIO DEL ÁCIDO 19-*epi*-OKADAICO

III.1.- ESTUDIO DE ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DEL ÁCIDO 19-*epi*-OKADAICO

Este nuevo compuesto se aisló como un sólido blanquecino amorfo, y su fórmula molecular resultó ser igual a la del AO, C₄₄H₆₈O₁₃, de acuerdo con su espectro de masas, m/z 827.4 [C₄₄H₆₈O₁₃+Na]⁺.

El espectro de RMN de protón correspondiente a esta nueva molécula es muy similar al del AO (**Figuras III.1 y III.2**), aunque muestra algunas diferencias significativas que afectan especialmente a los desplazamientos químicos de protón del metileno C-18 y del metino C-23. Por otro lado, el experimento HSQC presenta el mismo número de señales que en el caso del AO; 16 metinos, 16 metilenos y 5 metilos, todos de la misma naturaleza que los del AO. Igual ocurre con los 7 carbonos cuaternarios observados en el HMBC. Sin embargo, algunas de estas señales aparecen también con distinto desplazamiento de carbono, siendo destacables los casos de C-16, C-18, C-19 y C-23. (**Tabla III.1**).

El estudio de la estructura de esta molécula se decidió abordar siguiendo las pautas usadas en el estudio de la molécula de AO,⁹² es decir, aprovechando la presencia de los carbonos cuaternarios para dividirla en cinco regiones, **A (C-3→C-7)**, **B (C-11→C-18)**, **C (C-20→C-24)**, **D (C-26→C-33)** y **E (C-35→C-38)**. Las regiones **A**, **D** y **E** resultaron ser idénticas a las del AO en tanto que los cambios más sustanciales se concentraron en la zona de los fragmentos **B** y **C**.

⁹² Norte, M; González, R.; Fernández, J. J.; Rico, M. *Tetrahedron*, **1991**, 35, 7437-7446.

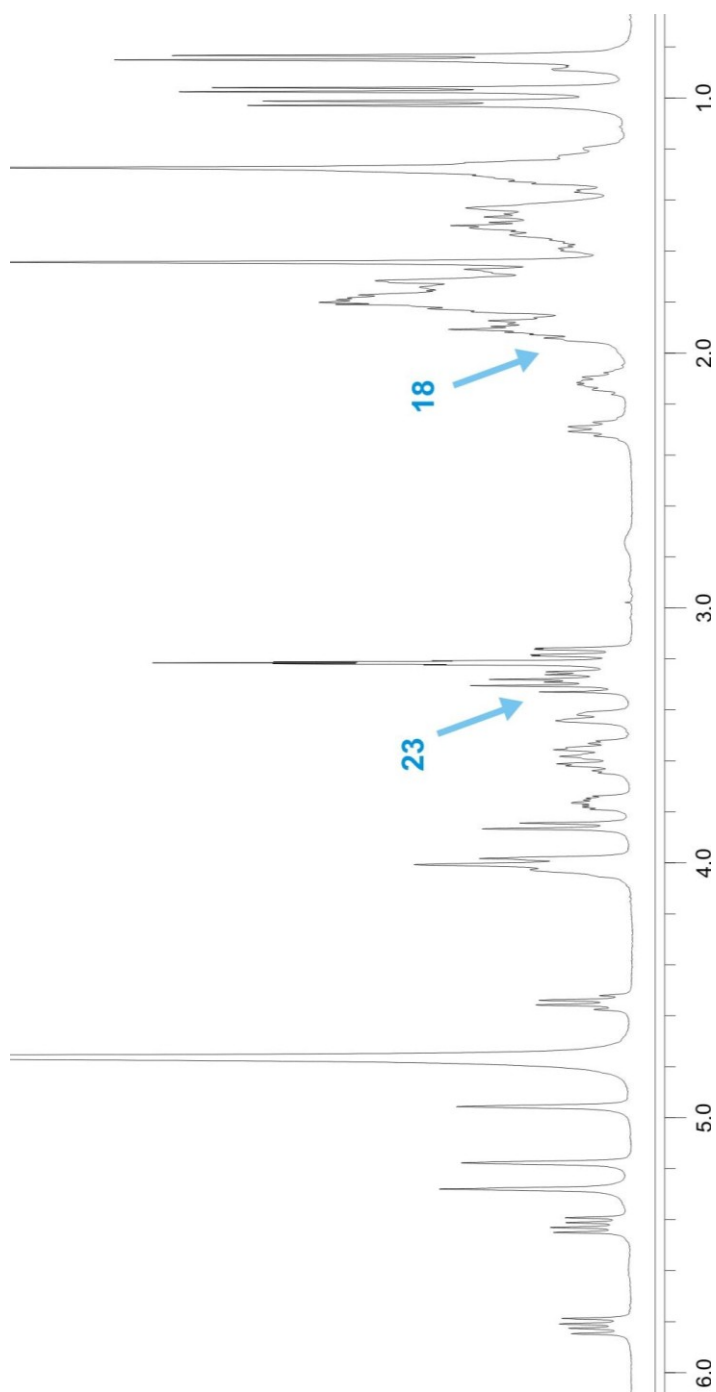


Figura III.1.- Espectro de RMN¹H del AO en CD₃OD.

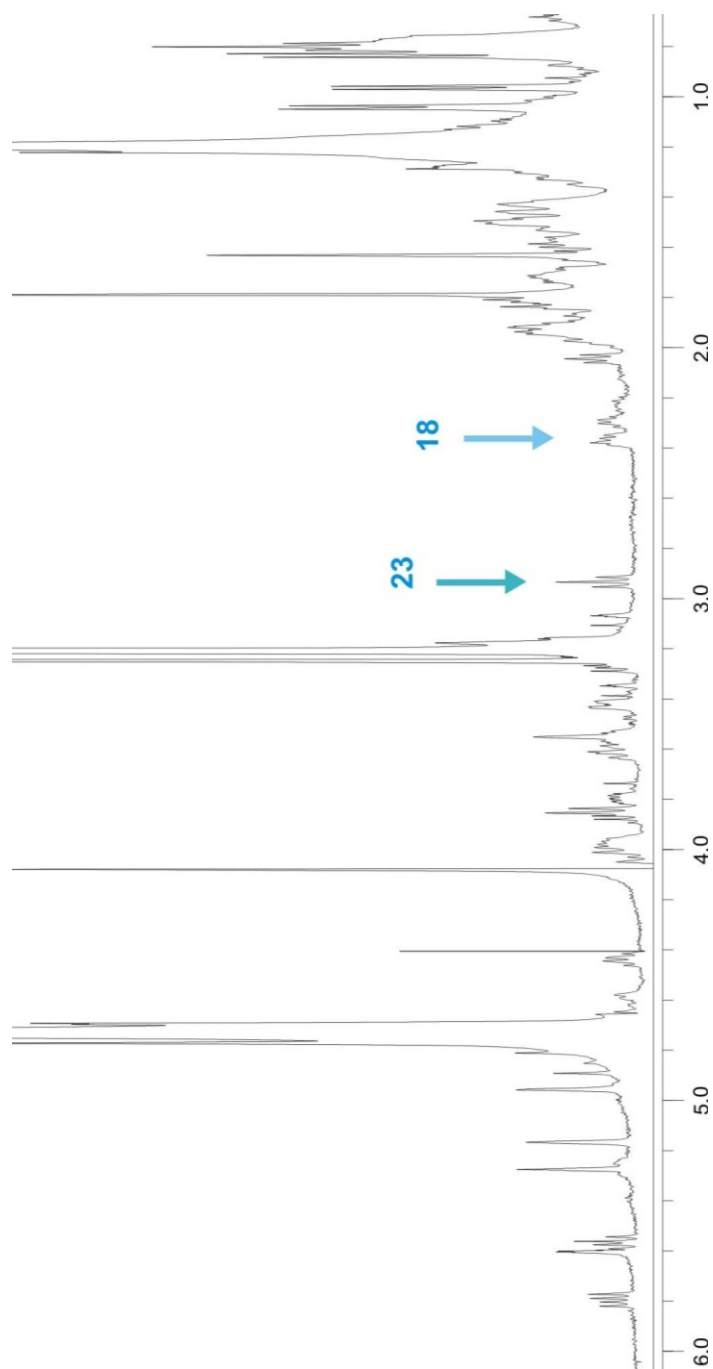
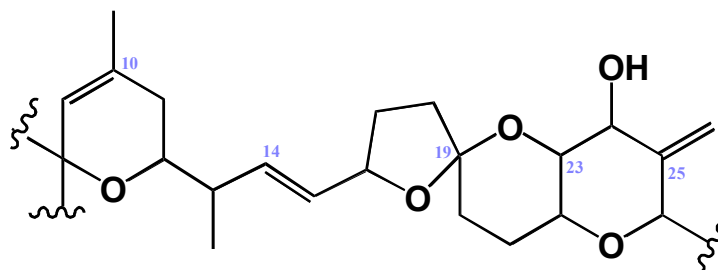


Figura III.2.- Espectro de RMN¹H del Ácido 19-*epi*-Okadaico en CD₃OD.



	AO		AEO	
Carbono	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
15	131.9	5.34	133.1	5.56
16	80.2	4.52	82.9	4.43
17	31.0	2.08/1.43	31.6	1.98/1.81
18	37.7	1.88/1.72	33.3	2.36/1.57
19	106.5		109.0	
20	33.4	1.84/1.72	34.4	1.82/1.74
21	27.5	1.90/1.75	28.7	1.92/1.45
22	71.1	3.50	70.9	3.60
23	78.1	3.28	81.8	2.93
24	71.8	3.92	71.3	4.05

Tabla III.1.- Desplazamientos de protón y carbono de las señales que en el AEO presentan cambios con respecto al AO.

El **fragmento B** se comenzó a estudiar en el experimento COSY (**Figura III.3**) a partir de una señal a campo bajo correspondiente al protón olefínico H-14 (δ_{H} 5.80) que forma un doble enlace E ($J = 15.8$ Hz) con la otra señal de protón olefínico, H-15 (δ_{H} 5.56). Partiendo de H-14 se observa una correlación con el metino alílico H-13 (δ_{H} 2.28) que a su vez está conectado con el metilo H₃-42 (δ_{H} 1.04) y el metino H-12 (δ_{H} 3.78). La secuencia de conexiones se cierra con la observada entre H-12 y el metileno H₂-11 (δ_{H} 1.93 y 1.66). Por otro lado, H-15 aparece acoplado con el metino

alílico unido a heteroátomo H-16 (δ_H 4.43), y para este último también se observa la correlación con el metileno H₂-17 (δ_H 1.98 y 1.81).

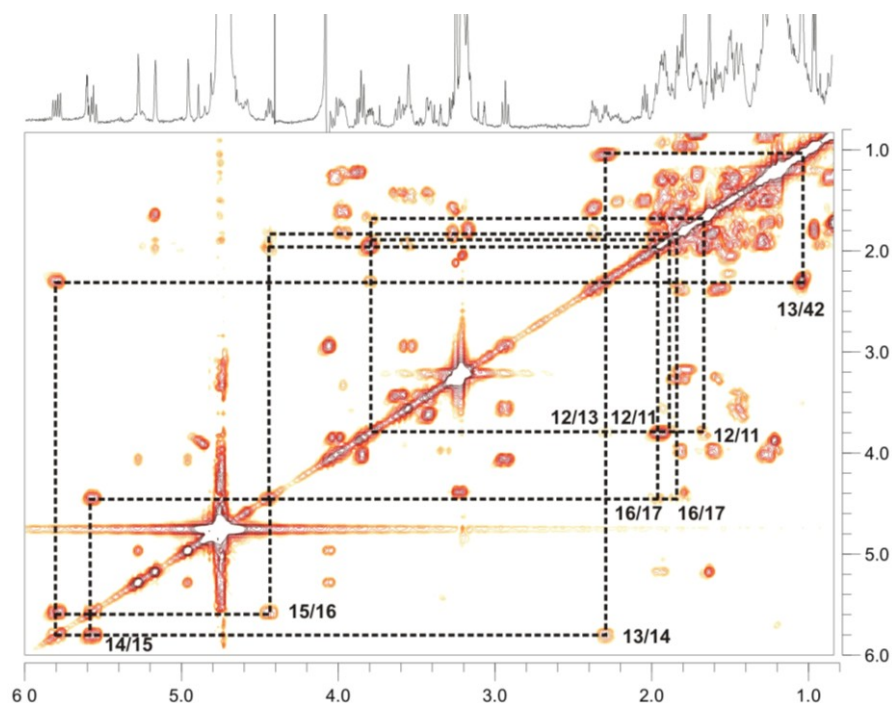


Figura III.3.- Espectro COSY para el fragmento B (C-11→C-18).

En tanto que el experimento COSY no nos permitió establecer la conectividad de este último metileno (H₂-17) con H₂-18 (δ_H 2.36 y 1.57) se decidió realizar un TOCSY-1D. Este experimento se realizó mediante excitación selectiva del protón H-14, permitiéndonos conectar la secuencia completa, como se observa en la **Figura III.4.**

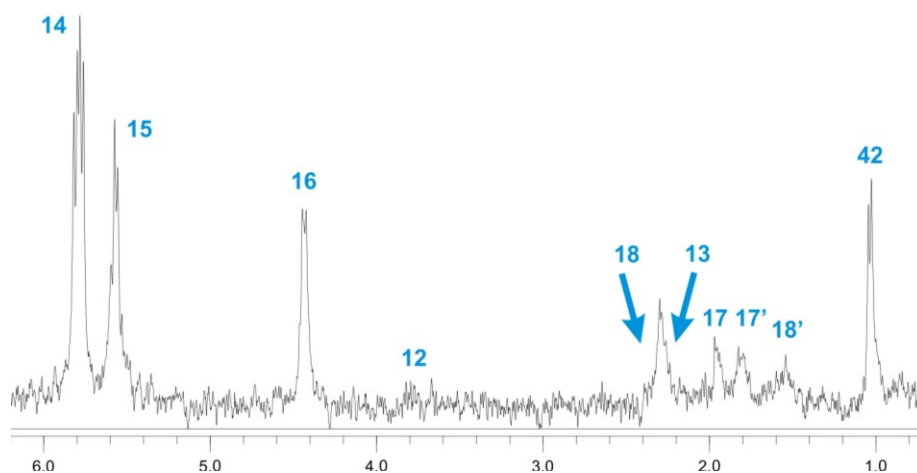


Figura III.4.- TOCSY-1D con excitación selectiva en H-14 (δ_H 5.80).

Los desplazamientos químicos de los carbonos correspondientes a este fragmento se establecieron en base a las señales observadas en el experimento HSQC, que nos confirman la presencia de dos metinos vinílicos C-14 (δ_C 136.7), C-15 (δ_C 133.1), dos metinos en α a un oxígeno C-12 (δ_C 71.6), C-16 (δ_C 82.9), así como un metino alílico C-13 (δ_C 42.1), tres metilenos diastereotópicos C-11 (δ_C 33.7), C-17 (δ_C 31.6) y C-18 (δ_C 33.3) y un metilo C-42 (δ_C 16.8). (**Figuras III.5 y III.6**).

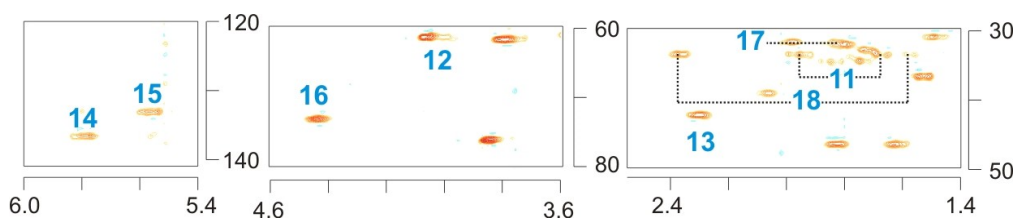
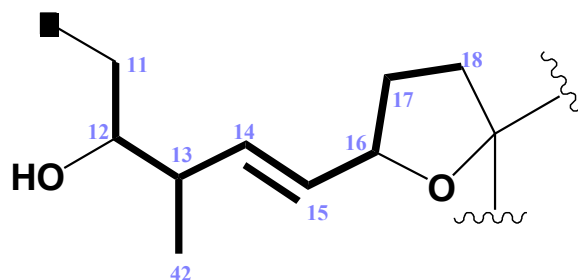


Figura III.5.-Zonas seleccionadas del espectro HSQC correspondientes a las señales del **fragmento B** (C-11→C-18).



H₂-11 (δ_{H} 1.93 y 1.66, δ_{C} 33.7) \leftarrow **H-12** (δ_{H} 3.78, δ_{C} 71.6), **H₃-42** (δ_{H} 1.04, δ_{C} 16.8) \leftarrow **H-13** (δ_{H} 2.28, δ_{C} 42.1) \leftarrow **H-14** (δ_{H} 5.80, δ_{C} 136.7) \rightarrow **H-15** (δ_{H} 5.56, δ_{C} 133.1) \rightarrow **H-16** (δ_{H} 4.43, δ_{C} 82.9) \rightarrow , **H₂-17** (δ_{H} 1.98 y 1.81, δ_{C} 31.6) \rightarrow **H₂-18** (δ_{H} 2.36 y 1.57, δ_{C} 33.3).

Figura III.6.- Fragmento B con sus correspondientes desplazamientos de ^1H y ^{13}C . Las correlaciones COSY y TOCSY se indican en negrita.

Las señales pertenecientes al **fragmento C** se pudieron conectar nuevamente usando el experimento COSY, que nos permite comenzar a partir del acoplamiento entre los metinos H-24 (δ_{H} 4.05) y H-23 (δ_{H} 2.93). Esta última señal nos lleva al metino H-22 (δ_{H} 3.60), que también se encuentra conectado con el metileno H-21 (δ_{H} 1.92 y 1.45) (**Figura III.7**). La secuencia se completó con el TOCSY-1D, excitando en este caso de forma selectiva el protón H-23, que nos permite llegar hasta el metileno H-20 (δ_{H} 1.82 y 1.74). (**Figura III.8**).

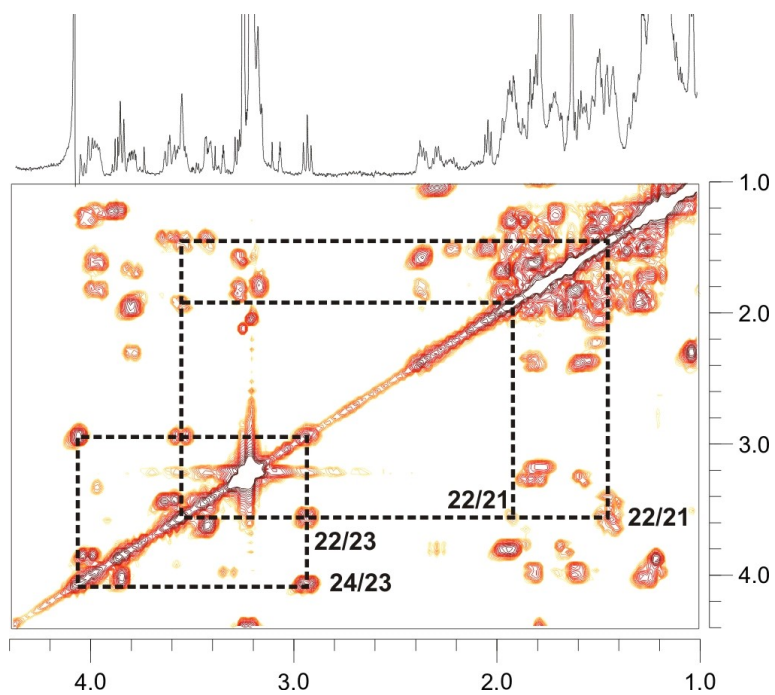


Figura III.7.- Espectro COSY del fragmento C (C-20→C-24).

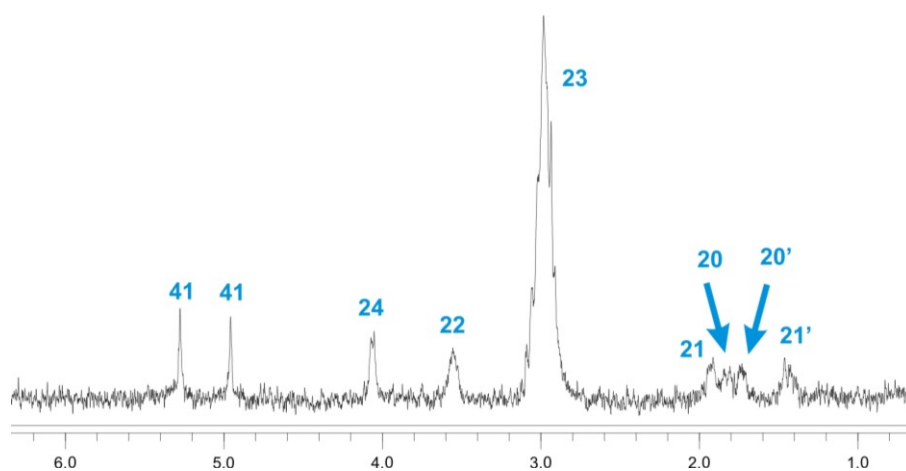


Figura III.8.- TOCSY-1D con excitación selectiva sobre H-23 (δ_H 2.93).

Una vez correlacionados todos los protones de este fragmento se pasó al estudio del experimento HSQC, a partir del cual se pueden obtener los desplazamientos químicos de los carbonos correspondientes a esta secuencia, tres metinos en α a un oxígeno C-22 (δ_C 70.9), C-23 (δ_C 81.8) y C-24 (δ_C 71.3), así como los dos metilenos con hidrógenos diastereotópicos C-20 (δ_C 34.4) y C-21 (δ_C 28.7). La secuencia de este fragmento se resume a continuación en las **Figuras III.9 y III.10**.

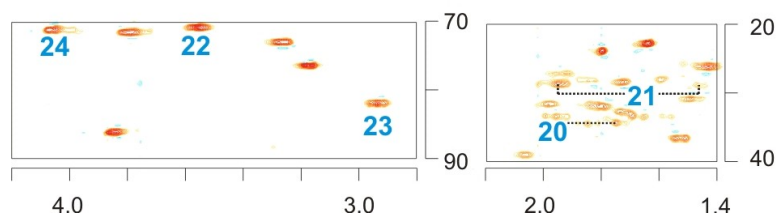
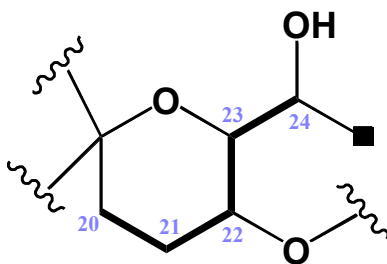


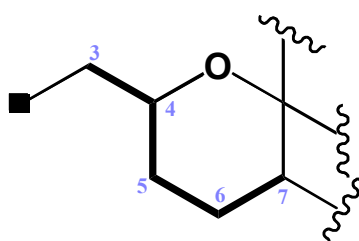
Figura III.9.- Sección del espectro HSQC correspondiente a las señales del fragmento C (C-20 \rightarrow C-24).



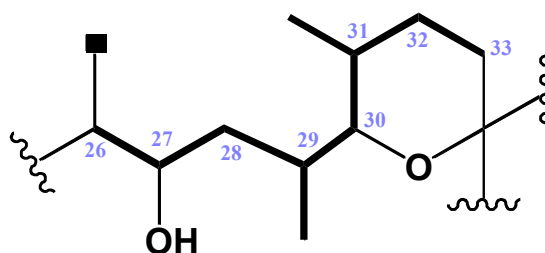
H-20 (δ_H 1.82 y 1.74, δ_C 34.4) \rightarrow **H-21** (δ_H 1.92 y 1.45, δ_C 28.7) \rightarrow **H-22** (δ_H 3.60, δ_C 70.9) \rightarrow **H-23** (δ_H 2.93, δ_C 81.8) \rightarrow **H-24** (δ_H 4.05, δ_C 71.3).

Figura III.10.- Fragmento C con sus correspondientes desplazamientos de ^1H y ^{13}C . Las correlaciones COSY y TOCSY se muestran en negrita.

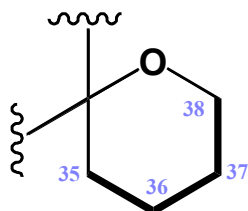
Aplicando la misma estrategia se establecieron los desplazamientos químicos de protón y carbono-13 de los fragmentos **A**, **D** y **E**.



Fragmento A: **H**₂-**3** (δ_{H} 1.81 y 1.60, δ_{C} 46.3) → **H**-**4** (δ_{H} 3.96, δ_{C} 68.5) → **H**₂-**5** (δ_{H} 1.73 y 1.25, δ_{C} 32.6) → **H**₂-**6** (δ_{H} 1.82 y 1.59, δ_{C} 28.0) → **H**-**7** (δ_{H} 3.26, δ_{C} 73.0).



Fragmento D: **H**-**26** (δ_{H} 3.84, δ_{C} 86.0) → **H**-**27** (δ_{H} 4.00, δ_{C} 65.7) → **H**₂-**28** (δ_{H} 1.33 y 0.86, δ_{C} 36.5) → **H**-**29** (δ_{H} 1.79, δ_{C} 31.9) → **H**-**40** (δ_{H} 0.95, δ_{C} 16.4); **H**-**30** (δ_{H} 13.17, δ_{C} 76.6) → **H**-**31** (δ_{H} 1.72, δ_{C} 28.4) → **H**₂-**39** (δ_{H} 0.83, δ_{C} 10.8); **H**₂-**32** (δ_{H} 1.95 y 1.30, δ_{C} 27.2) → **H**₂-**33** (δ_{H} 11.27, δ_{C} 30.5).



Fragmento E: **H**₂-**35** (δ_{H} 1.52, y 1.28, δ_{C} 36.5) → **H**₂-**36** (δ_{H} 1.81 y 1.44, δ_{C} 19.4) **H**₂-**37** (δ_{H} 1.42, δ_{C} 26.3) → **H**₂-**38** (δ_{H} 3.61 y 3.42, δ_{C} 61.1)

Figura III.11.- Fragmentos **A**, **D** y **E** con sus correspondientes desplazamientos de protón y carbono-13. Las correlaciones COSY se indican en negrita.

Una vez asignadas las distintas secuencias de acoplamiento protón-protón de la molécula se procedió a la unión de los distintos fragmentos a través del experimento HMBC. De este modo, podemos unir los fragmentos **B** y **C** a través de las correlaciones observadas entre C-19 (δ_C 109.0) con uno de los protones H₂-17 (δ_H 1.98) y uno de los protones H₂-21 (δ_H 1.92), como se puede observar en la **Figura III.12**.

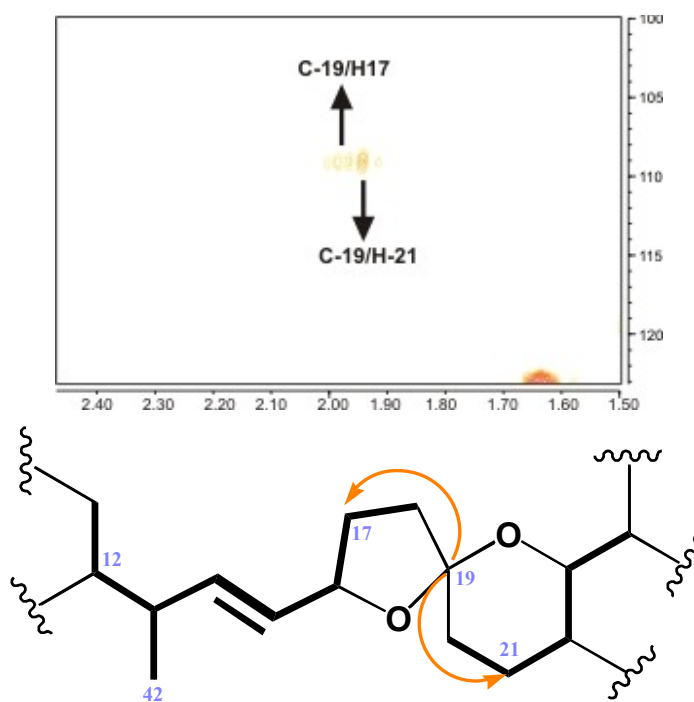


Figura III.12.- Espectro HMBC y estructura del fragmento **B** y **C** con las correlaciones que los une. En negrita se muestran las conexiones observadas en el COSY y en el TOCSY.

De la misma forma, las correlaciones observadas entre C-11 (δ_C 33.7) y C-9 (δ_C 123.3) con H₃-43 (δ_H 1.64) y con uno de los protones H₂-11 (δ_H 1.66), respectivamente, así como la de C-8 (δ_C 97.4) con H-9 (δ_H 5.17) nos permite conectar

los fragmentos **A** y **B**. Mientras que los fragmentos **C** y **D** quedan unidos a través de las conectividades de H-26 (δ_H 3.84) con C-24 (δ_C 71.3), de H-41 (δ_H 5.27) con C-24 (δ_C 71.3), C-25 (δ_C 146.4) y C-26 (δ_C 86.0), así como de H-41' (δ_H 4.96) con C-24 y C-26. Por último, los fragmentos **D** y **E** quedaron unidos a través de las correlaciones que mostró H-33 (δ_H 1.27) con C-34 (δ_C 97.8) y C-35 (δ_C 36.5). La estructura plana de este compuesto queda definitivamente fijada a través de las correlaciones que presenta el carbonilo C-1 (δ_C 182.7) con H₃-44 (δ_H 1.21) y H-3 (δ_H 1.60) así como la de C-2 (δ_C 75.4) con H-3 (δ_H 1.60). Todo ello configura una estructura plana para el compuesto idéntica a la del AO. (**Figura III.13**).

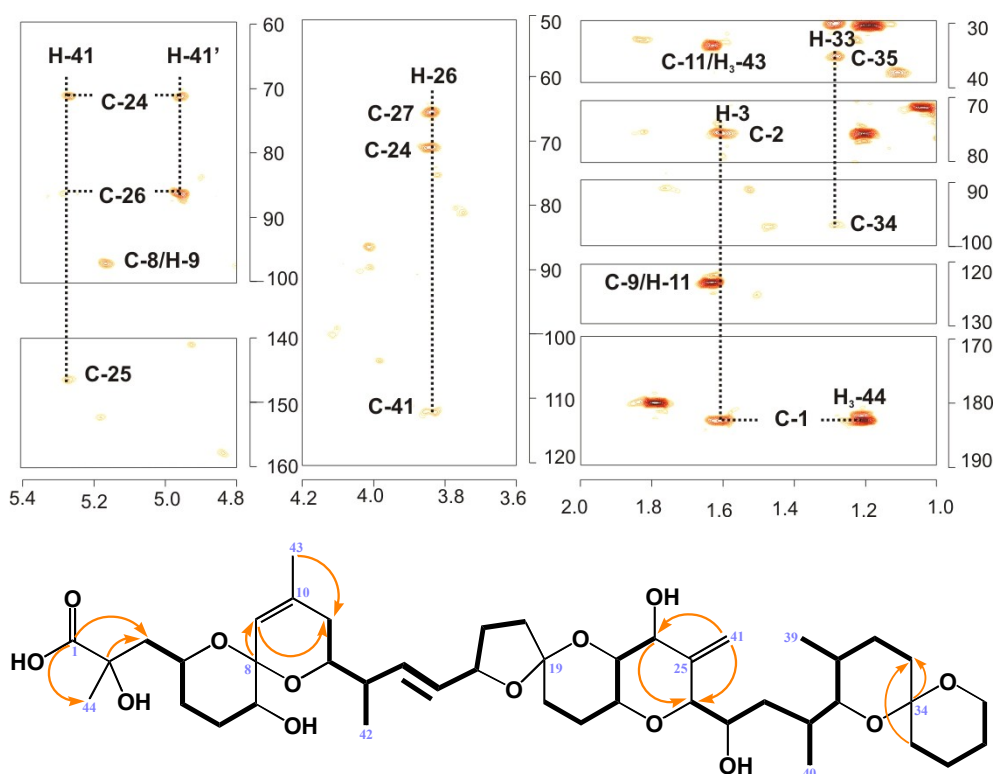


Figura III.13.- Zonas seleccionadas del espectro HMBC, indicando las correlaciones que unen a los fragmentos **A** con **B** y **C** con **D** y **E**. Las secuencias en negrita se unieron con el COSY y el TOCSY.

¿A qué puede, por tanto, deberse las diferencias de desplazamiento químico de protón y carbono observadas? La respuesta más inmediata es que puede deberse a algún aspecto configuracional y que debe localizarse en la zona donde se observan las diferencias, es decir, la de los fragmentos **B** y **C**. Obviamente, la técnica a aplicar para confirmar dicha aseveración es el experimento ROESY, y con este fin examinamos con detenimiento las correlaciones dipolares del espectro correspondientes a esta parte de la molécula (**Figura III.14**). En efecto, las características correlaciones ROE entre el metino H-22 con los metinos H-24 y H-27 así como las del metino H-26 con uno de los protones olefinicos de H₂-41, son observables en ambos compuestos, AO y AEO, por lo que la esteoquímica relativa del anillo de oxano **E** del sistema tricíclico se mantiene intacta en el nuevo compuesto. Sin embargo, en el experimento ROESY del nuevo compuesto se observa un ROE fuerte entre los protones H-23 (δ_H 2.93) y uno de los protones del metileno H₂-18 (δ_H 2.36), lo que no es posible en el AO (**Figura III.15**). Este hecho sólo es explicable aplicando un cambio en la configuración del carbono espiro-cetálico C-19 de *S** en el AO a *R** en el nuevo compuesto, tal y como se puede ver en la **Figura III.16**.

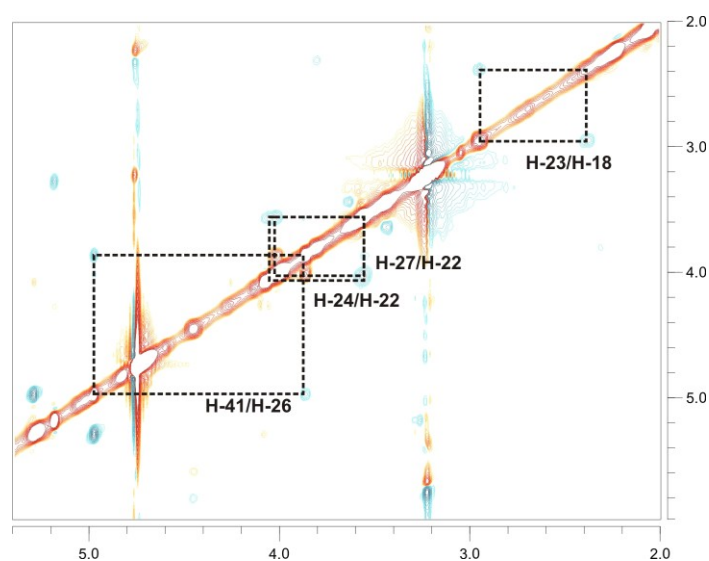
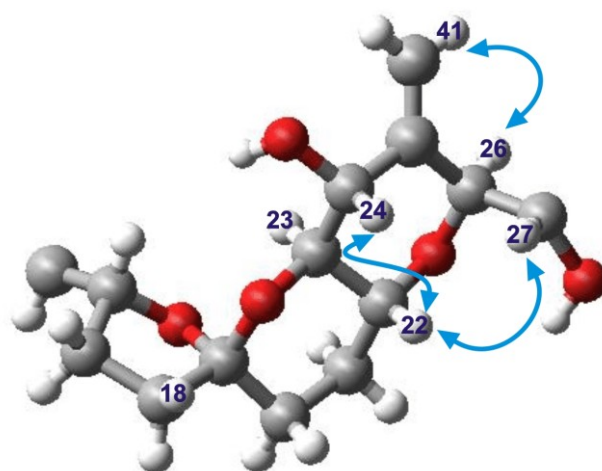
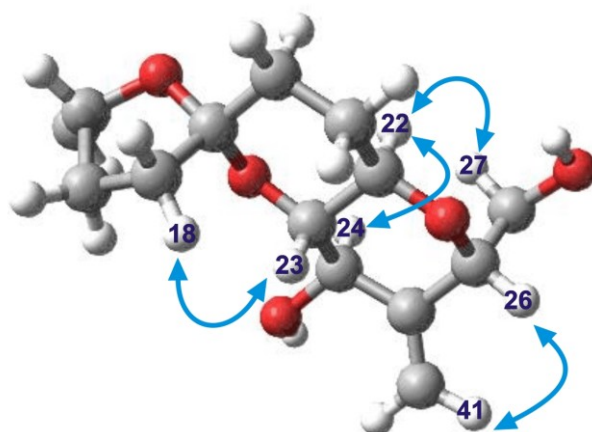


Figura III.14.- Espectro de ROESY de la zona del fragmento C-18→C-26 del AEO.



Representación tridimensional del AO.



Representación tridimensional del AEO.

Figura III.15.- ROEs observados en el sistema tricíclico del AO y del AEO.

III.- Estudio del Ácido 19-epi-Okadaico

De igual manera, si analizamos el resto de ROEs presentes en el nuevo compuesto podemos observar que coinciden con los del AO,⁷¹ estableciendo para el resto de la molécula la misma configuración relativa que en el AO,^{45,68,93} exceptuando el centro C-19 que ahora presenta una configuración 19*R**. Finalmente, partiendo de estos ROEs se pudieron asignar todos los protones diastereotópicos excepto los de los metilenos H₂-35 y H₂-36, como se indica en la **Tabla III.2**.

El aislamiento e identificación del AEO supone el primer ejemplo de toxina del grupo del AO que no posee la misma configuración relativa en el fragmento activo C-1→C-26, y en consecuencia debería afectarse la conformación de la molécula, y esto a su vez podría ser de gran importancia en la actividad biológica de la misma.

⁹³ La configuración relativa del AO es: (2*R**, 4*S**, 7*R**, 8*R**, 12*, 13*R**, 16*R**, 19*S**, 22*R**, 23*R**, 24*R**, 26*S**, 27*S**, 29*S**, 30*S**, 31*R**, 34*S**).

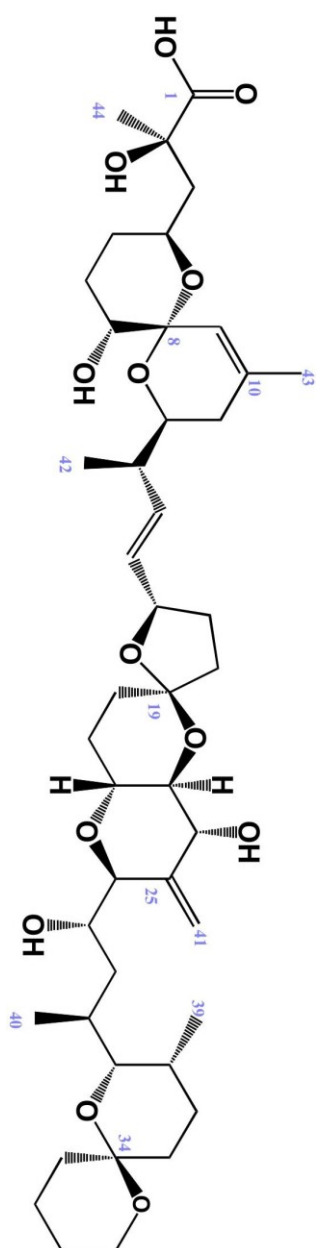


Figura III.16.- Estructura del AEO.

