

Curso 2003/04
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS/5
I.S.B.N.: 84-7756-592-9

BLANCA ROSA SUÁREZ GÓMEZ

Estudio sobre toxinas marinas
de naturaleza polietérea.
Aislamiento, elucidación estructural
y evaluación de su potencial farmacológico

Directores

MANUEL NORTE MARTÍN
J. JAVIER FERNÁNDEZ CASTRO
MARÍA L. SOUTO SUÁREZ



SOPORTES AUDIOVISUALES E INFORMÁTICOS
Serie Tesis Doctorales

Los trabajos que constituyen la presente Memoria fueron realizados en el Instituto Universitario de Bio-Orgánica "Antonio González", bajo la dirección de los Dres. Manuel Norte Martín, José J. Fernández Castro y María L. Souto Suárez a quienes expreso mi agradecimiento por haberme descubierto este mundo de la investigación.

AGRADECIMIENTOS:

A mi padre, por estar siempre al otro lado del teléfono, sobretodo en esa recta final, dispuesto a escuchar, y porque sus abrazos son los más reconfortantes del mundo. Porque siempre has creído en mí, tal vez demasiado... Gracias papaíto, por todo.

A mi hermano, por ser más que eso. Por tantos momentos inolvidables que hemos compartido. Porque gracias a tu "superregalo" pude llevar a cabo este sueño que tantos pesares me ha causado...gracias mi niño lindo.

A Víctor, por ser una de las mejores personas que hay en este mundo. Tu inteligencia y tu calidad humana no tienen límites, al igual que tu sentido del humor, que siempre consigue hacerme reír a carcajadas. Aunque lejos, siempre me has apoyado y levantado la autoestima. Gracias a ti y a tu familia.

A Claudia, mi amiga del alma. A pesar de estar al otro lado del mundo, tu amistad y apoyo siempre me llegó. Contigo empecé en este mundo, con tu ayuda di mis primeros pasitos en el laboratorio y con tus palabras de ánimo los últimos.

A David. No sólo te admiro como investigador, que no cabe duda eres lo mejorcito, sino también como persona, tu humildad, sencillez y gran corazón... Tu amistad no tiene precio. Gracias por ayudarme siempre, aquí y allí.

A Diego, una excelente persona y un fantástico amigo. Tu sencillez, generosidad y templanza, entre otras cosas, siempre me han ayudado a ver las cosas desde otro punto de vista.

A Luis. No cabe duda de que con un amigo como tú una nunca se podrá sentir sola. Gracias mi querido amigo, porque siempre has estado ahí.

A Kira, por esas tardes de relax, tu compañía y unas cervezas. Por demostrarme que la amistad existe y que aun hay gente que sabe escuchar.

A Boris, por apoyarme aún cuando eso doliera; por tu cariño y por todo lo que tú ya sabes....

A Jose, el granaíno, gracias a nuestras tesis nos conocimos, y gracias a ellas nuestra amistad creció.

A todas las personas que como Jose, conocí en congresos y que de alguna forma ayudaron a enriquecer mi trabajo y mi vida.

A Laura Sánchez, porque la amistad no tiene fecha de caducidad...Contigo siempre puedo hablar y nunca pasa el tiempo...

A Ana Belén, porque con tu sinceridad, la mía se queda corta, por hacerme reír, por tu amistad.

A Jenny, la hermana que nunca tuve, la única persona con la que puedo hablar de cuando éramos pequeñas, por tantos años de amistad...

A Natalia, la inteligencia y la dulzura hechos mujer, gracias por dejarme ser una buena compañera de laboratorio; por tu amistad, aquí, y a distancia.

A Elena, gracias por escucharme en esos momentos en que tanto lo necesitaba...

A mi tía Pepi, porque su fortaleza siempre me dio fuerzas a mí. A mi primo Manu, un ejemplo a seguir, gracias por tu amistad y tu apoyo. A Luis Alberto y Mimí, por muchísimas cosas. A toda mi familia, que de un modo u otro siempre estuvo ahí. Gracias a todos.

A Nabil, amigo de los pocos que quedan, por tantas conversaciones y apoyo, por tu compañía en esta última etapa.

A todos mis compañeros del IUBO, a los de antes y a los de ahora. En especial a Tomy, la calidad humana y científica en persona; Juan Ignacio, más de una risa y más de una confidencia; a Laura Rosquete y Alejandra, y su apoyo en momentos difíciles; a Héctor Carrasco, Marvin, Fracisco, Littman, Jorge Marapara y Fernando Torres, gracias a ustedes guardo momentos geniales de mis primeros años en este mundo.

A todos mis compañeros en el Scripps Institute of Oceanography, en La Jolla, San Diego, y en especial a Sam, Alejandra, Irma y Olvin, por demostrarme que me puedo sentir como en casa a pesar de estar tan lejos... gracias a todos ustedes viví una de las mejores experiencias de mi vida, gracias por todo, les llevo a fuego en mi corazón.

A William Fenical, gracias por permitirme vivir dicha experiencia. Caso excepcional que demuestra que el ser un brillante científico no tiene por qué estar reñido con la humildad, la generosidad y el respeto a los demás.

A Nancy y su familia, por abrirme las puertas de su casa y de su corazón en esa mi otra vida. Por su fuerza, que es capaz de superar cualquier cosa...

A Patrick, una de las pocas personas en este mundo que es capaz de hacerme reír a carcajadas. “Hoy es un día normal...., pero yo estoy en San Francisco”.

Al Instituto Español de Oceanografía, Centro Costero de Vigo, con mención especial a Isabel Bravo por las cepas del dinoflagelado *Prorocentrum lima*, y a José Franco y Beatriz por la realización de los espectros de LC-MS.

Al Dr. José A. Gavín Sazatornil, por su amistad, por su ayuda en parte del trabajo recogido en esta memoria.

Al Dr. Matías López Rodríguez, por su ayuda prestada en la realización del estudio de rayos X.

Al Ministerio de Educación y Cultura, al banco Santander y a la ULL por el apoyo económico que permitió el desarrollo de este trabajo.

A todo aquél que con una palabra agradable o una sonrisa, consiguió que confiara un poquito más en mí misma y no arrojara la toalla. A los que he nombrado y a los que he olvidado.

*A mi madre, fuente
inagotable de toda mi inspiración....
Te llevo en lo más profundo de mi
corazón, por y para siempre.*

ÍNDICE

TOXINAS MARINAS DE NATURALEZA POLIETÉREA

I. INTRODUCCIÓN	1
I.1.- TOXINAS DEL TIPO DSP	3
I.1.A.- Grupo del AO y toxinas relacionadas. Antecedentes	8
I.1.B.- Efectos celulares	9
II. NUEVOS METABOLITOS AISLADOS DE <i>PROROCENTRUM LIMA</i>	21
II.1.- AISLAMIENTO	22
II.2.- ESTUDIO ESTRUCTURAL	26
II.2.A.- 2',4'-Dimetilen-Pental Okadaato (DTX6) (41)	26
II.2.B.- Norokadanona (42)	31
II.2.C.- Metil Okadaato (43)	34
II.2.D.- 3'-Hidroxi-2'-Metilen-Propil Okadaato (44)	36
II.2.E.- 5'-Hidroxi-2'-Metilen-Penta-3'-Enil Okadaato (45)	39
II.2.F.- 5',7'-Dihidroxi-2',4'-Dimetilen-Heptil Okadaato (46)	44
II.2.G.- 5'-Hidroperoxi-7'-Hidroxi-2',4'-Dimetilen-Heptil Okadaato (47)	49

III. ANÁLISIS Y CONTROL DE TOXINAS	55
III.1.- INTRODUCCIÓN	55
III.2.- MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE TOXINAS MARINAS	56
III.2.A.- Métodos de Ensayo	56
III.2.B.- Métodos Analíticos	58
III.3.- LC-MS DE LOS METABOLITOS DE <i>P. LIMA</i>	60
III.3.A.- LC-MS de 11	61
III.3.B.- LC-MS de 12	62
III.3.C.- LC-MS de 13	63
III.3.D.- LC-MS de DTX6 (41)	64
III.3.E.- LC-MS de Norokadanona (42)	65
III.3.F.- LC-MS de Metil Okadaato (43)	66
III.3.G.- LC-MS de 44	67
III.3.H.- LC-MS de 45	68
III.3.I.- LC-MS de 46	69
III.3.J.- LC-MS de 47	70
IV. ESTUDIOS ESTRUCTURALES SOBRE AO Y DTX1	71
IV.1.- ANTECEDENTES	71
IV.2.- ESTUDIOS ESTRUCTURALES DE DTX1	74
IV.2.A.- NOESY y ROESY de DTX1C	75
IV.2.B.- Estudios de difusión mediante gradientes de campo magnético	78
IV.2.C.- Medidas de los coeficientes de difusión	79
IV.2.D.- Determinación del estado de asociación	80
IV.3.- ESTUDIO ESTRUCTURAL DEL AO MEDIANTE RAYOS X	84

V. PARTE EXPERIMENTAL	87
V.1.- TÉCNICAS EXPERIMENTALES GENERALES	87
V.1.A.- Resonancia magnética nuclear	87
V.1.B.- Infrarrojo	87
V.1.C.- Rotación óptica	88
V.1.D.- Masas	88
V.1.E.- LC-MS	88
V.1.F.- Difracción de rayos X	89
V.1.G.- Cromatografía de gel-filtración	90
V.1.H.- Cromatografía en columna	90
V.1.I.- Cromatografía HPLC	90
V.1.J.- Cromatografía en capa fina	91
V.1.K.- Filtración y esterilización de material y medios de cultivo	91
V.1.L.- Recolección por centrifugación	91
V.2.- ESTUDIO DEL DINOFLAGELADO <i>PROROCENTRUM LIMA</i>	92
V.2.A.- Condiciones de cultivo	92
V.2.B.- Recolección y extracción	95
V.2.C.- Marcha cromatográfica del extracto y datos físicos de los compuestos	96
V.3.- ESTUDIOS DE DIFUSIÓN	106
V.3.A.- Calibración de la fuerza de los gradientes	106
V.3.B.- Adquisición de los datos	106
V.3.C.- Procesado de los datos	107
V.4.- ESTUDIOS ESTRUCTURALES DEL AO	107

VI. METABOLITOS SECUNDARIOS DEL GÉNERO *PALYTHOA SP*

VI.1.- INTRODUCCIÓN	111
VI.2.- ANTECEDENTES	113
VI.3.- METABOLITOS AISLADOS DE <i>PALYTHOA SP</i>	118
VI.3.1.- AISLAMIENTO	118
VI.3.2.- ESTUDIO DE ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL	120
VI.3.2.A.- Derivados de germacranólido	120
VI.3.2.B.- Derivados de eudesmanólido	132
VI.3.2.C.- Nepthediol (71)	140
VI.4.- PARTE EXPERIMENTAL	142
VI.4.1.- TÉCNICAS EXPERIMENTALES GENERALES	142
VI.4.1.A.- Resonancia magnética nuclear	142
VI.4.1.B.- Infrarrojo	142
VI.4.1.C.- Rotación óptica	142
VI.4.1.D.- Cromatografía de gel-filtración	142
VI.4.1.E.- Cromatografía en columna	142
VI.4.1.F.- Cromatografía HPLC	143
VI.4.1.G.- Cromatografía en capa fina	143
VI.4.2.- RECOLECCIÓN Y EXTRACCIÓN DEL CELENTÉREO <i>PALYTHOA SP</i>	143
VI.4.3.- MARCHA CROMATOGRÁFICA DEL EXTRACTO Y DATOS FÍSICOS DE LOS COMPUESTOS	144

CONCLUSIONES

TOXINAS MARINAS DE NATURALEZA POLIETÉREA

I.-- INTRODUCCIÓN

I.1.- TOXINAS DEL TIPO DSP

I.1.A.- Grupo del AO y toxinas relacionadas. Antecedentes

I.1.B.- Efectos celulares

TOXINAS MARINAS DE NATURALEZA POLIETÉREA

I.- INTRODUCCIÓN

Los dinoflagelados son algas microscópicas, generalmente unicelulares (protistas) que habitan aguas marinas frescas, siendo los mares tropicales donde se sitúa un mayor número de especies. Se conocen aproximadamente unas 2000 especies, de las cuales unas 300, son las que, en ocasiones, pueden proliferar de manera descontrolada alcanzando niveles tan altos que producen coloración en la superficie del agua, dando lugar al fenómeno conocido como “mareas rojas” (**Figura 1.1**). Alrededor de 60 de estas especies proliferativas poseen la capacidad de producir toxinas y de esta forma convierten a los dinoflagelados en el mayor grupo de microalgas productor de toxinas, responsable de introducirlas mediante acumulación en cadenas alimenticias. Los principales vectores de transmisión son los mariscos bivalvos (mejillones, vieiras, almejas, berberechos, ostras, etc.) y en el caso de las ciguatoxinas, algunas especies de peces tropicales. Diferentes especies de gasterópodos y crustáceos pueden actuar también como vectores de transmisión de toxinas.¹



Figura 1.1.- “Marea roja”

¹ P. Vale y M. A. Sampayo, *Toxicon*, **2002**, 40, 989.

El estudio de las “mareas rojas” ha sido objeto de gran interés en los últimos años, especialmente en el caso de las toxinas polietéreas. Este problema es de carácter multidisciplinar y se trata de un fenómeno natural sujeto a parámetros medioambientales y, como hemos indicado, a través del cuál se producen contaminaciones tóxicas en los mariscos bivalvos con su posterior paso a la cadena alimenticia. Desde este punto de vista el fenómeno afecta al medio natural marino (muchos de estos episodios tóxicos fueron inicialmente relacionados con problemas de contaminación por vertidos), a la industria marisquera (en España la red de alerta en este campo empieza a montarse en la segunda parte de la década de los ochenta) y, finalmente, a la salud pública (gran parte de estas toxinas marinas son nocivas para el ser humano). Además, las toxinas responsables de estos fenómenos tienen un alto valor añadido a través de su uso en estudios farmacológicos.

Una pregunta frecuente es: “¿por qué los dinoflagelados producen estas toxinas?” No se ha articulado todavía una respuesta convincente. Se podría buscar una respuesta en base a la diversidad de compuestos bioactivos que producen. Una sugerencia obvia es aquella que implica mecanismos de defensa, aunque muchas de las toxinas no son excretadas al medio. Intuitivamente, una estrategia química de defensa que únicamente pueda ser activada con la muerte del organismo, no parece ofrecer ninguna ventaja al individuo, aunque sí a una población. Otra posibilidad apunta hacia la existencia del material tóxico en la dieta, es decir, el dinoflagelado podría en un principio no ser tóxico y convertirse en tal tras la ingesta de fitoplancton tóxico de muy pequeño tamaño como resultado de mixotrofia.² Por tanto, y hasta el momento esta pregunta sigue siendo un enigma.

Basándose en la sintomatología de la intoxicación y en los vectores de transmisión, se han definido seis tipos de síndromes asociados a las siguientes toxinas o venenos:

- Paralytic Shellfish Poisoning (PSP) (Veneno Paralizante de Marisco).

² I. Imai y G. Nishitani, *Phycologia*, **2000**, 39, 456.