Carbono	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Carbono	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Carbono	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
1	182.7		16	82.9	4.43	31	28.4	1.72
2	75.4		17	31.6	1.98(proR*)	32	27.2	1.95 (proR*)
3	46.3	1.81(proS*)	18	33.3	2.36(pro R*)	33	30.5	1.30 (proS*)
4	68.5	1.60(proR*)	19	109.0	1.57(proS*)	34	97.8	1.27
5	32.6	3.96	20	34.4	1.82(proR*)	35	36.5	1.52
6	28.0	1.73 (proS*)	21	28.7	1.74(proS*)	36	19.4	1.28
7	73.0	1.82 (proR*)	22	70.9	1.92(prosS*)	37	26.3	1.81
8	97.4	1.59 (proS*)	23	81.8	1.45(proR*)	38	61.1	1.44
9	123.3	3.26	24	71.3	3.60	39	10.8	1.42
10	139.1	5.17	25	146.4	2.93	40	16.4	3.61(proR*)
11	3.7	1.93(proS*)	26	86.0	4.05	41	112.1	3.42(pros*)
12	71.6	1.66(proR*)	27	65.7	3.84	42	16.8	0.83
13	42.1	3.78	28	36.5	4.00	43	22.8	0.95
14	136.7	2.28	29	31.9	1.33 (proR*)	44	27.7	5.27
15	133.1	5.80	30	76.6	0.86 (proS*)			4.96
		5.56			1.79			1.04
					3.17			1.64
								1.21

Tabla III.2.- Datos de RMN¹H y RMN¹³C para el AEO en CD₃OD.

III.2.- ANÁLISIS CONFORMACIONAL DEL ÁCIDO 19-*epi*-OKADAICO

En las interacciones ligando-proteína la conformación que adopta el ligando en su forma libre en disolución juega un papel importante en su actividad. El AO, es un inhibidor selectivo de las proteínas PP1 y PP2A, y se caracteriza por mantener tanto en estado sólido^{45,68} como en disolución^{69,70} una conformación igual a la que presenta en el complejo AO-PP1.⁶⁵ Si a su vez tenemos en cuenta que el AEO es un isómero del AO en un punto importante de la molécula para su plegamiento, nos resultó interesante iniciar un estudio conformacional con este nuevo metabolito, ya que esto junto con el ensayo de actividad del compuesto frente a PP1 y PP2A nos podría ayudar a profundizar en los conocimientos sobre la relación estructura-actividad de este tipo de ligando. Con este objetivo se abordó un trabajo en el que se combinaron Métodos Computacionales y los análisis de Resonancia Magnética Nuclear que se describen a continuación.

III.2.1.- Obtención de Restricciones Experimentales aplicando RMN

La Resonancia Magnética Nuclear, a partir de distintos experimentos, nos aportó los datos que se utilizaron como restricciones en el estudio conformacional del AEO. Más concretamente, los experimentos que se llevaron a cabo con este fin son los que se indican a continuación:

◆ En el experimento RMN¹H se midieron la mayor parte de las constantes de acoplamiento, y a partir de éstas se determinaron los ángulos diedros utilizando ecuaciones de tipo Karplus.

◆ En el experimento COSY-DQF se midieron aquellas constantes de acoplamiento que debido a solapamientos entre señales no se pudieron medir en el

RMN¹H, que también se convirtieron en ángulos diedros a partir de ecuaciones tipo Karplus.

◆ El experimento ROESY se utilizó para medir las intensidades de ROE que posteriormente se relacionaron con distancias interprotónicas.

III.2.1.a.- Determinación de distancias interprotónicas a partir del experimento ROESY

Para estimar las distancias H-H en el AEO se utilizó el experimento 2D-ROESY pese a que tiene una serie de inconvenientes frente al 2D-NOESY. El motivo es que para moléculas de ese tamaño el efecto NOE es muy pequeño (wfc aprox 1.1) independientemente de las distancias entre protones y por tanto la información estructural obtenida sería escasa, lo que no ocurre en el experimento ROESY. En los experimentos NOESY/ROESY se producen dos efectos contrapuestos durante el tiempo de mezcla (t_m). Por un lado la relajación cruzada que da lugar al efecto NOE/ROE y por otro la relajación “*spin-rod*” que tiende a restablecer los valores en el equilibrio, por lo que el NOE/ROE observado depende mucho del T1 y del tiempo de mezcla utilizado. Además, una interpretación cuantitativa del NOESY/ROESY debe considerar que la intensidad del NOE/ROE para un par de protones puede estar afectada por la presencia de otros protones cercanos (difusión de espín).

A la hora de cuantificar la intensidad de las señales en el experimento ROESY debe tenerse en cuenta la posible presencia de los siguientes efectos que pueden complicar el análisis:

◆ Dependencia de la distancia (en Hz) de cada señal analizada respecto a la posición del transmisor (*offset*), lo cual conlleva que en los bordes de la ventana espectral el bloqueo de espines sea más débil, por lo que el ROE no depende sólo de

las distancias internucleares sino también del *offset*. Este efecto fue estimado y corregido.^{94,95,96,97}

◆ Interferencias entre NOE y ROE, difíciles de corregir, pero que debido al tamaño de la molécula estudiada (efecto NOE de baja intensidad) no deben ser de gran importancia.

◆ Contribuciones TOCSY en el ROESY, que al ser de signo contrario cancelan parcialmente el ROE. Las contribuciones TOCSY se minimizaron con la elección de un campo de confinamiento adecuado de espines débil, con irradiación continua 1.4 KHz.

Para afrontar algunos de los problemas anteriores se realizaron experimentos ROESY con distintos tiempos de mezcla (200, 300 y 500 ms) con el fin de seleccionar un valor de “compromiso” lo suficientemente corto para que el efecto ROE se comportara de manera lineal pero en el que la intensidad de señal fuera suficiente para ser interpretable. Finalmente, la cuantificación de las intensidades de las señales de correlación se realizó fundamentalmente analizando el ROESY adquirido con un

94

$$ROE_{corr.}^{ij} = ROE_{exp.}^{ij} \frac{1}{\sin^2 \theta_i \sin^2 \theta_j}$$

$$\theta = \arctan(w/\Omega) \\ \Omega = w - w_0$$

θ es el ángulo entre el eje de precesión del núcleo y el campo de confinamiento (*spin-lock field*) de la magnetización xy; Ω es el denominado “*offset*”; w es frecuencia de precesión del núcleo; w_0 es la frecuencia del campo de confinamiento.

⁹⁵ Barbero, J. J. *Curso avanzado de Resonancia Magnética Nuclear*, **2005**, *11*, 175-192. (<http://www.uam.es/otros/germn/cursos.htm>).

⁹⁶ Keeler, J. *Understanding NMR Spectroscopy*, **2002 & 2004** chapter 8. (spectroscopyNow.com).

⁹⁷ Gemmecker, G. *Advanced NMR Spectroscopy*, **1999**. (spectroscopyNow.com).

tiempo de mezcla de 200 ms. A continuación, las integrales se convirtieron en distancias interprotónicas utilizando la aproximación de dos espines aislados⁹⁸ (ISPA). En la cual se considera que los dos protones objetos de estudio están aislados (no hay NOE/ROE indirectos) y se descarta el efecto de los movimientos internos. En esta aproximación se toma una intensidad NOE/ROE de referencia y se calcula la distancia que separa a la correspondiente pareja de protones.^{99,96,97} En nuestro caso, se tomó como calibración interna la distancia entre H-30 y H-32 (proR*) (2.57 Å), ya que al estar ambos hidrógenos dentro de un anillo oxano fusionado con otro anillo oxano se trata de una distancia estable, y se minimiza la contribución TOCSY que puede interferir en la cuantificación de las intensidades. De este modo se pudieron obtener las distancias correspondientes a un total de 36 picos de correlación que se utilizaron como restricciones de distancia (**Tabla III.3**).

Una vez determinadas las distancias que se usaron como restricciones se realizó una última corrección asociada a los grupos metilo, ya que la intensidad de la señal de este grupo se debe a tres protones. Por lo tanto, a las distancias medidas experimentalmente en este caso se le sumó 0.5 Å.¹⁰⁰

Finalmente, se añadió un margen de error extra a las distancias de restricción que se utilizaron, para así compensar posibles errores asociados a la medida de la intensidad de los picos cruzados y en su conversión a distancia. Para ello, como límite inferior se estableció un valor de 1.8 Å, mientras que como límite superior se tomó la distancia calculada más un 10% de la misma. (**Tabla III.3**).

98

$$r_{ij} = r_{ref} \sqrt[6]{\frac{I_{ref}}{I_{ij}}}$$

r_{ij} distancia entre los núcleos i - j .
 r_{ref} distancia que se toma como referencia.
 I_{ij} Intensidad del ROE entre los núcleos i - j .
 I_{ref} Intensidad del ROE entre los núcleos de referencia.

⁹⁹ Pastor, M. M *Curso introductorio a la espectroscopia de RMN*, Parte II, Aspectos Experimentales, **2005**. (http://desoft03.usc.es/mmartin/rmnweb/cursosrmn/CURSORMN_Manuel_parte2.pdf)

¹⁰⁰ Neuhaus, D.; Williamson, M. P. En: *The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis*. Ed. Wiley-VCH, **2000**, 499-506.

H-H	I ROE-expt.	D expt.	D expt.+10%
3 ^{proS*} -4	2,30	2,4	2,6
4-14	0,29	3,4	3,7
5 ^{proS*} -4	1,44	2,6	2,8
5 ^{proS*} -5 ^{proR*}	14,30	1,7	1,9
6 ^{proS*} -7	1,13	2,6	2,8
7-9	2,03	2,4	2,7
11 ^{proR*} -12	2,02	2,4	2,7
11 ^{proS*} -13	0,72	2,9	3,2
12-13	1,47	2,6	2,8
12-14	0,28	3,4	3,7
12-42	0,76	3,2	3,6
13-14	0,75	2,9	3,1
13-15	1,32	2,6	2,9
14-42	0,53	3,5	3,9
16-14	1,46	2,6	2,8
17 ^{proR*} -16	1,68	2,5	2,7
18 ^{proS*} -16	0,52	3,0	3,3
18 ^{proR*} -23	3,78	2,2	2,4
20 ^{proR*} -22	1,17	2,7	2,9
21 ^{proS*} -22	1,20	2,6	2,9
22-27	4,47	2,1	2,3
23-24	0,38	3,2	3,5
26-28	1,15	2,7	2,9
27-40	1,94	2,4	2,7
29-39	2,46	2,8	3,1
30-31	1,39	2,6	2,8
31-39	2,63	2,8	3,1
32 ^{proR*} -30	1,41	2,6	2,8
37-38 ^{proS*}	1,02	2,7	3,0
38 ^{proS*} -30	0,66	2,9	3,2
38 ^{proS*} -40	1,47	2,6	2,8
41-26	1,67	2,5	2,7
41-41'	8,03	1,9	2,1
42-13	2,73	2,8	3,1
42-15	0,25	3,9	4,3
43-9	2,02	2,9	3,2

Tabla III.3.- En esta tabla se muestran las distancias interprotónicas obtenidas a partir de la intensidad de los ROEs correspondientes.

III.2.1.b.- Determinación de restricciones de torsión a partir de las constantes de acoplamiento

Las restricciones aplicadas a los ángulos diedros de la molécula se obtuvieron de la medida de las constantes de acoplamiento protón-protón a tres enlaces, $^3J_{H-H}$. Dichas constantes se midieron a partir de los experimentos RMN¹H y del COSY-DQF, aunque del primero de ellos sólo fue posible obtener tres valores debido al solapamiento de las señales, éstos fueron de gran utilidad ya que sirvieron para validar el que las constantes medidas en el COSY-DQF eran aceptables. En este caso, las constantes que se tuvieron en cuenta fueron aquellas correspondientes a los protones de las partes más flexibles de la molécula **C-12/C-16** y **C-26/C-30**. Como se puede observar en la **Tabla III.4**, los valores medidos para todas estas constantes superaban los 7 Hz, lo que es indicativo de una orientación H-H *anti*, lo mismo que indicaron los ángulos calculados a partir de la ecuación de Barfield¹⁰¹ y de Karplus.¹⁰² Sin embargo, para ser conservadores se tomaron como restricciones en los cálculos valores de ángulo diedro de 180° a los que se les aplicó un margen de error de ± 40°.

Protones	$^3J_{H-H}$ AEO		Ec.Barfield (°)	Ec.Karplus (°)	Ángulo restricción(°)
	NMR ¹ H	COSY-DQF			
12-13		7.5	144	145	180±40
13-14	8.3	8.8	*	151	
15-16	7.9	8.9	*	148	
26-27		9.0	153	156	
27-28^{pro-R}		10.2	163	176	
28^{pro-S}-29		10.0	161	176	
29-30		10.9	171	*	

*Ángulos no calculados porque las ecuaciones no están parametrizadas para C-sp².

Tabla III.4.- Constantes de acoplamiento, sus ángulos diedros (°) obtenidos a partir de las ecuaciones de Barfield y Karplus, y los que se utilizaron como restricciones de torsión.

¹⁰¹ Smith, W. B.; Barfield, M. *Magn. Res. Chem.*, **1993**, 31, 696-697.

¹⁰² M. Karplus, *J. Chem. Phys.*, **1959**, 30, 11-15.

III.2.2.-Modelización del Ácido 19-*epi*-O utilizando Restricciones Experimentales

Una vez estimadas las distancias y los ángulos diedros que se utilizarían como restricciones se abordó el estudio conformacional del AEO en disolución utilizando técnicas de Mecánica Molecular. Concretamente, se realizaron búsquedas conformacionales, minimizaciones y dinámicas moleculares utilizando el programa MacroModel 8.5.¹⁰³

III.2.2.a.- Realización de Búsquedas Conformacionales

Como punto de partida para el estudio conformacional se utilizó una estructura generada por epimerización del centro C-19 de la estructura de rayos X del AO.^{68,69} El método de búsqueda conformacional elegido fue el MCMM (*Monte Carlo Multiple Minimum*),^{104,105} ya que es el más recomendado para muestrear de manera eficiente todo el espacio conformacional en este tipo de moléculas. Se realizaron de forma separada cuatro búsquedas conformacionales utilizando los campos de fuerza MMFFs (*Merck Molecular Force Field*)^{106,107} y el MM3*.^{108,109} Dado que la espectroscopia de RMN se realizó en MeOH y éste no se encuentra disponible dentro de la lista de ecuaciones parametrizadas en MacroModel 8.5,¹⁰³ las búsquedas se realizaron utilizando tanto el

¹⁰³ MacroModel es un programa de modelado molecular basado en campos de fuerza que permite realizar minimizaciones, búsquedas conformacionales y simulaciones dinámicas entre otros procesos. La interfase gráfica (GUI, *graphical user interface*) para MacroModel es Maestro, y en nuestro caso utilizamos la versión 6.0.

¹⁰⁴ Este método forma parte de la aplicación de MacroModel y es muy utilizado ya que explora de manera eficiente el espacio conformacional mediante cambios arbitrarios en las coordenadas cartesianas o en los ángulos de torsión.

¹⁰⁵ Chang, G.; Guida, W. C.; Still, W. C. *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111*, 4379-4386.

¹⁰⁶ Este campo de fuerza es uno de los que se ha publicado más recientemente y se caracteriza por ser un método general aunque es más popular con moléculas orgánicas.

¹⁰⁷ Halgren, T. A. *J. Comput. Chem.* **1996**, *17*, 490-519.

¹⁰⁸ Se encuentra dentro de la familia de campos de fuerza MM parametrizados por Allinger, que son muy utilizados para compuestos orgánicos de pequeño tamaño.

¹⁰⁹ Allinger, N. L.; Yuh, Y. H.; Lii, J.H. *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111*, 8551-8566.

modelo GB/SA (*Generalized Born/Surface Area*) de solvatación continuo para agua propuesto por Still y col.,¹¹⁰ así como con un modelo no solvatado en el que se aplicó una constante dieléctrica equivalente a la del MeOH (32.7), con el fin de tener información de cómo afectan las distintas condiciones de cada simulación a los resultados del estudio conformacional. Por lo tanto se estudió el espacio conformacional en cuatro condiciones diferentes, aplicando las restricciones de distancia y angulares comentadas en el **Apartado III.2.1**. Utilizando cada una de las condiciones citadas anteriormente se aplicaron búsquedas con 20000 pasos, variando en cada uno entre dos y cinco grados de libertad, tomando como estructura de partida en cada paso la generada en el paso anterior. Cada estructura fue minimizada mediante el algoritmo TNCG¹¹¹ (*Truncated Newton Conjugated Gradient*) empleando como criterio mínimo de convergencia valores de 0.05 KJ/Å mol. Todas aquellas estructuras con una diferencia de más de 50 KJ sobre la de mínima energía en cada búsqueda fueron eliminadas.

Una vez terminada cada búsqueda conformacional se procedió a la reminimización de los confórmeros obtenidos, manteniendo en cada caso el mismo campo de fuerza y solvatación que en el paso anterior, pero ahora el método que se utilizó para llevar a cabo esta minimización fue el FMNR (*Full Matrix Newton Raphson*) con 5000 iteraciones, un criterio de convergencia de 0.05 KJ/Å mol, y un umbral de RMSD de 0.25 Å para considerar dos confórmeros como duplicados. En este caso sólo se conservaron aquellos confórmeros situados dentro de una ventana de energía potencial de 26.0 KJ/mol con respecto al mínimo de la búsqueda. Se seleccionó esta energía como corte ya que se ha observado que permite tener una muestra óptima del espacio conformacional, donde se evita la presencia de estructuras estéricamente comprometidas y se permite la presencia de estructuras razonables con

¹¹⁰ Still, W. C.; Tempczyk, A.; Hawley, R. C.; Hendrickson, T. *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, *112*, 6127-6129.

¹¹¹ Ponder, J.; Richards, F. *J. Comput. Chem.*, **1987**, *8*, 1016–1024.

energías relativas sobrestimadas.¹¹² El número de estructuras que quedaron una vez aplicada esta minimización fueron 361, 399, 376 y 403 para los campos de fuerza MM3*-cte.diel., MM3*-H₂O, MMFFs-cte.diel. y MMFFs-H₂O, respectivamente. Dado que el número de estructuras resultó ser algo elevado para su manejo, se utilizó el programa X-Cluster^{113,114} para calcular la desviación cuadrática media (RMSD) de la posición de los átomos mediante la superposición de pares de estructuras, lo que permite agruparlas en familias conformacionales y el valor de RMSD nos indica la precisión de las estructuras entre sí. Como resultado de la aplicación de este programa, en las cuatro situaciones estudiadas se obtuvo una familia conformacional en la que pudieron incluirse todas las estructuras, que resultaron ser bastante homogéneas entre sí.

Por lo tanto, como muestra de esta amplia familia conformacional se seleccionaron los diez confórmeros de mínima energía para cada uno de los campos de fuerza utilizados. Estas estructuras se encuentran representadas en la **Figura III.17**, y en la **Tabla III.5** se pueden ver sus energías relativas así como los valores de RMSD con respecto al mínimo global de cada búsqueda.

¹¹² Thepchatr, P.; Cicero, D. O.; Monteagudo, E.; Ghosh, A. K.; Cornett, B.; Weeks, E. R.; Snyder, J. P. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 12838-12846.

¹¹³ El XCluster es un programa que se encuentra dentro del paquete de aplicaciones de MacroModel, y es una herramienta muy útil para analizar distintas conformaciones moleculares, ya que permite agruparlas de acuerdo a criterios de distancia mediante la superposición de los átomos.

¹¹⁴ Shenkin, P. S.; McDonald, D. Q. *J. Comput. Chem.* **1994**, *15*, 899-916.

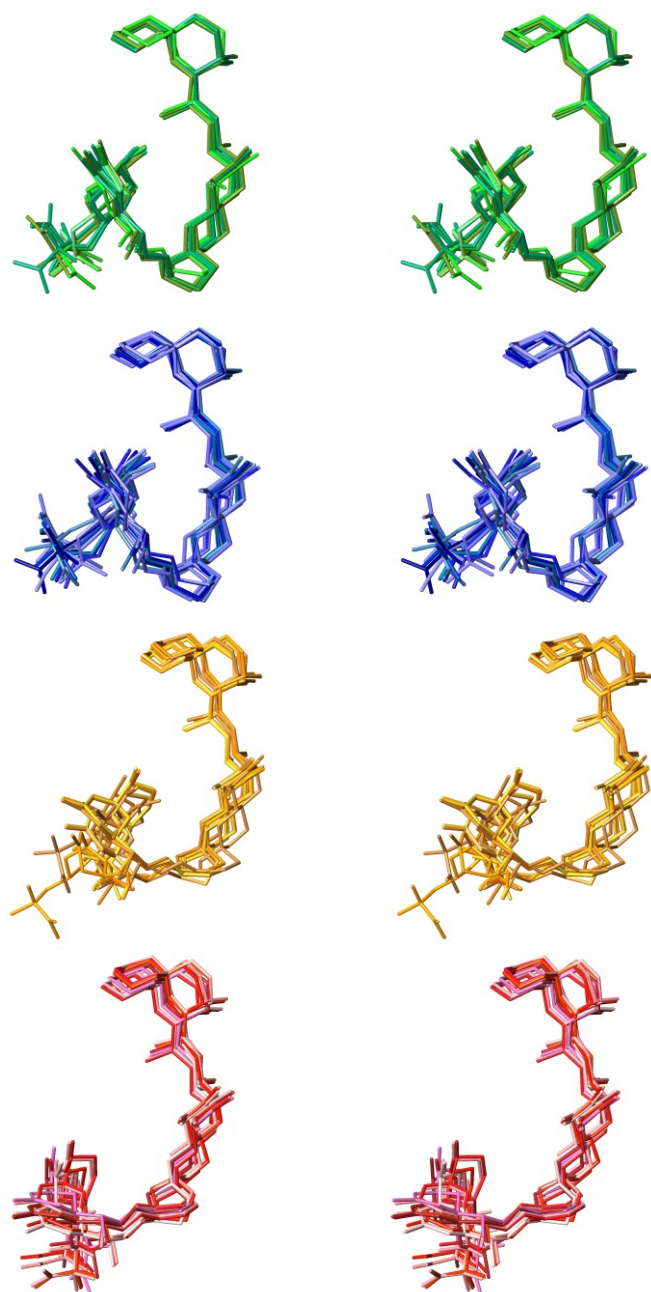


Figura III.17.- Representación estereoscópica de los diez conformeros de mínima energía resultantes de los campos de fuerza MM3*-cte.diel. (estructuras en verde), MM3*-H₂O (estructuras en azul), MMFFs-cte.diel. (estructuras en naranja), MMFFs-H₂O (estructuras en rojo).

Conformero	ΔE^a	RMSD(Å)	ΔE^b	RMSD(Å)	ΔE^c	RMSD(Å)	ΔE^d	RMSD(Å)
1	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0
2	1,05	0,2	0,25	0,4	2,36	0,1	2,29	0,8
3	1,54	0,9	0,74	0,7	2,43	1,0	2,83	1,0
4	2,38	0,1	1,50	0,2	4,11	0,5	2,89	0,1
5	2,83	0,9	3,19	0,8	4,70	2,2	3,50	1,0
6	3,96	0,5	4,05	0,7	5,10	1,0	3,61	1,2
7	4,13	0,5	4,37	0,6	5,21	0,1	3,78	0,1
8	4,25	0,9	5,24	0,9	6,00	1,4	4,01	0,9
9	4,29	0,0	6,58	0,7	6,12	0,9	4,12	0,8
10	4,34	0,6	6,61	0,4	6,46	0,0	5,06	1,3

Tabla III.5.- ΔE relativa (KJ/mol) para cada uno de los campos de fuerza. ΔE^a : MM3*-cte. diel., ΔE^b : MM3*-H₂O, ΔE^c : MMFFs-cte. diel., ΔE^d : MMFFs-H₂O. El valor de RMSD está calculado con respecto al mínimo global en cada situación.

Como se puede observar en la **Figura III.18** las disposiciones tridimensionales que adopta la molécula en los distintos campos de fuerza son bastante parecidas. Aunque también es cierto que en el campo de fuerza MM3* la molécula parece estar algo más plegada que en el MMFFs, no observándose diferencias importantes entre la situación solvatada y sin solvatar dentro de cada uno de estos campos de fuerza. De cualquier modo, la similitud entre las estructuras obtenidas en las distintas condiciones nos permite incluirlas en la misma familia conformacional.

Una vez establecida la similitud entre las estructuras resultantes del estudio de modelización estamos en disposición de pasar a evaluar como se ajustan las estructuras calculadas a nuestras medidas experimentales, es decir, la exactitud de nuestros resultados.

Para ello, se calcularon las violaciones de distancia para cada uno de los diez conformeros de mínima energía respecto a las distancias calculadas a partir del experimento ROESY. Como se puede observar en la **Tabla III.6** el número de violaciones para estos conformeros oscilan entre 1-6, y sus valores se encuentran entre 0,02-0,50 Å. Por lo tanto, ante estos resultados, si tenemos en cuenta que valores de violaciones hasta 0,5 Å son considerados como aceptables¹¹⁵, podemos aceptar que los datos teóricos nos muestran un buen modelo conformacional, que se adapta bastante a los datos experimentales.

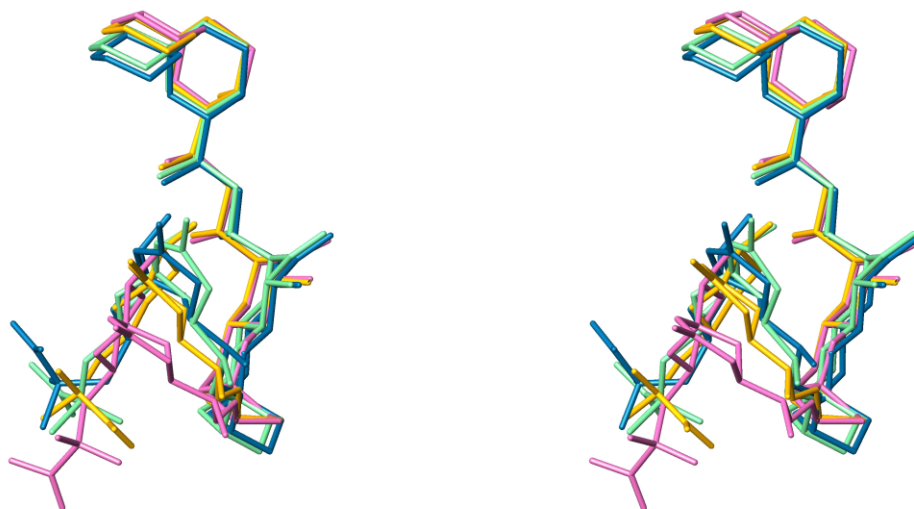


Figura III.18.- Imagen estereoscópica de los conformeros obtenidos en las búsquedas conformacionales, las estructuras representadas en los colores verde, azul, naranja y rojo representan a los conformeros resultantes de los campos de fuerza MM3*-cte. diel., MM3*-H₂O, MMFFs-cte. diel. y MMFFs-H₂O, respectivamente.

¹¹⁵ Nabuurs, S. B.; Spronk, C. A. E. M.; Vriend, G.; Vuister, G. W. *Concepts Magn Reson Part A*, **2004**, 22, 90–105.

Conf.	MM3*-cte.diel.		MM3*-H ₂ O		MMFFs-cte.diel.		MMFFs-H ₂ O	
	H-H	Viol. (Å)	H-H	Viol. (Å)	H-H	Viol. (Å)	H-H	Viol. (Å)
1	12-13	0,19	12-13	0,18	12-13	0,22	12-13	0,22
2	12-13	0,19	12-13	0,17	12-13	0,22	3 ^{proS*} -4 12-13	0,43 0,22
3	3 ^{proS*} -4 12-13	0,49 0,19	12-13	0,18	12-13	0,22	12-13	0,22
4	12-13	0,19	12-13 43-9	0,18 0,04	12-13	0,22	12-13	0,22
5	3 ^{proS*} -4 12-13	0,49 0,19	12-13 43-9	0,18 0,04	11 ^{proS*} -13 12-13 43-9	0,01 0,20 0,35	12-13	0,22
6	12-13	0,19	12-13 43-9	0,18 0,04	12-13	0,22	12-13	0,22
7	12-13	0,19	3 ^{proS*} -4 12-13 43-9	0,48 0,18 0,04	12-13	0,22	12-13	0,22
8	3 ^{proS*} -4 12-13	0,49 0,19	3 ^{proS*} -4	0,03	12-13 43-9	0,20 0,35	12-13	0,22
9	12-13	0,19	12-13	0,18	3 ^{proS*} -4 12-13	0,45 0,22	3 ^{proS*} -4 12-13	0,43 0,22
10	12-13	0,19	12-13	0,17	12-13	0,22	3 ^{proS*} -4 12-13	0,44 0,22

Tabla III.6.- En esta tabla se indican las violaciones de distancia para aquellos hidrógenos que violan las restricciones aplicadas (**Tabla III.3**).

III.2.2.b.- Estudios de dinámica molecular con el conformero del Ácido 19-epi-Okadaico

Propuesta la conformación para el AEO en disolución, la estructura de mínima energía se sometió a una simulación de dinámica molecular (MD) para comprobar su estabilidad conformacional y así corroborar el resultado obtenido a partir de las búsquedas anteriores.

Las simulaciones se desarrollaron en las mismas condiciones que se emplearon para llevar a cabo las búsquedas conformacionales, utilizando los campos de fuerza MMFFs y MM3* tanto con constante dieléctrica $\epsilon = 32.7$ como con el modelo solvatado GB/SA para agua. La dinámica que se realizó fue de tipo SD (*Stochastic Dynamic*),^{116,117} manteniendo una temperatura constante de 300 K y fijando las distancias protón-carbono mediante el algoritmo *Shake*¹¹⁸. La dinámica se realizó con un periodo de equilibrado de 50 ps seguidos de un periodo de 2.5 ns, utilizando como intervalos de tiempo entre integrales (*time step*) 1.5 fs.

La trayectoria de la dinámica durante cada simulación se obtuvo guardando las estructuras resultantes cada 0.5 ps a la vez que se monitorearon los ángulos diedros de las secuencias **C-12→C16** y **C-26→C-30** (**Figuras III.19 a III.25**), que al tratarse de fragmentos abiertos son los que más información nos pueden aportar acerca de la movilidad de la molécula. De acuerdo a estos datos, si nos fijamos en como evolucionan los ángulos indicados con el tiempo, nos encontramos con una situación estable en todos los casos exceptuando el diedro H-15–C-15–C-16–H-16 (**Figura III.21**), donde se observan algunas fluctuaciones en el campo de fuerza MM3*-H₂O, aunque la mayor parte del tiempo este ángulo de torsión se mantiene cercano a los 180°, coincidiendo con el valor observado en las otras tres condiciones en las que se

¹¹⁶ Este método (SD) presenta mejoras frente al de dinámica molecular (MD) ya que incluye fuerzas que simulan el efecto del movimiento de las moléculas de disolvente en el soluto.

¹¹⁷ Gunsteren, W. F. V.; Berendsen, H. J. C. *Mol. Simul.*, **1988**, *1*, 173-185.

¹¹⁸ Con este algoritmo se mantienen fijas las distancias hidrógeno-carbono.

llevó a cabo la dinámica. Esta ligera flexibilidad también se manifiesta en la distancia observada entre los hidroxilos situados sobre los carbonos C-24 y C-7, que como se puede ver en las **Figuras III.26** y **III.27** presenta oscilaciones entre 4 y 11 Å. Por lo tanto, aunque la molécula es bastante estable, estos datos nos indican que no es del todo rígida. Lo cual es coherente si tenemos en cuenta que en estos conformeros no está presente el puente de hidrógeno característico del AO,⁶⁵ entre el carbonilo C-1 y el hidroxilo en C-24, que es el que le confiere una cierta rigidez. Pero a pesar de la ligera movilidad que presenta el AEO, no parece evolucionar a otras disposiciones espaciales, manteniéndose dentro de la misma familia conformacional durante el tiempo de simulación y en los distintos campos de fuerza.

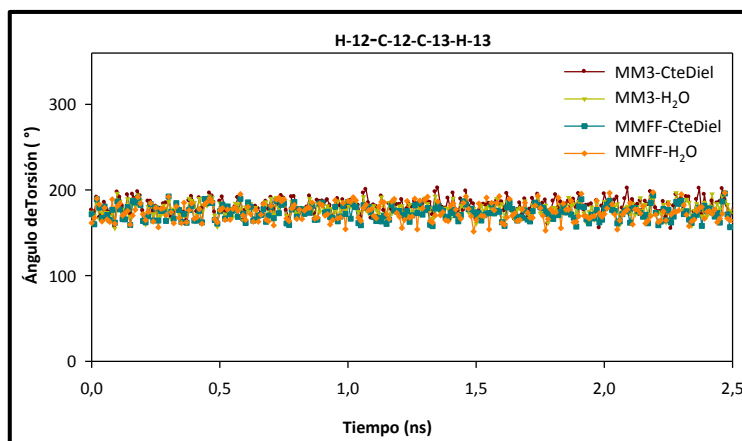


Figura III.19.- Evolución del ángulo diedro H-12–C-12–C-13–H-13 durante el tiempo de simulación con una SD para el AEO.

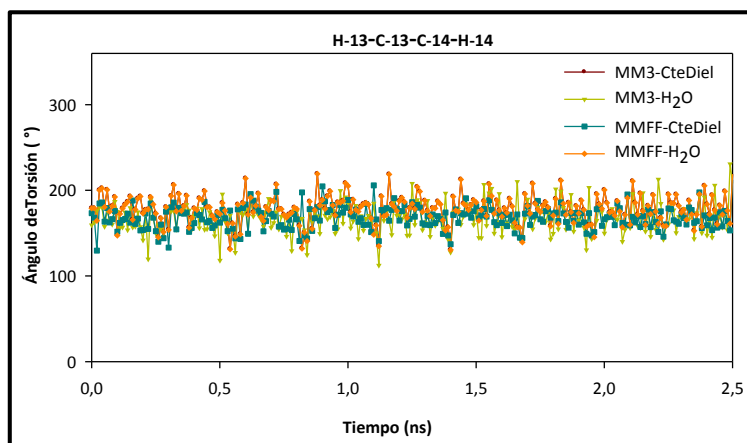


Figura III.20.- Evolución del ángulo diedro H-13–C-13–C-14–H-14 durante el tiempo de simulación con una SD para el AEO.

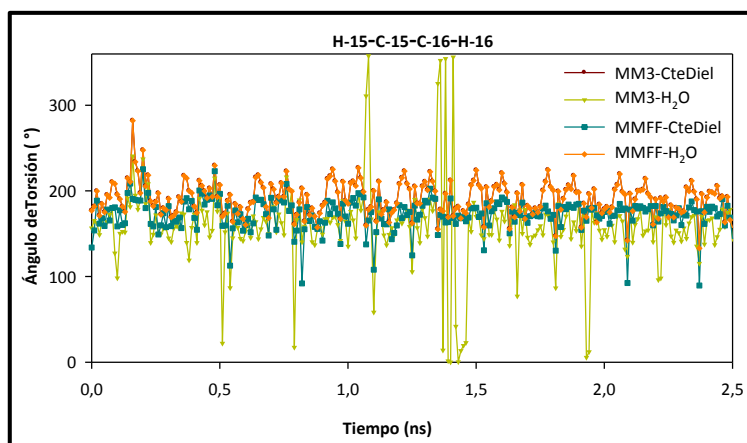


Figura III.21.- Evolución del ángulo diedro H-15–C-15–C-16–H-16 durante el tiempo de simulación con una SD para el AEO.

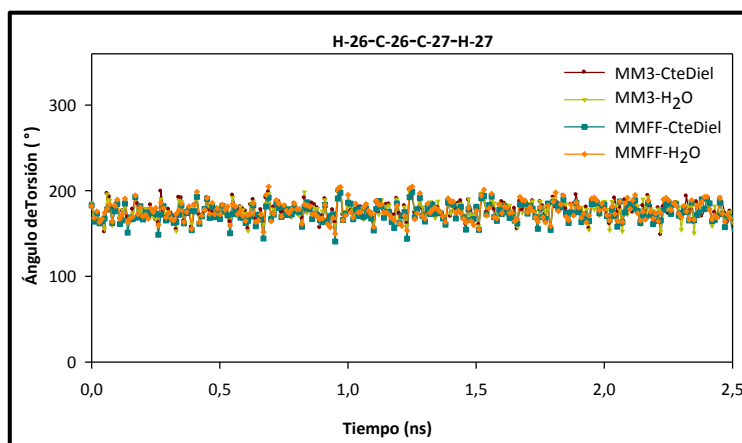


Figura III.22.- Evolución del ángulo diedro H-26–C-26–C-27–H-27 durante el tiempo de simulación con una SD para el AEO.

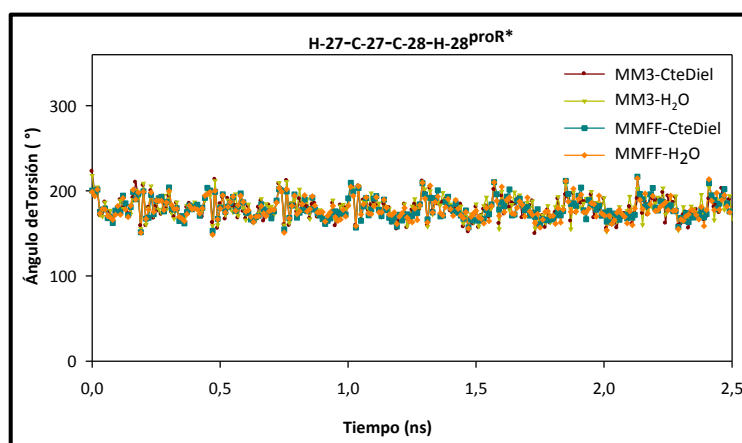


Figura III.23.- Evolución del ángulo diedro H-27–C-27–C-28–H28^{proR*} durante el tiempo de simulación con una SD para el AEO.

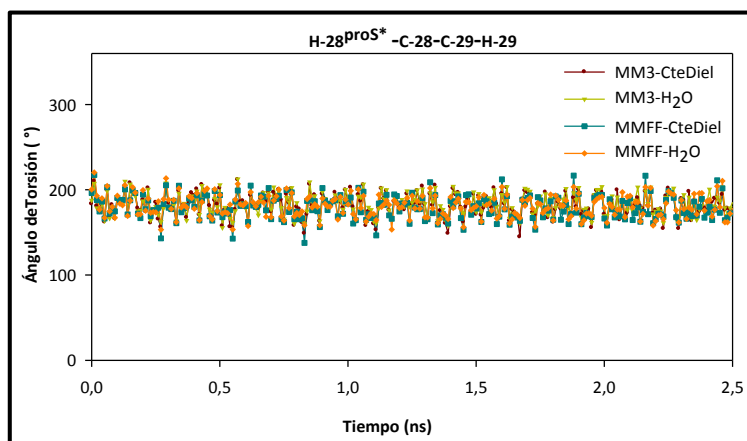


Figura III.24.- Evolución del ángulo diedro H-28^{proS*}-C-18-C-29-H-29 durante el tiempo de simulación con una SD para el AEO.

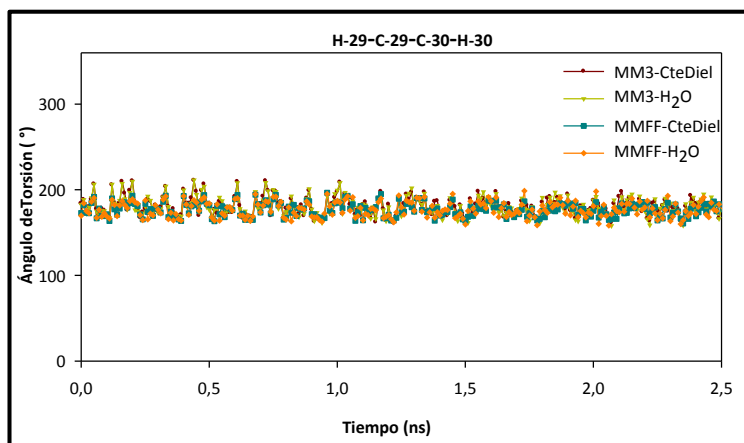


Figura III.25.- Evolución del ángulo diedro H-29-C-29-C-30-H30 durante el tiempo de simulación con una SD para el AEO.

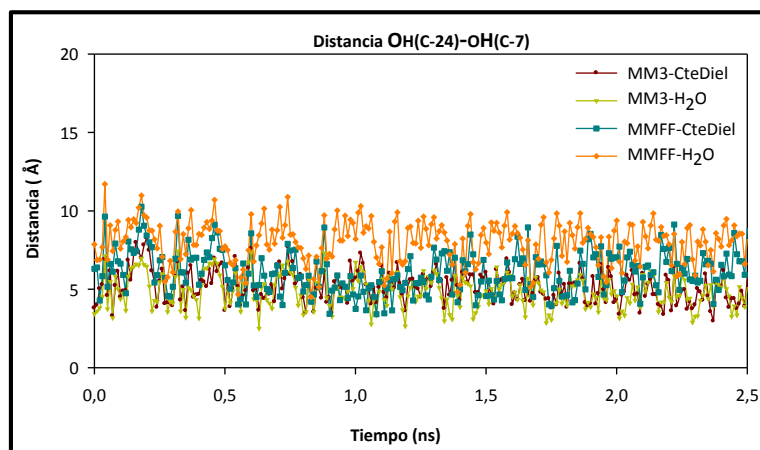


Figura III.26.- Evolución de la distancia entre el oxígeno del OH(C-24) y el hidrógeno de OH(C-7) durante el tiempo de simulación con una SD para el AEO.

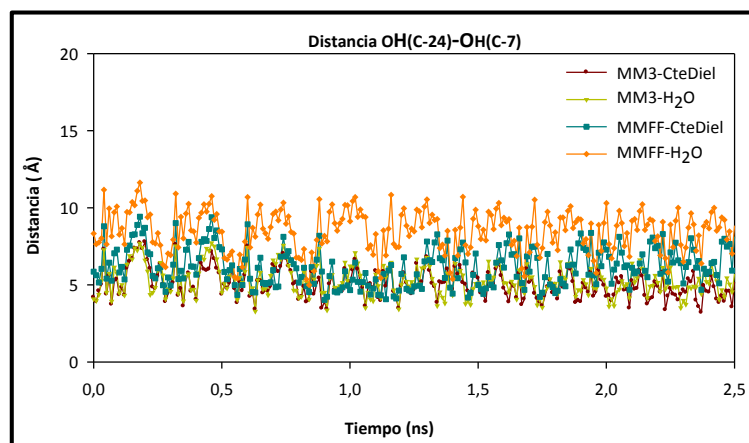


Figura III.27.- Evolución de la distancia entre el hidrógeno de OH(C-24) y el oxígeno de OH(C-7) durante el tiempo de simulación con una SD para el AEO.

Para concluir con este estudio computacional se compararon los ángulos diedros y las distancias obtenidas experimentalmente con los valores correspondientes a la estructura promedio de las dinámicas en los distintos campos de fuerza. Para esto se tomó la estructura promedio, ya que las moléculas en disolución se encuentran en movimiento permitiendo la existencia de equilibrios conformacionales, por lo que los datos experimentales se deben al aporte de todos los conformeros que coexisten en disolución. En la **Figura III.28** se pueden ver estas estructuras, y en las **Tablas III.7** y **III.8** se muestran los datos teóricos y experimentales correspondientes a los ángulos diedros y a las distancias interprotónicas. Ante estos datos, que se ajustan bastante bien a los experimentales tanto en el campo de fuerza MM3* como en el MMFFs, podemos pensar que nos encontramos ante una buena propuesta conformacional.

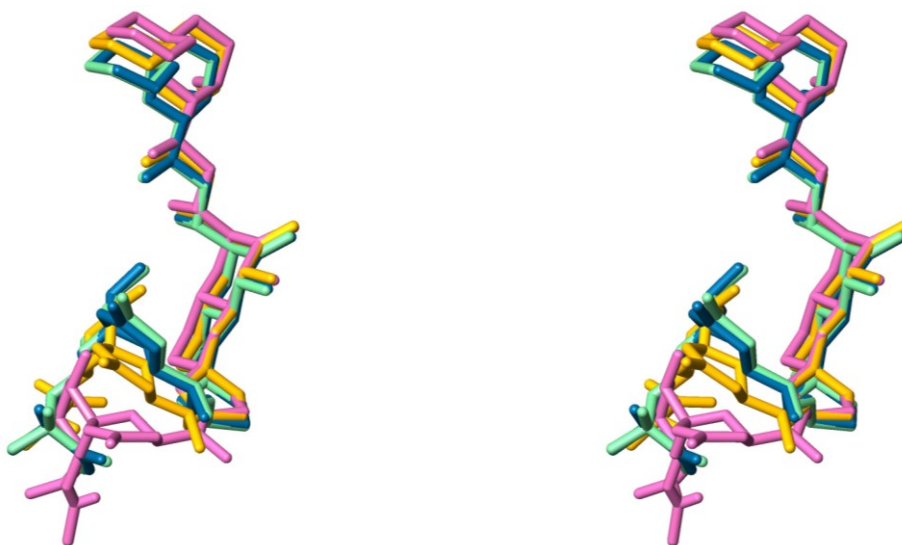


Figura III.28.- Imagen estereoscópica de la estructura promedio de las dinámicas en los distintos campos de fuerza: MM3*-cte. diel. en verde, MM3*-H₂O en azul, MMFFs-cte. diel. en naranja, MMFFs-H₂O en rojo.

Diedro	³ J _{H-H}		Ecuación Barfield (°)	Ecuación Karplus (°)	MM3* cte.diel. (°)	MM3* H ₂ O (°)	MMFFs cte.diel. (°)	MMFFs H ₂ O (°)
	HNMR	COSY-DQF						
12-13		7,5	144	154	177	177	172	174
13-14	8,3	8,8	*	151	165	165	167	179
15-16	7,9	8,9	*	148	172	172	176	193
26-27		9,0	153	156	176	176	171	175
27- 28 ^{proR}		10,2	163	176	180	180	180	180
28 ^{proS} -29		10,0	161	176	183	183	181	182
29-30		10,9	171	*	180	180	176	177

*Ángulos no calculados por no estar las ecuaciones parametrizadas para los c-sp².

Tabla III.8.- Ángulos diedros (°) obtenidos a partir de las ecuaciones de Barfield y Karplus, y los correspondientes a la estructura promedio de las dinámicas en los distintos campos de fuerza.

III.- Estudio del Ácido 19-epi-Okadaico

H-H	D expt.	MM3*-cte.diel.	MM3*-H ₂ O	MMFFs-cte.diel.	MMFFs-H ₂ O
3 ^{proS*} -4	2.4	2.5	2,5	2,5	2,5
4-14	3.4	3.5	3,5	3,1	3,1
5 ^{proS*} -4	2.6	2.5	2,5	2,5	2,5
5 ^{proS*} -5 ^{proR*}	1.7	1.8	1,8	1,8	1,8
6 ^{proS*} -7	2.6	2.4	2,4	2,4	2,4
7-9	2.4	2.5	2,5	2,5	2,5
11 ^{proR*} -12	2.4	2.4	2,4	2,4	2,4
11 ^{proS*} -13	2.9	2.6	2,6	2,6	2,6
12-13	2.6	3.1	3,1	3,1	3,1
12-14	3.4	2.9	2,9	2,8	2,7
12-42	3.2	3.4	3,4	3,4	3,4
13-14	2.9	3.1	3,1	3,1	3,1
13-15	2.6	2.4	2,4	2,4	2,4
14-42	3.5	3.7	3,7	3,8	3,8
16-14	2.6	2.5	2,5	2,4	2,4
17 ^{proR*} -16	2.5	2.4	2,4	2,4	2,4
18 ^{proS*} -16	3.0	3.0	3,0	2,9	2,8
18 ^{proR*} -23	2.2	2.2	2,2	2,1	2,1
20 ^{proR*} -22	2.7	2.5	2,5	2,5	2,5
21 ^{proS*} -22	2.6	2.5	2,5	2,4	2,4
22-27	2.1	2.2	2,2	2,2	2,2
23-24	3.2	3.1	3,1	3,1	3,1
26-28	2.7	2.5	2,5	2,5	2,5
27-40	2.4	2.2	2,2	2,2	2,2
29-39	2.8	2.8	2,8	2,9	2,9
30-31	2.6	2.5	2,5	2,5	2,5
31-39	2.8	2.5	2,5	2,5	2,4
32 ^{proR*} -30	2.6	2.6	2,6	2,6	2,6
37-38 ^{proS*}	2.7	2.5	2,5	2,5	2,5
38 ^{proS*} -30	2.9	2.6	2,6	2,6	2,6
38 ^{proS*} -40	2.6	2.7	2,6	2,7	2,7
41-26	2.5	2.4	2,4	2,4	2,4
41-41'	1.9	1.9	1,9	1,8	1,8
42-13	2.8	2.5	2,5	2,5	2,5
42-15	3.9	4.1	4,1	4,1	4,0
43-9	2.9	2.4	2,4	2,5	2,4

Tabla III.7.- Distancias experimentales y las correspondientes a la estructura promedio de las dinámicas en los distintos campos de fuerza.

III.3.- ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE PROTEÍNAS FOSFATASAS PP1 Y PP2A

Debido a que el AO se caracteriza por inhibir de forma selectiva a las proteínas PP1 y PP2A frente al resto de las fosfatasas de la misma familia, y dado que el AEO se diferencia del AO en la estereoquímica del centro C-19, lo que se traduce en cambio de conformación, decidimos llevar a cabo ensayos para evaluar la inhibición de estas proteínas por parte del nuevo metabolito.

Los ensayos de inhibición enzimática se realizaron adaptando una técnica de fluorescencia publicada por Vieytes y col.,¹¹⁹ cuyo fundamento es medir la actividad enzimática de la proteína a través de medidas de fluorescencia, utilizando la fluoresceína difosfato (FDP) como sustrato. Las disoluciones de las muestras que se ensayaron se prepararon a partir de una disolución inicial en MeOH, de modo que el porcentaje final de este disolvente en las muestras ensayadas fuera menor del 1%, ya que por debajo de este volumen el disolvente orgánico no afecta a las actividades¹¹⁹ del compuesto.

A la hora de determinar la inhibición enzimática se tomó como sustancia de referencia el AO, por lo que los ensayos tanto con PP1 como con PP2A se realizaron también empleando este inhibidor cuyo comportamiento es perfectamente conocido.⁶⁰

Los resultados obtenidos se resumen en las **Figuras III.29-III.32**, y como se puede observar en la **Tabla III.9**, los porcentajes de inhibición enzimática para el nuevo compuesto son muy similares a los que presenta el AO con ambas proteínas.

¹¹⁹ Vieytes, M. R.; Fontal, O. I.; Leira, F.; Baptista de Sousa, J. M. V.; Botana, L. M. *Analytical Biochemistry*, **1997**, 248-258.

III.- Estudio del Ácido 19-epi-Okadaico

Proteína	Compuesto	IC ₅₀ (nM)
PP1c	AO	106±10
	AEO	464±52
PP2Ac	AO	0,58±0,05
	AEO	0,47±0,04

Tabla III.9.- Porcentaje de inhibición de PP1 y PP2A con el AO y AEO.

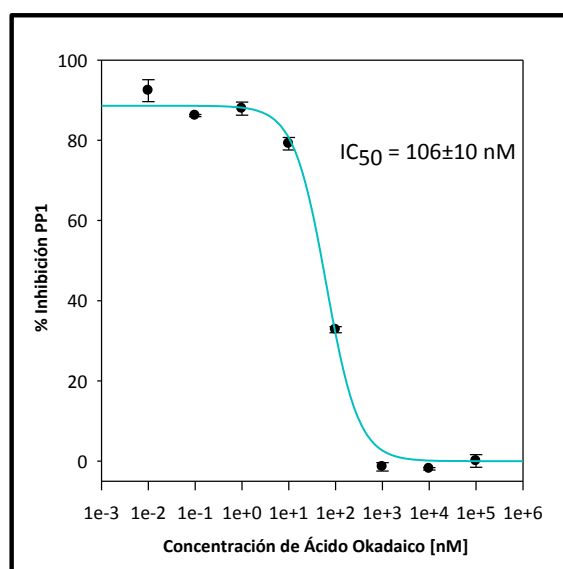


Figura III.29.- Inhibición de la proteína fosfatasa tipo I por el AO a las concentraciones 10⁻²-10⁵ nM y utilizando FDP (280 μM) como sustrato.

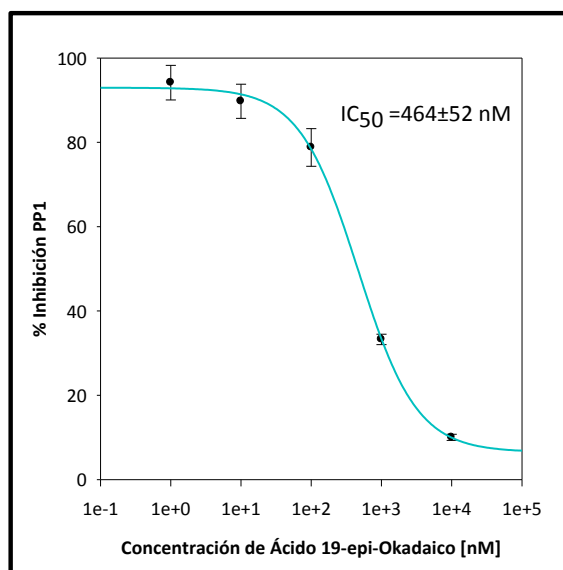


Figura III.30.- Inhibición de la proteína fosfatasa tipo 1 por el AEO a las concentraciones $1-10^4$ nM y utilizando FDP (280 μ M) como sustrato.

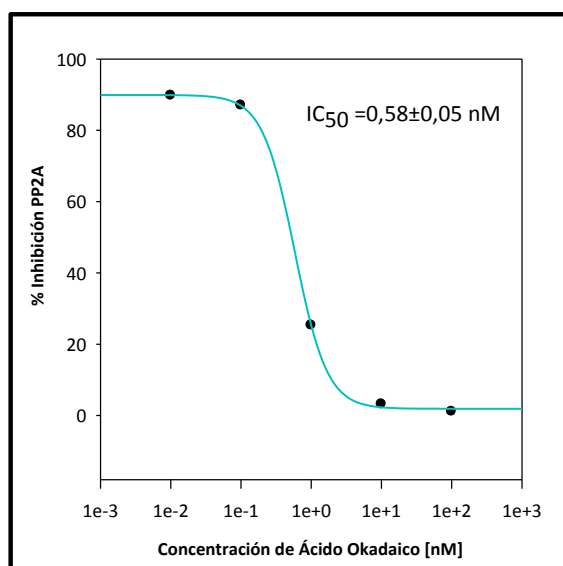


Figura III.31.- Inhibición de la proteína fosfatasa tipo 2A por el AO a las concentraciones 10^{-2} - 10^2 nM y utilizando FDP (280 μ M) como sustrato. En este caso la desviación estándar está incluida dentro del punto negro.

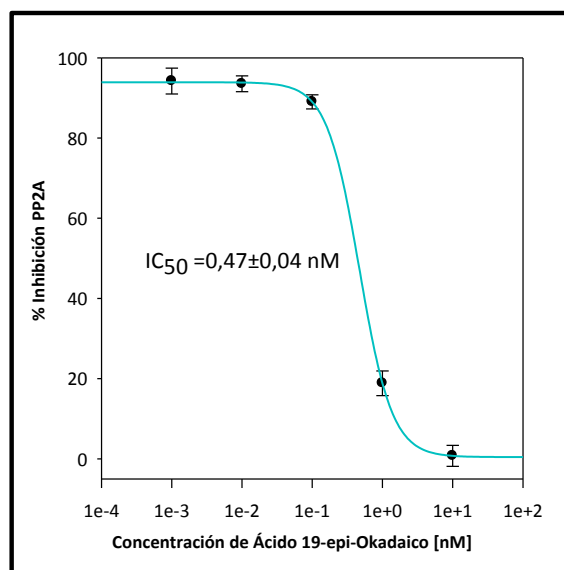


Figura III.32.- Inhibición de la proteína fosfatasa tipo 2a por el AEO a las concentraciones 10^{-3} - 10 y utilizando FDP (280 μ M) como sustrato.

Estos datos fueron inesperados, ya que la conformación de este metabolito difiere de la del AO (**Figura III.33**) y los grupos responsables de las interacciones en el caso de la PP1, de la cual se ha obtenido el cristal del complejo AO-PP1c, ahora presentan orientaciones distintas. Como se puede ver en la **Figura III.33**, el grupo ácido, crucial en el complejo AO-PP1, en este nuevo compuesto se orienta en sentido contrario al de la parte hidrofóbica C-30→C-38 de la molécula, lo cual podría ser un impedimento a la hora de la interacción. Por lo tanto, estos resultados nos motivaron a continuar en el estudio, para lo cual se determinó la constante de afinidad del AEO con la PP1 (**Apartado III.4**) por ser la proteína de la que se tienen datos cristalográficos, y así intentar sacar alguna conclusión sobre como puede unirse este nuevo compuesto al centro activo de la PP1.



Figura III.33.- Imagen estereoscópica de la superposición del AO y del AEO. La estructura gris representa el AO y la estructura naranja al AEO.

III.4.- ANÁLISIS TEÓRICO DE LA TERMODINÁMICA DE FORMACIÓN PARA EL COMPLEJO PP1-LIGANDO

Es de gran importancia conocer la relación existente entre la conformación de un ligando en disolución y la que adopta cuando se une a la proteína, ya que esto nos ayudaría a entender el mecanismo de la reacción, y a su vez, los factores energéticos involucrados. Además, la conformación en disolución de un ligando presente en un complejo, cuyos parámetros termodinámicos calculados estén de acuerdo con los medidos, debería estar relacionada con la forma activa del ligando o al menos con conformaciones que pueden unirse al enzima. Por lo tanto, recurrimos a una aproximación termodinámica basada en la estructura¹²⁰ para calcular la K_d (constante de disociación) del complejo formado por la proteína fosfatasa PP1 y los ligandos AO y AEO. Para determinar el valor de la K_d se calcularon los siguientes parámetros termodinámicos: entalpía, entropía, calor de formación y energía libre de Gibbs. Finalmente aunque no disponemos de valores experimentales de K_d para los complejos a estudiar, podemos tomar como referencia el valor de K_i (constante de inhibición) experimental, ya que su valor debe ser del mismo orden que el de K_d .

III.4.1.- Determinación de la constante de disociación

La K_{eq} de una reacción química se relaciona con la energía libre de Gibbs a través de la **Ecuación III.1** fundamental de la termodinámica. A su vez la energía libre puede diseccionarse en dos componentes, la entalpía (ΔH), y la entropía (ΔS) del proceso, tal y como se muestra con la **Ecuación III.2**.

¹²⁰ P lavigne, JR Bagu, R Boyko, L Willard, CF Colmes and BD Syke, *Protein Science*, 2000, 9, 252-264.

$$\Delta G (T) = RT \ln K \quad \text{Ecuación III.1}$$

$$\Delta G (T) = \Delta H (T) - T \Delta S (T) \quad \text{Ecuación III.2}$$

En este estudio, se utilizó un método para calcular la energía libre de disociación basado en una parametrización de la capacidad calorífica, la entalpía y la entropía desarrollado fundamentalmente por Murphy y Freire,^{121,122} que describiré a continuación.

III.4.1.a.- Cálculo de ΔH

El cambio en la entalpía producido durante un proceso de unión proteína-ligando o de desnaturalización es básicamente el mismo y se origina fundamentalmente en la formación de interacciones internas (van der Waals, puentes de hidrógeno, etc.) y en la desolvatación paralela de los grupos intervinientes en las mismas. Por lo tanto, los cambios en la entalpía del proceso pueden expresarse en términos de cambios en el ASA (*Accesible Surface Area*) y en las distancias interatómicas entre los grupos que interactúan. Así, puede decirse que a la temperatura de 60°C la diferencia de entalpía puede calcularse siguiendo la siguiente regla empírica (**Ecuación III.3**):

$$\Delta H (60) = 31.4 \Delta ASA_{\text{pol}} - 8.44 \Delta ASA_{\text{ap}} \quad \text{Ecuación III.3}$$

¹²¹ Murphy KP, Freire E., *Adv. Protein Chem.*, **1992**, 43, 313-361.

¹²² Luque I, Freire E., *Methods Enzymol.*, **1998**, 295, 295-315.

Y a cualquier otra temperatura se puede obtener utilizando la siguiente ecuación termodinámica (**Ecuación III.4**).

$$\Delta H (T) = \Delta H (60) + \Delta C_p (T-333.15) \quad \text{Ecuación III.4}$$

Donde $\Delta H (60)$, es la entalpía a una temperatura de referencia (60°C) y ΔC_p es el cambio de la capacidad calorífica independiente de la temperatura. Esto es posible ya que se puede considerar que ΔC_p es independiente de la temperatura entre 0 y 85°C ,¹²³ y a que su valor se puede calcular de manera fiable mediante el cálculo del cambio en la superficie accesible al disolvente (ASA) de los átomos polares ($\Delta\text{ASA}_{\text{pol}}$) y no polares ($\Delta\text{ASA}_{\text{ap}}$) implicados en el proceso a través de la **Ecuación III.5**.^{121,124,125} Ya que se ha observado que ΔC_p tiene su origen principalmente en los cambios de hidratación de los átomos expuestos al disolvente y que los átomos polares y apolares tienen contribuciones opuestas.^{121,123} Este valor de entalpía no tiene, sin embargo, que coincidir necesariamente con el experimental ya que por ejemplo en aquellos casos en los que hay transferencia de protones, la entalpía medida depende de la naturaleza del tampón utilizado.

$$\Delta C_p (T) = 0.45 \Delta\text{ASA}_{\text{ap}} - 0.26 \Delta\text{ASA}_{\text{pol}} \quad \text{Ecuación III.5}$$

¹²³ Gomez, J.; Freire, E. *J Mol Biol.*, **1995**, 252, 337–350.

¹²⁴ Xie, D.; Freire, E. *Proteins Struct. Funct. Genet.*, **1994**, 19, 291–301.

¹²⁵ Hilser, V.J.; Gomez, J.; Freire, E. *Proteins Struct. Funct. Genet.*, **1996**, 26, 123–133.

III.4.1.b.- Cálculo de ΔS

Si se considera que no hay transferencia de protones, el cambio en la entropía del proceso ΔS se puede asumir debida a cambios en la entropía de solvatación ($\Delta S_{sol}(T)$), entropía conformacional (ΔS_{conf}) y la entropía rotacional y traslacional (ΔS_{rt}), (**Ecuación III.6**). De todas estas contribuciones, sólo ΔS_{sol} es dependiente de la temperatura, pero puede expresarse en función de ΔC_p si las temperaturas a las que las entropías de hidratación polares y apolares son cero ($T^*_{S,ap}$ y $T^*_{S,pol}$) se utilizan como referencia (**Ecuación III.7**).

$$\Delta S(T) = \Delta S_{sol}(T) + \Delta S_{conf} + \Delta S_{rt} \quad \text{Ecuación III.6}$$

$$\Delta S_{sol}(T) = \Delta C_{p,ap} \ln(T/T^*_{S,ap}) + \Delta C_{p,pol} \ln(T/T^*_{S,pol}) \quad \text{Ecuación III.7}$$

Como se conoce que la entropía de solvatación es cero para los átomos apolares a 112 °C, y para los polares a 62 °C, $\Delta S_{sol}(T)$ puede parametrizarse como se indica en la **Ecuación III.8**.^{126,127}

$$\Delta S_{sol}(T) = 0.45\Delta ASA_{ap} \ln(T/385.15) - 0.26\Delta ASA_{pol} \ln(T/335.15) \quad \text{Ecuación III.8}$$

Por otro lado, el cambio en la entropía conformacional en la formación del complejo (ΔS_{conf}) se puede explicar de acuerdo a la **Ecuación III.9**.¹²⁸ Donde $\Delta S_{int \rightarrow ex}$ es la ganancia en entropía conformacional de las cadenas laterales asociada a la

¹²⁶ Baldwin RL. *Proc Natl. Acad. Sci.* **1986**, 83, 8069–8072.

¹²⁷ D'Aquino, J. A.; Gomez, J.; Hilser, V. J.; Lee, K.H.; Amzel, L. M.; Freire, E. *Proteins Struct. Funct. Genet.*, **1996**, 25, 143–156.

¹²⁸ Murphy, K. P.; Xie, D.; Thompson, K. S.; Amzel, L. M.; Freire, E. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **1994**, 18, 62–67.

transferencia de las mismas desde el interior de la proteína a su superficie. $\Delta S_{ex \rightarrow u}$, es el cambio en la entropía conformacional de las cadenas laterales cuando la estructura secundaria se despliega. Finalmente, ΔS_{bb} , es la ganancia en entropía conformacional para el esqueleto cuando se despliega. Los valores utilizados para $\Delta S_{int \rightarrow ex}$, $\Delta S_{ex \rightarrow u}$ y ΔS_{bb} se han determinado para todos los aminoácidos con análisis de mecánica estadística.¹²⁷

$$\Delta S_{conf} = \Delta S_{int \rightarrow ex} + \Delta S_{ex \rightarrow u} + \Delta S_{bb} \quad \text{Ecuación III.9}$$

En nuestro caso asumimos que no se producen cambios conformacionales en el esqueleto de la PP1. Esta suposición está basada en el hecho de que la estructura de la proteína en estado libre es superponible a la que tiene cuando forma el complejo con el inhibidor.⁶⁵ Por tanto planteamos que el cambio en entropía conformacional asociado a la unión proteína-ligando se debe únicamente a la ganancia en entropía conformacional de las cadenas laterales del centro activo ($\Delta S_{int \rightarrow ex}$) que puede calcularse de acuerdo a la **Ecuación III.10**, donde ΔASA_i es el cambio en ASA de la cadena lateral para el residuo i , y ASA_i es el ASA de la cadena lateral en un estado totalmente expuesto. Los valores de ASA utilizados en nuestros calculos fueron los publicados por Miller y col.¹²⁹

$$\Delta S_{conf} = \sum_i ((\Delta ASA_i / ASA_i) \Delta S_{int \rightarrow ex}) \quad \text{Ecuación III.10}$$

¹²⁹ Miller, S.; Janin, J.; Lesk, A. M.; Chothia, C. *J. Mol. Biol.*, **1987**, 196:641–656.

En el caso del AO consideramos la existencia de un pseudomacrocielo estabilizado por un puente de hidrógeno entre los grupos hidroxilo situados sobre C-7 y C-24, que se ha observado tanto en disolución como en el complejo con la PP1.⁶⁵ Hay que tener especial cuidado a la hora de estimar el valor de la entropía conformacional y el ASA en el caso de toxinas de naturaleza no proteica, en este caso se utilizó la ecuación propuesta por Bardy y col.,¹³⁰ que relaciona el número de enlaces con rotación (-1.76 cal K^{-1} por enlace) y el número de átomos ($0.414 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ por átomo) (**Ecuación III.11**) para corregir el efecto del volumen excluido.

$$\Delta S_{conf} = -1.76 N_{er} + 0.414 N_{atom} \quad \text{Ecuación III.11}$$

Por último, la asociación de dos o más moléculas reduce los grados de libertad disponibles para las mismas, produciendo un cambio en la entropía traslacional y rotacional ΔS_{rt} . Ha habido una considerable discusión acerca de la magnitud de este valor ya que no existen cálculos exactos disponibles. En nuestros cálculos, se utilizó el valor de la entropía crítica a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ^{123,128,131,132} igual a 8 Kcal mol^{-1} .

¹³⁰ Bardi J.; Luque, I.; Freire, E. *Biochemistry*, **1997**, *36*, 6588–6596.

¹³¹ Tamura, A.; Privalov, P. L. *J. Mol. Biol.*, **1997**, *273*, 1048–1060.

¹³² Amzel, M. L. *Proteins Struct. Funct. Genet.*, **1997**, *28*, 144–149.

III.4.2.- Cálculo de Parámetros Termodinámico del Complejo PP1-AO

A continuación se describe la utilización de la aproximación anteriormente descrita sobre la estructura de rayos X del complejo AO-PP1c (**Figura III.30**) para el cálculo teórico de la constante de afinidad y otros parámetros termodinámicos. En primer lugar, se calculó el ASA para todos los átomos del complejo así como para la PP1c y el AO individualmente. A continuación se obtuvieron las diferencias de ASA (Δ ASA) para todos los átomos de la PP1c y el AO antes y durante la interacción. Finalmente, se calculó ΔG° para cada residuo tal y como se explicó en la introducción anterior. Los cambios en ASA por residuo, polares y no polares, en la disociación del complejo se representan en las **Figuras III.31-III.32** y los de ΔG° en la **Figura III.33** y en la **Tabla III.10**.

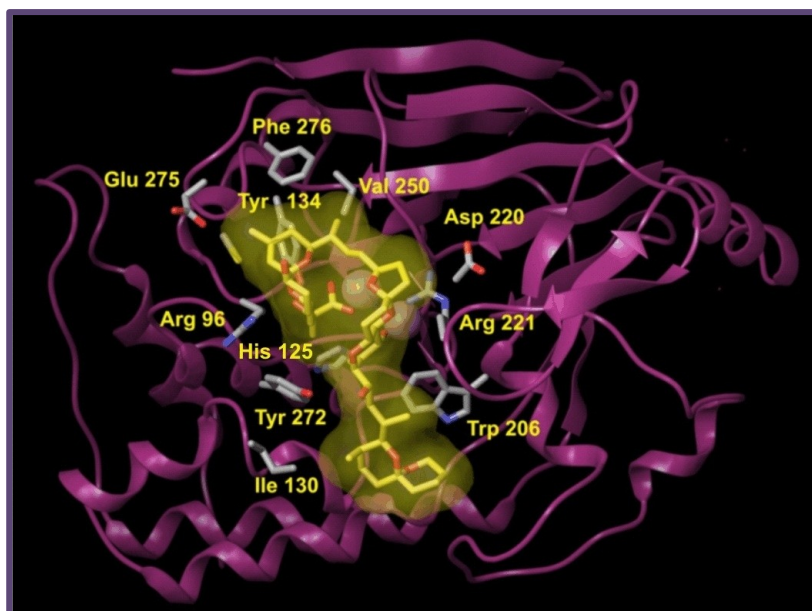


Figura III.30.- Imagen del complejo PP1c-AO, donde se pueden observar los residuos de la proteína responsables de la interacción.

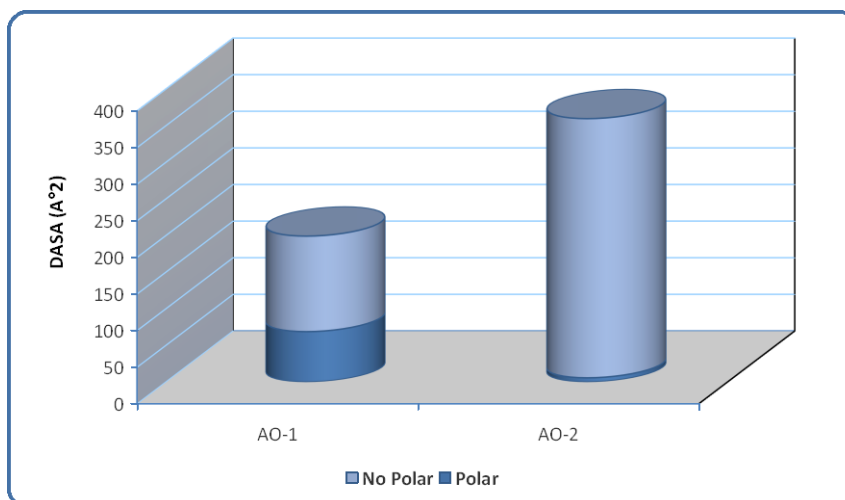


Figura III.31.- Cambio de ASA por residuo del AO con la asociación del complejo PP1c-AO, en azul oscuro se representa la superficie polar y en azul claro la no polar. AO-1 y AO-2 representan los fragmentos C-1→C-24 y C-25→C-38, respectivamente.

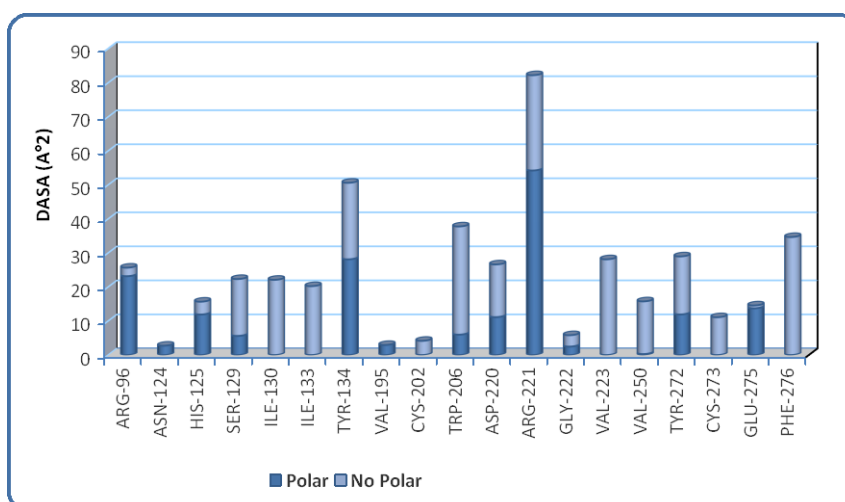


Figura III.32.- Cambio de ASA por residuo de la enzima con la asociación del complejo PP1c-AO, en azul oscuro se representa la superficie polar y en azul claro la no polar.

El AO en estado libre presenta un valor de ASA para la parte no polar de 837 Å² y para la polar de 146 Å², mientras que para la PP1c el ASA no polar es de 6928 Å² y la no polar de 5909 Å². En el caso de la proteína los cálculos también se realizaron para cada residuo. Como ya se ha dicho, debe tenerse especial cuidado a la hora de realizar la estimación de la entropía conformacional con estructuras de naturaleza no proteica, así para llevar a cabo los cálculos con el AO, el ligando se dividió en dos partes, el fragmento que denominamos AO-1, que comprende la región C-1→C-24 y AO-2, que comprende la región C-25→C-38. Se decidió hacerlo de esta manera para aprovechar la formación de un pseudo-macrocielo⁶⁵ estabilizado por un puente de hidrógeno entre el hidroxilo del carbonilo en C-1 y el hidroxilo que se encuentra en C-24, que confiere a esta región menor flexibilidad, al tiempo que se mantiene otra región con mayor movilidad. Esta aproximación es similar a la que se realizó con el cálculo de estos parámetros en el caso de la microcistina con este mismo enzima.¹²⁰ En la **Tabla III.10** se muestran los parámetros termodinámicos para todo el complejo y para los residuos del compuesto que sufren cambios en ASA después de la disociación.

El análisis de los resultados nos muestra que la energía libre de asociación calculada es favorable, $\Delta G^\circ(25) = -9.3 \text{ Kcal mol}^{-1}$, lo que equivale a una K_d de 159 nM. Este valor se correlaciona perfectamente con el valor publicado para la K_i ⁶² de 145 nM. Aunque estos dos parámetros no son formalmente iguales (no hemos encontrado valores K_d en la literatura), si han de estar en un orden comparable como de hecho ocurre. La asociación se encuentra gobernada por una entropía de asociación, $-T \Delta S^\circ(25) = -17.6 \text{ Kcal mol}^{-1}$ favorable y compensada por una entalpía de asociación desfavorable $\Delta H^\circ(25) = 8.4 \text{ Kcal mol}^{-1}$. Mirando los resultados con más detalle, es evidente que la mayor parte de la afinidad viene del cambio favorable en la entropía de solvatación, $-T \Delta S_{sol}^\circ(25) = -23.92 \text{ Kcal mol}^{-1}$, que implica esta interacción entre el AO y la PP1c. Si nos fijamos en la **Figura III.33**, el residuo AO-1, es el que más contribuye a la afinidad, con un ΔG° de $-3.4 \text{ Kcal mol}^{-1}$, y ese aporte se debe más a una $-T \Delta S_{sol}^\circ(25)$ favorable que a un $\Delta H^\circ(25)$, que es muy débilmente desfavorable, lo que

nos indica que la pérdida de las interacciones no covalentes favorables en la interfase del complejo es compensada por un cambio en la entropía de solvatación de las superficies expuestas al disolvente después de la asociación (**Tabla III.10**). Estos datos nos indican que esta parte de la molécula es importante para la unión con el ligando, como de hecho se ha observado, ya que modificaciones en esta parte del compuesto disminuyen considerablemente su afinidad por la PP1.⁶² Por otro lado, el residuo AO-2, que es el responsable de una gran parte del cambio en la superficie no polar, $\Delta ASA_{np} = 353.9 \text{ \AA}^2$, contribuye a la afinidad del ligando fundamentalmente a través del efecto hidrofóbico, aunque algo menos que el AO-1 en su globalidad (**Figura III.31** y **Tabla III.10**). En este caso, el AO-2 tiene una mayor contribución a la entropía de solvatación, $-T \Delta S_{sol}^{\circ}(25) = -12.1 \text{ Kcal mol}^{-1}$ (**Tabla III.10**), pero también se puede observar que $T \Delta S_{sol}^{\circ}(25)$ para este residuo se encuentra compensada por una $\Delta H^{\circ}(25)$ muy desfavorable y una $-T \Delta S_{conf}^{\circ}(25)$ también algo desfavorable (**Tabla III.10**).

Si analizamos de manera global los datos termodinámicos, se puede observar que la entalpía de asociación, $\Delta H^{\circ}(25) = 8.4 \text{ Kcal mol}^{-1}$, que es desfavorable, se ve compensada por una entropía de solvatación muy favorable para la formación del complejo. Hay que tener en cuenta, que otros factores como la transferencia de protones, que podría contribuir a la entalpía de disociación no se han considerado. Y además, no se dispone de valores de entalpía o entropía de asociación experimentales que nos permita comparar la entropía y entalpía de asociación calculada con la parametrización utilizada.

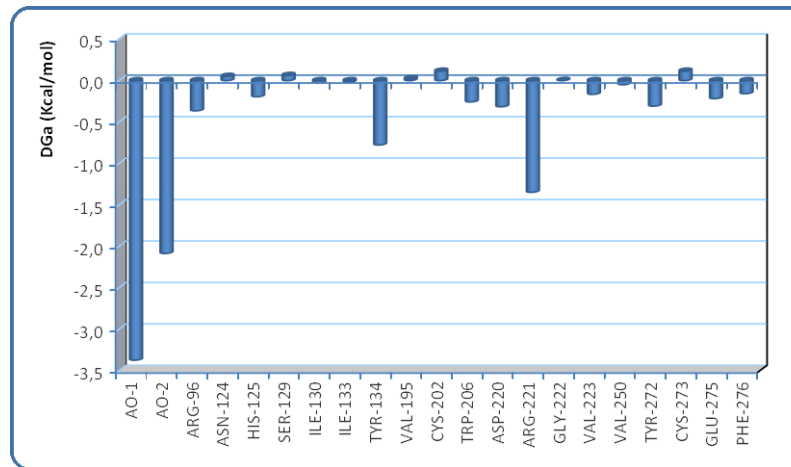


Figura III.33.- Datos de ΔG° (25) correspondientes al AO y a la PP1c.