- Diarrhetic Shellfish Poisoning (DSP) (Veneno Diarreico de Marisco).
- Amnesic Shellfish Poisoning (ASP) (Veneno Amnésico de Marisco).
- Neurotoxic Shellfish Poisoning (NSP) (Veneno Neurotóxico de Marisco).
- Ciguatera Fish Poisoning (CFP) (Veneno Ciguatérico).
- Azaspiracid Poisoning (AZP) (Veneno por Azaspirácido).

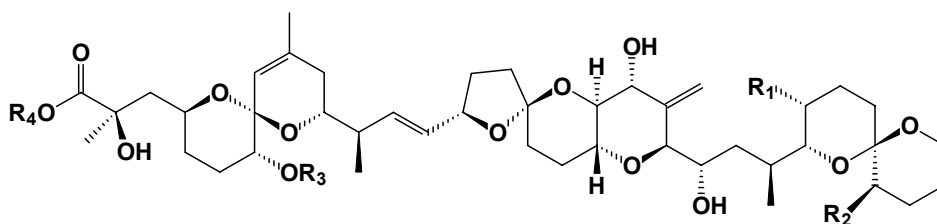
El avance en el conocimiento y control de estos fenómenos ha sido lento como consecuencia de la complejidad del problema en todas sus vertientes. En primer lugar, los dinoflagelados no eran bien conocidos en comparación con otros organismos marinos. En segundo lugar, las estructuras químicas de las toxinas eran complicadas y absolutamente nuevas, y sus determinaciones se retrasaron debido a las pequeñísimas cantidades de sustancia que podían aislarse de los mariscos contaminados. Sin embargo, en la última década se ha avanzado considerablemente en la identificación de estas estructuras, estableciéndose los cabezas de serie y sus derivados a través de la utilización de resonancia magnética nuclear (RMN) y espectrometría de masas, principalmente. Este desarrollo de las técnicas espectroscópicas junto con el de las cromatográficas, ha permitido la detección, aislamiento e identificación de nuevas toxinas. Aún así, persiste el inconveniente de la dificultad de acceso a patrones de referencia, especialmente para las toxinas minoritarias y las detectadas recientemente, para las que quedan por establecer métodos de análisis cuantitativos fiables.

I.1.- TOXINAS DEL TIPO DSP

El “Veneno Diarreico de Marisco”, DSP (*Diarrhetic Shellfish Poisoning*) es una enfermedad gastroenterítica severa causada por el consumo de marisco contaminado por dinoflagelados productores de este tipo de toxinas.³ Existen tres grupos de toxinas diferentes implicadas en el DSP: el del ácido okadaico (AO) y toxinas relacionadas (**1-13**); el de las yessotoxinas (YTXs) (**14-24**) y el de las

³ T. Yasumoto, Y. Oshima y M. Yamaguchi, *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **1978**, *44*, 1249.

pectenotoxinas (PTXs) (25-34).⁴ De estos tres grupos, el más importante es el del ácido okadaico y sus homólogos, debido a la gran cantidad de propiedades farmacológicas que presentan,⁵ además de que siempre ha sido considerado el único grupo productor de este síndrome diarreico. Esto se debe a que las YTXs y las PTXs difieren del grupo del AO tanto en las estructuras como en las propiedades toxicológicas (así, por ejemplo, no causan diarreas aunque sí hepatotoxicidad). Sin embargo, se clasificaron dentro de este tipo de toxinas porque aparecieron en episodios de DSP, coexistiendo con AO y DTXs. Por tanto, será en el grupo del AO y toxinas relacionadas, en las que centraremos nuestra atención.



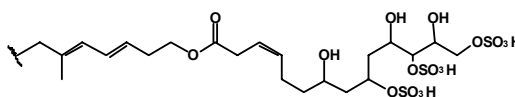
1 Ácido Okadaico: $R_1=CH_3$; $R_2=R_3=R_4=H$

2 DTX1: $R_1=R_2=CH_3$; $R_3=R_4=H$

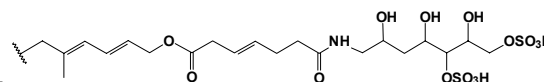
3 DTX2: $R_1=H$; $R_2=CH_3$; $R_3=R_4=H$

4 DTX3: $R_1=R_2=CH_3$; $R_3=acilo$; $R_4=H$

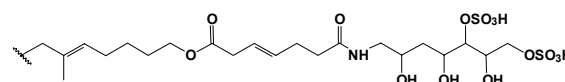
5 DTX4: $R_1=CH_3$; $R_2=R_3=H$; $R_4=$



6 DTX5a: $R_1=CH_3$; $R_2=R_3=H$; $R_4=$

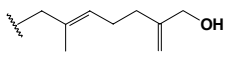
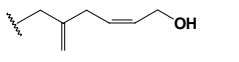
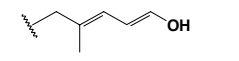
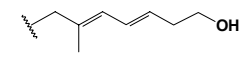
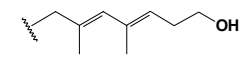
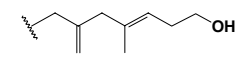


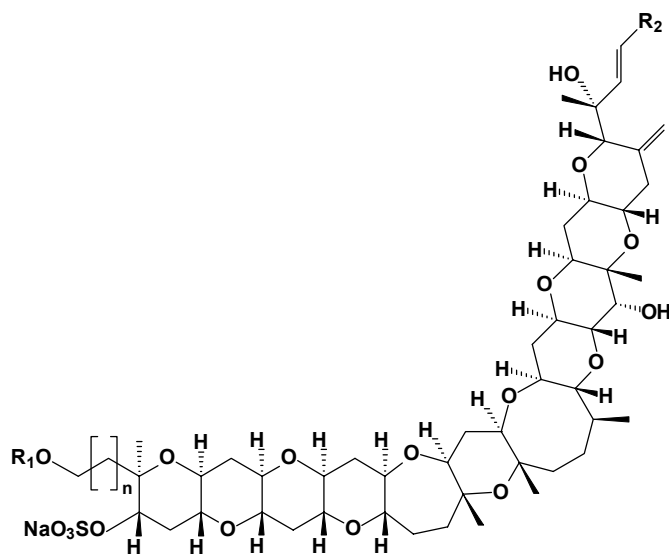
7 DTX5b: $R_1=CH_3$; $R_2=R_3=H$; $R_4=$

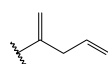
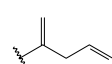
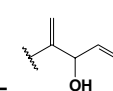
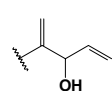



⁴ A. H. Daranas, M. Norte y J. J. Fernández, *Toxicon*, **2001**, 39, 1101, y referencias citadas en él.

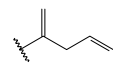
⁵ J. J. Fernández, M. L. Candenas, M. L. Souto, M. M. Trujillo y M. Norte, *Current Medicinal Chemistry*, **2002**, 9, 229.

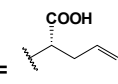
- 8 $R_1=CH_3$; $R_2=R_3=H$; $R_4=$ 
- 9 $R_1=CH_3$; $R_2=R_3=H$; $R_4=$ 
- 10 $R_1=CH_3$; $R_2=R_3=H$; $R_4=$ 
- 11 $R_1=CH_3$; $R_2=R_3=H$; $R_4=$ 
- 12 $R_1=CH_3$; $R_2=R_3=H$; $R_4=$ 
- 13 $R_1=CH_3$; $R_2=R_3=H$; $R_4=$ 




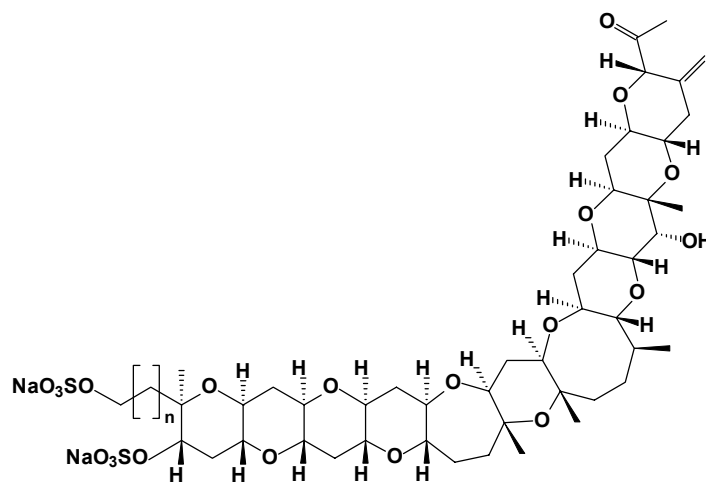
- 14 **Yessotoxina (YTX)**: $n=1$; $R_1=SO_3Na$; $R_2=$ 
- 15 **HomoYTX**: $n=2$; $R_1=SO_3Na$; $R_2=$ 
- 16 **45-HidroxiYTX**: $n=1$; $R_1=SO_3Na$; $R_2=$ 
- 17 **45-HidroxiHomoYTX**: $n=2$; $R_1=SO_3Na$; $R_2=$ 

18 45,46,47-TrinorYTX: $n=1$; $R_1=SO_3Na$; $R_2=$ 

19 1-DesulfoYTX: $n=1$; $R_1=H$; $R_2=$ 

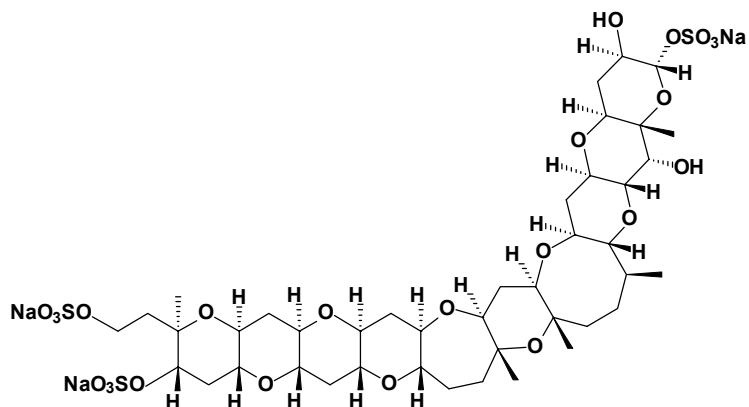
20 CarboxiYTX: $n=1$; $R_1=SO_3Na$; $R_2=$ 

21 CarboxihomoYTX: $n=2$; $R_1=SO_3Na$; $R_2=$ 

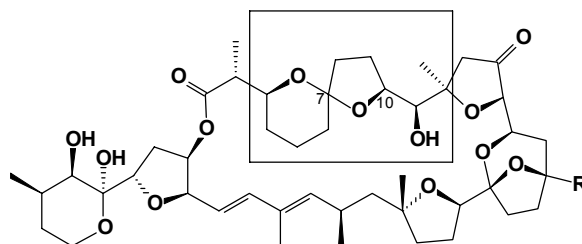


22 NoroxoYTX: $n=1$;

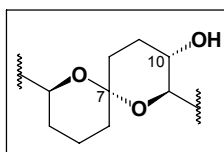
23 NoroxohomoYTX: $n=2$;



24 Adriatoxina (ATX)



- 25 Pectenotoxina 1 (PTX1): R=CH₂OH; R en C-7
- 26 Pectenotoxina 2 (PTX2): R=CH₃; R en C-7
- 27 Pectenotoxina 3 (PTX3): R=CHO; R en C-7
- 28 Pectenotoxina 4 (PTX4): R=CH₂OH; S en C-7
- 29 Pectenotoxina 5 (PTX5): R= Sin identificar
- 30 Pectenotoxina 6 (PTX6): R=COOH; R en C-7
- 31 Pectenotoxina 7 (PTX7): R=COOH; S en C-7



- 32 Pectenotoxina 8 (PTX8): R=CH₂OH; S en C-7
- 33 Pectenotoxina 9 (PTX9): R=COOH; S en C-7
- 34 Pectenotoxina 10 (PTX10): R= Sin identificar

I.1.A.- Grupo del AO y toxinas relacionadas. Antecedentes

Estas toxinas se caracterizan por producir un cuadro clínico con diarreas, náuseas, vómitos y fuertes dolores abdominales que suele manifestarse en el plazo comprendido entre los 30 minutos y las dos horas siguientes al consumo de marisco contaminado, produciéndose la recuperación después de tres días independientemente del tratamiento recibido.

El cabeza de serie es el ácido okadaico **1** (AO), aislado inicialmente de la esponja *Halichondria okadai*. Posteriormente se demostró que su verdadero origen se encuentra en los dinoflagelados de los géneros *Prorocentrum* y *Dinophysis*, identificándose una serie de dinofisistoxinas y toxinas relacionadas (**2-13**), siendo una gran parte de ellas aisladas de cultivos de *Prorocentrum*.

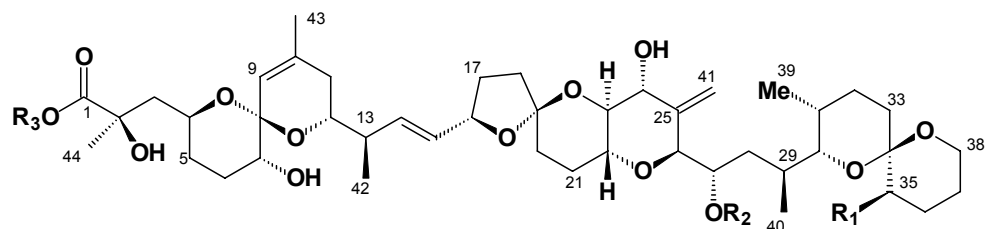
Se ha encontrado que algunos organismos cuya dieta básica son dinoflagelados tóxicos, podrían ser capaces de destoxificar AO y DTXs, mediante transformaciones químicas. Éste es el caso de la transformación de DTX1 (**2**) en DTX3 (**4**) por la vieira *Patinopecten yessoensis*.⁶ Estas formas aciladas (DTX3), además de ser menos tóxicas que las moléculas no esterificadas, nunca se han encontrado en microalgas marinas, por lo que se presume deben ser originadas en los mariscos bivalvos por acilación.⁷ Otro caso es el de la diatomea *Thalassiosira weissflogii*, que es capaz de transformar el diol éster tóxico de AO **11** producido por *P. lima* en los productos de oxidación más polares **35-37**.⁸ Algo parecido ocurre con la esponja marina *Merriamum oxeato*, donde se encontraron dos compuestos acetilados (**38** y **39**), esta vez en C₂₇-OH. Sin embargo, estos dos compuestos, además de ser inhibidores de las proteínas fosfatasas específicas de serina y treonina, también resultaron poseer interesantes efectos celulares, tales como una inhibición potente y eficaz del punto control G2 y la posibilidad de actuar como

⁶ T. Suzuki, H. Ota y M. Yamasaki, *Toxicon*, **1999**, 37, 187.

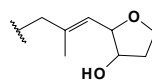
⁷ J. S. Lee, T. Igarashi, S. Fraga, E. Dahl, P. Hovgaard y T. Yasumoto, *J. Appl. Phycol.*, **1989**, 1, 147.

⁸ T. Hu, I. Burton, J. M. Curtis, M. A. Quilliam, J. A. Walter, A. J. Windust y J. L. C. Wright, *Tetrahedron Lett.*, **1999**, 40, 3981.

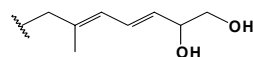
agentes radiosensitivos.⁹



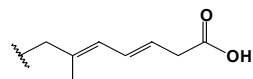
35 R₁=R₂=H; R₃=



36 R₁=R₂=H; R₃=



37 R₁=R₂=H; R₃=



38 R₁=R₃=H; R₂=Ac

39 R₁=CH₃; R₂=Ac; R₃=H

I.1.B.- Efectos celulares

Las toxinas de este grupo poseedoras del grupo carboxilo libre, se caracterizan por ser inhibidores selectivos de las proteínas-fosfatasa serina/treonina del tipo 1 (PP1, IC₅₀ = 0,27-0,32 μM) y 2A (PP2A, IC₅₀ = 1nM), siendo además el primer ejemplo de este tipo de inhibidores aislados de fuente natural. Hay que señalar que los derivados esterificados de este grupo de toxinas,

⁹ R. Britton, M. Roberge, C. Brown, R. van Soest y R. J. Andersen, *J. Nat. Prod.*, **2003**, 66, 838.

pierden la capacidad de inhibir a las proteínas-fosfatasas, aún cuando se ha demostrado que una vez ingerido el material contaminado e hidrolizado mediante las correspondientes esterasas recobran todo su potencial tóxico.^{5,10}

El AO ha sido extensamente utilizado en los últimos años para demostrar el papel jugado por PP1 y/o PP2A en la regulación de diferentes procesos celulares. Así, PP1 parece jugar un papel clave en la regulación del metabolismo del glucógeno, contracción del músculo liso, división celular y síntesis de proteínas. PP2A participa en el control la mayoría de las principales rutas metabólicas, como glucólisis y metabolismo de lípidos, apoptosis, crecimiento y división celular, transcripción y síntesis de proteínas. El efecto de hiperfosforilización producido por estas toxinas puede por tanto, inducir a la muerte celular o contribuir a la transformación celular, promoviendo así la aparición de tumores.

Según estudios realizados acerca de la relación estructura-actividad del AO, parece ser que tanto el grupo carboxilo C-1, como los cuatro grupos hidroxilo en los carbonos C-2, C-7, C-24 y C-27 son muy importantes en el desarrollo de su actividad. Por otro lado, los fragmentos C-1→C-14 y C-15→C-38 son mucho menos activos frente a las proteínas fosfatasas, siendo incluso el último fragmento, totalmente inactivo frente a PP2A. Así también, la conformación circular que adquiere la molécula, podría ser esencial en la acción inhibitoria del AO. De hecho, por RMN se demostró la formación en disolución de una cavidad flexible entre el grupo carboxilo C-1 y el grupo hidroxilo C-24¹¹ (**Figura 1.2**).

¹⁰ E. Arteché, G. Strippoli, G. Loirand, P. Pacaud, M. L. Candenas, J. C. Moltó, M. L. Souto, J. J. Fernández, M. Norte, J. D. Martín y J. P. Savineau, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1997**, 282, 201.

¹¹ N. Matsumori, M. Murata y K. Tachibana, *Tetrahedron*, **1995**, 51, 12229.

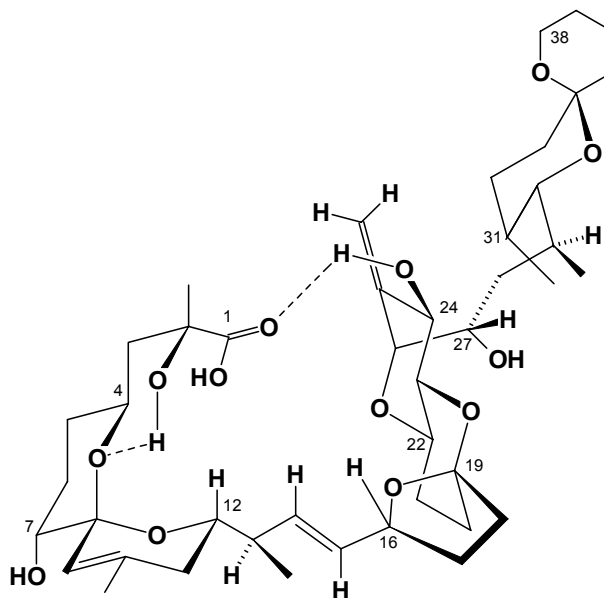


Figura 1.2.- Cavidad flexible propuesta para el ácido okadaico

Con respecto a esta relación estructura-actividad, se dio un gran paso adelante gracias a la determinación de la estructura cristalina del complejo molecular formado por el AO unido a la PP1 mediante rayos X.¹² Esta estructura revela que las interacciones por puentes de hidrógeno son muy importantes, pero también lo son las hidrofóbicas, como las que tienen lugar entre la región del AO comprendida entre los carbonos C-4 a C-16, con residuos básicos pertenecientes al sitio activo de la proteína. Gracias a este complejo cristalino se confirmó la existencia de un enlace de hidrógeno intramolecular que confiere al AO su estructura circular.

¹² J. T. Maynes, K. S. Bateman, M. M. Cherney, A. K. Das, H. A. Luu, C. F. B. Holmes y M. N. G. James, *J. Biol. Chem.*, **2001**, 276, 44078.

a) El ciclo celular

El AO y otros inhibidores de PPs han ayudado a desentrañar el complejo mundo del ciclo celular, y a identificar fosfatasa de la familia de las PPs como esenciales para las funciones relacionadas con el ciclo. Así, la adición de AO a células de mamíferos en la fase S, conduce a la activación de varias cdks, que causan una mitosis prematura.^{13,14} No está claro si PP1, PP2A o ambas son la diana de la mitosis inducida por AO, pero PP1 parece ser esencial en la entrada y salida de la fase M en células de mamíferos, en la separación de los cromosomas y en la división celular.¹⁵

El AO produce graves efectos sobre la estabilidad dinámica de los microtúbulos, causando un incremento significativo en la velocidad de elongación.¹⁶ También inhibe la formación del uso mitótico. Se ha demostrado además que el AO causa un aumento en la fosforilación de una proteína citosólica que regula la dinámica de los microtúbulos durante el ensamblaje del uso.¹⁷

Una ruta alternativa por la cual el AO podría regular la proliferación celular es mediante la activación de la familia de proteínas quinasas activadoras de mutógenos (MAPK).¹⁸ Factores de crecimiento causan la activación de receptores de proteínas quinasas de tirosina y de proteínas quinasas de serina/treonina, muchas de las cuales conducen a la activación de Ras, una pequeña proteína unida a GTP. Ras actúa a través de diferentes rutas de transcripción, en una de las cuales, la cascada que se muestra en la **Figura 1.3** juega un papel central en el control de la re-entrada al ciclo celular y en la activación de distintos factores de transcripción.¹⁹ La duración de la activación de esta cascada de quinasas es crítica

¹³ T. Hunter, *Cell*, **1995**, 80, 225.

¹⁴ R. Nuydens, M. De Jong, G. Van Den Kieboom, C. Heers, G. Dispersyn, F. Cornelissen, R. Nuyens, M. Borges y H. J. Geerts, *J. Neurochem.*, **1998**, 163, 1124.

¹⁵ A. Fernández, D. L. Brautigan y N. J. C. Lamb, *Cell. Biol.*, **1992**, 116, 1421.

¹⁶ B. Howell, D. J. Odde y L. Cassimeris, *Cell Motil. Cytoskeleton*, **1997**, 38, 201.

¹⁷ S. J. Mistry, H. C. Li y G. F. Atweh, *Biochem. J.*, **1998**, 334, 23.

¹⁸ S. F. Rosenberger, J. S. Finch, A. Gupta y G. T. Bowden, *J. Biol. Chem.*, **1999**, 274, 1124.

¹⁹ J. Y. Lehtonen, L. Daviet, C. Nahmias, M. Horiuchi y V. J. Dzau, *Mol. Endocrinol.*, **1999**, 13, 1051.

para determinar la dirección de la célula hacia crecimiento (activación transitoria) o hacia diferenciación (activación prolongada). La activación constitutiva de esta ruta es suficiente para producir transformaciones oncogénicas en algunos tipos celulares. El AO causa la activación de las quinasas MEK y ERK, e induce ciertas fosforilaciones.²⁰ Dentro de las fosfatasa sensibles al AO, PP2A parece ser la que juega un mayor papel en la desfosforilación e inactivación de las familias de quinasas MEK y ERK.²¹

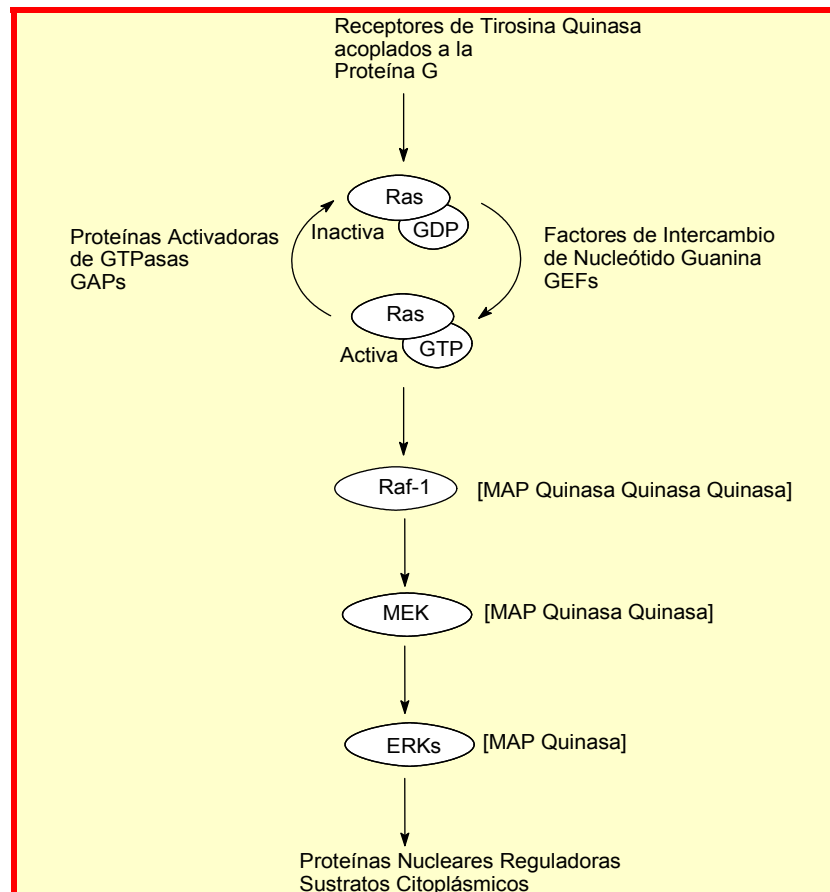


Figura 1.3.- Activación de Ras y de la cascada MAPK por factores de crecimiento

²⁰ K. J. Townsend, J. L. Trusty, M. A. Traupman, A. Eastman, y R. W. Craig, *Oncogene*, **1998**, 17, 1223.

²¹ H. Chung y D. L. Brautigan, *Cell Signal*, **1999**, 11, 575.

b) La apoptosis y el AO

El AO puede producir apoptosis pero derivados de éste sin efecto inhibitorio, o con uno bajo sobre las PPs, no inducen apoptosis, sugiriendo que el efecto está específicamente mediado por esta inhibición.²² Sin embargo, se conoce poco acerca del mecanismo responsable de la muerte celular inducida por AO, y no es seguro en muchos casos, que la inhibición de PP1 y/o de PP2A sea necesaria para activar el proceso. De hecho, el fragmento C-15→C-38, que no presenta actividad inhibitoria sobre PP2A, sí induce apoptosis. Además, se ha encontrado que el efecto del AO sobre la apoptosis y la detención de la mitosis están mediados por mecanismos independientes.²³

El AO induce la fragmentación del DNA, característica de la apoptosis, en diferentes poblaciones neuronales.²⁴ En el cerebro, tanto PP1 como PP2A controlan el grado de fosforilación de proteínas asociadas a microtúbulos, que regulan la estabilidad de los mismos. Así, están asociadas a la proteína tau que, una vez fosforilada, se disocia de los microtúbulos.²⁵ La pérdida de la estabilización mediada por tau conduce a interrupciones en el citoesqueleto del microtúbulo y a la degeneración de axones, lo que podría ser uno de los mecanismos de muerte celular neuronal.

Finalmente, el AO podría inducir el efecto contrario, es decir, prevenir apoptosis, dependiendo de la concentración, la longitud del tratamiento y el tipo celular estudiado.²⁶

²² F. Tergau, J. Weichert, I. Quentin, R. Opitz, C. Von Zezschwitz, J. Marwitz, V. Ritz y H. J. Steinfelder, *Naunym Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **1997**, 356, 8.

²³ A. Lerga, C. Richard, M. D. Delgado, M. Caselles, P. Frade, M. A. Cuadrado y J. Leon, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1999**, 260, 256.

²⁴ M. T. Fernández-Sánchez, A. García-Rodríguez, R. Díaz-Trelles y A. Novelli, *FEBS Lett.*, **1996**, 398, 106.

²⁵ T. Arendt, M. Holzer, R. Fruth, M. K. Brukner y U. Gartner, *Neurobiol. Aging.*, **1998**, 19, 3.

²⁶ M. Higuchi y B. B. Aggarwal, *J. Biol. Chem.*, **1993**, 268, 5624.

c) Promoción de tumores

El desarrollo del cáncer es fomentado por mutaciones que causan proliferación inapropiada asociada al bloqueo de apoptosis. El ciclo de división celular está controlado por una serie de reacciones de fosforilación/desfosforilación que actúan como interruptores que permiten a la célula pasar a la siguiente fase del ciclo celular. Como consecuencia, un error en uno de los pasos de fosforilación o desfosforilación podría proporcionar la señal para un crecimiento celular aberrante.

Por lo tanto, no es sorprendente que el AO actúe como promotor universal de tumores,²⁷ y en consecuencia, los estudios correspondientes con él y con otros inhibidores de PPs sugieren que PP2A y PP1 son importantes reguladores de crecimiento y transformación celulares.²⁸ El mecanismo de acción del AO consiste en la producción de hiperfosforilación y la consecuente expresión de un amplio número de genes de proliferación celular que lleva, entre otras, a activar las siguientes rutas:

1.- Inducción del Factor Alfa de Necrosis Tumoral (TNF- α)

El AO incrementa la secreción del TNF- α de diferentes células,²⁹ posible citoquina clave en promoción de tumores, e imita el patrón de fosforilación del mismo.

Aunque la aguda toxicidad en ratones y la citotoxicidad que presenta el ácido glicookadaico (GOK) (**40**), es dos veces menor que la observada en el AO, se ha encontrado que la amida del AO formada con glicina, posee actividad anticaquexia.³⁰ Caquexia es un estado de extrema desnutrición producido por cáncer y otras enfermedades infecciosas, o en procesos terminales, y está

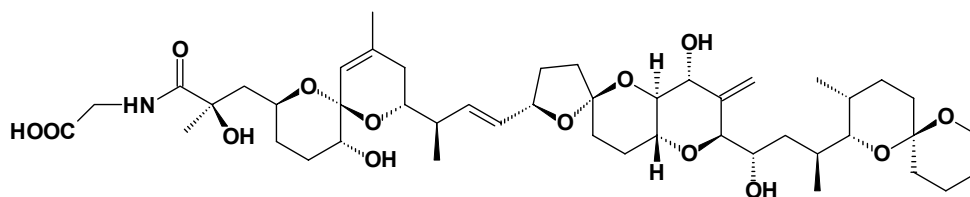
²⁷ H. Fujiki, *Mol. Carcinog.*, **1992**, 5, 91.