	ΔASA_{np}^a	ΔASA_{pol}^a	ΔCp^b	$\Delta H_a^{\circ c}$	$-T\Delta S_a^{\circ c}$	$-T\Delta S_{sol}^{\circ c}$	$-T\Delta S_{conf}^{\circ c}$	$\Delta G_a^{\circ c}$	K_d
PP1c-AO	762.4	248.7	-0.278	8.372	-17.6	-23.9	3.9	-9.3	159 nM
AO-1	130.4	68.7	-0.041	0.373	-3.7	-3.8	0.0	-3.4	
AO-2	353.9	5.6	-0.158	8.334	-10.4	-12.1	1.6	-2.1	
PP1c	278.0	174.3	-0.080	-0.335	-3.5	-8.0	-2.3	-3.8	

Tabla III.10.- Parámetros termodinámicos calculados para la disociación del complejo de rayos-X PP1c-AO así como de la enzima y los residuos individuales del AO (a: \AA^2 ; b: Kcal/mol K; c: Kcal/mol).

III.4.3.- Cálculo de Parámetros Termodinámicos el Complejo PP1-19-*epi*-Okadaico

Los valores determinados experimentalmente para el IC_{50} del AEO no son fáciles de interpretar para nosotros en términos estructurales. Esto motivó que como primera aproximación realizáramos, siguiendo la metodología anterior, una estimación de la afinidad que tendría el hipotético complejo resultante de la superposición directa de las dos regiones AEO-1 (C-1→C-24) y AEO-2 (C-25→C-38), en las que dividimos esta molécula, con las del AO, tal y como se indica en la **Figura III.34**. La superposición de la región AEO-1 es imposible ya que existe un claro conflicto estérico (**Figura III.34 (B)**). Por lo que partimos de la superposición de AEO-1 (**Figura III.34 (A)**) para realizar con el AEO los mismos cálculos que se llevaron a cabo con el AO en el apartado anterior. En las **Figuras III.35** y **III.36** se muestran las diferencias de ASA en los distintos residuos del complejo.

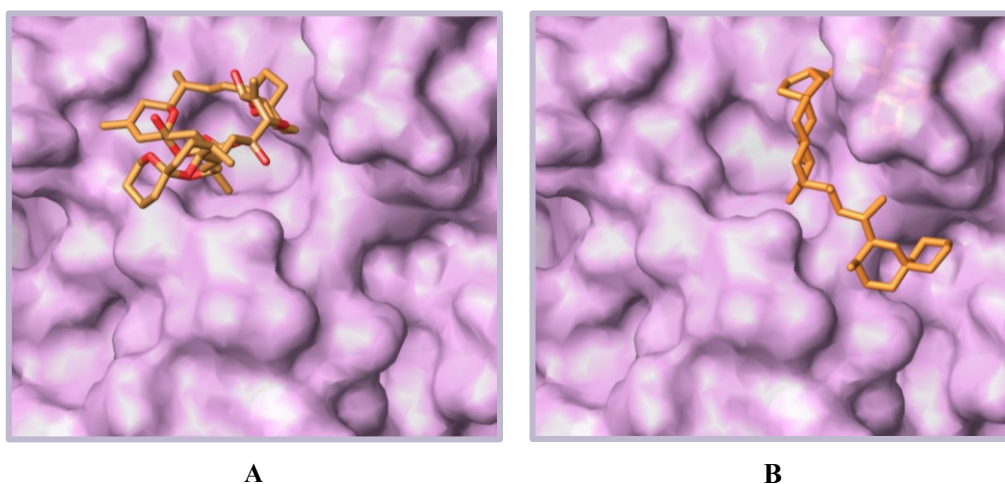


Figura III.34.- Imágenes de la unión del AEO a la PP1c si se superpone en la zona de unión del AO. En la figura **A** se ha superpuesto el residuo AEO-1 con el AO-1, y en la figura **B** la superposición ha tenido lugar entre el residuo AEO-2 y el AO-2.

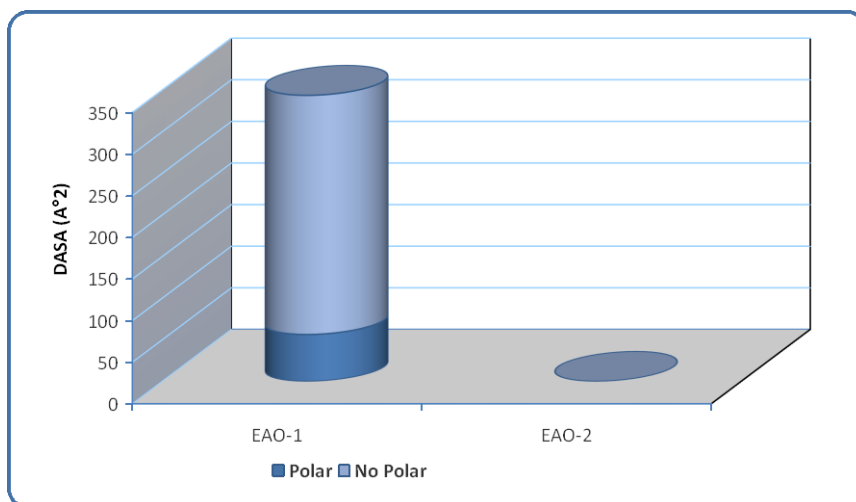


Figura III.35.- Cambio de ASA por residuo del AEO con la asociación del complejo PP1c-AEO, en azul oscuro se representa la superficie polar y en azul claro la no polar. AEO-1 y AEO-2 representan los fragmentos C-1→C-24 y C-25→C-38, respectivamente.

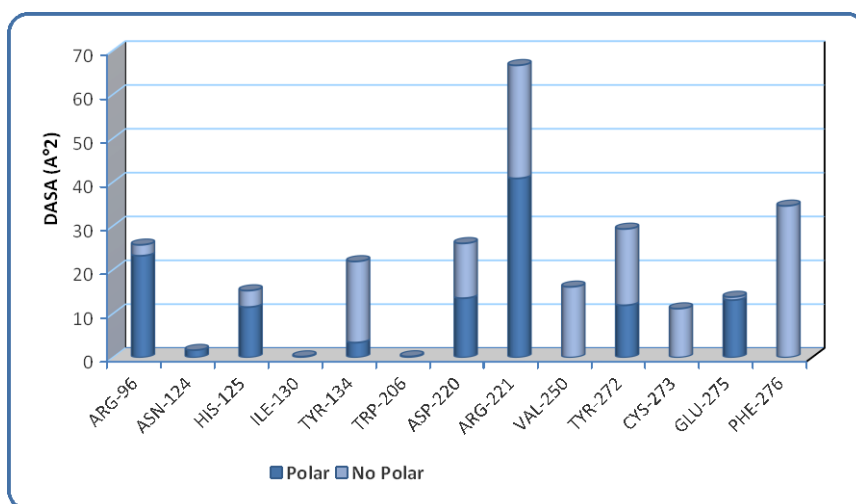


Figura III.36.- Cambio de ASA por residuo de la enzima con la asociación del complejo PP1c-AEO, en azul oscuro se representa la superficie polar y en azul claro la no polar.

Los resultados obtenidos de los cálculos termodinámicos con este ligando se muestran en la **Tabla III.11** y la **Figura III.37**. Si analizamos los datos, nos encontramos con una entropía de solvatación global, $-T \Delta S_{sol}^{\circ}(25) = -9.3 \text{ Kcal mol}^{-1}$, de nuevo favorable, que es contrarrestada por una entalpía global desfavorable, $\Delta H_a^{\circ}(25) = 3.3 \text{ Kcal mol}^{-1}$. Sin embargo, en este caso, como es lógico si nos fijamos en la estructura del complejo analizado, sólo hay contribución del residuo AEO-1. El valor calculado para la K_d , $37.9 \mu\text{M}$, difiere mucho de la K_i , $0.6 \mu\text{M}$, que se determinó de acuerdo a la relación propuesta por Cheng y col.,^{133,134} sugiriendo que el ligando no se une a la proteína en la forma analizada. Esto abre un nuevo campo de trabajo, ya que ahora sería interesante iniciar estudios de *docking*, RMN, etc. para saber como tiene lugar la unión de este ligando a la proteína.

¹³³ Cheng, Y. C.; Prusoff, W. H. *Biochemical Pharmacology*, **1973**, *22*, 3099-3108.

¹³⁴

$$\frac{(IC_{50})_1}{(IC_{50})_2} = \frac{(K_i)_1}{(K_i)_2}$$

$(IC_{50})_1$ concentración de compuesto 1 que produce el 50% de inhibición.
 $(IC_{50})_2$ concentración de compuesto 2 que produce el 50% de inhibición.
 $(K_i)_1$ constante de inhibición del compuesto 1
 $(K_i)_2$ constante de inhibición del compuesto 2

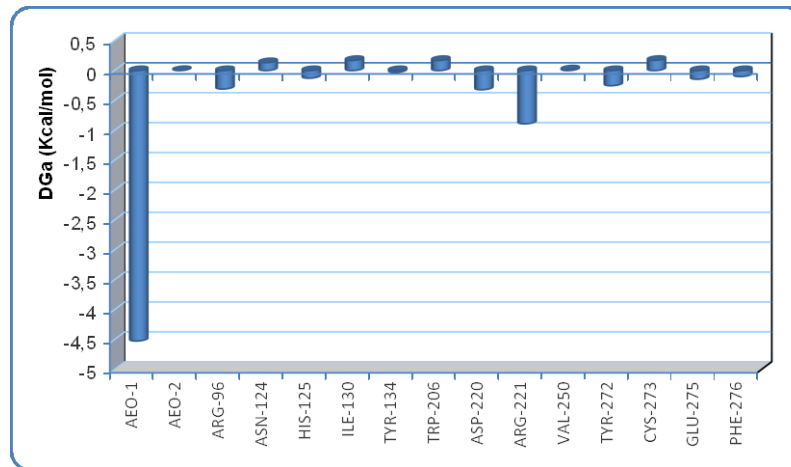


Figura III.37.- Datos de ΔG° (25) correspondientes al AEO y a la PP1c.

	ΔASA_{np}^a	ΔASA_{pol}^a	ΔCp^b	$\Delta H_a^{\circ c}$	$-T\Delta S_a^{\circ c}$	$-T\Delta S_{sol}^{\circ c}$	$-T\Delta S_{conf}^{\circ c}$	$\Delta G_a^{\circ c}$	K_d
PP1+AEO	431.0	175.6	-0.115	3.313	-9.3	-13.2	1.5	-6.0	37.9 μ M
AEO-1	287.4	56.3	-0.115	4.670	-9.2	-9.4	0.0	-4.5	
AEO-2	0.0	0.0	0.000	0.000	0.0	0.0	0.0	0.0	
PP1	143.6	119.30	-0.034	-1.357	-0.1	-3.8	1.5	-1.5	

Tabla III.11.- Parámetros termodinámicos calculados para la disociación del complejo PP1c-AEO así como de la enzima y los residuos individuales del AEO (a: \AA^2 ; b: Kcal/mol K; c: Kcal/mol).

IV.- ESTUDIO DEL ÁCIDO BELIZEÁNICO

IV.1- ESTUDIO DE ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DEL ÁCIDO BELIZEÁNICO

IV.2.- ESTUDIO CONFORMACIONAL DEL ÁCIDO BELIZEÁNICO

IV.2.1.- Búsqueda conformacional del Ácido Belizeánico

IV.2.2.- Obtención de datos experimentales a partir de la RMN

**IV.2.3.- Análisis de los resultados de modelización a partir de los
datos de RMN**

**IV.2.4.- Estudios de Dinámica molecular con los confórmeros
resultantes para los isómeros 16*S**19*S**, 16*S**19*R**,
16*R**19*S** y 16*R**19*R****

IV.2.5.- Análisis de los Resultados

IV.3.- PROPUESTA BIOSINTÉTICA PARA EL ÁCIDO BELIZEÁNICO

IV. ESTUDIO DEL ÁCIDO BELIZEÁNICO

IV.1- ESTUDIO DE ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DEL ÁCIDO BELIZEÁNICO

El Ácido Beliceánico (AB) se purificó como un sólido amorfo de color blanco, $[\alpha]_D^{25} = +2.7$, y su fórmula molecular fue establecida como $C_{44}H_{72}O_{14}$ de acuerdo al pico observado en el masas a m/z 847.4820 $[C_{44}H_{72}O_{14}+Na]^+$, y en su espectro de IR se observó una banda intensa (1732 cm^{-1}) correspondiente al grupo ácido.

El espectro de RMN de protón para este compuesto mostró una gran relación con el del AO, aunque con variaciones en algunas señales (**Figura IV.1** y **IV.2**). Sin embargo, dada la poca cantidad aislada y la inestabilidad del compuesto, la calidad de los espectros monodimensionales no era muy alta, por lo que tanto para la asignación de los desplazamientos de protón como para los de carbono hubo que recurrir a la espectroscopía bidimensional homo y heteronuclear. Las correlaciones observadas en los espectros HSQC y HMBC nos indicaron la existencia de 17 metinos (tres vinílicos), 16 metilenos (1 vinílico), 5 metilos (uno sobre un doble enlace) y 6 carbonos cuaternarios. Y la comparación de los desplazamientos químicos observados con aquellos establecidos para el AO, indicó que las diferencias entre ambas moléculas estaban localizadas en el fragmento C-11→C-24, en tanto que los desplazamientos químicos para el resto de las señales de protón y de carbono eran muy similares. (**Tabla IV.1** y **Figura IV.3**).

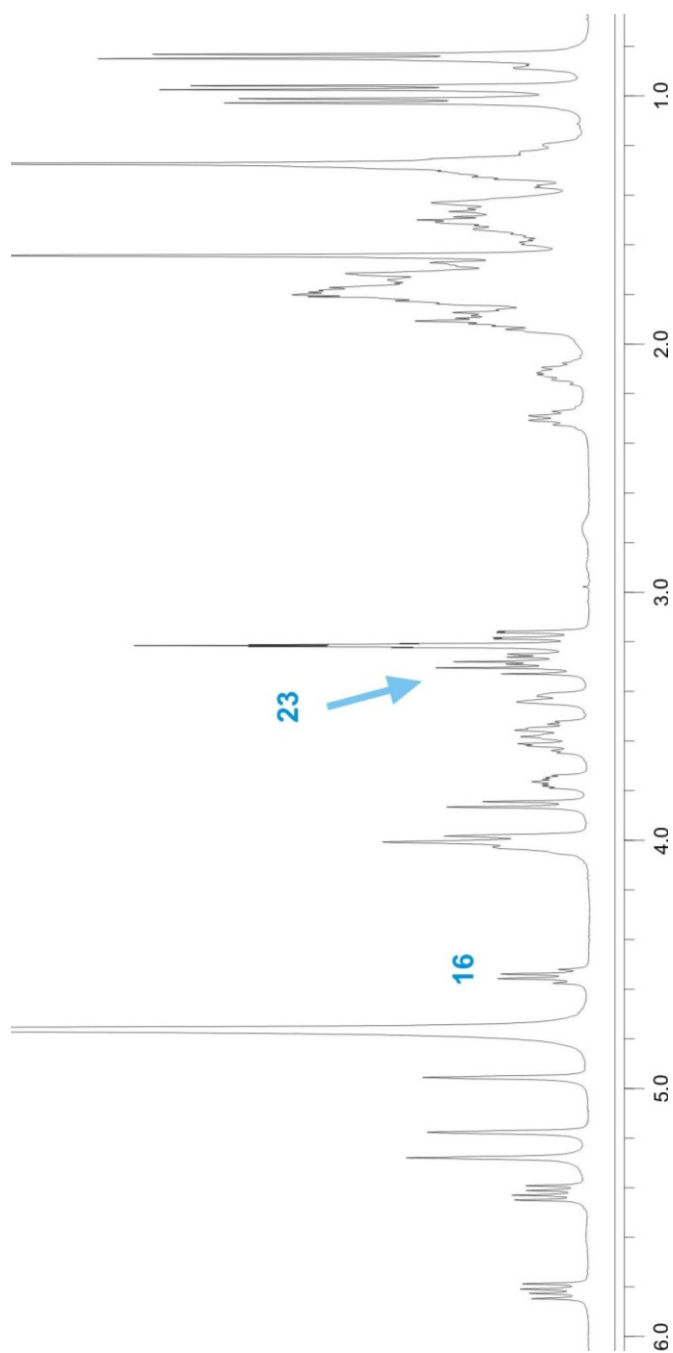


Figura IV.1.- Espectro RMN¹H del AO en CD₃OD.

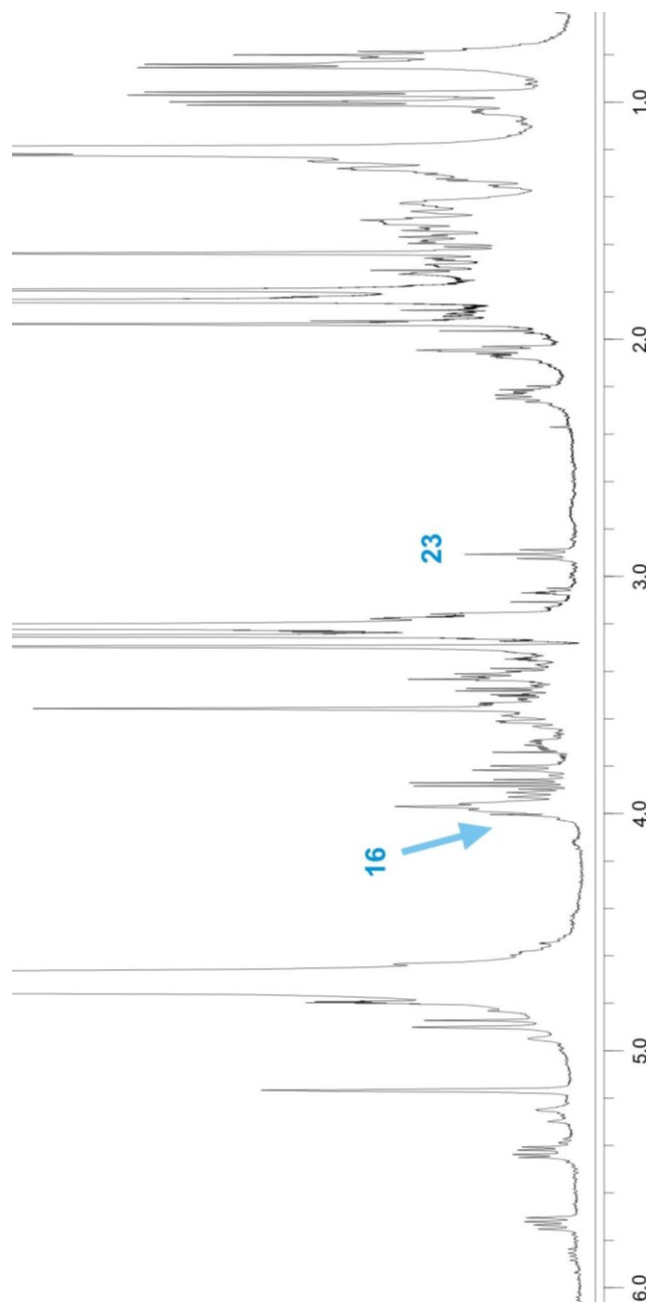


Figura IV.1.- Espectro RMN¹H del AB en CD₃OD.

Carbono	AO		AB	
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
14	137.2	5.81	134.5	5.74
15	131.9	5.34	133.9	5.44
16	80.2	4.52	71.9	3.97
17	31.0	2.08/1.43	31.8	1.65(2H)
18	37.7	1.88/1.72	31.0	1.52(2H)
19	106.5		70.7	3.57
20	33.4	1.84/1.72	27.6	1.60(2H)
21	27.5	1.90/1.75	27.3	2.08(2H)
22	71.1	3.50	74.0	3.55
23	78.1	3.28	78.1	2.91

Tabla IV.1.- Desplazamientos químicos del fragmento C-11→C-23 en el AO y en el AB.

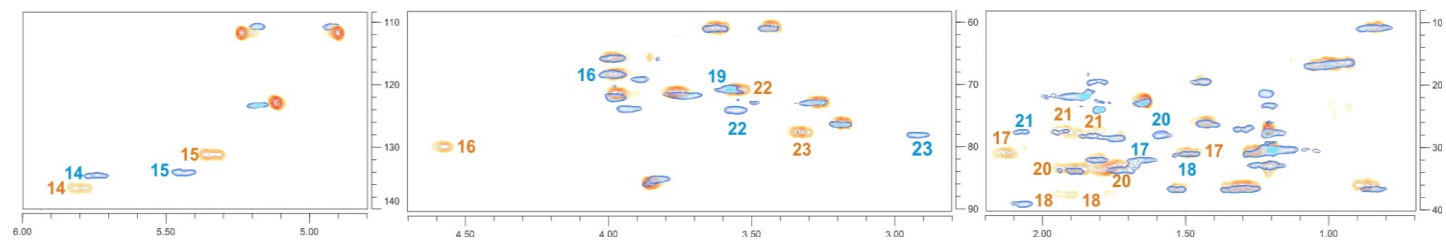
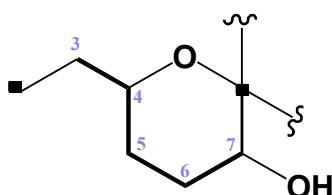
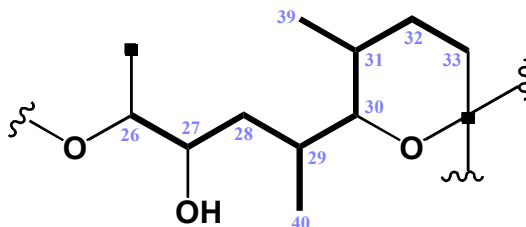


Figura IV.3.- Superposición del espectro de HSQC para el fragmento C-14→C-23. El espectro naranja se corresponde con el AO y el espectro azul pertenece al AB.

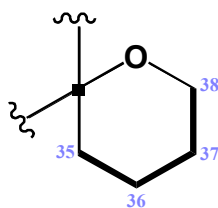
En efecto, los fragmentos **A** (C-3→C-7), **C** (C-26→C-33) y **D** (C-35→C-38) se establecieron a partir de las conectividades observadas en el experimento COSY y las correlaciones del experimento HSQC, resultando idénticos a los presentes en el AO. Estos fragmentos se encuentran abreviados en la **Figura IV.4**.



Fragmento A: **H**₂-**3** (δ_{H} 1.82 y 1.60, δ_{C} 46.2) → **H**-**4** (δ_{H} 3.97, δ_{C} 68.0) → **H**₂-**5** (δ_{H} 1.70 y 1.20, δ_{C} 32.7) → **H**₂-**6** (δ_{H} 1.83 y 1.59, δ_{C} 27.8) → **H**-**7** (δ_{H} 3.27, δ_{C} 72.8)



Fragmento C: **H**-**26** (δ_{H} 3.82, δ_{C} 85.1) → **H**-**27** (δ_{H} 3.8, δ_{C} 65.6) → **H**₂-**28** (δ_{H} 1.29 y 0.85, δ_{C} 36.4) → **H**-**29** (δ_{H} 1.82, δ_{C} 31.7) → **H**₃-**40** (δ_{H} 0.97, δ_{C} 16.2); **H**-**30** (δ_{H} 3.18, δ_{C} 76.3) → **H**-**31** (δ_{H} 1.74, δ_{C} 28.3) → **H**₃-**39** (δ_{H} 0.85, δ_{C} 10.7); **H**₂-**32** (δ_{H} 1.96 y 1.28, δ_{C} 27.4) → **H**₂-**33** (δ_{H} 1.27, δ_{C} 30.8).



Fragmento D: **H**₂-**35** (δ_{H} 1.54, 1.33, δ_{C} 36.4) → **H**₂-**36** (δ_{H} 1.81, 1.44, δ_{C} 19.2) **H**₂-**37** (δ_{H} 1.44, δ_{C} 25.9) → **H**₂-**38** (δ_{H} 3.63, 3.42, δ_{C} 60.8).

Figura IV.4.- Fragmentos del AB equivalentes a los del AO. Las correlaciones COSY se señalan en trazado grueso.

Los fragmentos **C** y **D** se pudieron unir por las correlaciones proporcionadas por el experimento HMBC entre el carbono cuaternario C-34 (δ_C 96.2) y los protones H₂-33 (δ_H 1.27) y H-35 (δ_H 1.54). A su vez, el **fragmento A** se conectó al carbono cuaternario C-2 por las correlaciones del metilo H₃-44 (δ_H 1.20) con los carbonos C-2 (δ_C 76.6) y C-3 (δ_C 46.2), mientras que las de C-1 (δ_C 182.5) con H-3 (δ_H 1.60) y H₃-44 permitieron fijar el grupo ácido. (**Figura IV.5**).

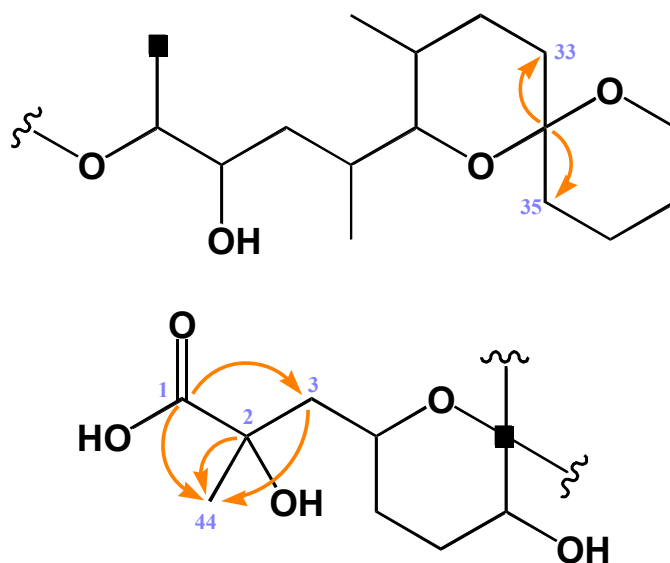


Figura IV.5.- Correlaciones de HMBC para los fragmentos **A**, **C** y **D**.

Obviamente el fragmento diferente era el **B**, y el punto de partida para su estudio fue el doble enlace *trans* C-14→C-15 ($J = 15.4$ Hz). En efecto, partiendo de los protones H-14 (δ_H 5.74) y H-15 (δ_H 5.44), fácilmente identificables en el espectro de protón, se establecieron en el experimento COSY las siguientes conectividades (**Figura IV.6**). El primero de estos protones, H-14, mostró un pico de correlación con el protón alílico H-13 (δ_H 2.26), el cual a su vez se correlacionó con el metino H-12 (δ_H

3.72) y con el metilo H₃-42 (δ_H 1.03). Esta secuencia se cierra con la conectividad entre el protón H-12 y el metileno H₂-11 (δ_H 1.91 y 1.73). Partiendo del otro protón olefínico, H-15, se conectó con el metino H-16 (δ_H 3.97) y éste se correlacionó con el metileno H₂-17 (δ_H 1.65). En este punto fue imposible seguir las conectividades del experimento COSY debido al solapamiento de las señales de protón provenientes de ésta parte de la molécula. Para solventar este problema se recurrió al experimento TOCSY-1D excitando de forma selectiva la señal aislada del protón H-15, lo que nos permitió verificar la secuencia H-11 (δ_H 1.91, 1.73) \rightarrow H-18 (δ_H 1.52). (**Figura IV.7**).

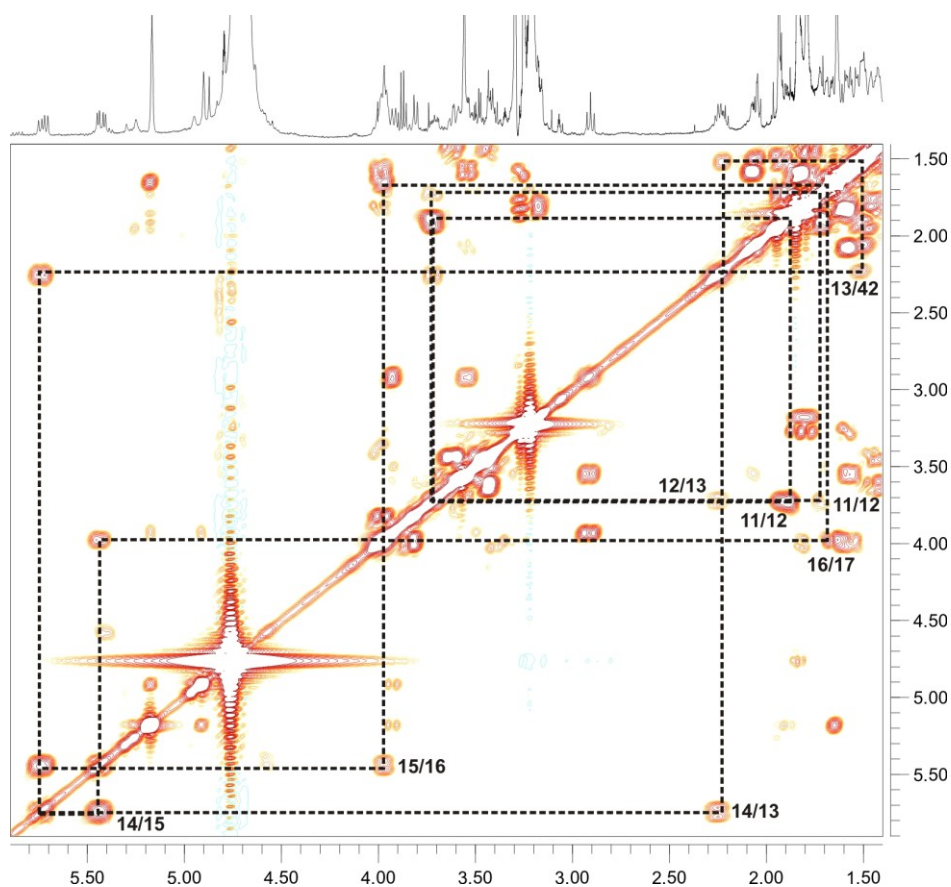


Figura IV.6.- Sección del espectro de COSY para la secuencia C-11 \rightarrow C-17.

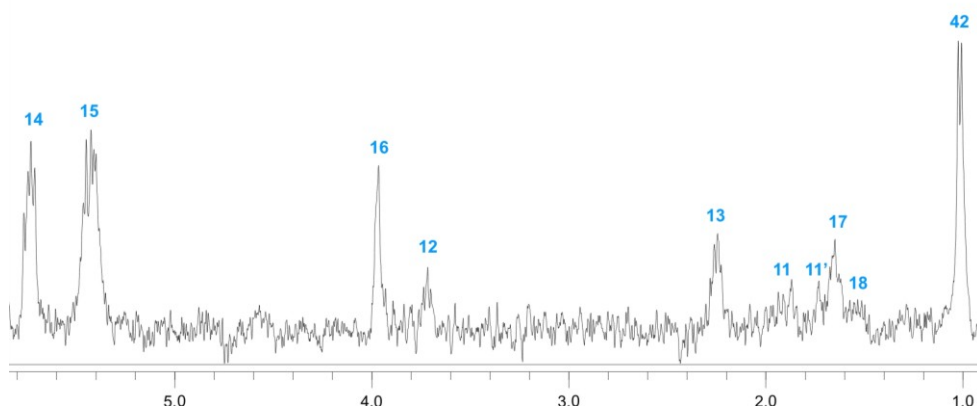


Figura IV.7.- Espectro TOCSY-1D excitando sobre el protón H-15.

En el otro extremo del fragmento, el protón H-24 (δ_{H} 3.93) aparecía conectado en el experimento COSY con H-23 (δ_{H} 2.91) y éste a su vez con el metino H-22 (δ_{H} 3.55). Así mismo, a partir de éste último se pudo establecer la secuencia H-22→H₂-21 (δ_{H} 2.08)→H₂-20 (δ_{H} 1.60) (**Figura IV.8**). Toda esta secuencia también se pudo observar en el TOCSY-2D.

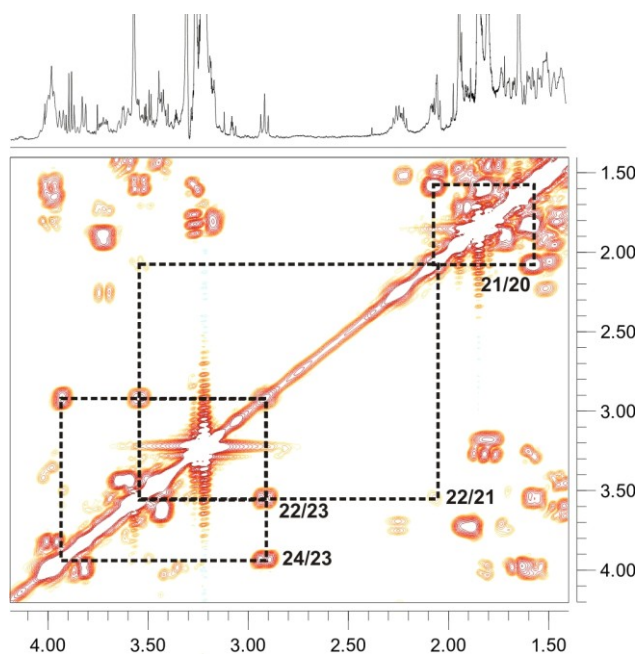


Figura IV.8.- Zona seleccionada del espectro COSY para la secuencia C-20→C-24.

Sin lugar a dudas, el cambio más relevante observado para las señales de protón de este fragmento del nuevo metabolito en comparación con el AO es la aparición de un nuevo metino en la zona de protones geminales a un oxígeno. Además, la identificación de los desplazamientos químicos correspondientes a los metilenos H-18 y H-20, nos permitió conectarlos en el experimento COSY con el nuevo metino H-19 (δ_H 3.57), cerrando todas las conectividades del nuevo fragmento. (Figuras IV.9 y IV.10).

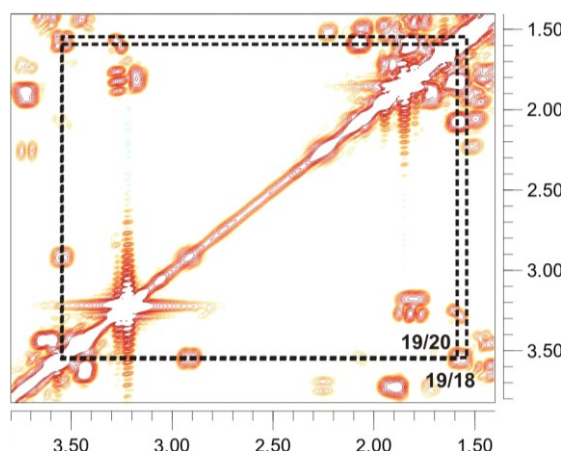


Figura IV.9.- Zona seleccionada del COSY para la secuencia C-18→C-20.

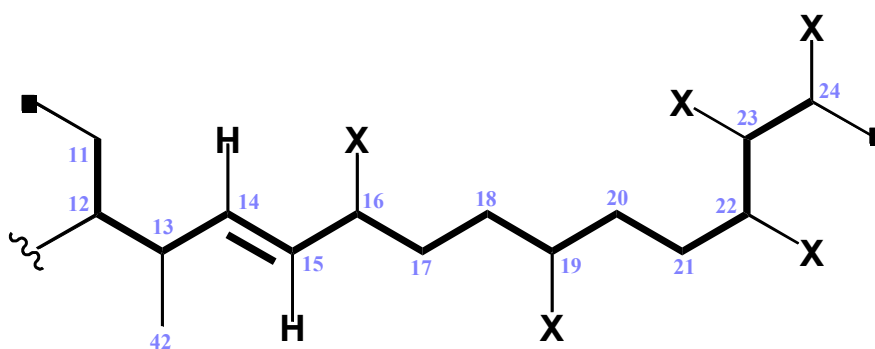
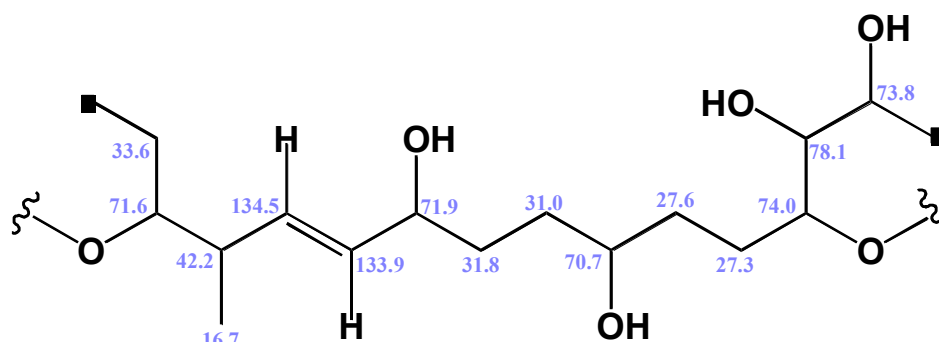


Figura IV.10.- Estructura plana del **fragmento B**. En negrita se muestran las correlaciones COSY.

Una vez identificados los protones de este fragmento se asignaron los desplazamientos de carbono correspondientes a través del HSQC. En este experimento se confirmó la existencia de dos metinos de naturaleza olefínica, C-14 (δ_C 134.5) y C-15 (δ_C 133.9), la de los seis metinos en α a un oxígeno, C-12 (δ_C 71.6), C-16 (δ_C 71.9), C-19 (δ_C 70.7), C-22 (δ_C 74.0), C-23 (δ_C 78.1) y C-24 (δ_C 73.8) junto a un

metino alílico C-13 (δ_C 42.2), y la de cinco metilenos, C-11 (δ_C 33.6), C-17 (δ_C 31.8), C-18 (δ_C 31.0), C-20 (δ_C 27.6), C-21 (δ_C 27.3) y de un metilo C-42 (δ_C 16.7). (**Figura IV.11**).

Este resultado pone de manifiesto, en consonancia con la aparición del nuevo protón en α a un oxígeno, la ausencia del carbono cuaternario cetálico característico del AO y derivados que es sustituido por un metino centrado a δ_C 70.7.



H₂-11 (δ_H 1.91 y 1.74, δ_C 33.6) ← **H-12** (δ_H 3.72, δ_C 71.6), **H₃-42** (δ_H 1.03, δ_C 16.7) ← **H-13** (δ_H 2.26, δ_C 42.2) ← **H-14** (δ_H 5.74, δ_C 134.5 → **H-15** (δ_H 5.44, δ_C 133.9) → **H-16** (δ_H 3.97, δ_C 71.9) →, **H₂-17** (δ_H 1.65, δ_C 31.8) → **H₂-18** (δ_H 1.52, δ_C 31.0) → **H-19** (δ_H 3.57, δ_C 70.7) → **H₂-20** (δ_H 1.60, δ_C 27.6) → **H₂-21** (δ_H 2.08, δ_C 27.3) → **H-22** (δ_H 3.55, δ_C 74.0) → **H-23** (δ_H 2.91, δ_C 78.1) → **H-24** (δ_H 3.93, δ_C 73.8).

Figura IV.11.- Desplazamientos de protón y carbono para el **fragmento B**.

Una vez identificado el fragmento central **B**, su unión con el resto de la molécula se realizó de acuerdo a las correlaciones presentes en el HMBC. El carbono cuaternario C-25 (δ_C 146.4) se correlacionó con los protones H-24 (δ_H 3.93) y H-26 (δ_H 3.82), mientras que los protones olefinicos H₂-41 (δ_H 5.18 y 4.92) se correlacionaron

con los metinos C-24 (δ_C 73.8) y C-26 (δ_C 85.1), lo que permitió unir los fragmentos **B** y **C** a través del carbono cuaternario C-25.

Por otro lado, se observaron conectividades de H-9 (δ_H 5.18) con C-8 (δ_C 97.6), C-11 (δ_C 33.6) y C-43 (δ_C 22.5), al igual que entre H₃-43 (δ_H 1.65) y C-10 (δ_C 139.3). De manera que permitieron situar a los carbonos cuaternarios C-8 y C-10, a la vez que unir los fragmentos **A** y **B**. (Figura IV.12).

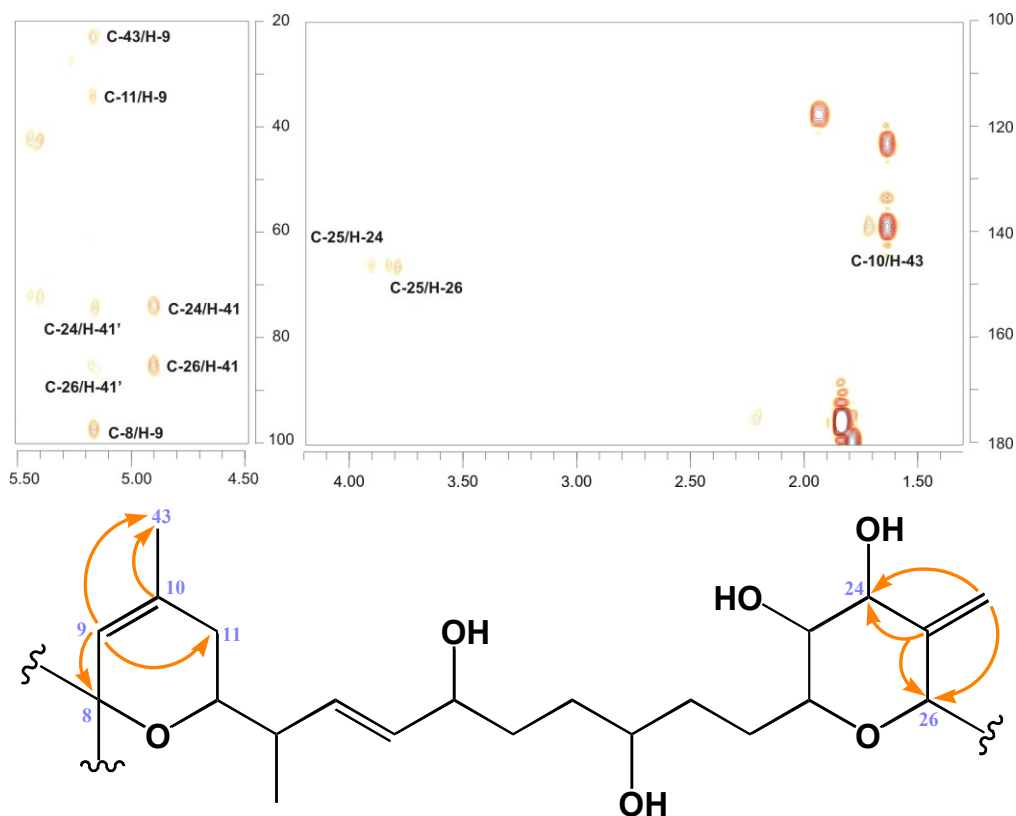


Figura IV.12.- Espectro de HMBC y correlaciones más significativas para los fragmentos **A**, **B**, y **C**.

Llegados a este punto se propone para este compuesto una estructura en la que aparecen dos regiones, C-1 → C-15 y C-22 → C-38, que coinciden con las regiones equivalentes en el AO. Sin embargo, la zona C-16 → C-21 presenta diferencias, ya que los anillos C y D característicos del AO no se encuentran en este compuesto, teniendo en su lugar una cadena abierta con dos alcoholes secundarios en las posiciones C-16 y C-19, así como sobre el metino del anillo C-23. (**Figura IV.13**)

La estereoquímica de esta molécula se asignó en base a las señales observadas en el experimento ROESY. Este estudio nos llevo a una situación configuracional equivalente a la de AO en todos aquellos centros que se mantienen inalterados. Pero, en el caso de los carbonos C-16 y C-19 no ha sido posible determinar su configuración debido a la falta de diastereotopía en los metilenos adyacentes.

Por lo tanto, finalizado el estudio estructural, se propone la existencia de un nuevo compuesto aislado del *P. belizeanum*. Dicha estructura se encuentra representada en la **Figura IV.13**, y se trata de un posible metabolito secundario involucrado en la biosíntesis del cabeza de serie AO.

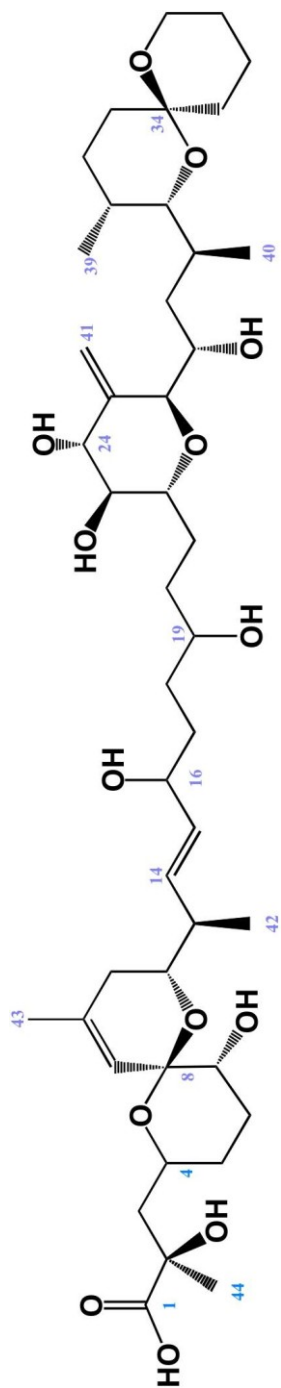


Figura IV.14.- Estructura del AB.

Carbono	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Carbono	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Carbono	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
1	182.5		16	71.9	3.97	31	28.3	1.74
2	76.6		17	31.8	1.65(2H)	32	27.4	1.96/1.28
3	46.2	1.82/1.60	18	31.0	1.52(2H)	33	30.8	1.27
4	68.0	3.97	19	70.7	3.57	34	96.2	
5	32.7	1.70/1.20	20	27.6	1.60(2H)	35	36.4	1.54/1.33
6	27.8	1.83/1.59	21	27.3	2.08(2H)	36	19.2	1.81/1.44
7	72.8	3.27	22	74.0	3.55	37	25.9	1.44
8	97.6		23	78.1	2.91	38	60.8	3.63/3.44
9	123.2	5.18	24	73.8	3.93	39	10.7	0.85
10	139.3		25	146.4		40	16.2	0.97
11	33.6	1.91/1.73	26	85.1	3.82	41	110.6	5.18/4.92
12	71.6	3.72	27	65.6	3.98	42	16.7	1.03
13	42.2	2.26	28	36.4	1.29/0.85	43	22.5	1.65
14	134.5	5.74	29	31.7	1.82	44	30.1	1.20
15	133.9	5.44	30	76.3	3.18			

Tabla IV.2.- Datos de RMN¹H y RMN¹³C para el AB en CD₃OD.

IV.2.- ESTUDIO CONFORMACIONAL DEL ÁCIDO BELIZEÁNICO

Una vez concluido el estudio estructural del ácido Belizeánico (AB), y debido a la relación existente entre la conformación que adoptan este tipo de moléculas y su actividad, se inició un estudio conformacional con este metabolito. A su vez se intentó resolver la estereoquímica de los centros quirales, C-16 y C-19. Como punto de partida para abordar este problema se tomaron los cuatro posibles isómeros $16S^*19S^*$, $16S^*19R^*$, $16R^*19S^*$ y $16R^*19R^*$, para así posteriormente comparar los resultados teóricos con los datos obtenidos de distintos experimentos espectroscópicos. Por lo tanto, lo que planteamos es resolver un problema estereoquímico a la vez que conformacional a través de una herramienta como es la mecánica molecular.

IV.2.1.- Búsqueda conformacional del Ácido Belizeánico

En el caso del AB las búsquedas conformacionales se realizaron sin ningún tipo de restricción. Fue posteriormente, en el análisis de estos resultados, cuando se tuvieron en cuenta las restricciones experimentales. Nuevamente el programa que se utilizó para realizar los estudios computacionales fue MacroModel 8.5.

Las búsquedas conformacionales se desarrollaron con los cuatro posibles isómeros indicados anteriormente, $16S^*19S^*$, $16S^*19R^*$, $16R^*19S^*$, $16R^*19R^*$, manteniendo en todos los casos las mismas condiciones de estudio. La estructura de partida que se tomó para cada isómero fue la generada con el Chem3D-ultra (versión 7.0) a partir de la estructura de rayos-X del AO, sin previa minimización. Y como método más adecuado para explorar de forma completa el espacio conformacional se optó por el método MCMM, con el campo de fuerza MMFFs, combinado con el modelo de solvatación continuo GB/SA.

Las búsquedas conformacionales para cada uno de los isómeros se realizaron en 100000 pasos, variando entre dos y cinco grados de libertad simultáneamente sin poner restricción a las torsiones permitidas, y las estructuras generadas se minimizaron con el método TNCG con un criterio de convergencia de 0.05 KJ/Å mol. Se consideraron conformeros duplicados aquellos con un valor de RMSD menor o igual a 0.25 Å, por lo que se eliminaron y se prosiguió el estudio con los conformeros que se encontraran dentro un intervalo de energía potencial de 50 KJ/mol por encima del de mínima energía.

A continuación, las estructuras resultantes de las búsquedas conformacionales se refinaron aplicando una nueva minimización. En este caso, se mantuvo el mismo campo de fuerza, MMFFs con el modelo de solvatación GBSA, y las minimizaciones se realizaron con un máximo de 5000 iteraciones usando el algoritmo FMNR, con un umbral de convergencia de 0,5 KJ/Å mol. Como límite para eliminar las estructuras duplicadas se tomó un RMSD de 0,25 Å, y como ventana de energía potencial se estableció un valor de 26.0 KJ/mol por encima del mínimo global. El número de estructuras que quedaron después de este paso para los isómeros 16S*19S*, 16S*19R*, 16R*19S* y 16R*19R* fueron 486, 319, 1032 y 652, respectivamente.

IV.2.2.- Obtención de datos experimentales a partir de la RMN

Nuevamente fue de la RMN de donde se obtuvieron los datos experimentales que nos sirvieron para desechar aquellas estructuras resultantes de los estudios teóricos que no se ajustaran a estos valores. Esta información se obtuvo básicamente del RMN¹H, TOCSY y ROESY. En los dos primeros experimentos se midieron constantes de acoplamiento, mientras que en el tercero se integraron los ROEs que se transformaron en distancias interprotónicas.

IV.2.2.a.- Determinación de distancias interprotónicas a partir del experimento ROESY

Las distancias interprotónicas del AB se valoraron con el experimento 2D-ROESY, que se adquirió en las siguientes condiciones: un campo de confinamiento de espines débil (1,4 KHz) para minimizar las contribuciones TOCSY, y para obtener una intensidad en las señales de correlación óptima para su interpretación se seleccionó un tiempo de mezcla de 500 ms.¹³⁴ Otro aspecto que se consideró fue el ya comentado *offset*, que se corrigió del mismo modo que en el caso del AEO (**Apartado III.2.1.a**).

Una vez considerados los aspectos comentados se convirtieron las intensidades de las integrales medidas en el ROESY en distancias interprotónicas de acuerdo a lo comentado en el **Apartado III.2.1.a**, para la cual se tomó como calibración interna la distancia entre los protones H-38' y H-36 (2.57 Å).

Calculadas estas distancias se pasó a corregir las señales de los metilos ya que los ROEs de estos grupos se deben a tres protones, dando lugar a intensidades superiores que las de las correspondientes distancias. Por lo tanto, a las distancias calculadas para estos protones se le sumó 0.5 Å. Finalmente, el tratamiento de estos datos de la manera indicada nos permitió obtener un total de 35 distancias interprotónicas. (**Tabla IV.3**).

¹³⁴ Se utilizó este tiempo de mezcla ya que el compuesto se degradó y no nos fue posible realizar más experimentos ROESY modificando este parámetro.

IV.- Estudio del Ácido Belizeánico

Asignación	I ROE-exp	I ROE-corr	D calculada
4/5	0,83	1,07	2,95
4/6	3,86	4,57	2,32
4/12	3,81	3,82	2,39
7/5	2,72	3,59	2,41
7/6'	2,21	2,77	2,52
9/7	3,68	3,96	2,38
9/43	1,56	1,99	2,66
12/11	3,04	3,67	2,41
12/13	1,37	1,54	2,78
12/42	1,02	1,38	3,33
13/15	2,16	2,60	2,55
13/42	1,48	2,23	2,61
14/12	1,14	1,27	2,87
14/16	2,30	2,56	2,55
14/42	0,43	0,65	3,21
15/16	1,21	1,30	2,86
15/17	0,83	1,09	2,94
16/17	4,96	6,05	2,21
20/21'	2,95	4,16	2,36
22/21	0,90	1,04	2,97
23/20	0,66	0,85	3,07
24/22	1,27	1,28	2,87
24/23	0,99	1,04	2,97
26/22	0,98	0,99	2,99
26/28	0,71	0,91	3,03
26/28'	0,59	0,82	3,09
27/22	2,61	2,63	2,54
27/28'	1,28	1,77	2,72
30/31	0,73	1,01	2,98
38 ^o /36	1,94	2,45	2,57
38/37	1,87	2,37	2,59
38/40	0,59	0,80	3,10
40/27	1,35	1,82	3,20
41/26	0,62	0,64	3,22
41'/41	11,96	12,98	1,95

Tabla IV.3.- Distancias interprotónicas calculadas a partir de las intensidades en las integrales del ROESY.

IV.2.2.b.- Determinación de restricciones de torsión a partir de las constantes de acoplamiento

Junto con las distancias interprotónicas obtenidas a partir del ROESY se utilizó la información que nos aportan las constantes de acoplamiento protón-protón a tres enlaces, ${}^3J_{\text{H-H}}$. Estas constantes se midieron principalmente en el experimento de protón RMN¹H, y en aquellas situaciones en las que no fue posible medirlas se recurrió al TOCSY-2D.¹³⁵ En nuestro caso las restricciones que nos interesan son las correspondientes a los fragmentos acíclicos ya que es donde la molécula presenta mayor flexibilidad. Sin embargo, el solapamiento de las señales correspondientes a los metilenos C-17, C-18, C-20 y C-21 no nos permitió obtener las constantes de acoplamiento para esta zona de la molécula, por lo que sólo se evaluaron a lo largo del estudio las que se indican en la **Tabla IV.4**. Para estas constantes se calcularon los ángulos diedros utilizando la ecuación de Barfield¹⁰¹ y la de Karplus.¹⁰² Aunque finalmente los ángulos se trataron de acuerdo al valor de la constante de acoplamiento, es decir, se clasificaron en pequeñas, medianas y grandes. Como se puede observar en la **Tabla IV.4** todas estas constantes tienen valores superiores o en torno a 7 Hz, por lo que todas las constantes se incluyeron dentro del grupo de “grandes” pudiendo interpretar que se trata de disposiciones H-H *anti*, de manera que para los ángulos diedros se aplicó la aproximación indicada en la tabla (180 ± 40), donde se incluye un amplio margen de error.

¹³⁵ Nuevamente, debido a la descomposición del compuesto no fue posible realizar el COSY-DQF, por lo que se optó por utilizar el experimento TOCSY-2D, que ya había sido adquirido.

Protones	J_{H-H} medida (Hz)		Ec.Barfield (°)	Ec.Karplus (°)	Ángulo restricción(°)
	J-HNMR	J-TOCSY-2D			
12-13	7.1		141	142	180±40
13-14	8.5	7.8	*	153	
14-15	15.5	15.2	*	*	
15-16	6.6	7.0	*	139	
26-27	8.8	8.6	150	155	
27-28 ^{pro-R}		9.2	155	159	
28 ^{pro-S} -29		9.4	156	161	
29-30	9.8	9.5	160	166	

*En estos casos no se pudo calcular el ángulo diedro porque las ecuaciones no están parametrizadas para los carbonos sp^2 .

Tabla IV.4.- Constantes de acoplamiento medidas en COSY-DQF y RMN¹H.

IV.2.3.- Análisis de los resultados de modelización a partir de los datos de RMN

Con todas las búsquedas conformacionales y minimizaciones finalizadas se pasó a analizar las estructuras resultantes de acuerdo a los datos experimentales. Para ello en primer lugar se intentó llevar a cabo un estudio similar a los realizados por Snyder y col.¹³⁶ y Nikiforovich y col.,¹³⁷ que se basan en la “deconvolución” de los datos de RMN (intensidad de las integrales de los ROEs y constantes de acoplamiento $^3J_{H-H}$) para obtener poblaciones conformacionales que sean capaces de explicar los datos experimentales. Por un lado Snyder y col. utilizan el programa NAMFIS¹³⁸ (NMR Analysis of Molecular Flexibility in Solution), mientras que Nikiforovich y col. aplican una aproximación estadística basada en la t de Student.^{139,140} Nosotros,

¹³⁶ Thepchatri, P.; Cicero, D. O.; Monteagudo, E.; Chosh, A. K.; Cornett, B.; Weeks, E. R.; Snyder, J. P. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 12838-12846.

¹³⁷ Nikiforovich, G. V.; Köver, K. E.; Zhang, W. J.; Marshall, C. R. *J. Am. Chem. Soc.*, **2000** *122*, 3262-3273.

¹³⁸ Cicero, D. O.; Barbato, G.; Bazzo, R. *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117*, 1027-1033.

¹³⁹ Nikiforovich, G. V.; Prakash, O.; Gehring, C. A.; Hruby, V. J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 3399-3406.

utilizando como ejemplo estos trabajos, realizamos combinaciones estadísticas calculando la correspondiente desviación cuadrática media (RMSD). Para ello, las estructuras resultantes de la búsqueda conformacional se agruparon con el programa X-Cluster (MacroModel 8.5), quedando un total de diez familias conformacionales. Seguidamente, utilizando el programa Mathematica 4,¹⁴¹ se generaron combinaciones estadísticas que incluyeran a estas diez familias. Para ello, en primer lugar se generaron fracciones molares que variaran en incrementos de 0.125, desde 0 a 1, de modo que la suma de todas estas fracciones fuera igual a 1. En segundo lugar, se crearon todas las posibles combinaciones de estas fracciones molares, lo que permitió, partiendo de estos datos estadísticos realizar combinaciones variando las fracciones molares de las diferentes familias conformacionales. De este modo se obtuvieron un total de 24311 posibilidades para combinar las diez familias, y para cada una de ellas se estimó la RMSD con respecto a los datos experimentales. Sin embargo, los resultados obtenidos no fueron coherentes ya que pequeños errores en nuestras medidas llevaban asociados errores mayores en los cálculos, por lo que combinaciones muy variadas se ajustaban de igual manera a los resultados experimentales. Debido a esto optamos por abordar el estudio de otro modo más convencional y filtramos las estructuras obtenidas de la búsqueda conformacional (**Apartado IV.2.1**) de acuerdo a nuestros datos experimentales, como se discute a continuación.

IV.2.3.a- Selección de estructuras de acuerdo a los ángulos de torsión

Para aplicar el primer filtro se seleccionaron todos los conformeros obtenidos de las búsquedas conformacionales una vez minimizados (**Apartado IV.2.1**). De este modo, en base a los ángulos diedros correspondientes a las constantes de acoplamiento

¹⁴⁰ Vesterman, B.; Sekacis, I.; Betins, J.; Podins, L.; Nikiforovich, G. V. *FEBS Lett.*, **1985**, *192*, 128-130.

¹⁴¹ Mathematica es un programa especializado en el análisis numérico y cálculo simbólico, muy utilizado en diferentes campos como pueden ser la física, bioquímica o análisis financiero.

$^3J_{H-H}$ entre los protones de las secuencias C-12 \rightarrow C-15 y C-26 \rightarrow C-30 se llevó a cabo el primer filtrado, para el cual se utilizaron los valores que se indican en la **Tabla IV.4**, donde se incluye el margen de error aplicado. De este modo se eliminaron aquellas estructuras que no se correspondieran con estos datos experimentales, permitiendo reducir el número de conformeros para cada isómero de manera considerable. A continuación, para asegurar la presencia de estructuras representativas de los cuatro isómeros se seleccionaron todos los conformeros que quedaron para cada uno de los isómeros y se epimerizaron en los carbonos C-16 y C-19, lo que permitió incluir en cada uno de los casos estudiados las estructuras presentes en los otros. De este modo, se amplió el número de estructuras para cada diastereómero, que se sometieron a una nueva minimización en las mismas condiciones que la indicada en el **Apartado IV.2.1**. Después de este paso quedaron 48, 37, 51 y 54 estructuras para los isómeros 16*S**19*S**, 16*S**19*R**, 16*R**19*S** y 16*R**19*R**, respectivamente.

IV.2.3.b- Aplicación de restricciones antidistancia

En este punto del análisis se aplicaron las restricciones de antidistancia,^{142,143} que son aquellas debidas a picos de correlación no observados. En nuestro caso, para tratar estas restricciones se consideró que si entre dos protones no se observa ROE es porque estos deben estar a una distancia superior a 4.0 Å. Se tomo esta distancia como límite ya que en nuestros datos se observó que todas las distancias obtenidas a partir de las intensidades de los ROEs (ver **Tabla IV.3**) se correspondían con distancias inferiores a este valor. Para aplicar este tipo de restricción es necesario que no haya duda de que la correlación no está presente, para lo cual es importante que las señales de ROE aparezcan en zonas del espectro donde no existan problemas de superposición. Otro aspecto importante que se debe considerar a la hora de aplicar este filtro es que para descartar una estructura deben aparecer varias violaciones antidistancias. De este

¹⁴² Cuniasse, P.; Raynal, I.; Yiotakis, A.; Dive, V. *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, *119*, 5239-5248.

¹⁴³ Bach, A. C.; Eyermann, C.J.; Gross, J. D.; Bower, M. J.; Harlow, R. L.; Weber, P. C.; DeGrado, W. F. *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, *116*, 3207-3219.

modo se aplicaron las 24 restricciones de antiodistancia que se muestran en la **Tabla IV.5**, disminuyendo el número de estructuras a 14, 9, 16 y 22 para los isómeros 16*S**19*S**, 16*S**19*R**, 16*R**19*S** y 16*R**19*R**, respectivamente. En todos los casos estas estructuras encajaron dentro de una misma familia conformacional.

Protón-1	Protón-2	Antiodistancia
3, 3'	20, 39, 40	≥ 4.00 Å
6,6'	19, 24, 40	
11,11'	39	
14	26	
15	26	
29, 36, 40, 41	42	
39	40	
35	43	
39, 40	44	

Tabla IV.5.- En esta tabla se indican de forma resumida los hidrógenos a los que se les aplicó la restricción antiodistancia, representados por protón-1 y protón-2.

IV.2.3.c- *Aplicación de las restricciones de distancia*

Por último se utilizaron las restricciones de distancias interprotónicas provenientes del experimento ROESY descritas en la **Tabla IV.3**. A partir de estos datos se calculó la desviación cuadrática media para las violaciones de distancia de los conformeros que quedaron para cada uno de los isómeros, resultando que en los cuatro casos el conformero que mejor se ajustó a los datos experimentales fue el mismo, con un valor de RMSD de 0.20 Å. Estas estructuras se representan en la **Figura IV.15**.

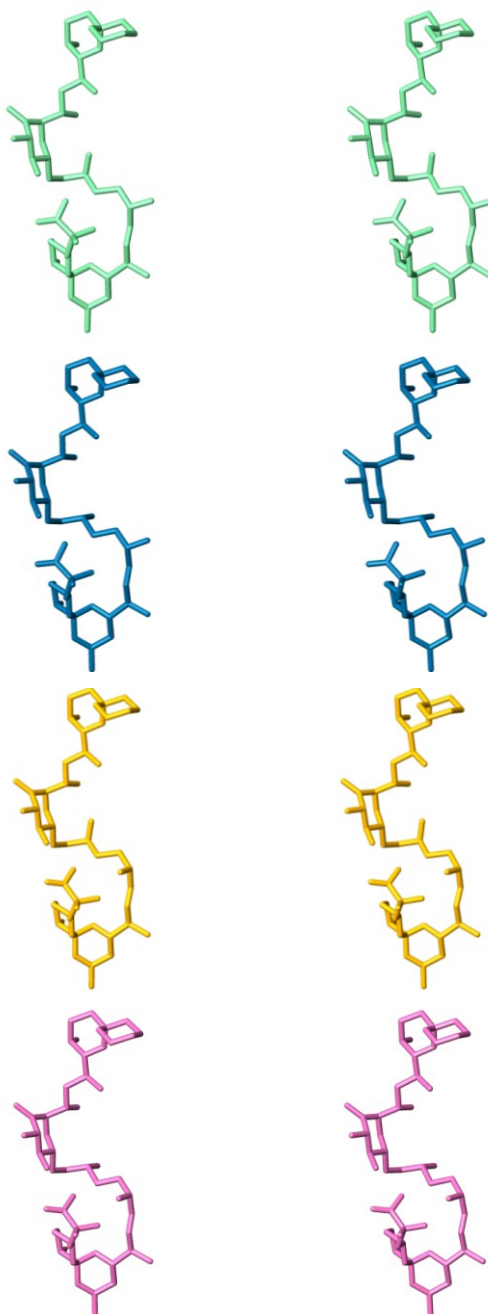


Figura IV.15.- Representación estereoscópica del conformero que mejor se ajustó para cada isómero. La estructura verde es el $16S^*19S^*$, la azul el $16S^*19R^*$, la naranja se corresponde con el $16R^*19S^*$ y la rosada con el $16R^*19R^*$.

Finalmente, para corroborar la existencia de una familia conformacional suficientemente estable como para no saltar a otras disposiciones espaciales se procedió a realizar una dinámica con cada una de las cuatro posibles estructuras.

IV.2.4.- Estudios de Dinámica molecular con los conformeros resultantes para los isómeros 16S*19S*, 16S*19R*, 16R*19S* y 16R*19R*

Se aplicó una dinámica estocástica a una temperatura constante de 300 K en el campo de fuerza MMFFs con el modelo de solvatación continua GB/SA en H₂O, para mantener fijos los enlaces protón-carbono se utilizó el algoritmo *shake*. Tras un periodo de equilibrado de 50 ps se llevaron a cabo las simulaciones durante un tiempo total de 5.0 ns, aplicando intervalos de tiempo entre integraciones de 1.5 fs. En cada dinámica se guardaron un total de 1000 estructuras, y durante las simulaciones se monitoreó la secuencia C-12 → C-22 con el fin de obtener información de la evolución de la estructura con el tiempo. En las Figuras IV.16-IV.24, se muestra el progreso de estos ángulos diedros durante el tiempo de simulación para cada isómero.

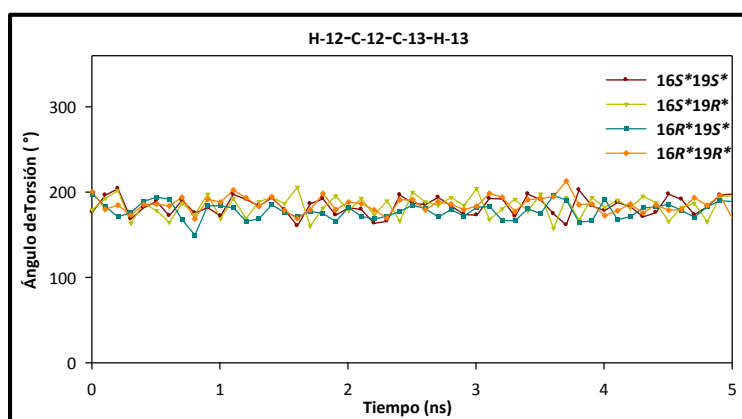


Figura IV.16.- Evolución del ángulo diedro H-12–C-12–C-13–H-13 durante el tiempo de simulación con una SD para los isómeros 16S*19S*, 16S*19R*, 16R*19S* y 16R*19R* del AB.

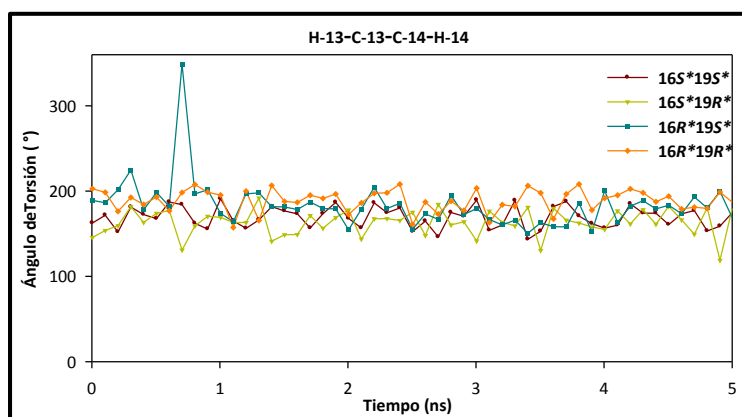


Figura IV.17.- Evolución del ángulo diedro H-13–C-13–C-14–H-14 durante el tiempo de simulación con una SD para los isómeros 16S*19S*, 16S*19R*, 16R*19S* y 16R*19R* del AB.

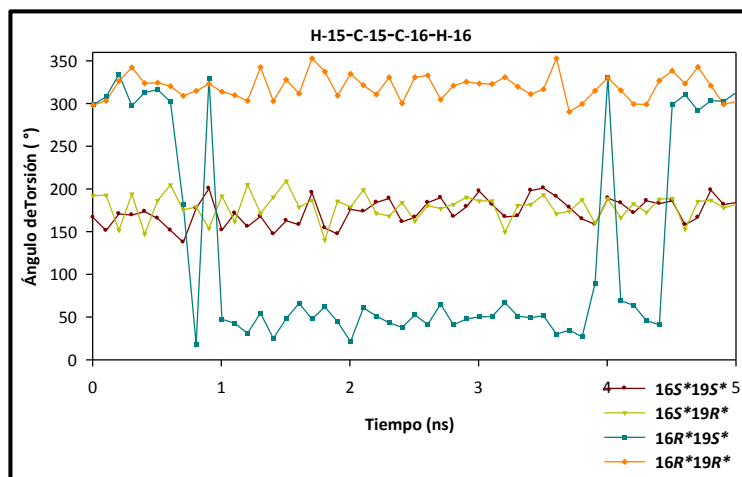


Figura IV.18.- Evolución del ángulo diedro H-15–C-15–C-16–H-16 durante el tiempo de simulación con una SD para los isómeros 16S*19S*, 16S*19R*, 16R*19S* y 16R*19R* del AB.

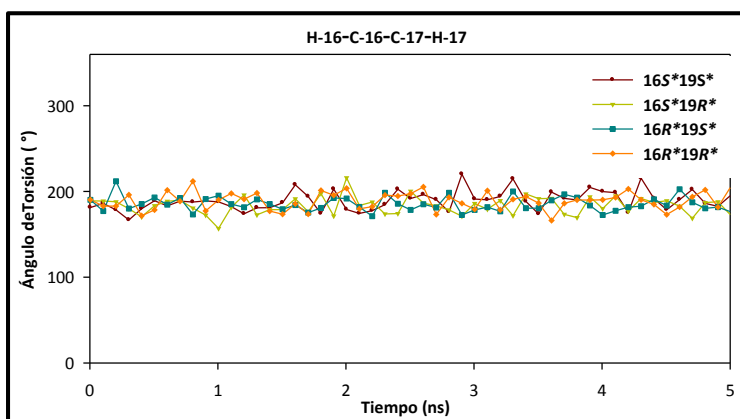


Figura IV.19.- Evolución del ángulo diedro H-16–C-16–C-17–H-17 durante el tiempo de simulación con una SD para los isómeros 16S*19S*, 16S*19R*, 16R*19S* y 16R*19R* del AB.

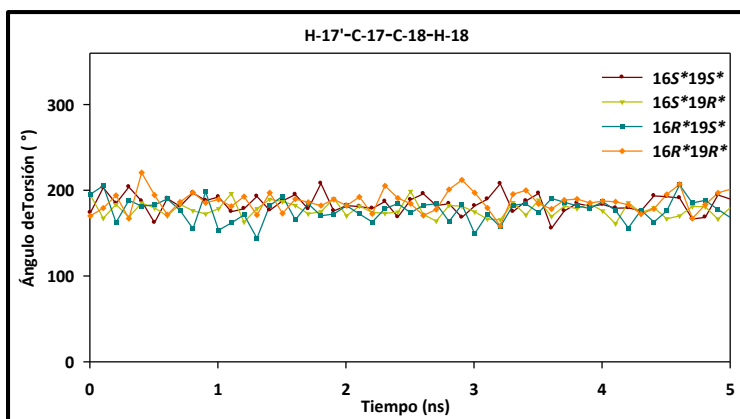


Figura IV.20.- Evolución del ángulo diedro H-17'–C-17–C-18–H-18 durante el tiempo de simulación con una SD para los isómeros 16S*19S*, 16S*19R*, 16R*19S* y 16R*19R* del AB.

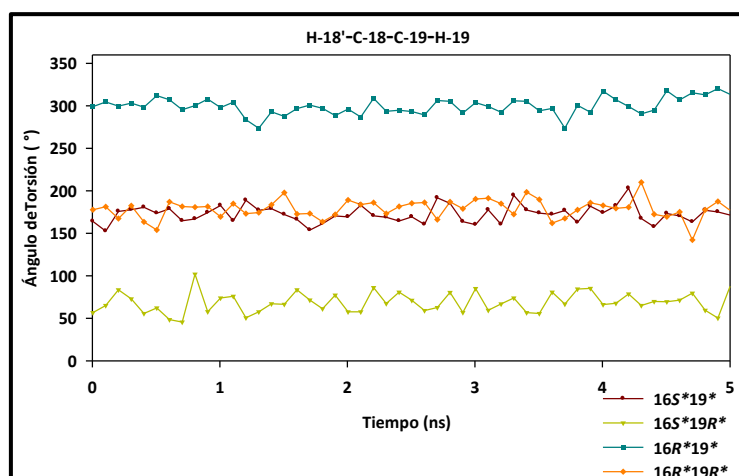


Figura IV.21.- Evolución del ángulo diedro H-18'–C-18–C-19–H-19 durante el tiempo de simulación con una SD para los isómeros 16S*19S*, 16S*19R*, 16R*19S* y 16R*19R* del AB.

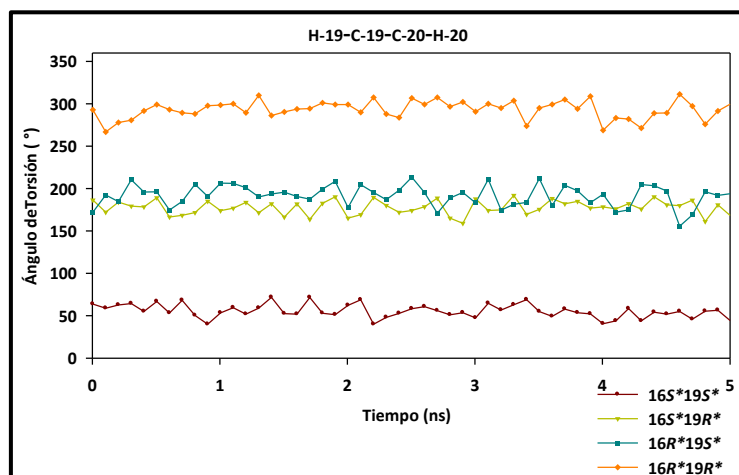


Figura IV.22.- Evolución del ángulo diedro H-19–C-19–C-20–H-20 durante el tiempo de simulación con una SD para los isómeros 16S*19S*, 16S*19R*, 16R*19S* y 16R*19R* del AB.

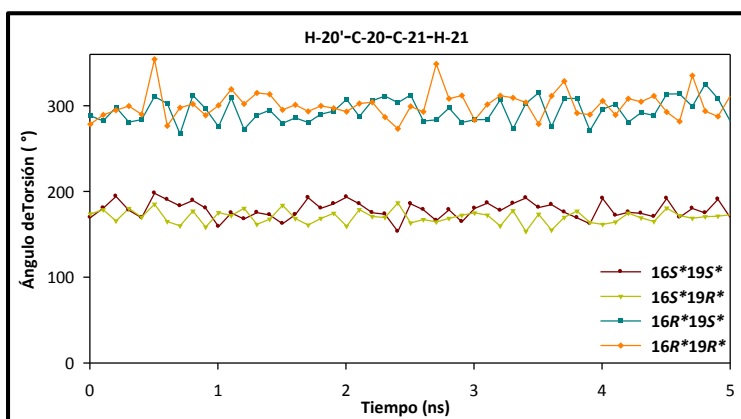


Figura IV.23.- Evolución del ángulo diedro H-20'–C-20–C-21–H-21 durante el tiempo de simulación con una SD para los isómeros 16S*19S*, 16S*19R*, 16R*19S* y 16R*19R* del AB.

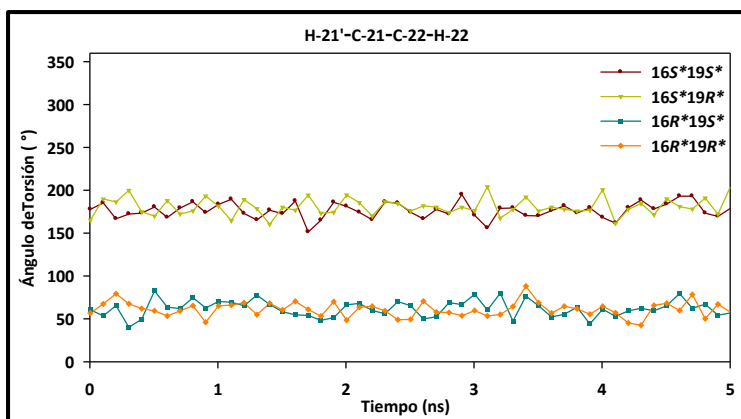


Figura IV.24.- Evolución del ángulo diedro H-21'–C-21–C-22–H-22 durante el tiempo de simulación con una SD para los isómeros 16S*19S*, 16S*19R*, 16R*19S* y 16R*19R* del AB.

Del análisis de estos resultados se observa que en ninguna de las cuatro situaciones el confórmero parece sufrir cambios considerables, manteniéndose dentro de una misma familia conformacional con el tiempo. Aunque si atendemos a la evolución de los ángulos diedros H-3-C-3-C-2-O-H(C-2) y O-H(C-2)-C-2-C-1-COOH(C-1), como se observa en las figuras **Figuras IV.25-IV.27**, aparece movilidad en esta parte de la molécula que nos podría hacer pensar en cambios conformacionales. Sin embargo, este movimiento se debe a la rotación sobre estos enlaces, que permite la existencia de un puente de hidrógeno entre este extremo de la molécula y el oxígeno del hidroxilo en C-23, en unas ocasiones formado con el protón del hidroxilo en C-2 y en otras, debido a rotaciones sobre el enlace C-2→C-1, con el protón del hidroxilo del grupo carboxilo (**Figuras IV.28-IV.31**). De este modo, concluimos que la molécula debe mantenerse en una conformación estable formando un pseudomacrocielo debido a la presencia de estos puentes de hidrógeno. Es importante destacar que este comportamiento es parecido en los distintos isómeros.