²⁸ M. R. Young, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1997**, 407, 311.

²⁹ A. Komori, J. Yatsunami, M. Suganuma, S. Okabe, S. Abe, A. Sakai, K. Sasaki y H. Fujiki, *Cancer Res.*, **1993**, 53, 1982.

³⁰ D. Uemura y Y. Hirata, En *Studies in Natural Products Chemistry*, Ed. Atta-ur-Rahman, Elsevier: Amsterdam, **1989**, Vol. 5 (Part. B), 377.

asociada con fiebre, escalofríos, temblores y pérdida de peso. La caquectina es uno de los factores relacionados con caquexia, y se ha demostrado que es la misma sustancia que TNF. Como TNF inhibe la actividad de lipoproteína lipasa (LPL)³¹ es importante encontrar un antagonista apropiado a esta sustancia, pero sin embargo, esta sustancia debería conservar la propiedad anticancerígena deseada de TNF. Ni GOK ni el AO afectan a la citotoxicidad del TNF. Aparentemente, la toxicidad de GOK es baja, y no suprime la actividad citotóxica del TNF hacia las células cancerosas, pero invierte específicamente el efecto supresor de la generación de LPL causada por el TNF,³² y por este motivo puede ser usado para la prevención o tratamientos de caquexia observados en cáncer u otras infecciones, y en las reacciones secundarias debidas a la administración del TNF.



Ácido Glicookadaico (GOK) (40)

2.- Hiperfosforilación de p53

La importancia de p53 en la regulación de promoción/apoptosis tumoral está demostrada por el hecho de que muchos tumores humanos tienen desórdenes en p53, o bien en sus activadores. La pérdida de la función de p53 está de esta forma asociada al incremento de la proliferación celular.³³ El AO induce hiperfosforilación de la proteína p53, aumentando así la función de activación de la transcripción.³⁴

³¹ M. Kawakami, Y. Ikeda, N. L. Trang, W. Vine, A. Cerami, En *Proceedings of IUPHAR*, Ed. W. Paton, MacMillan: London, **1984**, Vol. 2, 377.

³² D. Uemura, En *Bioorganic Marine Chemistry, Bioactive polyethers*, Ed. P. J. Scheuer, Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, **1991**, Vol. 4, 2.

³³ M. Guo y B. A. Hay, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **1999**, 11, 745.

³⁴ W. Zhang, C. McClain, J. P. Gau, X. Y. D. Guo y A. B. Deisseroth, *Cancer Res.*, **1994**, 54, 4448.

3.- Activación de AP-1 asociada con la hiperfosforilación de c-jun

El AO induce la expresión de los oncogenes c-jun y c-fos.³⁵ Además, causa un incremento en la expresión y actividad de AP-1, la proteína-1 activadora de c-jun,¹⁷ un efecto que es compartido por otros promotores de tumores, tales como los ésteres de forbol.³⁶ El efecto del AO sobre AP-1 parece implicar la inhibición de PP2A, y ha sido sugerido que PP2A es la responsable de mantener c-jun en su estado pobremente regulado.³⁷

4.- Factor Alfa de Crecimiento Transformante (TGF- α)

El AO eleva transitoriamente el nivel de RNA mensajero del TGF- α , y el nivel de proteínas en la epidermis de ratón.³⁸ Efectos similares fueron observados con otros promotores de tumores, sugiriendo que un aumento en los niveles de TGF- α podría jugar un papel esencial en la estimulación mutogénica durante la promoción de tumores.

5.- Hiperfosforilación del Retinoblastoma

La proteína retinoblastoma (pRb) es un supresor de tumores bien conocido.³⁹ En su forma activa hipofosforilada, actúa como un represor transcripcional, manteniendo a la célula en la fase G1 del ciclo celular e inhibiendo la entrada en la fase S. Al mismo tiempo, pRb actúa como un activador de los factores de transcripción y diferenciación, que produce la detención del ciclo celular.⁴⁰ La proteína retinoblastoma debe ser desfosforilada cuando la célula sale de la mitosis y su desfosforilación activa la función de la proteína como supresor del

³⁵ K. Kiguchi, C. Giometti, C. H. Chubb, H. Fujiki y E. Huberman, *Biochem. Biophys. Res Commun.*, **1992**, 189, 1261.

³⁶ S. F. Rosenberg y G. T. Bowden, *Oncogene*, **1996**, 12, 2301.

³⁷ J. S. Lee, B. Favre, B. A. Hemmings, B. Kiefer y Y. Nagamine, *J. Biol. Chem.*, **1994**, 269, 2887.

³⁸ K. Kiguchi, L. M. Beltran, J. You, O. Rho, J. DiGiovanni, *J. Mol. Carcinog.*, **1995**, 12, 225.

³⁹ N. Dyson, *Genes Dev.*, **1998**, 12, 2245.

⁴⁰ P. Zhang, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **1999**, 11, 655.

crecimiento.⁴¹ El AO induce la hiperfosforilación de pRb, dando lugar a la inactivación de su funcionalidad, lo cual produce defectos en la detención del ciclo celular, y en la diferenciación. El efecto estimulador del crecimiento por el AO podría además ser mediado por la inactivación del efecto supresor del crecimiento por pRb, como ha sido sugerido para ciertas células de cáncer pancreático.⁴²

El poder tumorigénico del AO parece deberse por tanto, a sus múltiples efectos en diferentes niveles de procesos celulares cruciales, mostrando que PP1 y PP2A juegan un papel esencial como reguladores del crecimiento o transformación celular.

d) Otros efectos

El AO provoca además otros muchos efectos:

- a) Inhibe la síntesis de glucógeno.
- b) Causa efectos en la contracción de músculo liso, estudios que han sido esenciales para determinar la importancia de procesos de fosforilación/desfosforilación en la regulación de canales iónicos.⁴³
- c) Aumenta el grado de fosforilación de varias proteínas, tales como la proteína tau asociada a microtúbulos, sugiriendo que las fosfatasas podrían participar en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer.⁴⁴ Recientemente se han realizado estudios acerca del estrés oxidativo inducido por AO en células de neuroblastoma, que también se produce como consecuencia de

⁴¹ C. J. Sherr, *Science*, **1996**, 274, 1672.

⁴² J. Yatsunami, A. Komori, T. Ohta, M. Suganuma y H. Fujiki, *Cancer Res.*, **1993**, 53, 239.

⁴³ S. Herzig y J. Neumann, *Physiol. Rev.*, **2000**, 80, 173.

⁴⁴ T. Arendt, M. Holzer, R. Fruth, M. K. Bruckner y U. Gartner, *Neuroscience*, **1995**, 69, 695.

esta enfermedad, demostrándose que, la vitamina C y en mayor proporción, la melatonina, reducen el efecto provocado por el AO.⁴⁵

- d) Estimula la meiosis de oocitos y la movilidad de espermatozoides, proporcionando un papel a los mecanismos de fosforilación/desfosforilación en la fertilización.⁴⁶
- e) Relativo a la transcripción de genes, está aceptado como un regulador universal de factores de transcripción, pues la actividad de estas proteínas como moduladores de la expresión génica cambia por fosforilación.²⁹

El AO ha sido una herramienta esencial para aumentar el entendimiento de muchos procesos celulares. Los datos aportados dan una idea de la complejidad de los mecanismos de fosforilación/desfosforilación, de su amplia y crucial implicación celular y de las grandes diferencias que existen entre diversos tipos celulares. De esta forma, el AO y otros inhibidores de proteínas fosfatasas, continuarán siendo decisivos en investigación biológica, ayudando a clarificar el intrínseco mecanismo de acción de neurotransmisores, hormonas o fármacos.

⁴⁵ P. Montilla-López, M. C. Muñoz-Águeda, M. F. López, J. R. Muñoz-Castañeda, I. Bujalance-Arenas e I. Túniz-Fiñana, *Europ. J. Pharmacol.*, **2002**, 451, 237.

⁴⁶ G. D. Smith, A. Sadhu y D. P. Wolf, *Biol. Reprod.*, **1998**, 58, 880.

II. NUEVOS METABOLITOS AISLADOS DE *PROROCENTRUM LIMA*

II.1.- AISLAMIENTO

II.2.- ESTUDIO ESTRUCTURAL

II.2.A.- 2',4'-Dimetilen-Pental Okadaato (DTX6) (**41**)

II.2.B.- Norokadanona (**42**)

II.2.C.- Metil Okadaato (**43**)

II.2.D.- 3'-Hidroxi-2'-Metilen-Propil Okadaato (**44**)

II.2.E.- 5'-Hidroxi-2'-Metilen-Penta-3'-Enil Okadaato (**45**)

II.2.F.- 5',7'-Dihidroxi-2',4'-Dimetilen-Heptil Okadaato (**46**)

II.2.G.- 5'-Hidroperoxi-7'-Hidroxi-2',4'-Dimetilen-Heptil
Okadaato (**47**)

II.- NUEVOS METABOLITOS AISLADOS DE *PROROCENTRUM LIMA*

Prorocentrum lima (Figura 2.1) es un dinoflagelado bentónico encontrado normalmente unido o asociado a macrofitos, detritos flotantes, escombros u otros sustratos y, menos comúnmente en plancton. Aunque es una especie muy extendida, parece ser más abundante en aguas tropicales y subtropicales.

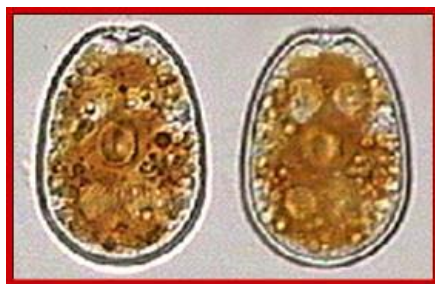


Figura 2.1.- *Prorocentrum lima*

Debido a la gran dificultad de obtener cultivos puros en el laboratorio de *Dinophysis spp.*, los cultivos de *Prorocentrum* han sido utilizados mundialmente para estudiar la cinética de producción y como medio de obtención de toxinas DSP, desde que se identificó el AO como uno de los compuestos básicos producidos por estas especies.⁴⁷ *P. lima* es además una fuente muy utilizada de AO y DTX1 como toxinas estándares, para su uso como material de referencia. Sin embargo, el grado de toxicidad varía según la cepa de *P. lima* utilizada,⁴⁸ así como el clon,⁴⁹ siendo también importante, ya no sólo a nivel de cultivos, sino en el rastreo en busca de episodios de contaminación, la época del año y los factores atmosféricos.⁵⁰

⁴⁷ Y. Murakami, Y. Oshima y T. Yasumoto, *Bull. Japan Soc. Sci. Fish.*, **1982**, 48, 69.

⁴⁸ I. Bravo, M.L. Fernández, I. Ramilo y A. Martínez, *Toxicon*, **2001**, 39, 1537.

⁴⁹ N. Bouaïcha, A. Chézeau, J. Turquet, J.-P. Quod y S. Puisieux-Dao, *Toxicon*, **2001**, 39, 1195.

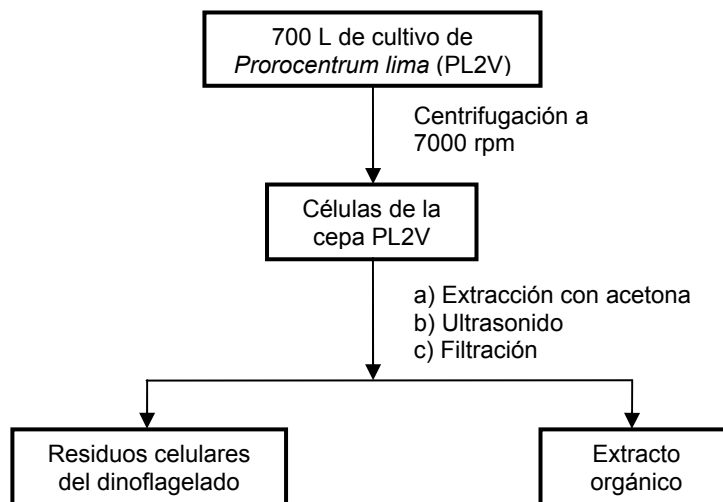
⁵⁰ P. Vale y M. A. Sampayo, *Toxicon*, **2003**, 41, 187.

II.1.- AISLAMIENTO

Con el fin de estudiar las toxinas minoritarias existentes en el dinoflagelado *Prorocentrum lima*, se llevó a cabo un cultivo a gran escala para el cual se utilizó la cepa PL2V del mismo, que nos fue suministrada por Isabel Bravo, del Instituto Oceanográfico de Vigo. Para ello se siguieron las condiciones de cultivo que vienen empleándose en nuestro laboratorio desde hace años para el crecimiento de este dinoflagelado, y que se describen con detalle en la parte experimental.

El ciclo de cultivo parte de la disponibilidad de una batería de erlenmeyers de 250 mL con 150 mL de cultivo. Tras 30 días de crecimiento del dinoflagelado, comienza el ciclo con el trasvase de las células contenidas en tres de estos erlenmeyers, a cada uno de los erlenmeyers de 5 L que contienen 3 L de medio Guillard K. Transcurridos 30 días desde la inoculación, se trasvasan las células a tanques de vidrio de 60 L conteniendo 40 L de medio.