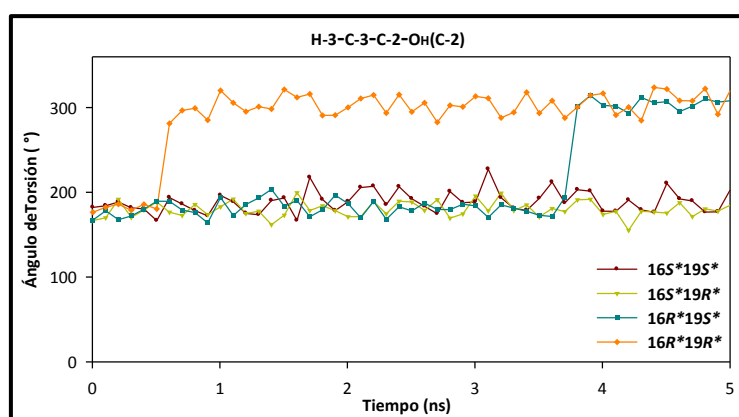


Figura IV.25.- Evolución durante el tiempo de simulación con una SD del ángulo diedro entre uno de los hidrógenos del metileno H₂-3 y el oxígeno del hidroxilo sobre C-2 para los isómeros 16S*19S*, 16S*19R*, 16R*19S* y 16R*19R* del AB.

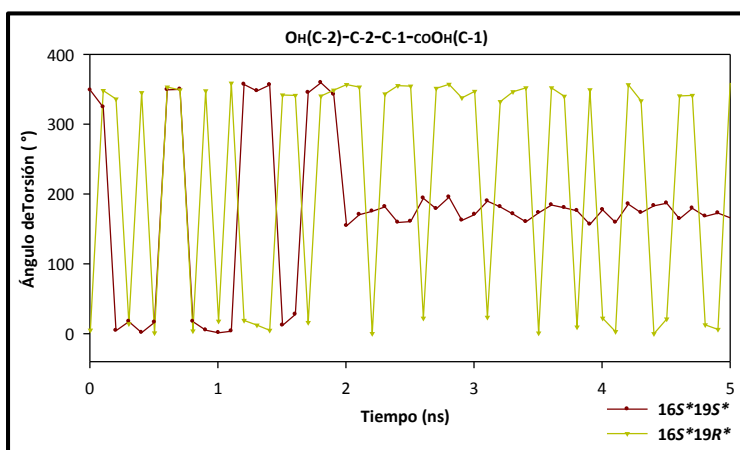


Figura IV.26.- Evolución durante el tiempo de simulación con una SD del ángulo diedro entre el oxígeno del hidroxilo sobre C-2 y el oxígeno del hidroxilo en C-1 para los isómeros 16S*19S*, 16S*19R* del AB.

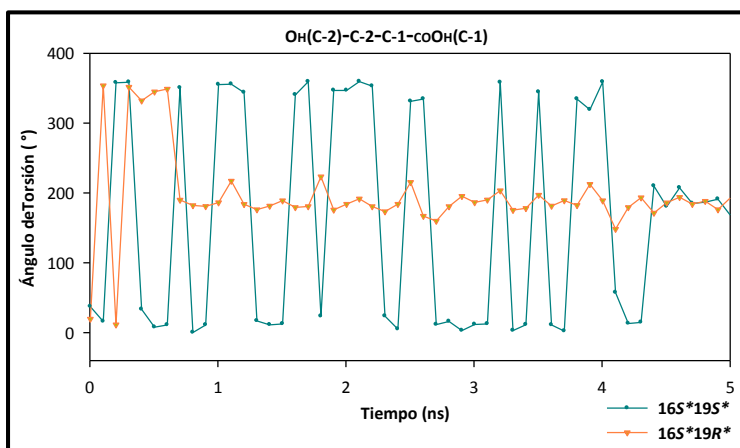


Figura IV.27.- Evolución durante el tiempo de simulación con una SD del ángulo diedro entre el oxígeno del hidroxilo sobre C-2 y el oxígeno del hidroxilo en C-1 para los isómeros 16R*19S* y 16R*19R* del AB.

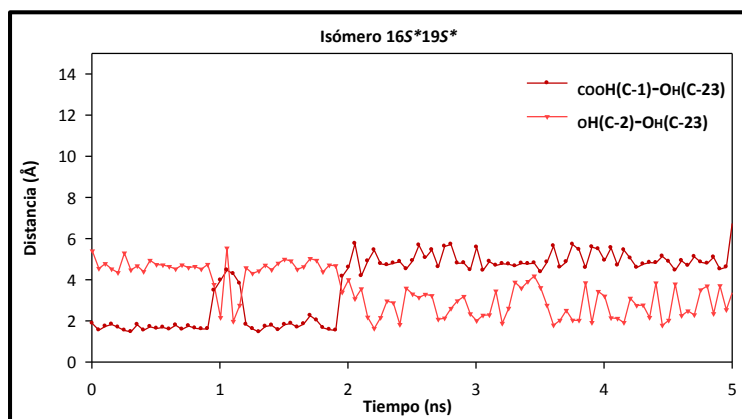


Figura IV.28.- Evolución durante el tiempo de simulación con una SD de la distancia entre el oxígeno del hidroxilo sobre C-23 y los hidrógenos sobre los hidroxilos en C-1 y C-2 para el isómero 16S*19S* del AB.

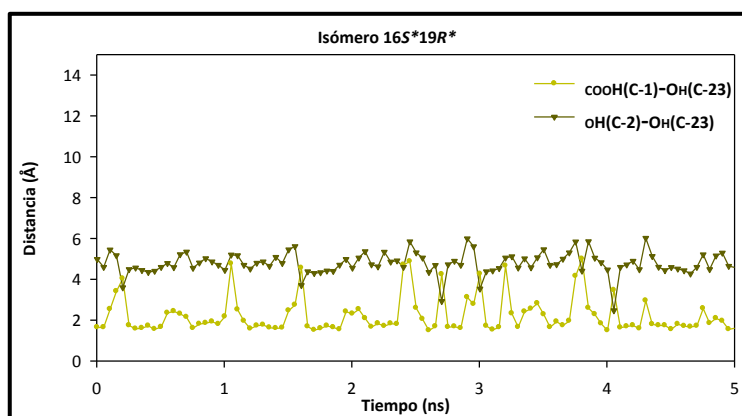


Figura IV.29.- Evolución durante el tiempo de simulación con una SD de la distancia entre el oxígeno del hidroxilo sobre C-23 y los hidrógenos sobre los hidroxilos en C-1 y C-2 para el isómero 16S*19R* del AB.

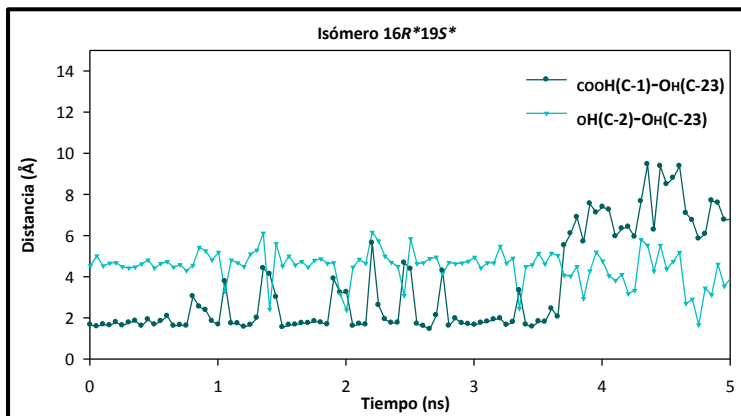


Figura IV.30.- Evolución durante el tiempo de simulación con una SD de la distancia entre el oxígeno del hidroxilo sobre C-23 y los hidrógenos sobre los hidroxilos en C-1 y C-2 para el isómero 16R*19S* del AB.

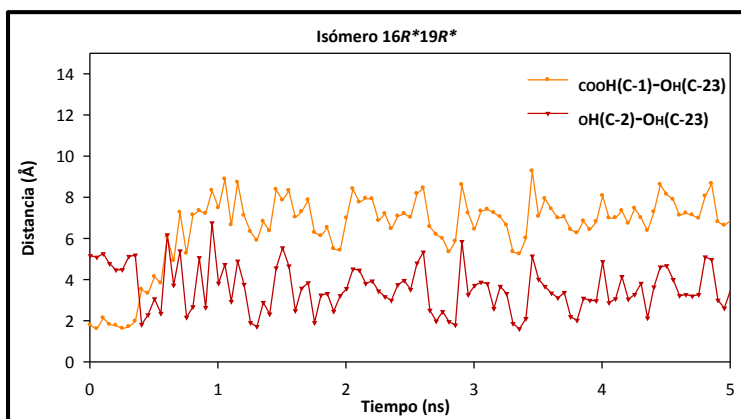


Figura IV.31.- Evolución durante el tiempo de simulación con una SD de la distancia entre el oxígeno del hidroxilo sobre C-23 y los hidrógenos sobre los hidroxilos en C-1 y C-2 para el isómero 16R*19R* del AB.

IV.2.5.- Análisis de los Resultados

A continuación, para cada isómero, se calculó la estructura promedio de la dinámica (**Figura IV.32**). Obteniendo de este modo una información equivalente a las medidas experimentales, ya que las distancias obtenidas a partir del ROESY son un promedio de los posibles conformeros en disolución, y lo mismo ocurre con las constantes de acoplamiento. Por lo tanto, como se muestra en las **Tablas IV.6** y **IV.7**, se midieron las distancias entre los protones así como de los ángulos diedros, en las estructuras promedio, de los que se tenía información experimental.

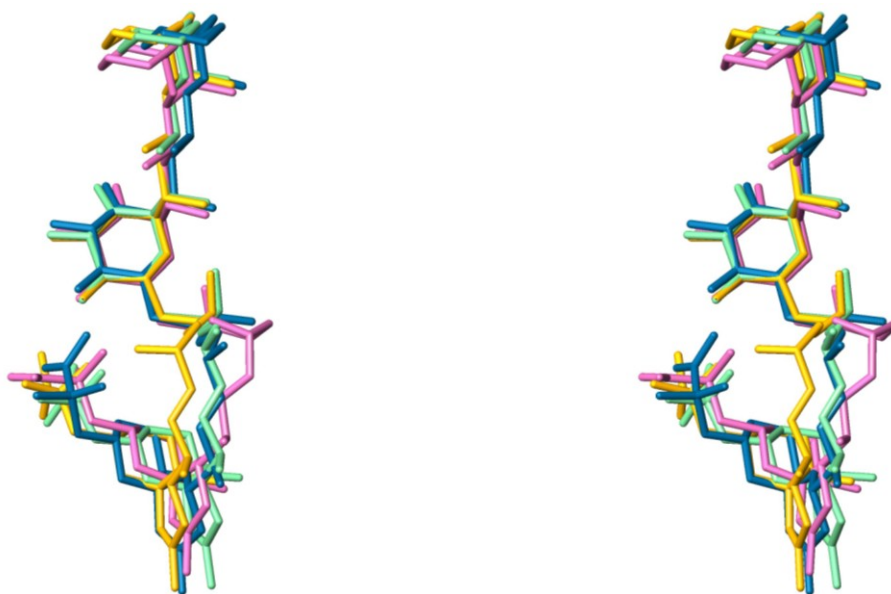


Figura IV.32.- Imagen estereoscópica de la estructura promedio obtenida de la dinámica con los distintos isómeros. La estructura azul es el $16S^*19S^*$, la verde el $16S^*19R^*$, la naranja se corresponde con el $16R^*19S^*$ y la rosada con el $16R^*19R^*$.

Si nos fijamos únicamente en los valores de RMSD de los distintos isómeros del AB no es posible discernir entre ninguno de ellos ya que las diferencias con respecto a los datos experimentales son similares para todos los casos. Aunque, si atendemos a la distancia entre H-14 y H-16 (**Tabla IV.7**) se pueden apreciar diferencias entre los isómeros **16-S*** y **16-R***, siendo la distancia en el caso **16-S*** la más cercana a los datos experimentales. A su vez, si tenemos en cuenta los ángulos diedros, se observa que en el caso H-15–C-15–C-16–H-16 los valores son diferentes para los isómeros **16-S*** y **16-R***, ya que en los isómeros **16S*** nos encontramos con disposiciones *anti*, mientras que para el **16R*** los ángulos se corresponden con disposiciones *gauche* (**Tabla IV.6**), y aunque J_{15-16} tiene un valor experimental de 6.60 Hz, que podría generar dudas en torno a esta disposición, también es cierto que en el caso del AO esta constante es de aproximadamente 7 Hz y se corresponde con una disposición anti. Por lo tanto, si tenemos en cuenta estos datos, podemos proponer que nos encontramos ante alguno de los isómeros con estereoquímica **16S***. Sin embargo, para el carbono C-19 no es posible seleccionar entre ninguna de las dos configuraciones debido a la falta de datos experimentales en torno a este centro.

Diedro	J_{H-H} medida (Hz)		Ecuación Barfield (°)	Ecuación Karplus (°)	16S*19S* (°)	16S*19R* (°)	16R*19S* (°)	16R*19R* (°)
	HNMR	TOCSY						
H12-C12-C13-H13	7.1		142	142	-176	-176	-176	144
H13-C13-C14-H14	8.5	7.8		153	167	166	165	-178
H15-C15-C16-H16	6.6	7.0		139	174	172	-68	-49
H26-C26-C27-H27	8.8	8.6	154	150	-175	-173	-175	-162
H27-C27-C28-H28		9.2	154	155	-178	-179	-178	-179
H28'-C28-C29-H29		9.4	156	156	-180	178	178	-172
H29-C29-C30-H30	9.8	9.4	160	166	-176	-176	-177	175

Tabla IV.6.- Ángulos diedros (°) obtenidos a partir de las ecuaciones de Barfield y Karplus y los correspondientes a la estructura promedio de las dinámicas en los distintos isómeros.

IV.- Estudio del Ácido Belizeánico

H-H	Dcalculada	16S*19S*	16S*19R*	16R*19S*	16R*19R*
4-5	2,95	3,07	3,07	3,07	3,08
4-6	2,32	2,62	2,64	2,55	2,62
7-5	2,41	2,64	2,67	2,61	2,60
7-6'	2,52	2,42	2,42	2,41	2,42
9-7	2,38	2,46	2,49	2,43	2,44
9-43	2,66	2,41	2,41	2,41	2,40
12-4	2,39	2,90	2,78	2,97	2,86
12-11	2,41	2,45	2,45	2,45	2,43
12-13	2,78	3,06	3,06	3,06	3,07
12-42	3,33	3,31	3,19	3,34	3,22
13-15	2,55	2,38	2,40	2,36	2,33
13-42	2,61	2,54	2,53	2,54	2,54
14-12	2,87	2,55	2,53	2,52	2,66
14-16	2,55	2,45	2,43	3,40	3,55
14-42	3,21	3,18	3,23	3,16	3,25
15-16	2,86	3,11	3,10	2,57	2,48
15-17	2,94	2,53	2,58	2,51	2,62
16-17	2,21	2,55	2,51	2,50	2,45
20-21'	2,36	2,39	2,40	2,43	2,48
22-21	2,97	3,05	3,05	3,05	3,04
24-22	2,87	2,60	2,66	2,68	2,70
24-23	2,97	3,07	3,07	3,06	3,06
26-28	3,03	2,47	2,50	2,48	2,49
26-28'	3,09	3,16	3,19	3,10	3,13
27-22	2,54	2,21	2,22	2,22	2,18
27-28'	2,72	2,51	2,51	2,53	2,52
30-31	2,62	2,45	2,45	2,46	2,45
38'-36	2,57	2,69	2,69	2,68	2,62
38-37	2,59	2,44	2,44	2,44	2,51
38-40	3,10	2,74	2,75	2,72	2,70
40-27	3,20	2,97	2,93	3,02	2,93
41-26	3,22	2,40	2,38	2,38	2,40
41-41'	1,95	1,85	1,84	1,85	1,85

Tabla IV.7.- Distancias experimentales y las correspondientes a la estructura promedio de las dinámicas en los distintos isómeros.

Por lo tanto, finalizado el estudio de modelización con los cuatro isómeros del AB, $16S^*19S^*$, $16S^*19R^*$, $16R^*19S^*$ y $16R^*19R^*$, se puede proponer para el metino C-16 una configuración S^* , no pudiéndose resolver la situación en el caso del centro quiral C-19. De este modo, aunque no se pudo obtener la configuración relativa de C-19 sí que se pudo llegar a la disposición espacial que esta molécula adopta en disolución, ya que como se comentó anteriormente parece que la quiralidad de estos centros no afecta a las preferencias conformacionales de la molécula.

El que sea una estructura de este tipo la que presenta el AB, independientemente de las configuraciones en los carbonos C-16 y C-19, encaja con los datos espectroscópicos. Es decir, si analizamos los desplazamientos de carbono y protón para esta molécula se observa que las mayores diferencias con respecto al AO radican en la zona central, C-16 \rightarrow C-23. Lo cual nos indica que los entornos electrónicos en el resto de la molécula deben mantenerse similares a los del AO, y esto es así si se compara el confórmero propuesto para esta molécula con la estructura en disolución del AO (**Figura IV.33**).

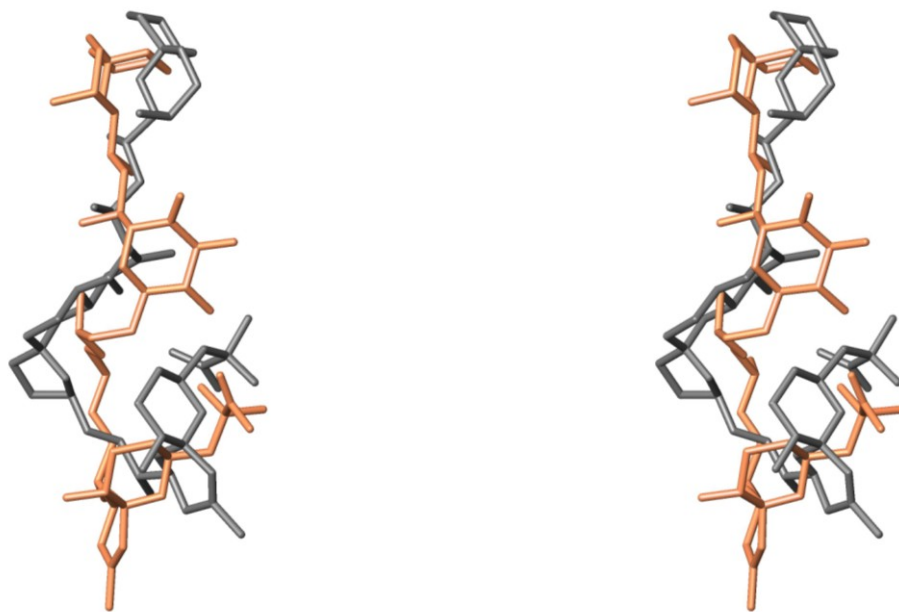


Figura IV.33.- Imagen estereoscópica de la superposición del AO y el AB, representados en gris y naranja, respectivamente.

IV.3.- PROPUESTA BIOSINTÉTICA PARA EL ÁCIDO BELIZEÁNICO

El aislamiento e identificación del AB resulta relevante desde un punto de vista biosintético. En efecto, su estructura está íntimamente relacionada con el AO que da lugar a un amplio grupo de metabolitos de naturaleza poliéter, tal y como se ha puesto de manifiesto en diferentes apartados de esta memoria.

La comparación de la estructura química del AO con las de otros grupos de poliéteres cíclicos tanto de origen marino como terrestre, pone de manifiesto aspectos comunes y divergentes con ambos grupos. En la serie del AO, los anillos presentan un tamaño que es común con el de los poliéteres terrestres así como los sistemas espiro característicos de aquellos. Por el contrario, no presentan los anillos de tamaño medio característicos de los de origen marino y tienen en común con éstos la presencia de sistemas de anillos trans-fusionados. Estas diferencias estructurales colocaban al grupo del AO en una situación intermedia entre los poliéteres cíclicos de origen terrestre y marino. Los experimentos biosintéticos llevados a cabo en los tres grupos muestran que: a) todos ellos tienen origen policétido; b) los de origen terrestre son policétidos clásicos, esto es, su cadena refleja las unidades C₂ procedentes de la condensación iterativa de unidades de acetato y/o propionato y/o butirato; c) en los marinos las cadenas son de naturaleza mixta, es decir hay fragmentos formados por unidades C₂ junto con otros en los que esta unidad se ha perdido. Para ellos se ha acuñado el término de policétido “no clásico”.

En efecto, este origen mixto de la cadena carbonada del poliéter ha sido demostrado experimentalmente por nuestro grupo^{144,145,146} sobre el AO a través de estudios biosintéticos. Una vez que cultivos de *P. lima* fueron “alimentados” con

¹⁴⁴ Norte, M.; Padilla, A.; Fernández, J. J. *Tetrahedron Lett.*, **1994**, *35*, 1441-1444.

¹⁴⁵ Norte, M.; Padilla, A.; Fernández, J. J.; Souto, M. L. *Tetrahedron*, **1994**, *30*, 9175-9180.

¹⁴⁶ Daranas, A. H.; Fernández, J. J.; Norte, M.; Gavín, J. A.; Gómez, B. S.; Souto, M. L. *Chem. Rec.*, **2004**, *4*, 1-9.

acetato sódico enriquecido en ^{13}C en el carbono del metilo ($^{13}\text{C}_2\text{CH}_3\text{COONa}$), del carboxilo ($^{13}\text{C}_1\text{CH}_3\text{COONa}$) ó en ambos ($^{13}\text{C}_{1,2}\text{CH}_3\text{COONa}$), se produjo el enriquecimiento diferenciado de todos los carbonos exceptuando C-37 y C-38 y, además, se pudo identificar las unidades de acetato en la molécula. (**Figura IV.33**). Posteriormente, Wright y col.^{147,148} confirmaron nuestros resultados y además demostraron que C-37 y C-38, provienen de una unidad inicial de glicolato. Estos experimentos demostraron que junto a fragmentos de estructura de policétido clásico, aparecen fragmentos no encuadrables dentro de este concepto, como es el caso de los fragmentos [C-8–C-9–C-10–C43] y [C-23–C-24–C-25(C-41)–C26], caracterizados por la presencia de carbonos vecinales provenientes del metilo del acetato. Este tipo de fragmentos también fueron observados en las cadenas de otros poliéteres de origen marino, como es el caso de los estudios sobre las brevetoxinas llevados a cabo por Nakanishi¹⁴⁹ y Shimizu¹⁵⁰ que, como consecuencia de ello, propusieron que en la formación de estos metabolitos podrían estar involucrados fragmentos de la ruta de los ácidos tricarboxílicos (TCA), que se integrarían en las cadenas junto con fragmentos de policétidos procedentes de acetato.

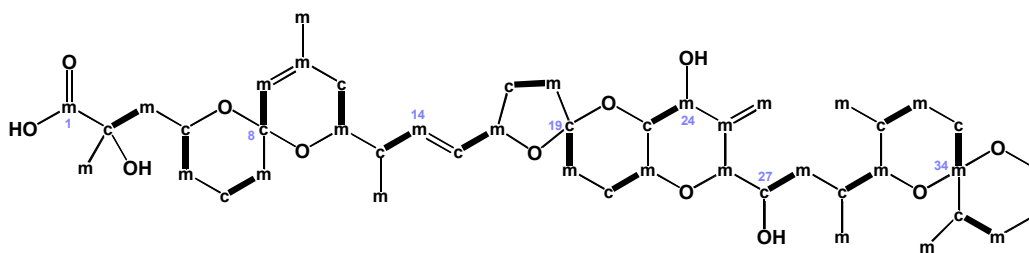


Figura IV.33.- Patrón de marcaje para el AO por adición de [$1\text{-}^{13}\text{C}$], [$2\text{-}^{13}\text{C}$] y [$1,2\text{-}^{13}\text{C}_2$] acetato de sodio.

¹⁴⁷ Wright, J. L. C.; Hu, T.; McLachlan, J. L.; Needham, J.; Walter, J. A. *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 8757-8758.

¹⁴⁸ Macpherson, G. R.; Burton, I. W., Le Blanc, P.; Walter, J. A.; Wright, J. L. C. *J. Org. Chem.*, **2003**, *68*, 8757-1664.

¹⁴⁹ Lee, M. S.; Qin, G. W.; Nakanishi, K.; Zagaroski, M. G. *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111*, 6234.

¹⁵⁰ Chou, H. N.; Shimizu, Y. *J. Am. Chem. Soc.*, **1987**, *109*, 2184.

Posteriormente, los patrones de incorporación de ^{18}O en el AO obtenidos por Murata y col. por adición de acetato enriquecido en $(^{18}\text{O}^{13}\text{C}_2)\text{CH}_3\text{COONa}$, $^{18}\text{O}_2$ y $(^{18}\text{O})\text{H}_2\text{O}$ ^{151,152} establecieron el origen de los oxígenos, de los que solo el oxígeno del anillo de tetrahidrofurano y los de los hidroxilos secundarios sobre C7 y C27 derivan directamente de los oxígenos del acetato (**Figura IV.34**). Los demás, excepto los del grupo carboxilo, derivan del oxígeno molecular poniendo de manifiesto la existencia de reacciones de oxidación posteriores a la formación de la cadena del polieno precursor.^{153,154}

Estos resultados experimentales han dado lugar a hipótesis biogénicas que han tratado de probarse a través de la adición de precursores biosintéticos avanzados enriquecidos en ^{13}C . Sin embargo, todos los intentos de incorporación han dado como resultado el enriquecimiento no distintivo del producto final lo que no ha permitido probar las hipótesis propuestas.

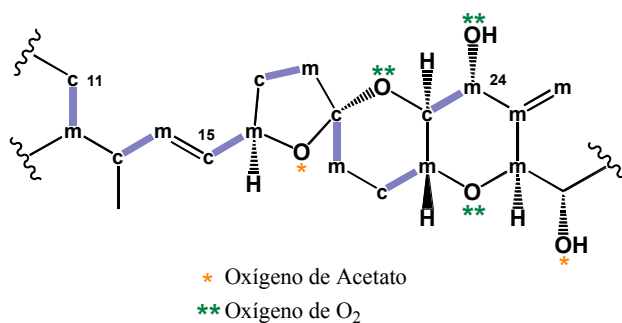


Figura IV.34.- Patrón de marcaje para el sistema tricíclico del AO por adición de $[^{18}\text{O}, ^{13}\text{C}]$ -acetato de sodio y $[^{18}\text{O}]\text{-O}_2$.

¹⁵¹ Murata, M.; Izumikawa, M; Tachibana, K.; Fujita, T.; Naoki, H. *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 147-151.

¹⁵² Izumikawa, M.; Murata, M; Tachibana, K.; Fujita, T.; Naoki, H. *Eur. J. Biochem.*, **2000**, *267*, 5179-5183.

¹⁵³ Fernández, J. J.; Souto, M. L.; Daranas, A. H.; Norte, M. *Recent. Res. Organic. Chem.*, **2000**, *4*, 183-199.

¹⁵⁴ Daranas, A. H.; Fernández, J. J.; Norte, M.; Gavín, J. A.; Gómez, B. S.; Souto, M. L. *The Chemical Record*, **2004**, *4*, 1-9.

Una de estas propuestas fue la de Murata y col., que plantean la formación de los anillos C, D y E sobre la base del origen biosintético de los carbonos establecidos por nuestro grupo y el de los oxígenos encontrado por ellos. De acuerdo con ello, Murata propone que este sistema particular se genera a partir de un intermedio β -epóxido del polieno precursor que, a través de un ciclación nucleofílica iniciada por un grupo hidroxilo secundario, conduce al sistema cíclico presente entre los carbonos C-16/C-25 tal y como se muestra en la **Figura IV.35**.

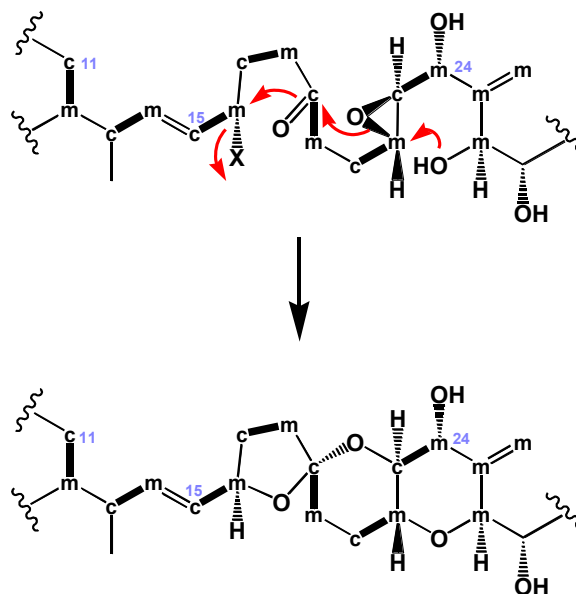


Figura IV.35.- Propuesta de Murata y col. para la formación de los anillos C, D y E del AO.

Es en este sentido, tal y como se afirmaba al principio, que resulta relevante el aislamiento e identificación del AB ya que supone un apoyo indirecto para esta propuesta. En efecto, el polieno precursor del AO comienza a partir de la unidad proveniente del glicolato (C-38–C-37) y continúa con la adición de unidades de acetato hacia C-1. Para el sistema que nos ocupa, el fragmento C-24/C-11¹⁵⁵ sería un policétido clásico generado por la condensación de siete unidades de acetato, que seguiría la ruta clásica de los policétidos en la que las enzimas que catalizan su formación son las policétido sintetasas (PKSs). Por otro lado, para el poliéter ionóforo monensina, estructuralmente muy relacionado con este grupo de toxinas, se ha podido demostrar su origen en un polieno biosintetizado por una policétido sintetasa (PKS) modular¹⁵⁶ formada por ocho módulos de multienzimas separados, que dan lugar al policétido precursor. El módulo mínimo está formado por una ceto-acil sintetasa (KS) y una β acil-transferasa (AT), responsables de la incorporación de la unidad de acetilo intacta. El nivel de oxidación y la estereoquímica de la unidad C₂ en la cadena del policétido se ajustan de manera inmediata después de cada paso de elongación a través de la acción de un módulo específico de enzimas. Estos módulos, además de las enzimas del módulo mínimo, pueden contener una β -ceto reductasa (KR), o una KR más una deshidratasa (DH), o una KR más una DH más una enoil-reductasa (ER), según el caso.

Teniendo en cuenta los resultados de la biosíntesis del AO obtenidos en nuestro laboratorio y su similitud estructural con la monensina, podemos suponer un mecanismo similar para la formación del heptacétido lineal entre los carbonos C-24/C-11. En la **Figura IV.36** se dan cada uno de los pasos de elongación y cual sería el contenido de cada uno de los módulos de enzimas.

¹⁵⁵ Se nombra del final al principio debido a que la formación del policétido comienza en el metileno C-24.

¹⁵⁶ Gallimore, A. R.; Stark, C. B. W.; Bhatt, A.; Harvey, B. M., Demydchuk, Y.; Bolanos-García, V.; Fowler, D. J.; Staunton, J.; Leadly, P. F.; Spencer, J. B. *Chemistry & Biology*, **2006**, *13*, 453-460.

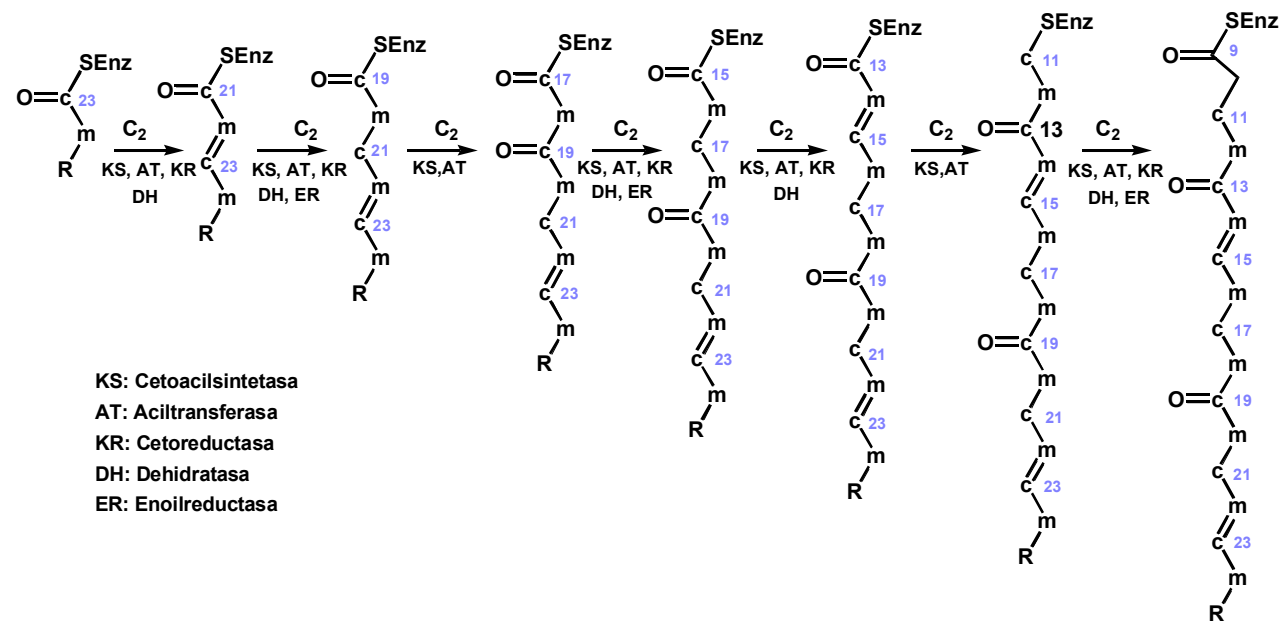


Figura IV.36.- Mecanismo propuesto para la formación del heptacétido lineal entre los carbonos C-24/C-11 del AO.

Una vez generado el polieno precursor del AO, la ulterior oxidación del doble enlace C-22/C-23 y de los carbonos derivados del metilo C-16 y C-24, genera el sustrato propuesto por Murata y col. para que se produzca la ciclación del fragmento. Además, en algún momento del proceso debe producirse el ataque nucleofílico del metilo de una unidad de acetato sobre el carbonilo C-13 para generar, por una descarboxilación ulterior, el metilo secundario que aparece en el mismo. Es de reseñar que todos los metilos presentes en la toxina derivan de acetato y ninguno de ellos procede de SAM (*S-adenosil metionina*), lo que no es usual ni en políeters marinos (que junto con estos también poseen metilos derivados del SAM) ni en los terrestres (en los que derivan o del SAM o de una unidad de propionato).

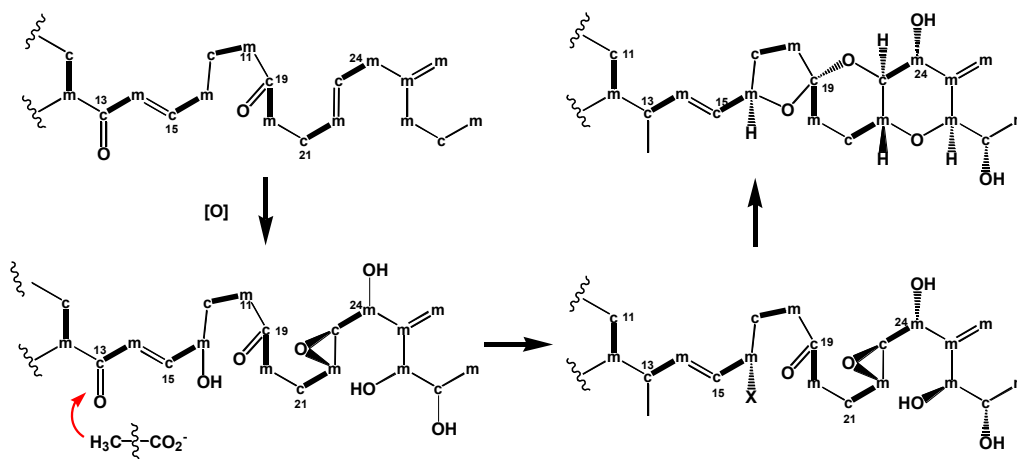


Figura IV.37.- Formación del sistema C-D-E a partir del sustrato propuesto por Murata y col.

¿En qué sentido el aislamiento del AB refuerza esta hipótesis? Resulta obvio que la incorporación de la unidad C₂ (C-17–C-18) en la biosíntesis del polieno precursor debe ser diferente en un caso y otro. Así mientras el módulo responsable en

el AO era el mínimo (KS, AT), en el caso del AB debe contener además una β -cetoreductasa (KR), lo que generará diferentes polienos precursores para ambos ácidos. (Figura IV.38).

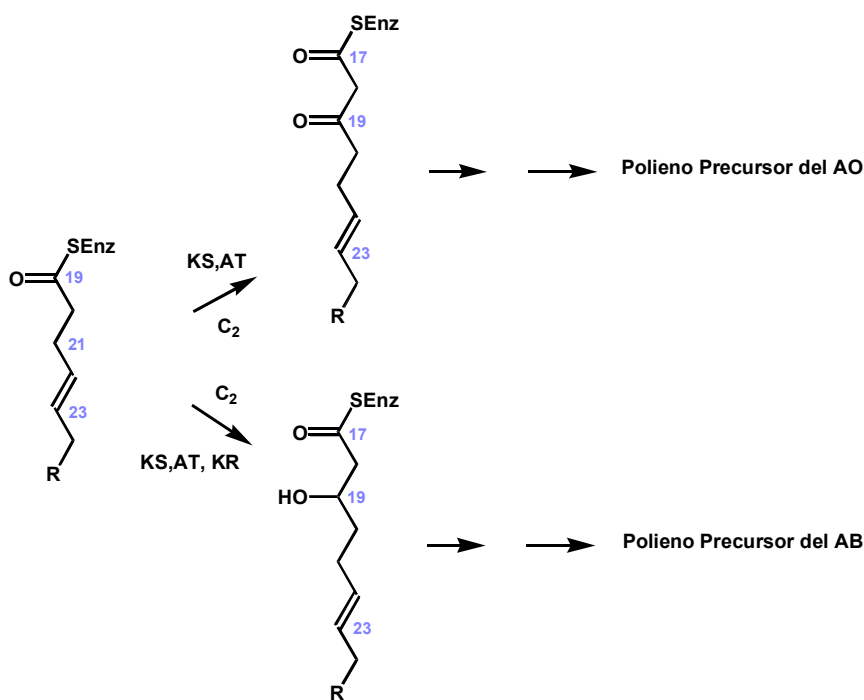


Figura IV.38.- Propuesta para la formación del polieno precursor para el AB.