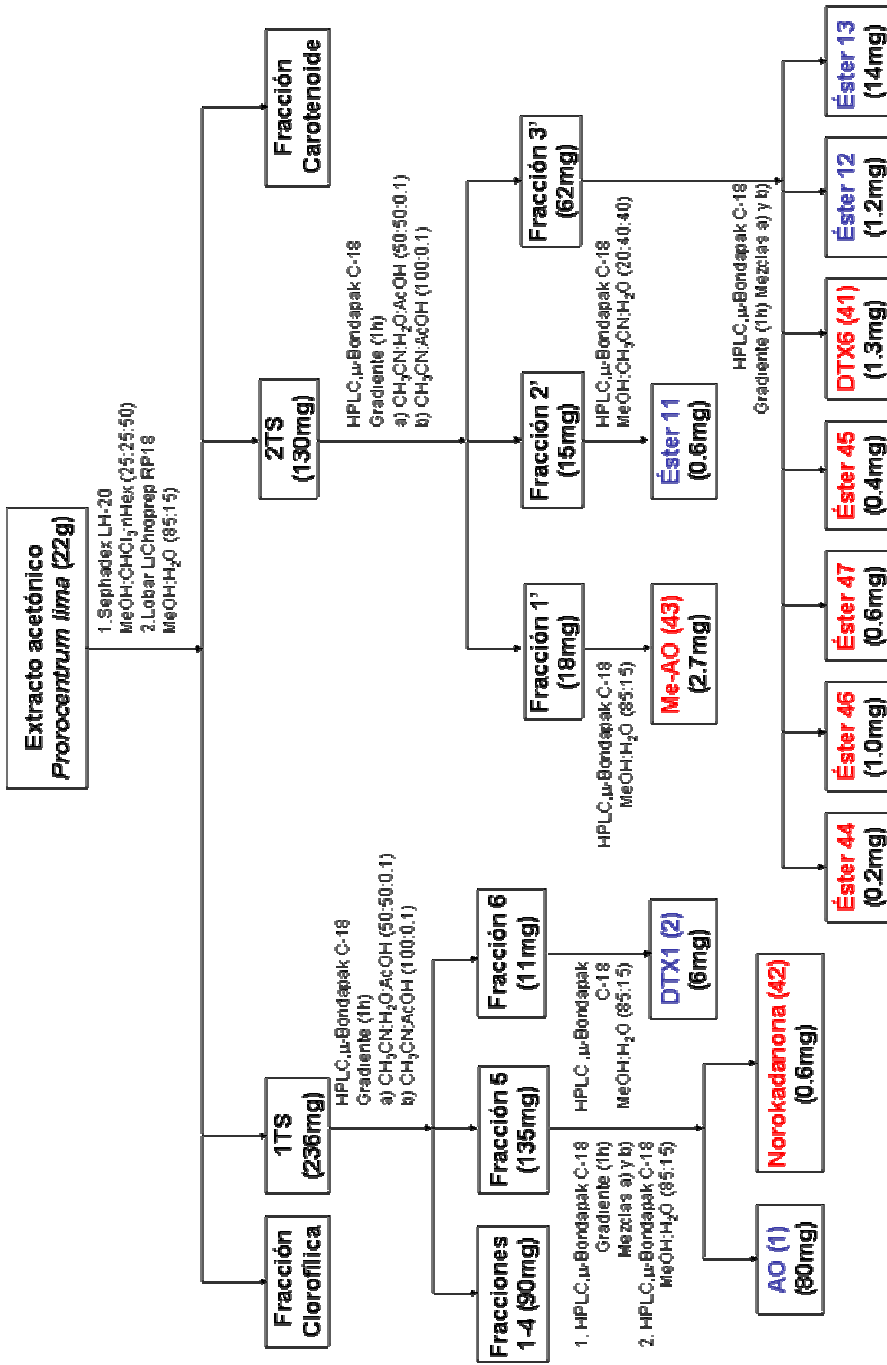
Después de 4 meses de un ciclo de cultivo completo, se obtuvieron unos 700 litros de cultivo. Para la recolección de las células, los fondos de los tanques fueron raspados con cuidado para levantar el dinoflagelado depositado en los mismos. Una vez suspendidas las células, se recolectaron por centrifugación continua a 7000 r.p.m., y se maceraron en acetona hasta agotamiento, al tiempo que fueron sometidas a ultrasonido para producir la ruptura de la pared celular. Separados los residuos celulares por filtración, se procedió a la evaporación del disolvente, que dio lugar a un extracto de color verde oscuro de 22 g. Este proceso se resume en el **Esquema 2.1**.



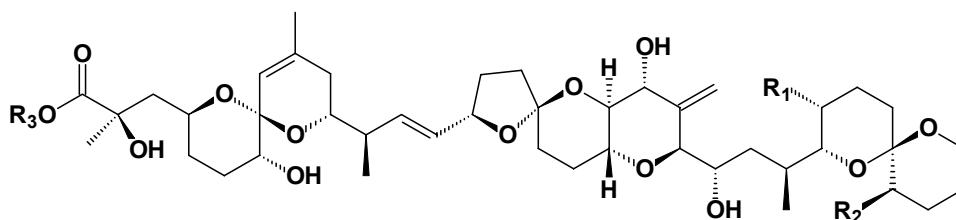
Esquema 2.1.- Proceso de recolección y preparación de extractos

El extracto resultante fue cromatografiado de acuerdo con la marcha expuesta en el **Esquema 2.2.**

Partiendo de 22 gramos de extracto acetónico, se obtuvieron AO (1), DTX-1 (2), y varios ésteres del AO ya conocidos: el 7'-hidroxi-4'-metil-2'-metilen-hepta-4'-enil okadaato (13), éster mayoritario en los extractos de esta cepa, el 7'-hidroxi-2'-metil-hepta-2',4'-dienil okadaato (11), que había sido aislado previamente de *P. concavum*, y el 7'-hidroxi-2',4'-dimetil-hepta-2',4'-dienil okadaato (12) aislado de la cepa PL3V de *P. lima*.



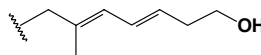
Esquema 2.2- Proceso cromatográfico para la separación de toxinas producidas por el dinoflagelado *P. lima*



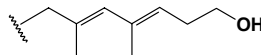
1 **Ácido Okadaico**: $R_1=CH_3$; $R_2=R_3=H$

2 **DTX1**: $R_1=R_2=CH_3$; $R_3=H$

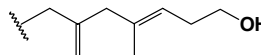
11 $R_1=CH_3$; $R_2=H$; $R_3=$



12 $R_1=CH_3$; $R_2=H$; $R_3=$



13 $R_1=CH_3$; $R_2=H$; $R_3=$



Además, llegamos a la obtención de 7 nuevos compuestos (**41-47**),^{51,52} señalados en color rojo en el **Esquema 2.2**, cuyas estructuras se discutirán en el siguiente apartado. Tal y como se aprecia en el esquema, fueron aislados en pequeñas cantidades, lo que dificultó en gran medida su elucidación estructural.

⁵¹ B. Suárez-Gómez, M. L. Souto, M. Norte y J. J. Fernández, *J. Nat. Prod.*, **2001**, *64*, 1363.

⁵² J. J. Fernández, B. Suárez-Gómez, M. L. Souto y M. Norte, *J. Nat. Prod.*, **2003**, *66*, 1294.

II.2.- ESTUDIO ESTRUCTURAL

II.2.A.- 2',4'-Dimetilen-Pental Okadaato (DTX6) (41)

El primer compuesto que estudiamos fue un derivado del AO al que denominamos DTX6 (**41**). Este nuevo metabolito fue aislado como un sólido amorfo de color blanquecino cuya fórmula molecular $C_{51}H_{76}O_{14}$ fue establecida en base a su espectro de masas de alta resolución, donde se puede observar su ion molecular a m/z 912.5237 (calc. 912.5235). Además, se observa en su espectro de MS-FAB una fragmentación $[M+H]^+$ a m/z 805, correspondiente a AO.

En el espectro de IR se observan bandas características de la presencia de un grupo éster a 1738 cm^{-1} y de un carbonilo α - β insaturado a 1672 cm^{-1} . Datos que son reforzados por la absorción en el UV (EtOH) a λ_{max} : 270 y 242 nm.

El espectro de RMN ^1H (**Figura 2.2**) presenta una clara similitud con el del AO (**1**), con la aparición de nuevas señales que los diferencian y que apuntamos mediante flechas rojas en dicha figura. Estas señales corresponden a dos metilenos H_2 -1' y H_2 -3' que forman un sistema A-B a δ_{H} 4.66, 4.55 ($J=13.4\text{ Hz}$) y 3.07, 3.01 ($J=12.5\text{ Hz}$), respectivamente; dos grupos metilenos olefínicos, H_2 -6' y H_2 -7' a δ_{H} 5.12, 4.95 y 6.16, 5.89, y un protón de aldehído H-5' a δ_{H} 9.67, que no aparece en la **Figura 2.2**, pues se escapa de la escala del espectro. Las correlaciones observadas para estas nuevas señales en el experimento HSQC, nos permitieron asignar los desplazamientos químicos para los carbonos que los soportan: C-1' a δ_{C} 66.5, C-3' a δ_{C} 33.8, C-5' a δ_{C} 200.1, C-6' a δ_{C} 114.9 y C-7' a δ_{C} 126.5.

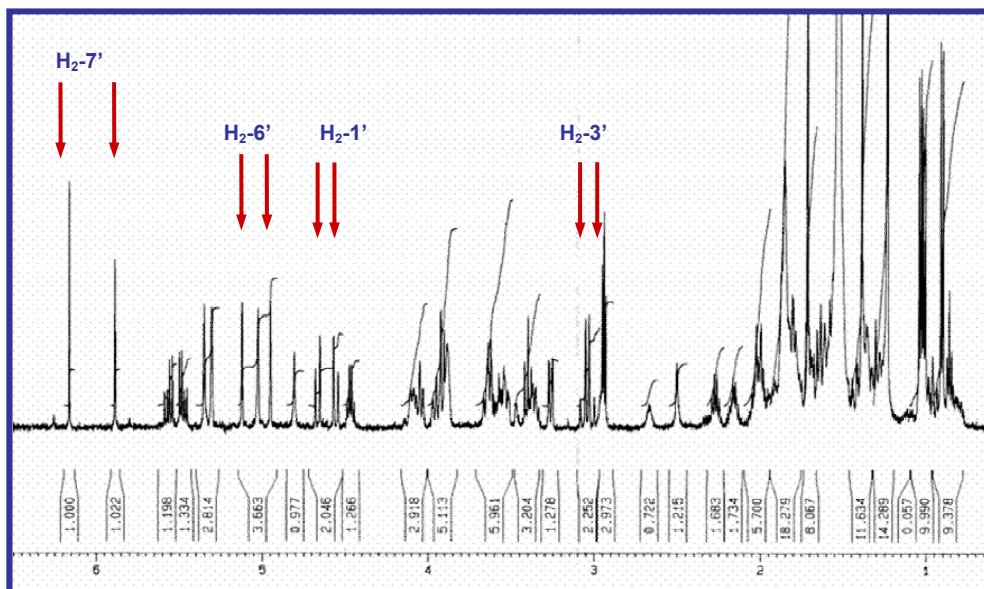


Figura 2.2.- RMN ^1H (500 MHz) de la DTX6 (**41**). Mediante flechas de color rojo se indican las señales nuevas con respecto al espectro del AO (**1**)

El experimento HMBC (**Figura 2.3**) nos permitió confirmar la estructura y la localización en la molécula del nuevo fragmento a partir de las correlaciones observadas entre el carbono cuaternario C-1 (δ_{C} 176.2) correspondiente al esqueleto carbonado del AO, y uno de los protones H₂-1', perteneciente a la cadena del éster. Éstos a su vez, muestran correlaciones con el carbono cuaternario C-2' (δ_{C} 141.6) y con el metileno olefínico C-6' (δ_{C} 114.9). En la **Figura 2.4** podemos observar mediante flechas, las correlaciones de HMBC más significativas, como las existentes entre el carbono de aldehído C-5' (δ_{C} 200.1) con los protones del metileno H₂-7' y los del H₂-3', así como las del carbono C-3' con los protones metilénicos olefínicos H₂-6' y H₂-7'. Estas conexiones fijan de manera inequívoca la cadena carbonada lateral, permitiendo asignar la totalidad de los carbonos y protones de la nueva molécula (**Tabla 2.1**). La estereoquímica relativa de los centros quirales presentes se estableció a partir de las conectividades apreciadas en el experimento ROESY y coincide con la observada en el AO (**1**).

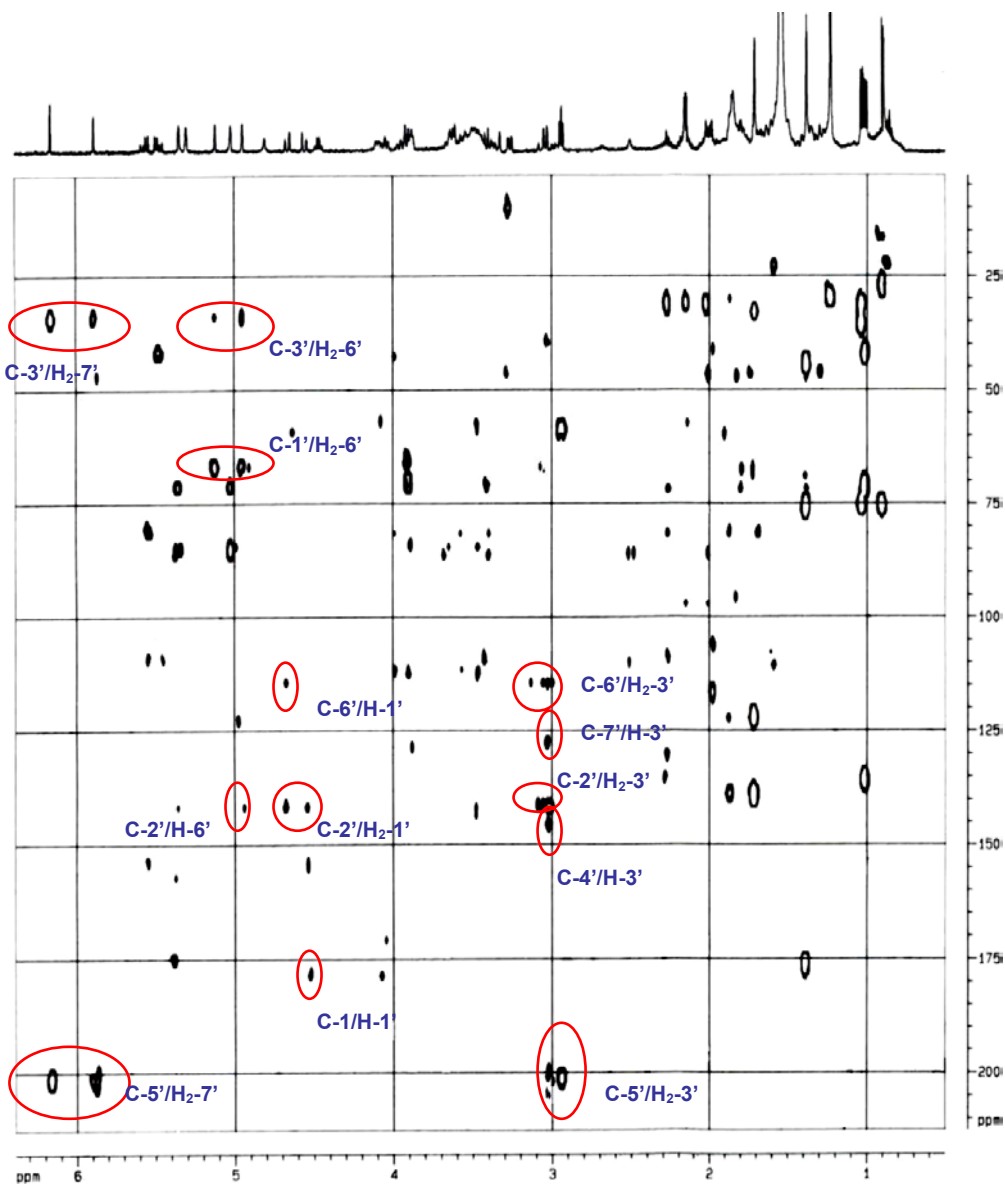


Figura 2.3.- HMBC (400 MHz) de la DTX6 (**41**). Las señales rodeadas en color rojo son las conectividades existentes entre los carbonos y protones del nuevo fragmento de la molécula