Estos polienos se funcionalizarán de forma idéntica con la diferencia de la ausencia del grupo carbonilo en C-19, que evita la formación del sistema espiro en este carbono. De esta manera, el sistema de anillos C, D y E presente en el AO es sustituido por un único anillo oxano en el AB. Un dato importante en apoyo de esta hipótesis es que es consistente con la estereoquímica observada para el AB. En efecto, mientras el carbono C-23 posee una estereoquímica idéntica a la observada para el AO

el carbono C-16 la posee opuesta, lo que está de acuerdo con la imposibilidad de ciclación en cascada contemplada en la hipótesis de Murata y col., que a su vez dejaría un resultado como el AB, es decir, una cadena abierta. (Figura IV.39)

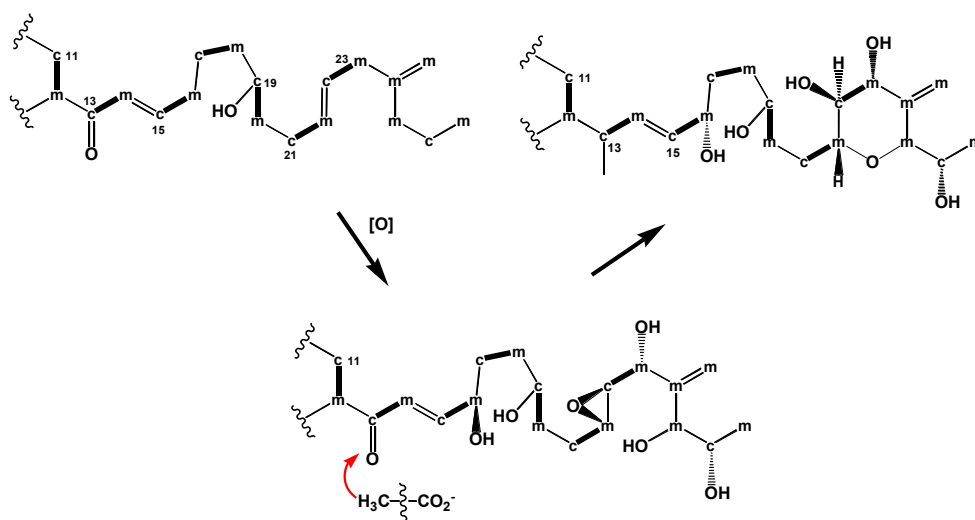


Figura IV.39.- Propuesta para la formación del anillo oxano del AB.

V.- AUTO-ASOCIACIONES DEL ÁCIDO OKADAICO

V.1.- ANTECEDENTES

V.2.- AISLAMIENTO DEL ÁCIDO OKADAICO EN ESTADO AGREGADO

V.3.- PROPUESTA ESTRUCTURAL CORRESPONDIENTE AL TETRÁMERO

V.- AUTO-ASOCIACIONES DEL ÁCIDO OKADAICO

V.1.- ANTECEDENTES

En estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio sobre las toxinas de tipo DSP se ha observado la capacidad que tienen estas para formar complejos con metales y auto-asociarse. Recientemente, han sido publicadas las condiciones y estructura del complejo AO-K⁺ (AOC),¹⁵⁷ donde se observó la presencia de una especie formada por dos unidades idénticas de OA y un catión de potasio. Las principales diferencias que se observaron entre este complejo y el AO en forma monomérica residen en los siguientes aspectos:

♦ En el espectro de RMN¹H para el AOC se observó una menor resolución de las señales que en el caso del AO, y además, algunas de ellas, las correspondientes a los protones H-12, H-14, H-15, H-23 y H-42, presentaron unas diferencias notables en los desplazamientos químicos tal como se muestra a continuación (AO→ AOC).

H-14 (δ_H 5.63→ δ_H 5.74), H-15 (δ_H 5.42→ δ_H 5.28),
H-12 (δ_H 3.35→ δ_H 3.47), H-23 (δ_H 3.35→ δ_H 3.40) y
H₃-42 (δ_H 0.97→ δ_H 0.93)

♦ Tanto para el AOC como para el AO los espectros ROESY mostraron señales de correlación, mientras que en el espectro NOESY se observaron picos de correlación para el AO y no para el AOC. Además, en el espectro de ROESY correspondiente al AOC se observaron dos nuevas señales correspondientes a los protones H-4 con H-41 y H-12 con H-26, imposibles de justificar en la estructura del AO, pero que apoyan a la estructura dimérica.

¹⁵⁷ Daranas, A. H.; Fernández, J. J.; Morales, E. Q.; Norte, M.; Gavín, J. A. *J. Med. Chem.*, **2004**, *47*, 10-13.

♦ Las medidas que se realizaron de los coeficientes de difusión D para el AOC y el AO en CDCl_3 , indicaron que la relación de masa aparente entre AOC y OA era 2.1.

♦ El espectro de masas para el AOC confirmó la presencia de dos unidades de AO y un ión K^+ .

♦ En el espectro de RMN ^1H y ^{13}C que presenta el AOC solo se observan señales correspondientes a los 44 carbonos que constituyen una unidad de AO. Por tanto, las dos unidades de AO que forman parte del AOC presentan elementos de simetría y deben ser totalmente equivalentes.

♦ El estudio conformacional del AOC llevó a proponer que se trataba de una especie dimérica con una estructura pseudomacro-cíclica, donde el catión de potasio se encontraba coordinado a los tres oxígenos (O-4, O-5 y O-6) contiguos a los carbonos C-7 y C-8, tal como se puede apreciar en la **Figura V.1**.

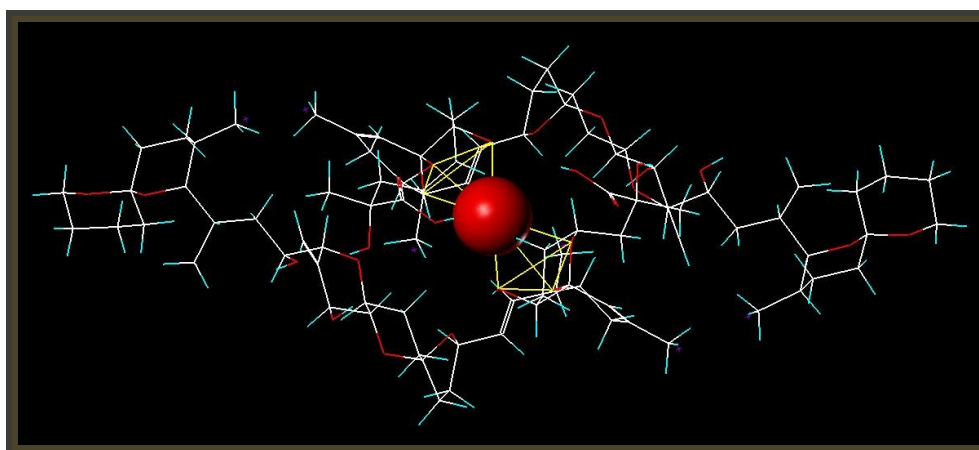


Figura V.1.- Estructura del dímero donde se muestran la coordinación del potasio, publicado por Daranas y col.¹⁵⁶

◆ Otro aspecto importante es la diferencia de actividad observada entre el AO y el OAC en ensayos realizados sobre músculo de útero de rata cuando se alteran las concentraciones extracelulares de diferentes cationes.¹⁵⁸ Así, en ausencia de Na⁺ o de Ca²⁺ la actividad y potencia de AO y AOC son idénticas, mientras que en ausencia de K⁺, OA es inactivo y AOC presenta un 100 % de actividad contráctil. Hechos que justifican claramente la necesidad del K⁺ para la actividad *in vivo*.

V.2.- AISLAMIENTO DEL ÁCIDO OKADAICO EN ESTADO AGREGADO

En el transcurso de esta tesis junto con los compuestos purificados se aisló una muestra con elevada concentración de AO. En este caso, al realizar los espectros de resonancia magnética nuclear de protón nos encontramos con ligeros cambios en los desplazamientos químicos en las mismas señales que en el caso del AOC, H-12, H-14, H-15, H-23 y H-42 (**Figuras V.2 y V.3**).

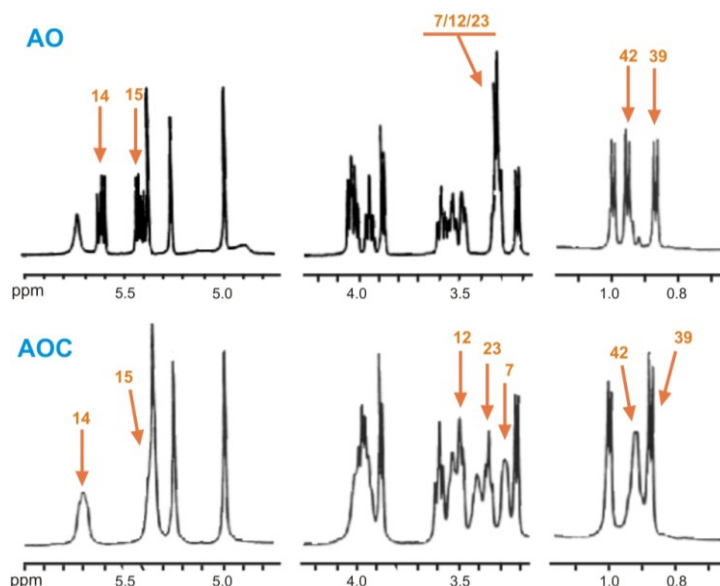


Figura V.2.- Espectros de RMN¹H del AO y AOC recogidos de la publicación del dímero.¹⁵⁶

¹⁵⁸ Norte, M.; Fernández, J. J.; Souto, M. L.; Gavín, J. A.; Candenas, M. L.; Ausina, P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1998**, 8, 1007-1012.

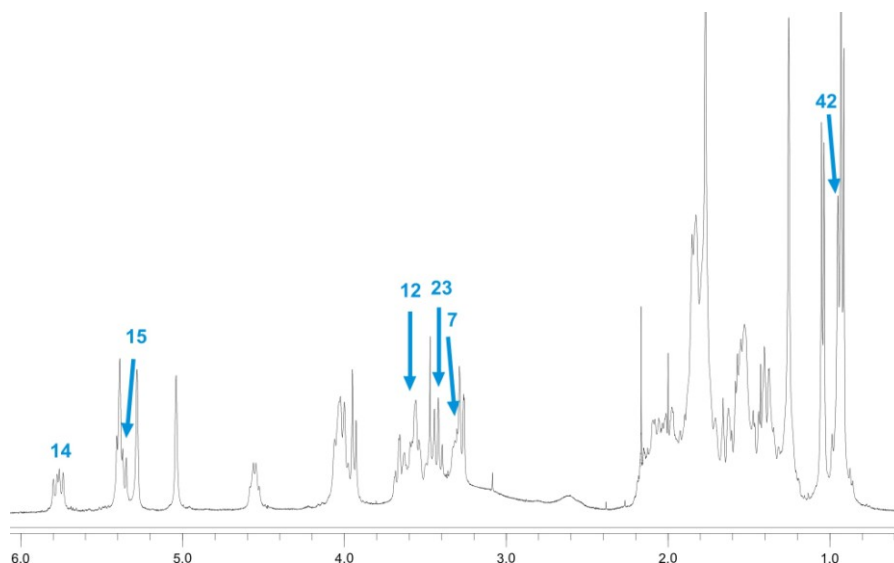


Figura V.3- Espectro de RMN¹H del AO agregado.

Del mismo modo, en el espectro de ROESY aparecieron las señales de correlación correspondientes a H-4 con H-41 y H-12 con H-26, características de la especie AOC. También se observó claramente en el espectro de protón que al añadir D₂O a la muestra el aspecto del espectro es similar al que presenta el AO en forma monomérica, lo cual parece encajar con lo observado en el caso del AOC, donde al utilizar disolventes orgánicos próticos aparecían equilibrios entre las distintas especies.

Por lo tanto, estos cambios nos hicieron pensar en un principio en la presencia nuevamente del complejo con algún metal, AOC-M⁺; pero fue al realizar la espectrometría de masas y observar un pico a *m/z* 3336.1 (**Figura V.4**) cuando fue detectada la presencia de un agregado que implicaba a más de dos unidades de AO. El estudio de los fraccionamiento en los espectros MS-MS, usando técnicas de nanospary y con la muestra disuelta en metanol, nos indican que este estado de agregación debería

estar formado por cuatro unidades de AO, y que de alguna forma debería también tener la posibilidad de acomodar tres moléculas del disolvente utilizado en la realización de los espectros. Los espectros de RMN¹³C realizados con esta especie vuelven a mostrar únicamente la presencia de las 44 señales que forman el esqueleto carbonado de este tipo de toxinas, y por tanto ponen de manifiesto la existencia nuevamente de elementos de simetría que hacen que las cuatro unidades de AO sean totalmente equivalentes.

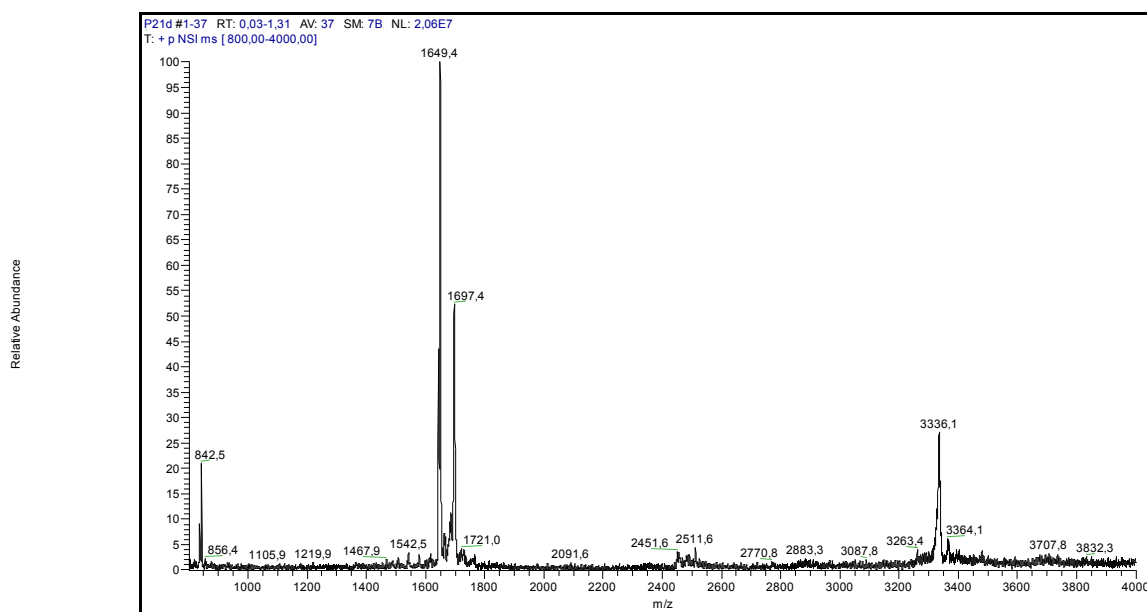


Figura V.4- Espectro de masas correspondientes al AO en su forma agregada.

Ante estos datos, suponiendo que la formación de este nuevo estado de agregación es totalmente simétrico, ya que al no observarse desdoblamiento en las señales de RMN¹H y ¹³C los entornos electrónicos en las distintas subunidades deben ser equivalentes y similares a los del AOC. Y teniendo en cuenta que los picos observados en el espectro de masas (**Figura V.4**) concuerdan con la presencia de monómero, dímero y tetrámero, y que no aparece un pico significativo correspondiente al trímero, parece lógico suponer que la formación del tetrámero tiene lugar a partir de la asociación de dos unidades diméricas. De este modo, partiendo del dímero publicado por el grupo,¹⁵⁶ se recurrió a experimentos de *docking* (acoplamiento) para proponer una conformación para este dímero de dímero.

V.3.- PROPUESTA ESTRUCTURAL CORRESPONDIENTE AL TETRÁMERO

La asociación de macromoléculas es esencial para que tengan lugar importantes procesos biológicos como por ejemplo la replicación del DNA o la síntesis de proteínas, para que esto ocurra las moléculas deben ser complementarias desde un punto de vista geométrico y químico, además normalmente forman oligómeros simétricos. Debido a esto, en los últimos años se han creado diversos programas para predecir estas estructuras y su simetría.^{159,160,161} Entre estos se encuentra el algoritmo creado por Comeau y col.,¹⁶⁰ disponible en el servidor público *ClusPro*,¹⁶² que es capaz de predecir la estructura y simetría de homo-oligómeros partiendo de la estructura del monómero y sabiendo cuantas unidades forman el complejo. Este proceso se puede resumir del siguiente modo:

¹⁵⁹ Berchanski, A.; Eisenstein, M *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, **2003**, *53*, 817-829.

¹⁶⁰ Hussain, A. S. Z.; Kumar, C. K.; Rajesh, C. K.; Sheik, S. S.; Sekar, K. *Nucleic Acid Research*, **2003**, *31*, 3356-3358.

¹⁶¹ Comeau, S. R.; Camacho, C. J. *Journal of Structural Biology*, **2005**, *150*, 233-244.

¹⁶² <http://structure.pitt.edu>

Partiendo de dos estructuras idénticas y utilizando el programa DOT¹⁶³ se generan por *docking* (acoplamiento) más de 20000 conformaciones que se filtran de acuerdo a aspectos energéticos, reduciendo el número a 2000. Sobre los conformeros resultantes dependiendo del número de monómeros que formen el complejo se aplican distintas operaciones de simetría, y se seleccionan aquellas conformaciones que se ajusten a estas operaciones, eliminando el resto. Finalmente se generan *clusters* (grupos) aplicando un RMSD de 3 Å, y se selecciona de cada uno de ellos la estructura que presente una mejor simetría.

Por lo tanto, aunque este programa se creó para proteínas, decidimos utilizarlo con el fin de generar todos los posibles tetrámeros a partir del dímero del AO. De este modo, en colaboración con Sr. Comeau se aplicó el método descrito, pero en nuestro caso el proceso fue algo más sencillo. Partiendo de dos unidades idénticas del dímero publicado se generaron por *docking* un total de 20000 estructuras. A continuación se aplicaron las operaciones de simetría sobre estas estructuras y se seleccionaron sólo aquellas con un valor de RMSD máximo de 3 Å, quedando finalmente un total de 76 agregados simétricos formados por un dímero de dímero. Sobre estas estructuras se aplicó posteriormente el programa X-Cluster, implementado por MacroModel versión 8.5, obteniéndose un total de siete familias estructurales, A, B, C, D, E, F y G (**Figuras V.5.a y V.5.b**). En estas figuras cada unidad de AO se representa con un color diferente, mientras que las unidades que forman el dímero se encuentran en el mismo color pero en tonalidades diferentes (azul oscuro-azul claro y marrón oscuro-marrón claro).

¹⁶³ Mandell, J. G.; Roberts, V. A.; Pique, M. E.; Kotlovyi, V.; Mitchell, J. C.; Nelson, E.; Tsigelny, Eyck, F. T. *Protein Eng.*, **2001**, *14*, 105-113.



Familia A



Familia B



Familia C

Figura V.5.a.- Representación estereoscópica de las familias conformacionales A, B y C resultantes al aplicar el X-Cluster.

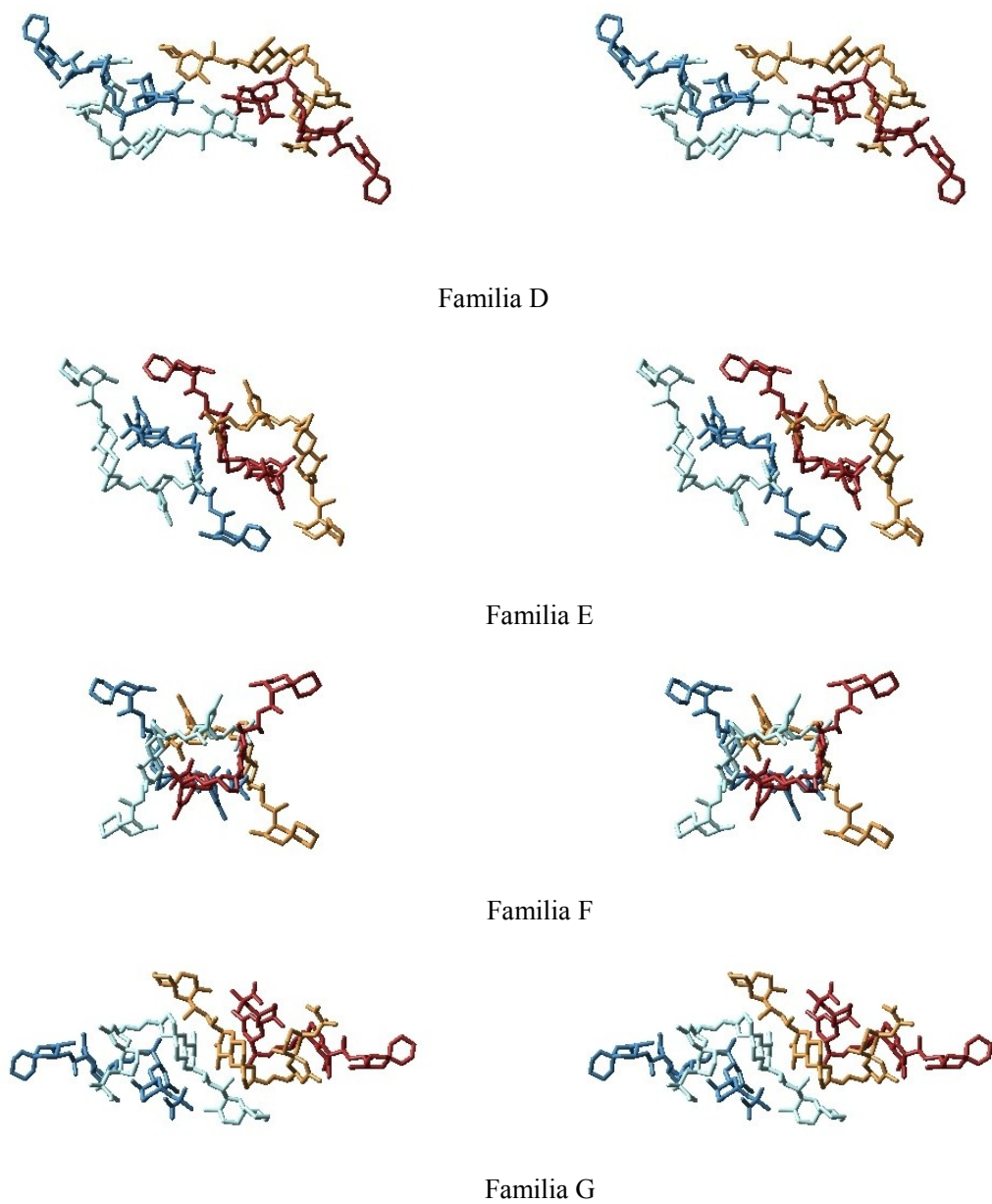


Figura V.5.b.-Representación estereoscópica de las familias conformacionales D, E, F y G resultantes al aplicar el X-Cluster.

Si se analizan cuidadosamente todas estas familias (**Figuras V.5.a y V.5.b**) se puede observar que únicamente el grupo F respeta lo observado en el espectro de RMN¹H, y explicaría la ausencia de desdoblamiento en las señales indicativo de que los monómeros que forman el tetrámero deben ser simétricos ya que todos los entornos electrónicos son equivalentes. Por el contrario, en el resto de las familias se ve claramente que esto no ocurre. Además, en el caso de la estructura F está presente una cavidad central donde pueden incluirse las tres moléculas de disolvente que se aprecian en el pico a m/z 3336.25 $[(AO)_4 + (MeOH)_3 + Na]^+$ del espectro de masas para la especie tetramérica (**Figura V.4**).

Por lo tanto, ante estos resultados proponemos que la agregación tetramérica que forma el AOA debe tener una estructura tal como se muestra en la **Figura V.6.a y V.6.b**, que está formada por cuatro unidades de monómero (cada una representada en un color diferente) que provienen de dos dímeros. Como se puede ver en estas figuras, la región hidrofóbica de la unidad de AO se dispone hacia el exterior, quedando los grupos carbonilos situados en el interior del agregado, donde se encuentra la cavidad que podría albergar las tres moléculas de disolvente.

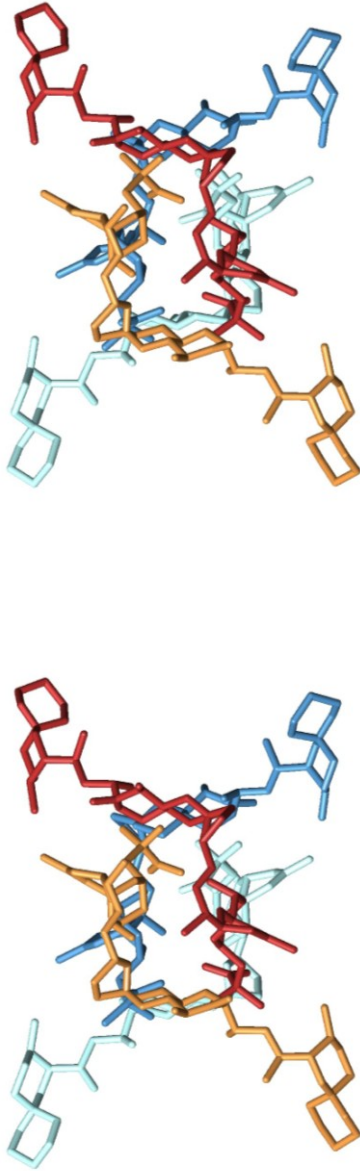


Figura V.6.a.- Imagen estereoscópica de la estructura propuesta para el tetramero de AO, proyección 1 (vista desde el eje z).

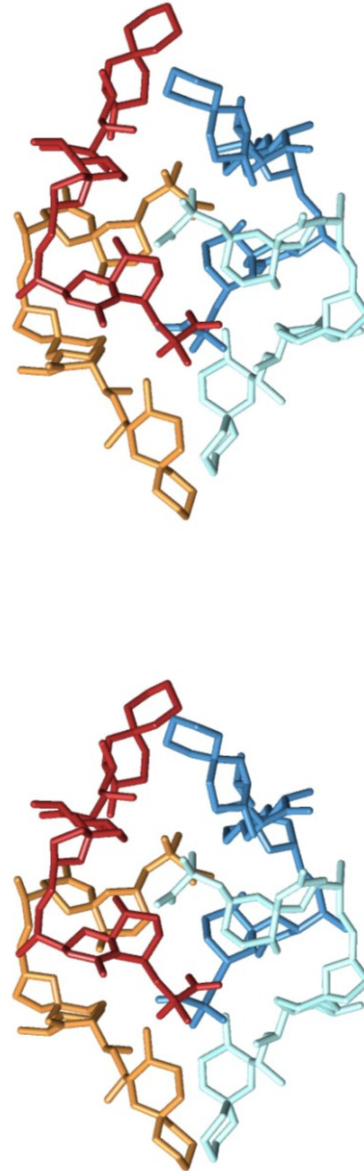


Figura V.6.b.- Imagen estereoscópica de la estructura propuesta para el tetramero de AO, proyección 2 (vista desde el eje y).

VI.- PARTE EXPERIMENTAL

VI.1.- TÉCNICAS EXPERIMENTALES GENERALES

VI.1.1.- Técnicas Espectroscópicas

VI.1.2.- Técnicas Cromatográficas

VI.1.3.- Técnicas de Cultivo

VI.2.- ESTUDIO DEL DINOFLAGELADO *PROROCENTRUM BELIZEANUM*

VI.2.1.- Condiciones de Cultivo

VI.2.2.- Mantenimiento y Crecimiento de las Células

VI.2.3.- Recolección y Extracción de las Células

VI.2.4.- Marcha Cromatográfica del Extracto

VI.2.5.- Datos Físicos de los Compuesto Aislados

VI.3.- ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE PP1 Y PP2A

VI.3.1.- Preparación de las Disoluciones Stock

VI.3.2.- Ensayo de inhibición de fosfatasas

VI.4.- MÉTODOS COMPUTACIONALES

VI.4.1.- Espectroscopía de RMN

VI.4.2.- Modelos de Inicio

VI.4.3.- Mecánica Molecular

VI.5.- CÁLCULOS TERMODINÁMICOS PARA LOS COMPLEJOS

AO-PP1 Y EAO-PP1

VI.- PARTE EXPERIMENTAL

VI.1.- TÉCNICAS EXPERIMENTALES GENERALES

VI.1.1.- Técnicas Espectroscópicas

VI.1.1.a.- Resonancia Magnética Nuclear

Para la realización de los experimentos de RMN los productos fueron disueltos en CDCl_3 y CD_3OD según la situación (usando como referencia interna TMS). Dichos espectros fueron realizados en espectrómetros AVANCE 300 MHz y BRUKER[®], AMX 400 y 500 MHz según las necesidades. Se utilizaron los programas suministrados por la casa BRUKER[®] para los experimentos RMN^1H , RMN^{13}C , COSY, TOCSY, ROESY, HMBC y HSQC. El procesamiento de los experimentos se realizó utilizando el programa MestRec.

VI.1.1.b.- Infrarrojo

Los espectros IR se llevaron a cabo con los productos en film, empleando un espectrofotómetro BRUKER[®], modelo IFS 55 (F.T.I.R.).

VI.1.1.c.- Rotación óptica

Las determinaciones de la actividad óptica se realizaron en un polarímetro PERKIN-ELMER[®], modelo 241, a 25° C, usando la línea D del sodio y en disolución de cloroformo o metanol, según el compuesto, usando células de 1 dm.

VI.1.1.d.- Espectrometría de Masas

Las medidas de espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) se desarrollaron en un espectrómetro VG AutoSpec FISON. Para realizar los espectros las muestras se introdujeron mediante sonda de sólidos calentada de 30° a 280° C, y la temperatura de la fuente de ionización se fijó a 230° C. Como gas se utilizó xenón, y como matriz *m*-nitrobenzol (NBA), que se salinizó con NaI.

Los análisis MS-MS se llevaron a cabo en un espectrómetro Thermo Finnigan LQC, equipado con una fuente de NanoSpray, y la muestra se aplicó diluida en MeOH con una velocidad de flujo de 50 nL/min.

VI.1.2.- Técnicas Cromatográficas

VI.1.2.a.- Cromatografía de gel-filtración

Para este tipo de cromatografía se utilizó como soporte Sephadex LH-20, de SIGMA[®] (Ø 6.5 cm x 60 cm) y (Ø 3 cm x 45 cm), y las columnas se montaron en metanol siguiendo las instrucciones del fabricante. La mezcla de eluyente utilizada en todos los casos fue *n*-Hexano:Diclorometano:Metanol en las proporciones 2:1:1.

VI.1.2.b.- Cromatografía en columna de media presión

Estas cromatografías se realizaron en columnas preempaquetadas LOBAR[®] GRÖBE B (Ø 25 mm x 310 mm) LiChroprep RP-18 y RP-8 (40-63 µm) de la casa MERCK[®], aplicando presión con una bomba de émbolo, FLUID METERING[®] modelo RP-SY. En este procedimiento, la relación peso de mezcla de producto/peso de gel de sílice, fue como mínimo de 1/200.

VI.1.2.c.- Cromatografía de alta eficacia (HPLC)

En este tipo de cromatografía se utilizó un HPLC SHIMADZU[®], compuesto por dos bombas LC-7A con mezclador de alta presión y un detector de fotiodo SPD-M6A. Y como columna para fase reversa se utilizó una XTerra[®] (Ø 1.9 cm x 15 cm) Prep MS C₁₈ (10 µm). El flujo empleado en todas las cromatografías fue entre 0.75 y 1.50 ml/min.

VI.1.2.d.- Cromatografía en capa fina (TLC)

La evolución de las cromatografías en columna se siguió mediante cromatografía en capa fina con cromatofolios de la casa MERCK[®], tipo AL TLC Sílica gel 60 F₂₅₄. Y para el revelado se siguieron distintos procedimientos:

- Visualización de la placa a la exposición de la luz UV (254nm).
- Pulverización sobre la placa de una disolución de ácido Fosfomolíbico al 5% en etanol y posterior calentamiento a 140° C.

Las cromatografías en general fueron eluidas en sistemas formados por mezclas de Benceno:Acetona:Metanol:Ácido Acético 6N (150:80:19:1).

VI.1.3.- Técnicas de Cultivo

VI.1.3.a.- Esterilización de material y medios de cultivo

Todo el material puesto en contacto con los cultivos, desechable o no, fue aséptico. El material no desechable se lavó dos veces con un programa enérgico, pH 12.2, en una lavadora MIELE[®] Electronic G7747, y seguidamente se autoclavó a 121°C durante 30 minutos en un aparato PENTA[®] con capacidad para 140 litros. Las manipulaciones se realizaron bajo una campana de flujo laminar TELSTAR BH-100, previa exposición del material a luz UV.

El agua usada como soporte en la preparación de los medios fue agua de mar recogida lejos de la orilla con el fin de disminuir la presencia de agentes contaminantes y partículas en suspensión, que se transportó y almacenó en tanques de plástico durante semanas antes de su uso (la utilización de agua envejecida suele estar recomendada). Previamente a la adición de los nutrientes a partir de las disoluciones “*stock*”, se le añadió un 5 % de agua destilada para asegurarnos que la adición de éstos no alterase la

salinidad de forma significativa. Se esterilizó pasándola a través de un sistema de filtros (1 μm , 0.45 μm y 0.22 μm) con una bomba peristáltica PR-2003 de J.P.SELECTA.

Las disoluciones “*stock*” fueron filtradas usando membranas de nylon de la casa NALGENE® con un poro de 0.22 μm , y almacenadas en botellas de poliestireno COSTAR®.

VI.1.3.b.- *Recolección de las células*

El método con el cual se procedió para recolectar las células, una vez eliminada el agua sobrenadante de las peceras, fue el de centrifugación a 7000 r.p.m. y una temperatura entre 5 y 10 °C. Para ello se utilizó una centrifuga SORVAL® RC-5B.

VI.2.- ESTUDIO DEL DINOFLAGELADO *PROROCENTRUM BELIZEANUM*

VI.2.1.- Condiciones de Cultivo

VI.2.1.a.- *Medio de Cultivo*

En primer lugar se buscó un medio de cultivo apropiado para el crecimiento de las células, y con este fin se utilizó el Guillard-K,²⁹ que usa como soporte agua de mar. Esta agua de mar se preparó de acuerdo a lo indicado en el **Apartado VI.1.3.a**, y el siguiente paso fue añadir los correspondientes nutrientes al agua con jeringuillas estériles a partir de las disoluciones “*stock*”. Éstas se prepararon disolviendo la cantidad de producto requerida en un 80-90% del volumen final de agua destilada necesaria, se sometieron a agitación hasta conseguir una disolución total y se completó el volumen con agua destilada.

Una vez preparadas las disoluciones se esterilizaron por filtración, pasándolas por membranas con poros de 0.22 μm en condiciones asépticas, y se almacenaron en la nevera. La naturaleza y concentraciones molares de las soluciones “stock” de nutrientes para el medio K se da en la **Tabla VI.1**. Estas disoluciones se preparan de tal forma que, tomando 1 ml de disolución de nutrientes por litro de medio de cultivo resulte la concentración deseada.

Aditivos	Concentración final en el medio (M)	Disolución “Stock” (g/l agua destilada)
1.-Nutrientes mayoritarios		
NaNO ₃	8.83x10 ⁻⁴	75.05
NaH ₂ PO ₄	1x10 ⁻⁵	1.38
Na ₂ SiO ₃ .9H ₂ O*	1.07x10 ⁻⁵	30.0
2.-Metales traza		
FeEDTA	1.46x10 ⁻⁵	4.3
MnCl ₂ .4H ₂ O	9x10 ⁻⁷	0.18
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8x10 ⁻⁸	0.02
CoCl ₂ .6H ₂ O	5x10 ⁻⁸	0.01
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	3x10 ⁻⁸	7x10 ⁻³
CuSO ₄ .5H ₂ O	1x10 ⁻⁸	2.5x10 ⁻³
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	9x10 ⁻⁵	33.6
3.-Vitaminas		
Tiamina.HCl	3x10 ⁻⁷	0.1
Biotina	2.1x10 ⁻⁹	5.1x10 ⁻⁴
B ₁₂	3.7x10 ⁻¹⁰	5.0x10 ⁻⁴
4.-Otros aditivos		
TRIS	1x10 ⁻³	121.14
NH ₄ Cl	5x10 ⁻⁵	2.68
H ₂ SeO ₃	1x10 ⁻⁸	1.3x10 ⁻³
* Sólo se usa en el caso de que se realicen cultivos de diatomeas		

Tabla VI.1.- Composición del medio Guillard K.

VI.2.1.b.- Temperatura

La temperatura empleada fue 23 °C, ya que se ha observado que a esta temperatura el organismo crece adecuadamente.

VI.2.1.c.- Intensidad lumínica y fotoperiodo

Los mejores resultados se obtuvieron cultivando bajo luz suministrada por tubos fluorescentes de neón, con una intensidad lumínica de aproximadamente $160 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-2}$, equivalente al 10% de la existente en la superficie del agua a pleno sol y con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad.

VI.2.1.d.- Necesidad extra de aireación

Ni durante el mantenimiento del cultivo, realizado en erlenmeyers de 50 ml conteniendo 30 ml de cultivo, ni en los posteriores niveles del escalado del cultivo para la obtención de biomasa, erlenmeyers de 250 ml con 150 ml de cultivo, de 5 l con 2.5 l de cultivo y tanques de 80 l con 45 l de cultivo, fue necesario un aporte extra de aire. Esto es debido a que la cámara de aire que queda en cada uno de estos recipientes, mayor de 1/3 del volumen total del recipiente, es suficiente para un buen crecimiento celular.

VI.2.2.- Mantenimiento y Crecimiento de las Células

En todos los casos, tal y como ya se ha mencionado, la manipulación de los cultivos se realizó bajo campana de flujo laminar en condiciones asépticas, y el material que se puso en contacto con los cultivos fue desechable o previamente esterilizado en el autoclave a 121° C durante 30 minutos.

VI.2.2.a.- Mantenimiento

El mantenimiento del *Prorocentrum belizeanum* se llevó a cabo en un cuarto de cultivos acondicionado en el laboratorio con paneles de iluminación, control de fotoperiodos y sistemas de refrigeración. Lo que permitió mantener la temperatura a 23° C, y con luz generada por tubos fluorescentes de neón se crearon ciclos de luz-oscuridad de 16:8 horas. El mantenimiento se realizó en recipientes de 50 ml con 30 ml de medio.

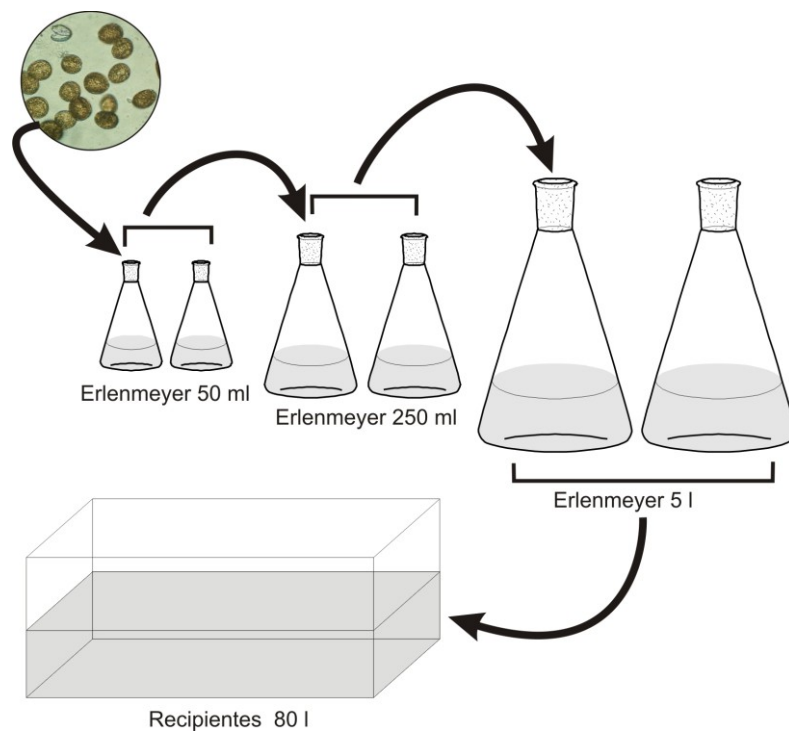
La renovación del medio se realizó cada 21 días, tomando como inóculo un erlenmeyer de 50 ml con 30 ml de cultivo que se repartió entre 6 erlenmeyers del mismo volumen que contenían 25 ml de medio K. El volumen del recipiente ocupado con cultivo fue aproximadamente 2/3 del volumen total, quedando 1/3 como cámara de aire por lo que no fue necesario un aporte extra de aire como ya indicamos anteriormente.