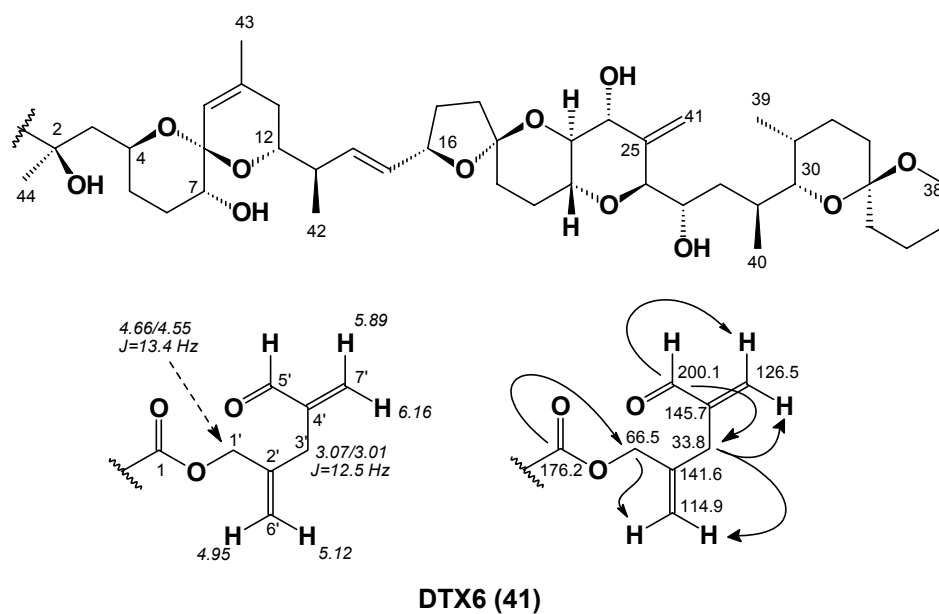


Figura 2.4.- Desplazamientos químicos más significativos tanto de ^1H como de ^{13}C de la cadena lateral de DTX6 (41). Mediante flechas se señalan las correlaciones observadas en el experimento de HMBC

Tabla 2.1.- Datos de RMN (CDCl₃) para DTX6 (41)

Carbano	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Carbano	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
1	176.2	-	27	64.6	4.04
2	75.3	-	28	35.2	0.98/1.32
3	44.2	1.68/2.06	29	31.0	1.85
4	68.7	3.96	30	75.2	3.26
5	31.7	1.36/1.91	31	27.2	1.76
6	27.3	1.75/1.82	32	26.2	1.86/1.99
7	71.3	3.35	33	30.3	1.36/1.51
8	96.0	-	34	95.5	-
9	121.5	5.31	35	35.8	1.44/1.64
10	138.2	-	36	18.7	1.40/1.61
11	32.9	1.85/1.88	37	25.4	1.50/1.83
12	71.2	3.38	38	60.2	3.54/3.64
13	42.1	2.22	39	10.7	0.90
14	135.8	5.56	40	15.6	1.03
15	130.1	5.47	41	113.1	5.02/5.35
16	79.3	4.68	42	16.0	1.01
17	30.6	1.51/2.15	43	22.7	1.72
18	37.1	1.86/2.04	44	27.6	1.39
19	105.7	-	1'	66.5	4.55/4.66
20	32.7	1.36/1.49	2'	141.6	-
21	26.4	1.76/1.82	3'	33.8	3.01/3.07
22	70.9	3.63	4'	145.7	-
23	76.6	3.41	5'	200.1	9.67
24	70.6	4.09	6'	114.9	4.95/5.12
25	143.9	-	7'	126.5	5.89/6.16
26	85.0	3.92			

II.2.B.- Norokadanona (42)

La norokadanona (42) fue aislada como un sólido blanco amorfo y sus datos de masas de alta resolución muestran un ion molecular a m/z 758.4610 (calc. 758.4605, $C_{43}H_{66}O_{11}$) lo que demuestra que se trata de un nor derivado del AO. La ausencia de la señal característica del grupo carboxilo o éster, junto con la fuerte banda observada a 1715 cm^{-1} en el espectro de IR nos señala la existencia de una cetona, lo cual se confirmó en base a los espectros de RMN. Así, en el espectro de RMN ^{13}C , se observó un carbono cuaternario, C-2 a δ_{C} 207.2, correspondiente a un carbono carbonílico. Por otro lado, en el espectro de RMN ^1H , se apreció la existencia de una señal singlete de un grupo metilo, H₃-1 a δ_{H} 2.15, junto con la ausencia de la señal correspondiente al metilo H₃-44 del AO (**Figura 2.5**). Además, las señales para los protones H₂-3 y H-4 se desplazan a campos más bajos respecto de las equivalentes en el AO. Todo ello concuerda con la presencia de un agrupamiento de metil cetona en los carbonos C-1 y C-2 de la molécula. Esto fue confirmado gracias a los datos obtenidos del experimento HMBC, donde el carbono cuaternario C-2 presenta correlaciones con los protones H₃-1, H₂-3 y H-4, estableciéndose la estructura dada (42). Los datos de RMN de ^1H y de ^{13}C se muestran en la **Tabla 2.2**.

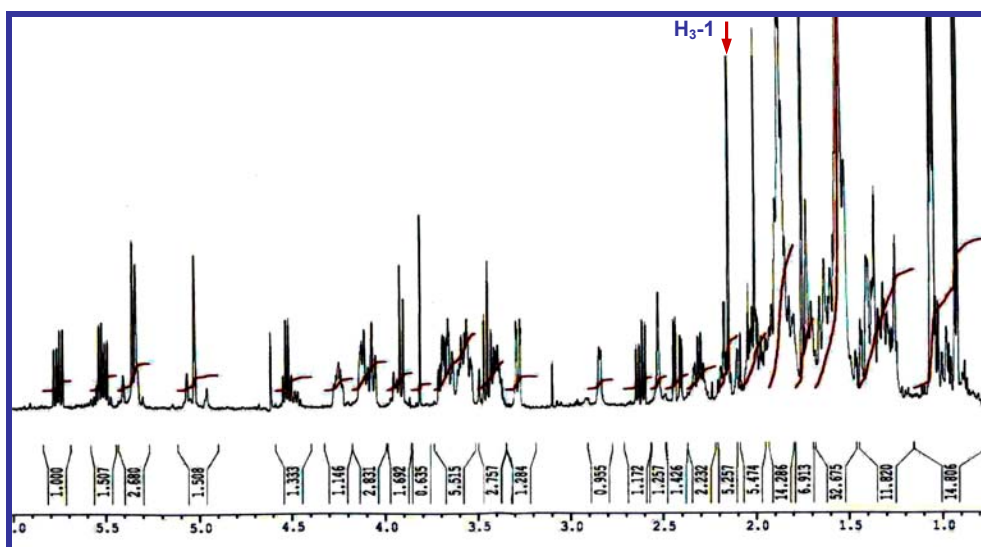
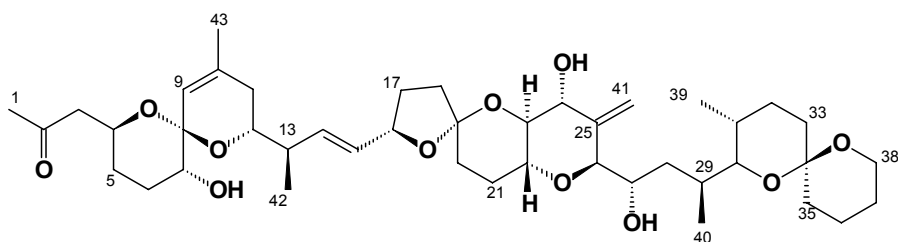


Figura 2.5.- RMN ^1H (500 MHz) de la norokadanona (42)

Este compuesto había sido sintetizado a partir del AO, pero nunca antes se había obtenido de fuente natural.⁵³



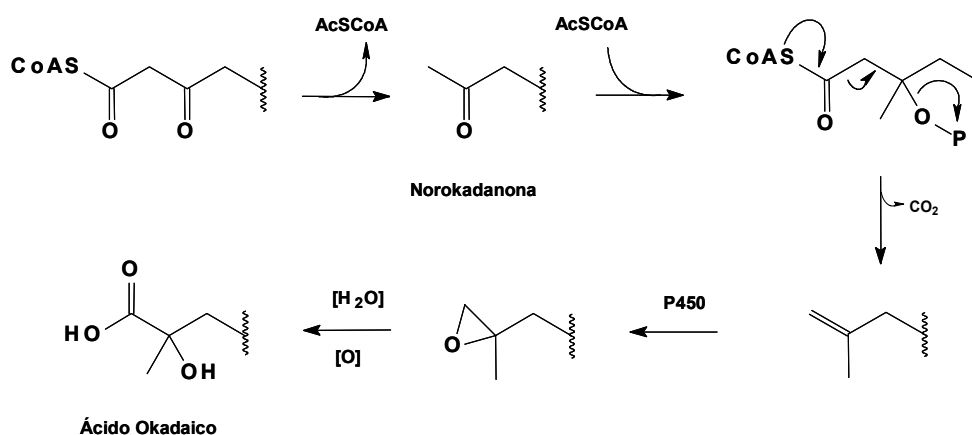
Norokadanona (42)

Tabla 2.2.- Datos de RMN (CDCl₃) para norokadanona (42)

Carbono	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Carbono	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
1	30.9	2.15	23	77.1	3.45
2	207.2	-	24	70.7	4.11
3	49.1	2.42/2.62	25	143.1	-
4	65.8	4.25	26	85.1	3.91
5	30.2	1.25/1.36	27	64.7	4.07
6	27.3	1.73/1.87	28	35.6	0.98/1.32
7	71.7	3.39	29	31.1	1.96
8	95.8	-	30	75.4	3.28
9	122.9	5.34	31	27.6	1.80
10	138.7	-	32	26.5	1.82/1.92
11	33.0	1.87/1.92	33	30.6	1.34/1.52
12	71.2	3.69	34	95.5	-
13	41.9	2.31	35	36.4	1.31/1.46
14	136.9	5.76	36	23.5	1.48/1.65
15	131.5	5.51	37	25.0	1.58/1.82
16	79.7	4.52	38	61.0	3.56/3.66
17	30.7	1.63/2.19	39	10.8	0.92
18	37.5	1.88/2.01	40	16.2	1.06
19	105.5	-	41	113.0	5.02/5.35
20	32.2	1.36/1.53	42	16.2	1.05
21	26.9	1.84/1.90	43	22.6	1.75
22	70.3	3.57			

⁵³ S. Nishiwaki, H. Fujiki, M. Suganuma, H. Furuya-Suguri, R. Matsushima, I. Yukahari, M. Ojiva, K. Yamada, D. Uemura, T. Yasumoto, F. J. Schmitz, y T. Sugimura, *Carcinogenesis*, **1990**, *11*, 1837.

La biosíntesis de este tipo de sustancias es aún un problema por resolver a pesar de la gran cantidad de experimentos que se han llevado a cabo. Sin embargo, el aislamiento de la norokadanona refuerza la hipótesis existente sobre el origen biogénico de los oxígenos en el AO (1) (**Esquema 2.3**). Murata y col.^{54,55} habían observado una fuerte incorporación de ^{18}O en el carbono C-2 en experimentos de adición de $^{18}\text{O}_2$, en tanto que en experimentos con H_2^{18}O no se apreciaba dicha incorporación. Por el contrario, tan sólo uno de los dos oxígenos del carbono C-1, aparecía enriquecido con ^{18}O proveniente de H_2^{18}O , y el otro a partir de $^{18}\text{O}_2$. En efecto, la propuesta para la biosíntesis de la norokadanona, explica esta pauta de incorporación observada para los oxígenos. De esta forma, consideramos a la norokadanona como un intermedio en la biosíntesis del AO, sobre el cual se incorporaría otra molécula de acetil coenzima A. El intermedio resultante sufriría descarboxilación dando lugar a una olefina terminal que se oxidaría por acción de enzimas del tipo P450, para formar un epóxido. La hidratación del mismo, dejaría el oxígeno procedente de oxígeno molecular en el carbono C-2, y el procedente de agua en el carbono C-1, tal y como se había observado. Finalmente, una oxidación nos daría el AO.



Esquema 2.3.- Posible origen biosintético de los oxígenos en el ácido okadaico, con la norokadanona como intermedio

⁵⁴ M. Izumikawa, M. Murata, K. Tachibana, T. Fujita y H. Naoki, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 147.

⁵⁵ M. Izumikawa, M. Murata, K. Tachibana, T. Fujita y H. Naoki, *Eur. J. Biochem.*, **2000**, 267, 5179.

II.2.C- Metil Okadaato (43)

Se aisló el metil okadaato (**43**) como sólido blanco amorfo. Este compuesto fue fácilmente identificado comparando sus datos espectroscópicos con los del AO (**1**), puesto que sus espectros de RMN ^1H eran bastante parecidos (**Figura 2.6**). El espectro de masas de alta resolución nos apuntó hacia la existencia de un carbono más, $\text{C}_{45}\text{H}_{70}\text{O}_{13}$, observándose el ion molecular a 841.4709 (calc. 841.4714). Este carbono extra aparece como metilo, $\text{H}_3\text{-1}'$ a δ_{H} 3.79 en el espectro de RMN ^1H , y es señalado mediante una flecha de color rojo en la **Figura 2.6**.

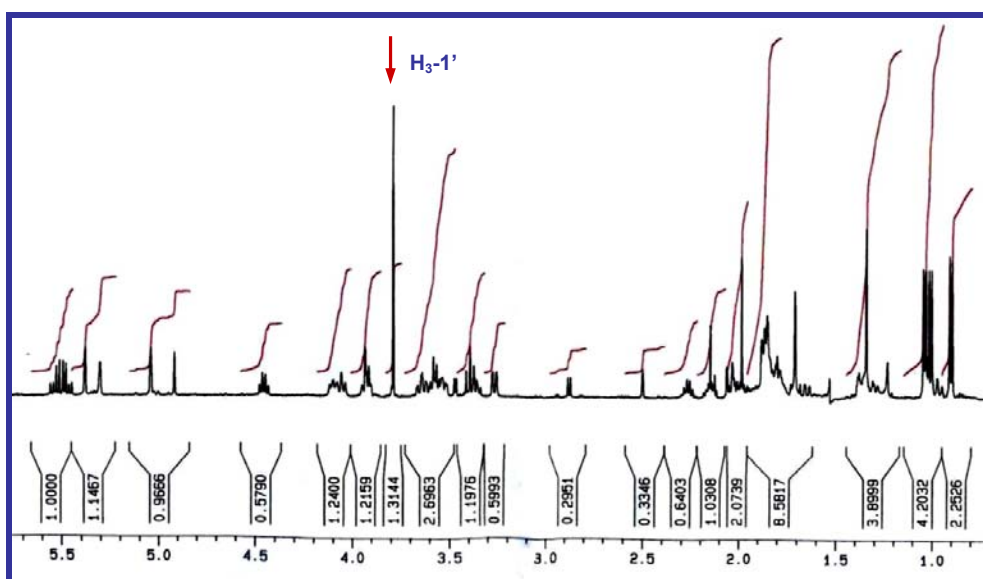
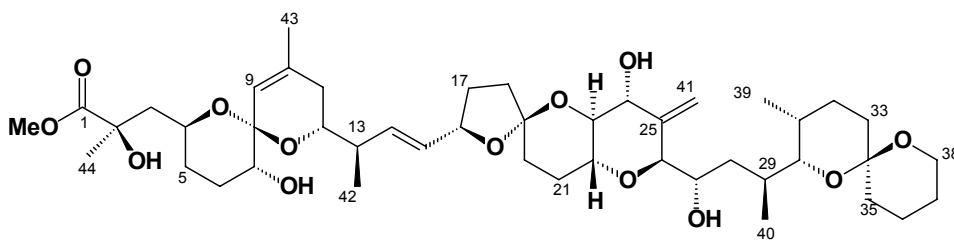


Figura 2.6.- RMN ^1H (500 MHz) del metil okadaato (**43**)

La presencia de un grupo éster fue demostrada por la fuerte banda observada a 1739 cm^{-1} en el espectro de IR. Los datos de RMN de ^{13}C y ^1H están recogidos en la **Tabla 2.3**.