VI.2.2.b.- Crecimiento

El escalado del cultivo se realizó en un cuarto de cultivos acondicionado en el laboratorio como el indicado en el **Apartado VI.2.2.a**, permitiendo tanto la manipulación como la incubación de recipientes con grandes volúmenes de cultivo. La temperatura se estabilizó a 23° C, e igual que en el caso anterior, la luz utilizada en los ciclos luz-oscuridad de 16:8 horas fue generada por tubos fluorescentes de neón distribuidos de forma simétrica en el cuarto.

El trasvase a recipientes mayores se realizó cada tres semanas, tiempo que tardaban las células en alcanzar su máximo crecimiento. Partiendo de erlenmeyers de 50 ml con 30 ml de cultivo se fue aumentando el volumen de forma progresiva de acuerdo con lo que se indica en el **Esquema VI.1**: erlenmeyers de 250 ml con 150 ml de cultivo, erlenmeyers de 5 l con 2.5 l de cultivo y recipientes de 80 l con 45 l de cultivo.

El paso de un nivel a otro se realizó tomando como inóculo dos recipientes del nivel inferior a uno de capacidad superior, conteniendo la cantidad de medio necesario para completar los volúmenes indicados. La cámara de aire disponible en todos los niveles fue aproximadamente igual o superior a 1/3 del volumen del recipiente.

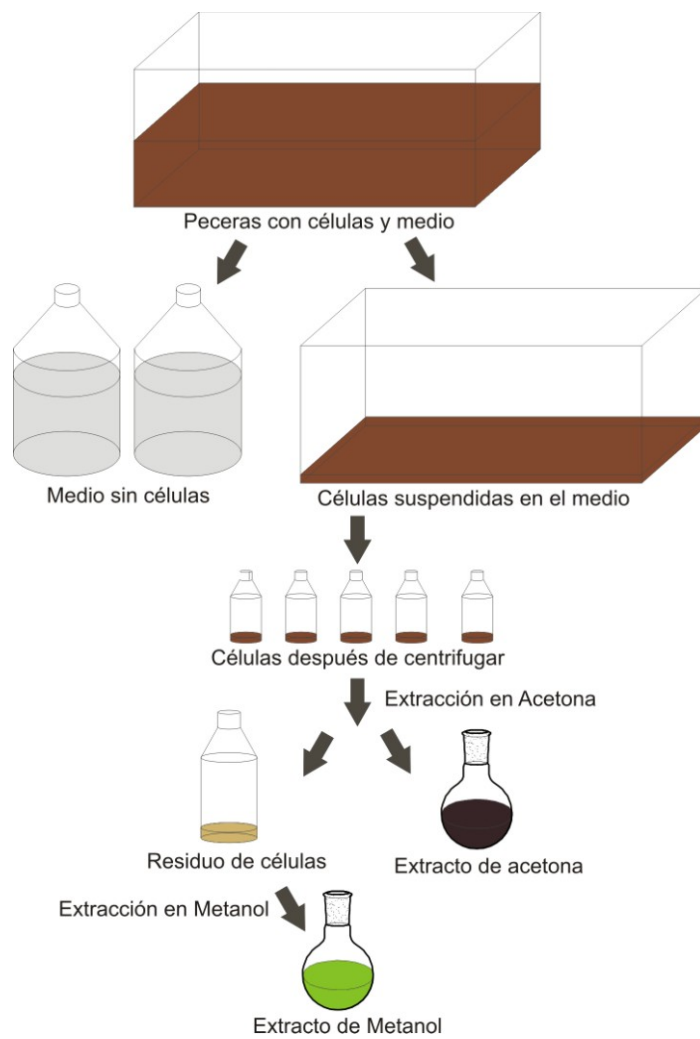


Esquema VI.1.- Etapas del cultivo a gran escala de *P. belizeanum*.

A la vista de los datos anteriores, se puede establecer el tiempo necesario para completar un ciclo de cultivo del *P. belizeanum* en un plazo no inferior a los 5 meses. Y este proceso se repitió sucesivamente hasta obtener un total de aproximadamente 1020 l de cultivo.

VI.2.3.- Recolección y Extracción de las Células

Pasado el tiempo necesario desde la inoculación de la célula madre para obtener aproximadamente 1100 litros de cultivo, se procedió a la recolección. Aprovechando el carácter bentónico del organismo en estudio, el primer paso de este proceso fue eliminar el medio, ya que las células se quedan adheridas en las paredes de la pecera. De esta manera se redujo considerablemente la cantidad de agua de mar enriquecida, lo que permitió suspender las células con la ayuda de una varilla de teflón en un pequeño volumen, que posteriormente se eliminó por centrifugación a 7000 r.p.m. y 5-10 °C. Una vez separadas las células del medio, se pasó a su maceración en acetona al tiempo que se sumergían en un baño de ultrasonido durante 15 minutos a 30°C para ayudar a la ruptura de las células, este proceso se repitió cinco veces. Y a continuación, los restos de células fueron extraídos con metanol hasta agotamiento. Después de filtrar a través de una placa de vidrio y proceder a la evaporación de los disolventes, se obtuvieron dos extractos, el de acetona de un color marrón oscuro (22.1 g) y otro en metanol de color verde (16.0 g).

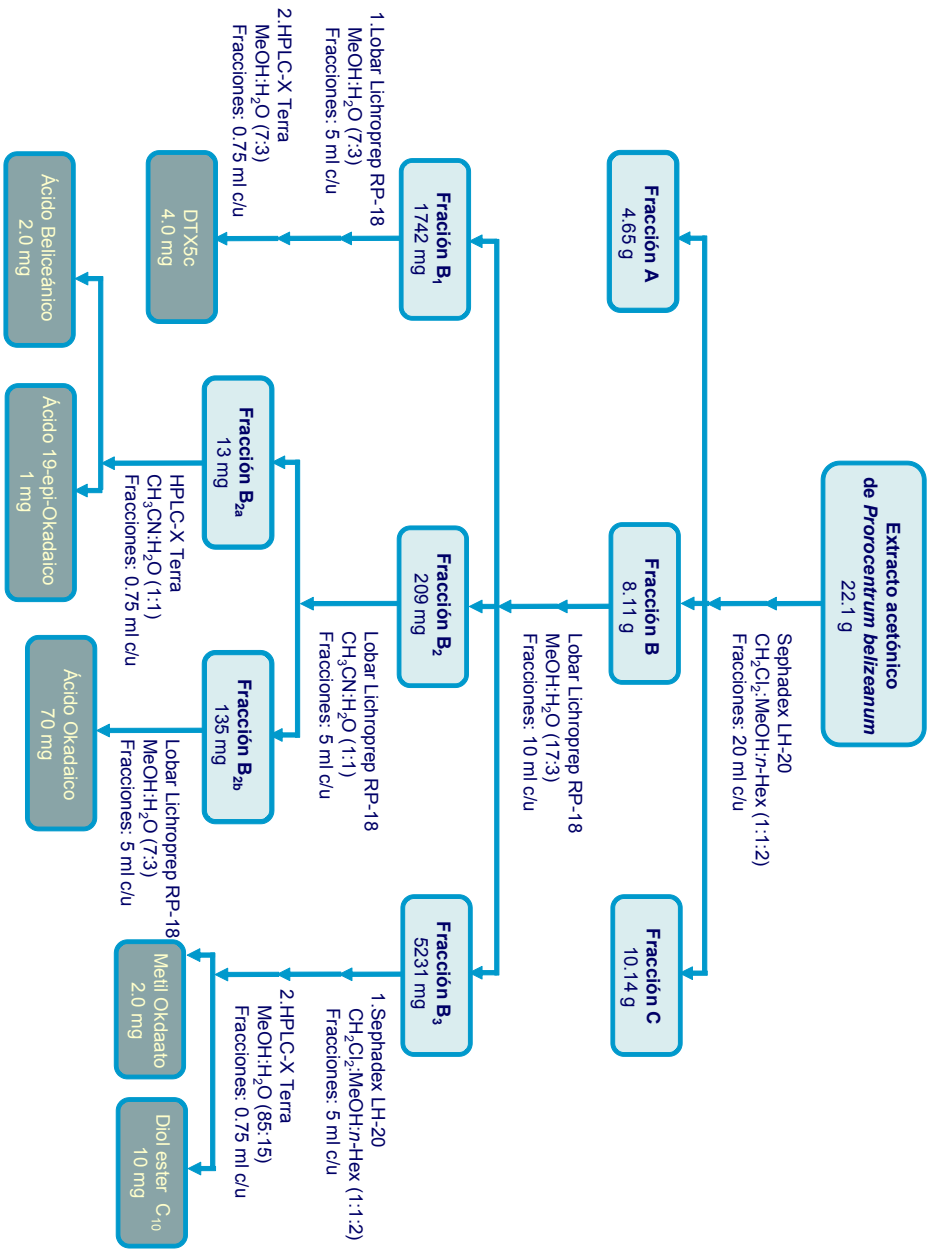


Esquema VI.2.- Procedimiento de extracción de las células de *P. belizeanum*

VI.2.4.- Marcha Cromatográfica del Extracto

El extracto de acetona (22.1 g) fue inicialmente cromatografiado en una columna de Sephadex LH-20 (\varnothing 6.5 cm x 60 cm) utilizando como eluyente la mezcla *n*-Hexano:Diclorometano:Metanol (2:1:1) (**Esquema III.3**). Se recogieron un total de 90 fracciones, de 20 ml cada una, y aquellas que mostraron un comportamiento parecido en cromatografía de capa fina fueron reunidas y concentradas. Debido a que esta columna soporta un máximo de 6 g, el extracto inicial se dividió en varias partes, y todas ellas fueron cromatografiadas en idénticas condiciones, uniendo finalmente las fracciones iguales resultantes de cada columna. Esto dio lugar a tres fracciones diferentes, de peso A=4.65 g, B=8.11 g y C=10.14 g.

Una vez eliminada la mayor parte de las clorofilas (fracción A) y carotenos (fracción C) presentes en este extracto, se decidió continuar con la fracción B, cuyos TLC mostraron la presencia del AO como metabolito mayoritario. En este punto, la fracción B (8.11 g) se cromatografió varias veces por una columna Lobar RP-18 (\varnothing 25 mm x 310 mm) eluida con la mezcla MeOH:H₂O (17:3). Nuevamente se dividió la fracción en varias partes ya que el límite para estas columnas se encuentra en 1 g. En este caso, en cada una de las marchas cromatográficas se recogieron 100 fracciones de 10 ml cada una, que fueron reunidas según su comportamiento en TLC, dando lugar a tres nuevas fracciones, B₁=1742 mg, B₂=209 mg y B₃=5231 mg.



Esquema VI.3.-Marcha Cromatográfica del extracto inicial de *P. belizeanum*.

VI.2.4.a.- Estudio de la fracción B₁

A partir de la fracción B₁ se llevaron a cabo varias cromatografías en fase reversa utilizando nuevamente una columna Lobar RP-18 (Ø 25 mm x 310 mm), pero en este proceso el eluyente fue la mezcla MeOH:H₂O (7:3), y se recogieron de cada columna 125 fracciones con 5 ml cada uno. De acuerdo a su comportamiento en TLC se reunieron los tubos 74-120, dando lugar a una única fracción. Posteriormente, esta fracción se cromatografió en una columna de HPLC preparativa XTerra (Ø 1.9 cm x 15 cm), utilizando la mezcla MeOH:H₂O (7:3) y recolectando 150 fracciones con 0.75 ml, lo que permitió purificar el compuesto DTX-5c (4.0 mg).

VI.2.4.b.- Estudio de la fracción B₂

La siguiente fracción que se sometió a estudio fue la B₂, la cual se cromatografió por una columna Lobar RP-18 (Ø 25 mm x 310 mm) utilizando como fase móvil la mezcla CH₃CN:H₂O (1:1) y las 100 fracciones de 5 ml que se recogieron se dividieron en dos únicas fracciones B_{2a} (13 mg) y B_{2b} (135 mg). A continuación, la fracción B_{2a} se cromatografió a través de una columna de HPLC XTerra (Ø 1.9 cm x 15 cm) con una mezcla CH₃CN:H₂O (1:1), lo que dio lugar a la purificación del AB (2.0 mg), y del AEO (1.0 mg.). Por otro lado, la fracción B_{2b} se cromatografió por una columna Lobar RP-18 (Ø 25 mm x 310 mm) utilizando como eluyente MeOH:H₂O (7:3), y de este modo se purificó el metabolito mayoritario AO (70 mg).

VI.2.4.c.- Estudio de la fracción B₃

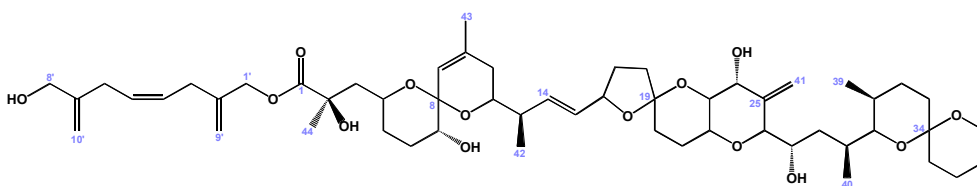
La tercera de las fracciones, B₃, se dividió en varias partes y se cromatografió inicialmente por una columna de Sephadex LH-20 (Ø 3 cm x 45 cm), utilizando como eluyente la mezcla *n*-Hexano:Diclorometano:Metanol (2:1:1). En cada columna se recolectaron 100 fracciones con 5 ml cada una y todas las fracciones equivalentes de las distintas columnas se unieron. La marcha cromatográfica se continuó con la fracción correspondiente a los tubos 25-40, que se cromatografió por una columna preparativa de HPLC XTerra, utilizando como fase móvil la mezcla MeOH:H₂O

(85:15). De este modo se purificaron el Diol Éster C₁₀ del AO (10 mg) (7-hidroximetil-2-metileno-octa-4,7-dienil okadaato), y el ya conocido Metil Okadaato (2 mg).

VI.2.5.- Datos Físicos de los Compuesto Aislados

Una vez aislados los nuevos productos de la microalga el siguiente problema a abordar fue la determinación de la estructura de los mismos. Esto se llevó a cabo haciendo uso de varios métodos de espectroscopía sobre los productos puros (**Apartado VI.1.1**).

Los procesos de elucidación estructural por métodos espectroscópicos son deductivos y consisten en realizar uno o más experimentos espectroscópicos para alcanzar las conclusiones estructurales por el análisis combinado de los resultados. A continuación se resumen los datos obtenidos.

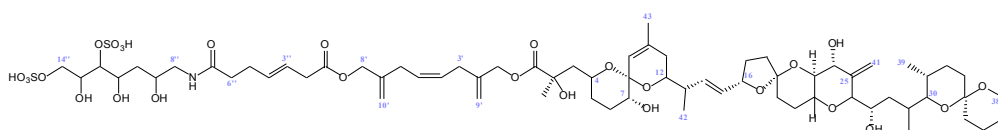
VI.2.5.a.- Diol ester C₁₀ del Ácido Okadaico

Sólido amorfo blanco IR $\nu_{\text{máx}}$: 3443, 2924, 2360, 1732, 1682, 1456, 1076 cm^{-1}
 $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +8.4$ (c 0.24, CHCl_3)
 RMN ^1H y ^{13}C , CDCl_3

n° C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	n° C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	n° C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
1	176.3		19	106.0		37	25.3	1.56/1.53
2	75.8		20	30.0	1.42/1.37	38	60.7	3.68/3.55
3	44.2	2.03/1.70	21	28.0	1.81/1.74	39	11.0	0.92
4	68.7	3.99	22	70.3	3.60	40	16.5	1.06
5	32.0	1.72/1.35	23	77.4	3.43	41	112.7	5.37/5.05
6	27.7	1.82/1.78	24	71.3	4.12	42	16.2	1.02
7	72.0	3.39	25	143.9		43	23.2	1.73
8	71.6		26	85.3	3.94	44	27.8	1.41
9	122.3	5.34	27	66.3	4.05	1'	67.5	4.68/4.58
10	138.7		28	35.5	1.33/0.97	2'	142.4	
11	33.3	1.88/1.86	29	31.5	1.94	3'	31.3	2.86
12	71.2	3.57	30	75.2	3.30	4'	128.0	5.56
13	42.3	2.28	31	28.0	1.80	5'	129.2	5.60
14	135.7	5.54	32	27.0	2.02/1.87	6'	31.3	2.85
15	131.3	5.51	33	31.0	1.54/1.40	7'	147.9	
16	79.5	4.48	34	96.3		8'	64.8	4.06
17	31.0	2.16/1.60	35	36.2	1.65/1.45	9'	113.7	5.10/5.02
18	37.3	2.05/1.87	36	19.0	1.88/1.55	10'	110.7	5.05/4.89

FAB HRMS: m/z 977.5541 (calc. 977.5602, $[\text{C}_{54}\text{H}_{82}\text{O}_{14}+\text{Na}]^+$)

VI.2.5.b.- DTX-5c



Sólido amorfo blanco

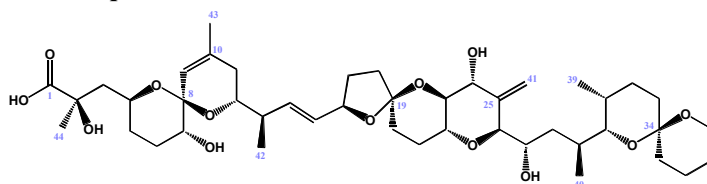
$[\alpha]_D^{25} = +4.5$ (c 0.19, MeOH)

RMN ^1H y ^{13}C , CD_3OD

IR $\nu_{\text{máx}}$: 3417, 2931, 1731, 1644, 1454, 1235,
1071 y 976 cm^{-1}

n°C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	n°C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	n°C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
1	176.2		24	71.1	4.10	3'	31.8	2.86/2.86
2	74.9		25	146.2		4'	128.8	5.59
3	45.8	1.89/1.81	26	85.9	3.92	5'	128.8	5.59
4	67.6	4.00	27	65.5	4.08	6'	31.8	2.83/2.83
5	32.5	1.73/1.36	28	36.7	1.36/0.94	7'	148.1	
6	26.9	1.89/1.66	29	31.8	1.87	8'	66.9	4.52
7	72.5	3.34	30	76.1	3.26	9'	112.6	5.06/4.99
8	97.4		31	28.3	1.80	10'	109.8	5.01/4.87
9	123.2	5.26	32	26.9	2.00/1.80	1''	172.4	
10	138.7		33	30.4	1.36/1.36	2''	38.1	3.08/3.08
11	32.5	1.99/1.89	34	95.6		3''	123.2	5.61
12	71.8	3.69	35	36.7	1.59/1.43	4''	133.7	5.61
13	42.3	2.35	36	19.1	1.87/1.52	5''	29.0	2.33/2.33
14	135.8	5.78	37	26.2	1.50/1.38	6''	36.0	2.29/2.29
15	131.6	5.54	38	60.6	3.70/3.52	7''	175.2	
16	79.6	4.57	39	10.0	0.93	N-H		4.08
17	31.1	2.21/1.57	40	16.3	1.05	8''	45.8	3.26/3.26
18	37.4	1.99/1.85	41	111.9	5.33/5.01	9''	69.0	3.90
19	106.8		42	16.3	1.05	10''	38.1	1.94/1.73
20	33.2	1.92/1.87	43	22.6	1.73	11''	69.7	4.24
21	26.9	1.98/1.85	44	25.4	1.42	12''	80.3	4.33
22	70.4	3.64	1'	67.6	4.62/4.52	13''	71.1	4.22
23	77.5	3.36	2'	142.4		14''	70.7	4.38/4.12

FAB HRMS: m/z 1498.5852 (Calc. 1498.5852, $[\text{C}_{68}\text{H}_{103}\text{NO}_{27}\text{S}_2\text{Na}_3]^+$)

VI.2.5.c.- Ácido 19-*epi*-Okadaico

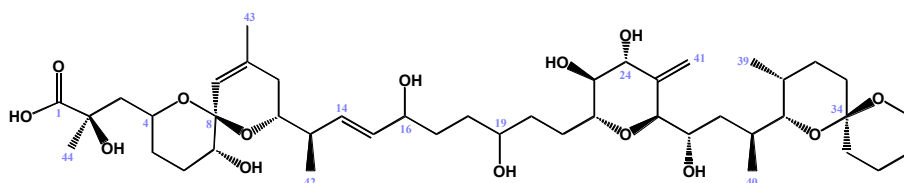
Sólido amorfo

IR $\nu_{\text{máx}}$: 3433, 2925, 2854, 1741, 1587, 1464, 1381,
1261, 1178, 1074 cm^{-1} $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -5.84$ (*c* 0.068 MeOH)RMN ^1H y ^{13}C , CD_3OD

$n^\circ\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$n^\circ\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$n^\circ\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
1	182.7		16	82.9	4.43	31	28.4	1.72
2	75.4		17	31.6	1.98(proR)	32	27.2	1.95 (proR)
					1.81(proS)			1.30 (proS)
3	46.3	1.81(proS)	18	33.3	2.36(pro R)	33	30.5	1.27
		1.60(proR)			1.57(proS)			
4	68.5	3.96	19	109.0		34	97.8	
5	32.6	1.73 (proS)	20	34.4	1.82(proR)	35	36.5	1.52
		1.25 (proR)			1.74(proS)			1.28
6	28.0	1.82 (proR)	21	28.7	1.92	36	19.4	1.81(proS)
		1.59 (proS)			1.45			1.44(proR)
7	73.0	3.26	22	70.9	3.60	37	26.3	1.42
8	97.4		23	81.8	2.93	38	61.1	3.61(proS)
								3.42(proR)
9	123.3	5.17	24	71.3	4.05	39	10.8	0.83
10	139.1		25	146.4		40	16.4	0.95
11	33.7	1.93(proS)	26	86.0	3.84	41	112.1	5.27
		1.66(proR)						4.96
12	71.6	3.78	27	65.7	4.00	42	16.8	1.04
13	42.1	2.28	28	36.5	1.33 (proR)	43	22.8	1.64
					0.86 (proS)			
14	136.7	5.80	29	31.9	1.79	44	27.7	1.21
15	133.1	5.56	30	76.6	3.17			

FAB HRMS: m/z 827.4 (Calc. 827.4558, $[\text{C}_{44}\text{H}_{68}\text{O}_{13}\text{Na}]^+$)

VI.2.5.d.- *Ácido Belizeánico*



Sólido amorfo
 $[\alpha]_D^{25} = +2.74$ (c 0.073 MeOH)

IR $\nu_{\text{máx}}$: 3393, 2927, 2857, 1732, 1601, 1458,
 1385, 1238, 1180, 1088 cm^{-1}

RMN ^1H y ^{13}C , CD_3OD

$n^\circ\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$n^\circ\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$n^\circ\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
1	182.5		16	71.9	3.97	31	28.3	1.74
2	76.6		17	31.8	1.65(2H)	32	27.4	1.96/1.28
3	46.2	1.82/1.60	18	31.0	1.52(2H)	33	30.8	1.27
4	68.0	3.97	19	70.7	3.57	34	96.2	
5	32.7	1.70/1.20	20	27.6	1.60(2H)	35	36.4	1.54/1.33
6	27.8	1.83/1.59	21	27.3	2.08(2H)	36	19.2	1.81/1.44
7	72.8	3.27	22	74.0	3.55	37	25.9	1.44
8	97.6		23	78.1	2.91	38	60.8	3.63/3.44
9	123.2	5.18	24	73.8	3.93	39	10.7	0.85
10	139.3		25	146.4		40	16.2	0.97
11	33.6	1.91/1.73	26	85.1	3.82	41	110.6	5.18/4.92
12	71.6	3.72	27	65.6	3.98	42	16.7	1.03
13	42.2	2.26	28	36.4	1.29/0.85	43	22.5	1.65
14	134.5	5.74	29	31.7	1.82	44	30.1	1.20
15	133.9	5.44	30	76.3	3.18			

MS-ES: m/z 847.7 (calc. 847.4820, $[\text{C}_{44}\text{H}_{72}\text{O}_{14} + \text{Na}]^+$)

VI.3.- ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE PP1 Y PP2A

VI.3.1.- Preparación de las Disoluciones Stock

VI.3.1.a.- *Ácido 19-epi-Okadaico y Ácido Okadaico*

El AEO se cuantificó mediante RMN¹H, utilizando como patrón interno el C₆H₆, y de esta muestra se preparó una disolución “stock”, 1 mM en MeOH, a partir de la cual se realizaron diluciones seriadas en H₂O hasta conseguir las concentraciones deseadas, desde 0.01 nM hasta 100 μM. La concentración de disolvente orgánico en la mezcla de reacción fue inferior al 1% (v/v). Estas muestras se almacenaron en una nevera a 6°C. Del mismo modo se prepararon las diluciones para el AO, pero en este caso el rango de concentraciones fue de 0.1 nM a 1 mM, y se partió de una disolución *stock* 10 mM.

VI.3.2.b.- *Tampón de Reacción*

Se preparó una disolución “*stock*” de tampón de reacción con una concentración 10X, 500 mM HEPES (*CAMBREX*), 1 mM Na₂EDTA (Riedel-deHaën), 50 mM DTT (SIGMA) y 0.25% Tween-20 (*Acofarma*®), pH 7.0. Esta disolución se dividió en alícuotas de 1 ml que se almacenaron a -20 °C.

VI.3.2.c.- *Proteína Fosfatasa tipo 1 (PP1)*

La proteína PP1 que se utilizó en el ensayo fue de músculo esquelético de conejo, de New England *BioLab*, diluida en 200 mM NaCl, 50 mM HEPES (pH 7.0, 25 °C), 1 mM MnCl₂, 0.1 mM EGTA, 2.5 mM DTT, 0.025% Tween-20 y 50% glicerol. Y a partir de esta disolución se prepararon diluciones antes de cada ensayo, utilizando el tampón de reacción, con 0.025 unidades/μl. Todas estas muestras se almacenaron a -70°C.

VI.3.2.d.- Proteína Fosfatasa tipo 2A (PP2A)

Para el ensayo de PP2A se utilizó proteína de riñón de bovino de SIGMA, diluida en 50 mM Tris-HCl (7.0), 14 mM 2-mercaptoetanol, 1 mM benzamidina, 0.1 mM PMSF, 1 mM EDTA y 50% glicerol. Y en este caso se prepararon diluciones, en el tampón, que contenían 0.0044 u/ μ l, y que junto con la muestra inicial de PP2A se guardaron a -70 °C.

VI.3.2.e.- Cloruro de Manganeso

A partir del $MnCl_2$ se preparó una disolución “*stock*” 10 mM (10X) que se guardó en alícuotas de 100 μ l a -20 °C.

VI.3.2.f.- Fluoresceína difosfato (FDP)

Como sustrato se utilizó FDP (fluoresceína difosfato) de la casa SIGMA, a partir del cual se preparó una disolución “*stock*” 280 μ M en H_2O (Panreac), que se almacenó a -20 °C en alícuotas de 500 μ l.

VI.3.2.- Ensayo de inhibición de fosfatasas

Los ensayos enzimáticos se realizaron en microplatos de 96 pocillos no traslúcidos, y las mezclas de reacción se llevaron a cabo en un volumen final de 100 μ l. El procedimiento que se siguió es el que se indica a continuación. Para el AEO se realizaron 5 réplicas en cada ensayo, mientras que para el AO el número de réplicas fue de 3, y en todas ellas se usaron un *control* y un *blanco*. En el *control* se sustituyó la muestra a evaluar por H_2O y en el *blanco* no se añadió la muestra a evaluar ni la proteína, sustituyendo estos volúmenes por H_2O . En primer lugar se añadió a cada pocillo H_2O , tampón, $MnCl_2$ y proteína, PP1 o PP2A dependiendo del ensayo. Esta mezcla de reacción se incubó durante 10 minutos a 37 °C con agitación, y a continuación se le añadió los inhibidores a ensayar en todos los pocillos menos en el

control y el *blanco*, y nuevamente se incubó la mezcla durante 10 minutos en las mismas condiciones que en el paso anterior. Pasados estos 10 minutos se adicionó el substrato, FDP, en todos los pocillos incluidos el *control* y el *blanco*, y nuevamente se incubó la mezcla a 37 °C con agitación, y a los 10 minutos se iniciaron las medidas de fluorescencia. Para realizar estas medidas se utilizó un fluorímetro de Genios, con lector de microplatos con una longitud de onda de excitación a 485 nm y de emisión a 535 nm. Todo este proceso se resume en la **Tabla VI.2**.

Reactivo	Concentración final	Volumen por pocillo (µl)					
		Control		Muestra		Blanco	
		PP1	PP2A	PP1	PP2A	PP1	PP2A
H₂O		30	29	30	29	30	29
Tampón	50 mM HEPES 1.1 mM Na ₂ EDTA 5 mM DTT 0.025 % Tween	10		10		10	
MnCl₂	1 mM	10		10		10	
Proteína	PP1, 0.1 unidad PP2A, 0.022 unidad	4	5	4	5	---	
Incubación durante 10 minutos a 37 °C							
Inhibidor	Okadaico: 0.01-100000 nM 19-epi-Okadaico: 0.001-10000 nM	---		10		---	
Incubación durante 10 minutos a 37 °C							
FDP	100 µM	36		36		36	
Incubación durante 10 minutos a 37 °C							

Tabla VI.2.-Resumen de los pasos realizados en los ensayos con PP1 y PP2A.

VI.4.- MÉTODOS COMPUTACIONALES

IV.4.1.- Espectroscopía de RMN

Los datos empleados para los estudios computacionales fueron extraídos de los experimentos de RMN; RMN¹H, COSY-DQF, TOCSY-2D y ROESY. Y en todos los casos la espectroscopía se realizó en CD₃OD a 278 K y en espectrómetros BRUKER[®] AMX 400 y 500 MHz. El procesado de estos espectros se realizó con el MestRec (versión 4.8.6).

El experimento ROESY se realizó con distintos tiempos de mezcla para el AEO, 200 ms, 300 ms, 400 ms y 500 ms, mientras que para el AB sólo se realizó con un tiempo de mezcla de 500 ms. El volumen de los picos de correlación se integró con el MestRec (4.8.6), y estas intensidades se convirtieron en distancias a partir de la Aproximación de Dos Espines Aislados (ISPA).

Los valores de las constantes de acoplamiento se determinaron principalmente del experimento RMN¹H, y cuando no fue posible obtener información se recurrió de manera cautelosa a los experimentos COSY-DQF y TOCSY-2D.

VI.4.2.- Modelos de Inicio

Las estructuras de partida de los compuestos que se sometieron a estudios conformacionales se prepararon como se indica a continuación. En el caso del AEO se tomó la estructura de rayos X del AO sin derivatizar obtenida en nuestro laboratorio,⁶⁹ y se epimerizó en C-19. Mientras que para el AB, como estructura de inicio se utilizó la generada con el programa Chem3D-ultra (versión 7.0), sin previa minimización.

VI.4.3.- Mecánica Molecular

Todos los cálculos de Mecánica Molecular se realizaron en un Athlon AMD MP, utilizando el programa MacroModel (versión 8.5) y la interfaz gráfica de Maestro (versión 6.0).

VI.4.3.a.- Búsquedas conformacionales

En todas las búsquedas conformacionales se empleó el método de Monte Carlo de Múltiples Mínimos (MCMM). Para el AEO se realizaron búsquedas con 20000 pasos con los campos de fuerza MMFFs y MM3, combinando ambos con una constante dieléctrica (32.7 Å) que es la correspondiente al MeOH) y con el modelo de solvatación continua GB/SA en agua. En el caso del AB, los estudios se realizaron en el campo de fuerza MMFFs junto con el mismo modelo de solvatación continua utilizado con el AEO y con 100000 pasos. En todos los casos se aplicó como criterio de convergencia 0.05 KJ/Å mol y como límite de energía potencial 50 KJ por encima del confórmero de mínima energía. Los cortes en las distancias de las interacciones no enlazantes fueron, 8.0 Å para las interacciones van der Waals y 20.0 Å para las electrostáticas.

VI.4.3.b.- Minimizaciones

Las minimizaciones se llevaron a cabo en los mismos campos de fuerza en que se realizaron las búsquedas conformacionales, utilizando para los dos estudios el método FMNR (Full Matrix Newton Raphson). En ambas situaciones se aplicó un número máximo de 5000 iteraciones, con un criterio de convergencia de 0.05 KJ/Å mol. Y como límite de energía potencial para salvar las estructuras se estableció 26 KJ/Å mol por encima del confórmero de mínima energía.

VI.4.3.c.- Simulaciones dinámicas

Las dinámicas que se desarrollaron fueron de tipo Estocástica, manteniendo para cada molécula el campo de fuerza que se utilizó en su respectiva búsqueda conformacional. Todas las simulaciones se realizaron a 300 K, manteniendo fijas las distancias protón-carbono con el algoritmo *shake*. Y las pautas bajo las que se desarrollaron las dinámicas son las que se indican a continuación, en la **Tabla VI.3**.

	AEO	AB
Tiempo de equilibrado	50 ps	10 ps
Tiempo de simulación	2.5 ns	5.0 ns
Tiempo entre integraciones	1.5 fs	1.5 fs
Nº estructuras guardadas	5000	1000

Tabla VI.3.- Resumen de los pasos que se siguieron en las dinámicas.

VI.5- Cálculos termodinámicos para los complejos AO-PP1 y EAO-PP1

Los cálculos termodinámicos se realizaron con el programa STC¹⁶⁴ (*Structural Thermodynamics Calculation*), el cual está compuesto por dos módulos. El primero, CALC-ASA, calcula los cambios en el área de superficie accesible (ASA) para los procesos de disociación a partir de las coordenadas PDB (Protein Data Bank), utilizando el algoritmo ANAREA¹⁶⁵ implementado en el programa VADAR.¹⁶⁶ Los ficheros de salida contienen los valores de ASA para cada átomo del complejo, así

¹⁶⁴ <http://www.pence.ca/ftp>

¹⁶⁵ Richmond, T.J. *J. Mol. Biol.* **1984**, *82*, 63–89.

¹⁶⁶ Willard, L.; Ranjan, A.; Zhang, H.; Monzavi, H.; Boyko, R. F.; Sykes, B. D.; Wishart, D. S. *Nucleic Acids Research*, **2003**, *31*, 3316–3319.

como las diferencias, tanto de las contribuciones polares como no polares. Y además, estos valores también los reagrupa por residuos. Y por otro lado, el módulo THERMO realiza los cálculos termodinámicos para ΔASA , que es la suma de las contribuciones polares (ΔASA_{pol}) y no polares (ΔASA_{np}).

CONCLUSIONES

1.- Con el fin de llevar a cabo un estudio de los metabolitos producidos por la microalga *Prorocentrum belizeanum* realizamos cultivos artificiales a gran escala de este organismo a partir de una muestra de células cedidas por cortesía de D. Santiago Fraga. De este modo conseguimos un total de 1020 l de cultivo, y de las células contenidas en este volumen obtuvimos un extracto de acetona (22.1 g).

2.- A partir del extracto de acetona aislamos dos metabolitos ya conocidos, ácido Okadaico y Metil-Okadaato, junto con cuatro nuevos derivados del ácido Okadaico: diol éster C₁₀ del ácido Okadaico, DTX-5c, ácido *epi*-Okadaico y ácido Belizeánico.

3.- El diol éster C₁₀ del ácido Okadaico es el primer ejemplo con una cadena diol de diez carbonos, ya que hasta el momento, en los derivados del ácido Okadaico sólo se han encontrado cadenas diol con un máximo de nueve carbonos.

4.- La DTX-5c resultó ser la primera toxina del grupo de toxinas DSP solubles en agua aislada de una especie distinta al *P. maculosum*, ya que hasta el momento todos los compuestos de este grupo (DTX-4a, DTX-4b, DTX-5a y DTX-5b) sólo se habían encontrado en la especie *P. maculosum*.

5.- Uno de los metabolitos que aislamos, el ácido *epi*-Okadaico, presentó como modificación con respecto al ácido Okadaico epimerización en el carbono C-19, lo cual lleva asociado un cambio en la conformación del compuesto. Por lo tanto, realizamos un estudio conformacional de este metabolito combinando métodos computacionales y de RMN, que nos llevaron a proponer una conformación para este nuevo metabolito diferente a la que presenta el ácido Okadaico. Debido a esta observación también realizamos ensayos de inhibición enzimática del ácido *epi*-Okadaico tanto con PP1 como con PP2A, y los porcentajes de inhibición fueron similares a los del ácido Okadaico en el caso de la PP2A, mientras que con la PP1 observamos diferencias. Los

valores que se obtuvieron nos llamaron la atención si se tiene en cuenta el cambio conformacional del ácido *epi*-Okadaico con respecto al ácido Okadaico, por lo que realizamos un análisis termodinámico para el complejo ácido *epi*-Okadaico-PP1, de cuyos resultados se desprende que el ligando no se une a la proteína de la forma propuesta ya que el valor obtenido de K_d difiere bastante del estimado para K_i .

6.- Actualmente nos encontramos realizando estudios de *docking* con el fin de determinar como tiene lugar la unión entre el ácido *epi*-Okadaico y la proteína PP1.

7.- De entre los metabolitos que hemos aislado el ácido Belizeánico es el que más ha variado su esqueleto con respecto al ácido Okadaico, ya que en este compuesto no se ha formado el anillo oxolano **C** ni el oxano **D**. La modificación que presenta el ácido Belizeánico viene unida de la formación de dos nuevos carbonos quirales, C-16 y C-19. Para intentar proponer la estereoquímica de estos a la vez que la conformación del metabolito planteamos un estudio conformacional en el que se combinaron nuevamente métodos computacionales con RMN. A raíz de este estudio se propone una configuración S^* para C-16, mientras que para C-19 no es posible obtener una propuesta. Sin embargo, la conclusión de nuestro trabajo es que la conformación de esta molécula en disolución es similar independientemente de que el carbono C-19 sea S^* o R^* .

8.- El aislamiento del ácido Belizeánico resultó ser de gran interés desde un punto de vista biosintético, ya que apoya la propuesta de Murata, según la cual los anillos **C**, **D** y **E** se forman por una ciclación nucleofílica a partir de un intermedio β -epóxido. Sin embargo, en el ácido Belizeánico la reducción del grupo carbonilo en C-19 evita la formación del sistema espiro en este carbono, lo cual está de acuerdo con la estereoquímica en C-16 (S^*) opuesta a la del ácido Okadaico debido a que no ocurre la ciclación.

Conclusiones

9.- En una muestra de ácido Okadaico, con una concentración aproximada 30 mM, observamos la presencia de una especie agregada formada por cuatro unidades de ácido Okadaico, y ante los datos de masas y de RMN proponemos que se encuentra formada por dos dímeros de ácido Okadaico. Por lo que mediante la utilización del método propuesto por Comeau y col. presentamos una conformación para el agregado que encaja con los datos experimentales.