Este compuesto, al igual que la norokadanona, había sido preparado previamente a partir de AO. Sin embargo, la pequeña cantidad obtenida de este

compuesto, junto con el hecho de que nunca antes había sido aislado por procedimientos similares, sugieren que se trata de un metabolito y no de un artefacto.



Metil Okadaato (43)

Tabla 2.3.- Datos de RMN (CDCl₃) para metil okadaato (43)

Carbono	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Carbono	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
1	176.9	-	24	70.8	4.10
2	75.9	-	25	143.9	-
3	43.9	1.68/2.05	26	84.8	3.92
4	68.7	3.93	27	64.5	4.06
5	31.6	1.37/1.70	28	35.2	0.97/1.43
6	27.3	1.82/1.97	29	31.0	1.91
7	71.5	3.36	30	74.9	3.27
8	96.0	-	31	27.2	1.79
9	121.6	5.31	32	27.3	1.91/1.97
10	138.6	-	33	30.3	1.34/1.52
11	32.9	1.85/1.88	34	95.5	-
12	70.9	3.57	35	35.8	1.31/1.48
13	41.8	2.26	36	18.7	1.39/1.61
14	135.4	5.56	37	25.4	1.44/1.51
15	130.5	5.47	38	60.3	3.54/3.64
16	78.9	4.46	39	10.6	0.90
17	30.6	1.58/2.13	40	16.1	1.04
18	37.1	1.86/2.04	41	112.4	5.04/5.38
19	105.7	-	42	15.8	1.01
20	31.5	1.28/1.42	43	22.9	1.71
21	26.4	1.80/1.87	44	27.6	1.34
22	69.5	3.58	1'	52.7	3.79
23	75.5	3.39			

II.2.D.- 3'-Hidroxi-2'-Metilen-Propil Okadaato (**44**)

Otro de los nuevos compuestos aislados en nuestro laboratorio fue el okadaato **44**. Este metabolito, del que tan sólo se obtuvieron 0.2 mg se aisló como sólido amorfo de color blanquecino y su fórmula molecular $C_{48}H_{74}O_{14}$, fue establecida en base a su espectro de masas de alta resolución, donde se puede observar su ion molecular a m/z 874.5156 (calc. 874.5078). El espectro de IR nos señala la existencia de un éster por la banda observada a 1739 cm^{-1} , y junto con los datos de RMN de ^{13}C y ^1H recogidos en la **Tabla 2.4**, llegamos a la conclusión de que debía tratarse de un nuevo éster del AO.

Los datos espectroscópicos de RMN ^1H mostraron la presencia de tres nuevos grupos metilenos: $\text{H}_{2-1'}$ a δ_{H} 4.72, 4.83 ($J=13.0\text{ Hz}$), $\text{H}_{2-3'}$ a δ_{H} 4.15, y el metileno olefínico $\text{H}_{2-4'}$ a δ_{H} 5.19 y 5.25 (**Figura 2.7**).

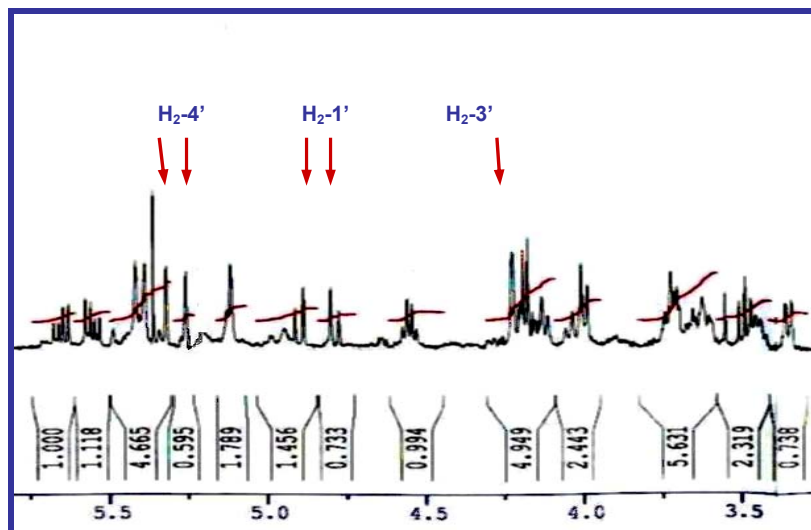


Figura 2.7.- RMN ^1H (500 MHz) de **44**. Se muestra sólo la zona del espectro comprendida entre 3.25 y 5.75 ppm, donde aparecen las señales correspondientes a los protones de la cadena lateral del éster, indicadas mediante flechas

Las correlaciones observadas para estas nuevas señales en el experimento HSQC, nos permitieron asignar los desplazamientos químicos para los carbonos C-1' a δ_C 64.6, C-3' a δ_C 63.9 y C-4' a δ_C 114.6 (**Figura 2.8**).

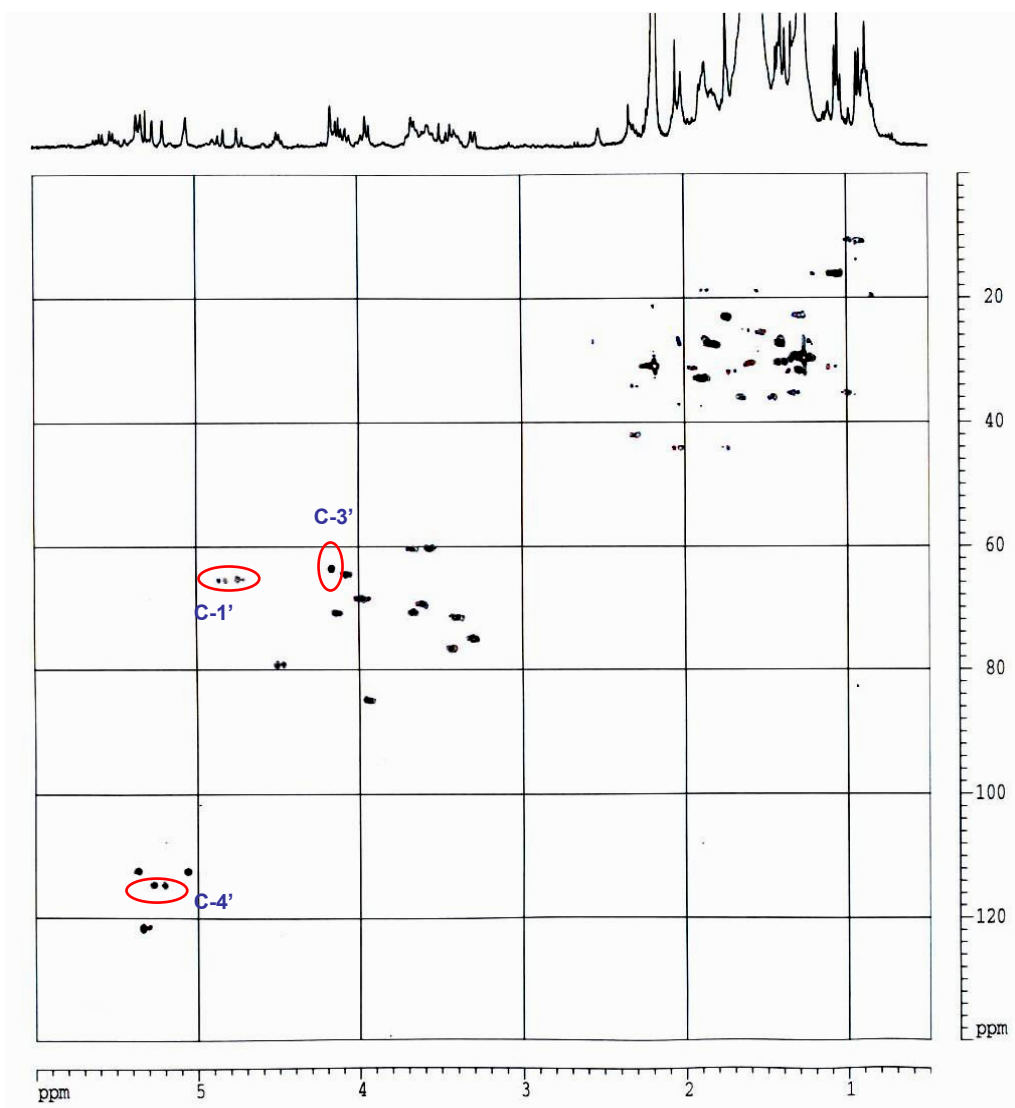


Figura 2.8.- HSQC (400 MHz) de **44**. Las conectividades entre los protones metilénicos H₂-1', H₂-3' y H₂-4', y sus correspondientes carbonos, están señaladas mediante círculos de color rojo

La estructura de la cadena del éster fue completada en base a los datos del experimento de HMBC, donde el carbono C-1 a δ_C 176.0 mostró conectividades con los protones H₂-1', y el carbono cuaternario C-2' a δ_C 142.1 con todos los protones de la nueva cadena carbonada. Estas correlaciones se señalan mediante flechas en la **Figura 2.9**. Por último, este compuesto muestra la misma estereoquímica que el AO, como pudo extraerse de los datos obtenidos en el experimento de ROESY.

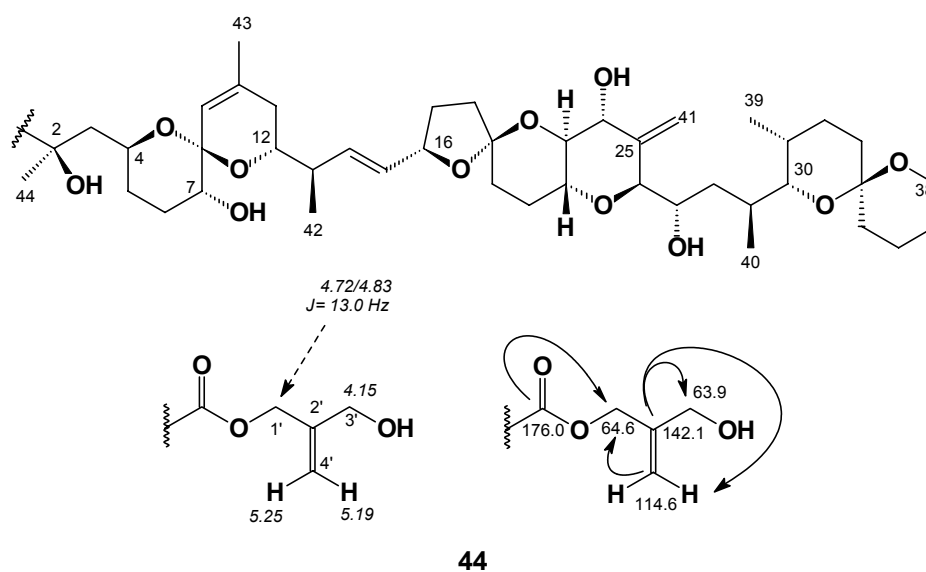


Figura 2.9.- Desplazamientos químicos más significativos tanto de ¹H como de ¹³C del nuevo fragmento de la molécula de **44**. Mediante flechas se señalan las correlaciones más importantes observadas en el experimento de HMBC.

Tabla 2.4.- Datos de RMN (CDCl₃) para **44**

Carbono	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Carbono	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
1	176.0	-	25	143.8	-
2	75.8	-	26	85.0	3.94
3	44.2	1.71/2.02	27	64.9	4.06
4	68.7	3.97	28	35.2	0.96/1.31
5	31.9	1.36/1.75	29	31.3	1.95
6	27.2	1.85/2.02	30	75.2	3.27
7	72.1	3.38	31	27.4	1.81
8	95.9	-	32	26.0	1.92/1.97
9	122.0	5.32	33	30.2	1.36/1.56
10	138.5	-	34	96.0	-
11	32.9	1.86/1.89	35	36.0	1.31/1.47
12	70.8	3.64	36	20.2	1.45/1.65
13	42.0	2.30	37	25.2	1.51/1.60
14	135.9	5.58	38	60.3	3.56/3.66
15	131.2	5.48	39	11.0	0.91
16	79.2	4.48	40	16.1	1.05
17	30.2	1.58/2.17	41	112.4	5.04/5.35
18	37.3	1.86/2.03	42	16.1	1.03
19	106.0	-	43	23.0	1.73
20	32.0	1.26/1.40	44	27.3	1.39
21	26.5	1.82/1.89	1'	64.6	4.72/4.83
22	69.4	3.59	2'	142.1	-
23	76.8	3.42	3'	63.9	4.15 (2H)
24	71.2	4.11	4'	114.6	5.19/5.25

II.2.E.- 5'-Hidroxi-2'-Metilen-Penta-3'-Enil Okadaato (45)

Este nuevo éster se obtuvo también como un sólido amorfo de color blanquecino. En el espectro de masas se observó un ion molecular a m/z 921.7 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calc. 922.5054), lo que permitió establecer su fórmula molecular como $\text{C}_{50}\text{H}_{76}\text{O}_{14}$. Nuevamente, una banda a 1732 cm^{-1} en el espectro de IR, nos indica que se trata de un éster.

En el espectro de RMN ^1H se observan varias señales nuevas a campos bajos (**Figura 2.10**): un metileno olefínico, $\text{H}_2\text{-6}'$ a δ_{H} 4.95 y 5.13, dos grupos

metilenos, H₂-1' y H₂-5' a δ_H 4.54, 5.09 y δ_H 4.17, respectivamente, y dos protones vinílicos, H-4' a δ_H 5.85 y H-3' a δ_H 5.90.

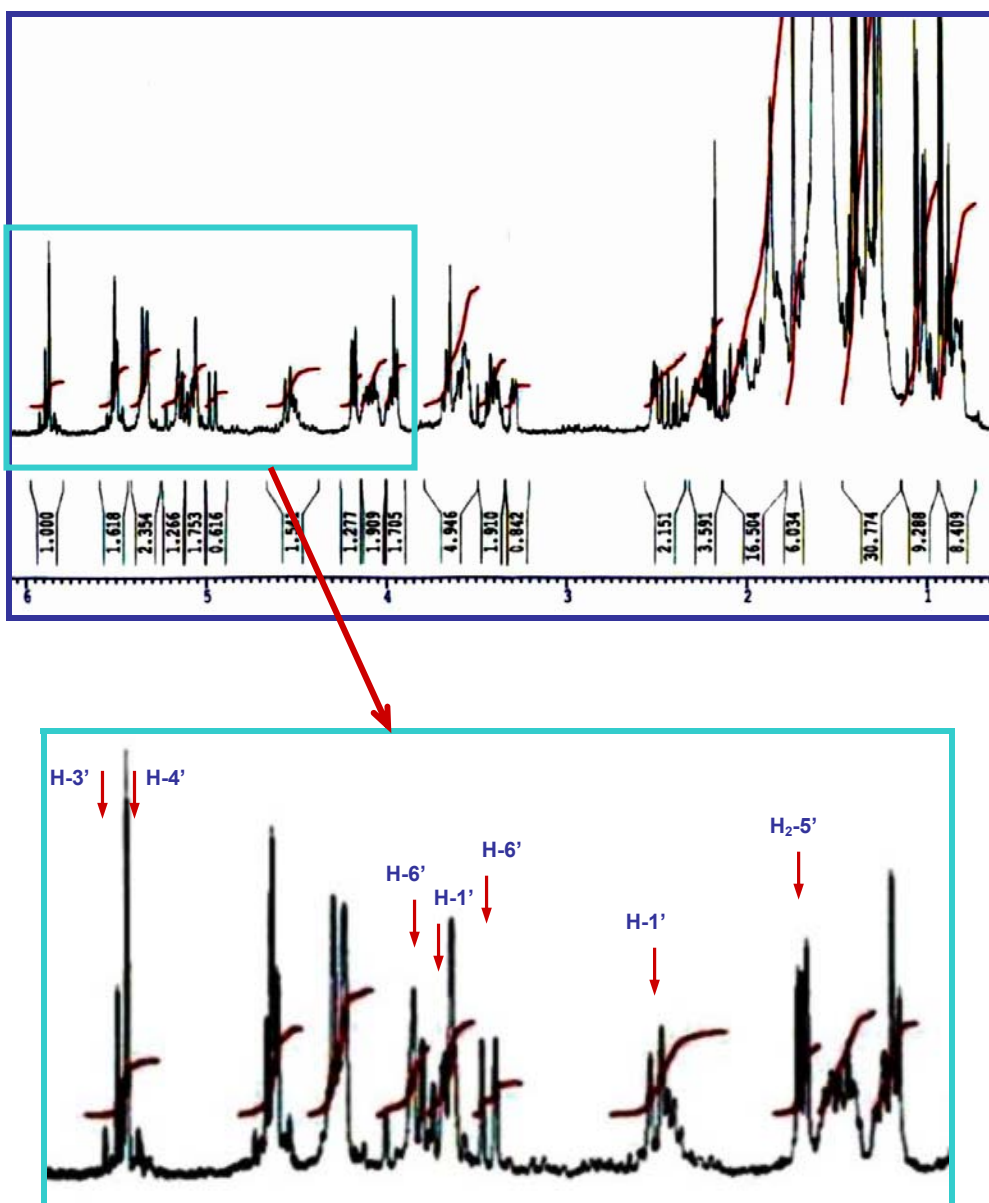


Figura 2.10.- RMN ¹H (500 MHz) de **45**. Se ha ampliado la zona donde aparecen las señales correspondientes a los protones pertenecientes a la cadena lateral del éster, que han sido apuntadas con flechas de color rojo

En el experimento COSY de este compuesto, sólo se aprecia correlaciones a larga distancia entre los protones $H_{2-6'}$ y $H_{2-1'}$, y entre los protones $H_{2-5'}$ y $H-4'$, así como entre $H-3'$ y $H-4'$, cuyas señales de correlación aparecen pegadas a la diagonal y dificulta su visión (**Figura 2.11**), por lo que acudimos nuevamente a experimentos bidimensionales heteronucleares con el fin de completar la estructura.

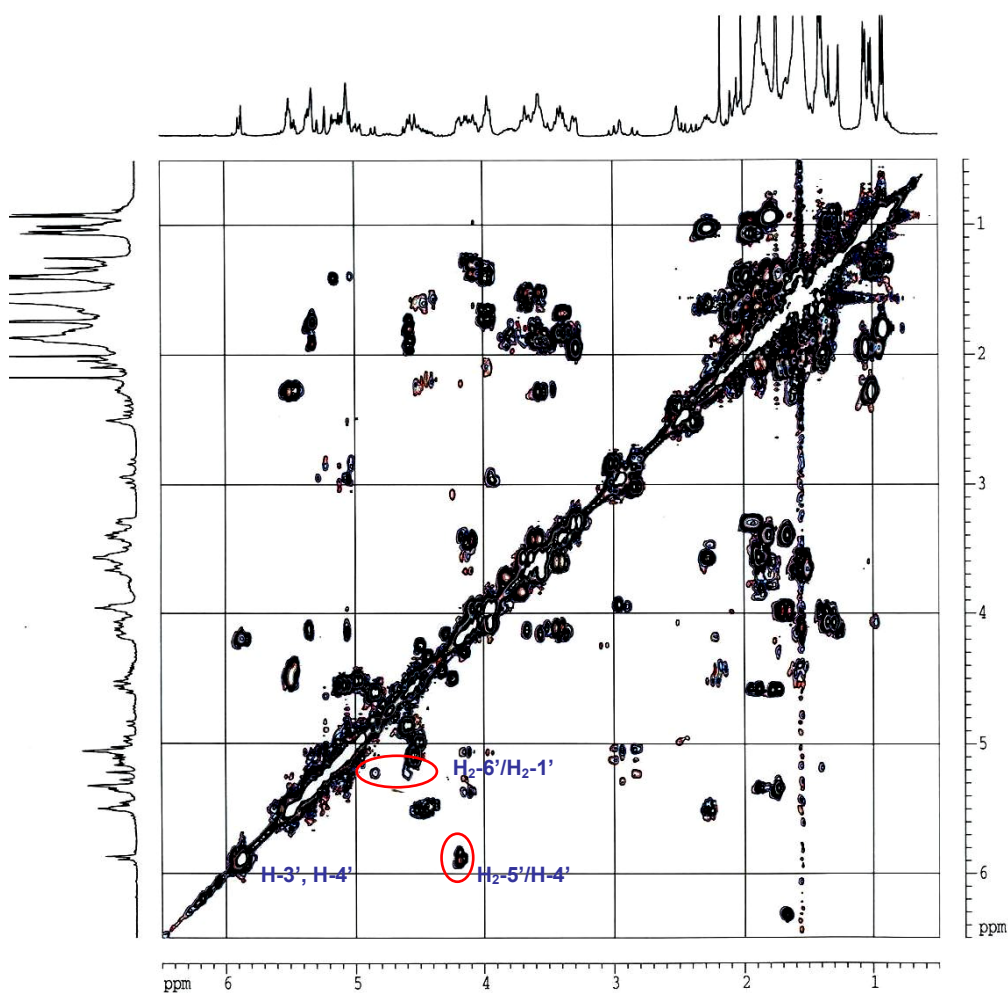


Figura 2.11.- COSY (400 MHz) de **45**. Aparecen rodeadas en rojo las conectividades entre protones más significativas para la elucidación estructural de la cadena lateral de este nuevo éster

Los experimentos de HMBC y HSQC permitieron completar la estructura de la cadena lateral de la molécula y establecer de esta forma, los desplazamientos para todos los carbonos y protones de este nuevo éster del AO (**Tabla 2.5**). Así, además de la clásica conectividad existente entre el carbono cuaternario C-1 a δ_C 176.1 con los protones H₂-1' en el experimento de HMBC, se observó también que el carbono C-1' a δ_C 67.7, se correlaciona con los protones del metileno olefínico H₂-6' y con el protón vinílico H-3', el cual presenta conexión con el carbono olefínico C-4' a δ_C 132.8, y con el alcohol alílico C-5' a δ_C 62.8. En la **Figura 2.12** se muestran las conectividades más significativas, observadas en este experimento.

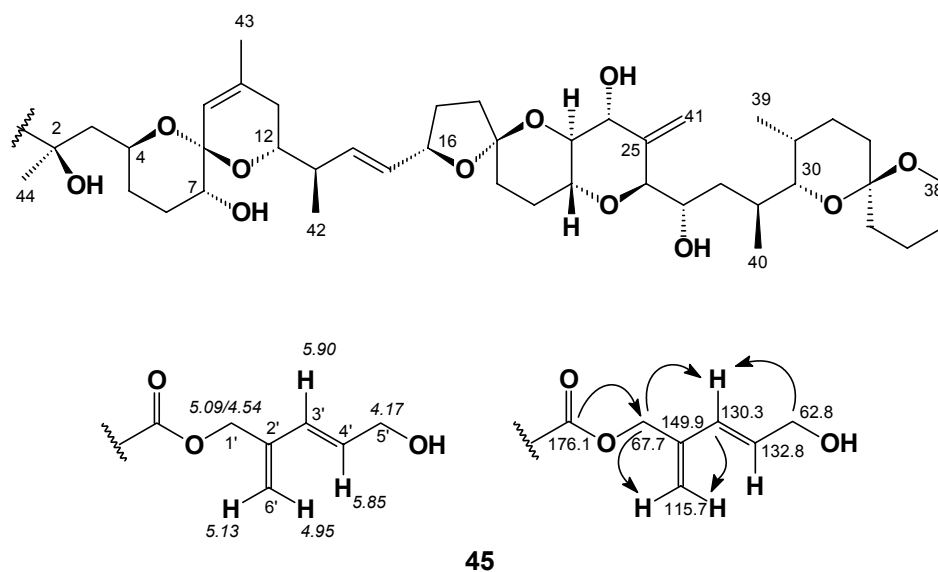


Figura 2.12.- Desplazamientos químicos más significativos de **45**. Mediante flechas se señalan las correlaciones más importantes observadas en el experimento de HMBC

Por último, la estereoquímica del doble enlace entre los carbonos C-3' y C-4', pudo ser establecida gracias a la constante de acoplamiento observada para sus protones, H-3' y H-4', en el espectro de RMN ¹H ($J=16.2$ Hz).

Tabla 2.5.- Datos de RMN (CDCl₃) para **45**

Carbono	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Carbono	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
1	176.1	-	26	84.7	3.95
2	76.0	-	27	64.4	4.06
3	44.0	1.70/2.10	28	35.1	0.98/1.35
4	68.4	3.98	29	31.2	1.91
5	32.0	1.38/1.75	30	75.0	3.29
6	26.5	1.85/2.10	31	27.2	1.81
7	71.8	3.39	32	26.2	1.86/1.99
8	96.1	-	33	30.4	1.38/1.53
9	121.8	5.38	34	95.6	-
10	139.0	-	35	35.9	1.46/1.65
11	32.9	1.86/1.88	36	18.7	1.54/1.89
12	71.1	3.53	37	25.6	1.50/1.57
13	42.2	2.26	38	60.7	3.56/3.66
14	136.0	5.52	39	10.9	0.92
15	131.3	5.49	40	16.1	1.05
16	79.1	4.50	41	112.7	5.06/5.35
17	30.5	1.58/2.22	42	15.8	1.01
18	37.1	1.88/2.04	43	23.0	1.74
19	106.0	-	44	28.1	1.41
20	32.2	1.38/1.42	1'	67.7	4.54/5.09
21	26.8	1.76/1.85	2'	149.9	-
22	69.9	3.59	3'	130.3	5.90
23	76.2	3.42	4'	132.8	5.85
24	71.2	4.11	5'	62.8	4.17 (2H)
25	144.0	-	6'	115.7	4.95/5.13

II.2.F.- 5',7'-Dihidroxi-2',4'-Dimetilen-Heptil Okadaato (46)

Se aisló un nuevo compuesto cuya fórmula molecular $C_{53}H_{82}O_{15}$, fue establecida gracias al espectro de masas y el ion molecular observado a m/z 980.1 $[M+Na]^+$ (calc. 980.5473). Este sólido blanco amorfo resultó ser un éster de AO (banda a 1737 cm^{-1} en el espectro de IR) con una cadena lateral de 7 átomos de carbono, como las observadas para los ésteres **11**, **12** y **13**.

La comparación de los espectros de RMN 1H y ^{13}C con los del AO, permiten identificar las señales pertenecientes a la cadena del éster (**Figura 2.13**). Estas señales corresponden a dos metilenos olefínicos: H_2-9' a δ_H 4.91, 5.19 y H_2-8' a δ_H 5.10, 5.18; tres metilenos alifáticos: H_2-1' a δ_H 4.51, 4.82, H_2-3' a δ_H 2.83, 2.99 y H_2-7' a δ_H 3.78, 3.84; y por último, una señal para un protón geminal a un grupo alcohol: $H-5'$ a δ_H 4.36. Además, el experimento HSQC nos permitió asignar inicialmente el desplazamiento de un grupo metileno en la zona comprendida entre δ_H 1.6 y 1.9. Todas estas señales se indican mediante flechas de color rojo en la **Figura 2.13**.

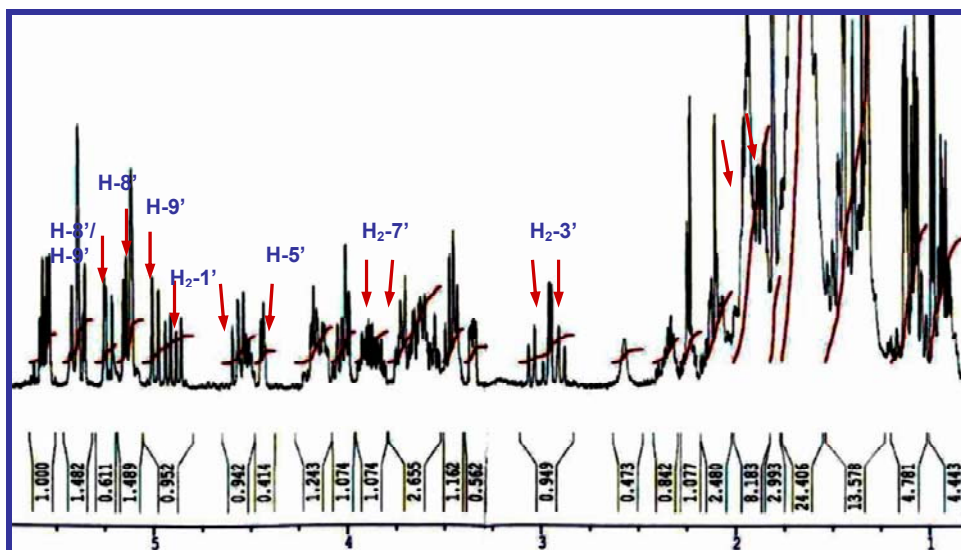


Figura 2.13.- RMN 1H (500 MHz) de **46**. Las señales indicadas mediante flechas rojas son las correspondientes a los protones de la cadena lateral del éster

La plena identificación de este último metileno se llevó a cabo de la forma siguiente. En el experimento COSY se observó correlación entre la señal del protón H-5' a δ_H 4.36 con las señales correspondientes al metileno a δ_H 1.61, 1.82, y éstas a su vez con el metileno H₂-7' a δ_H 3.78, 3.84, estableciéndose la presencia del fragmento -CH(OH)-CH₂-CH₂OH. Se acudió entonces a un experimento TOCSY-1D (**Figura 2.14**), en el que se irradió selectivamente la señal del protón geminal al grupo alcohol a δ_H 4.36 (H-5') y se observan conectividades con las señales para los protones H₂-6' a δ_H 1.61, 1.82 y H₂-7' a δ_H 3.78, 3.84.

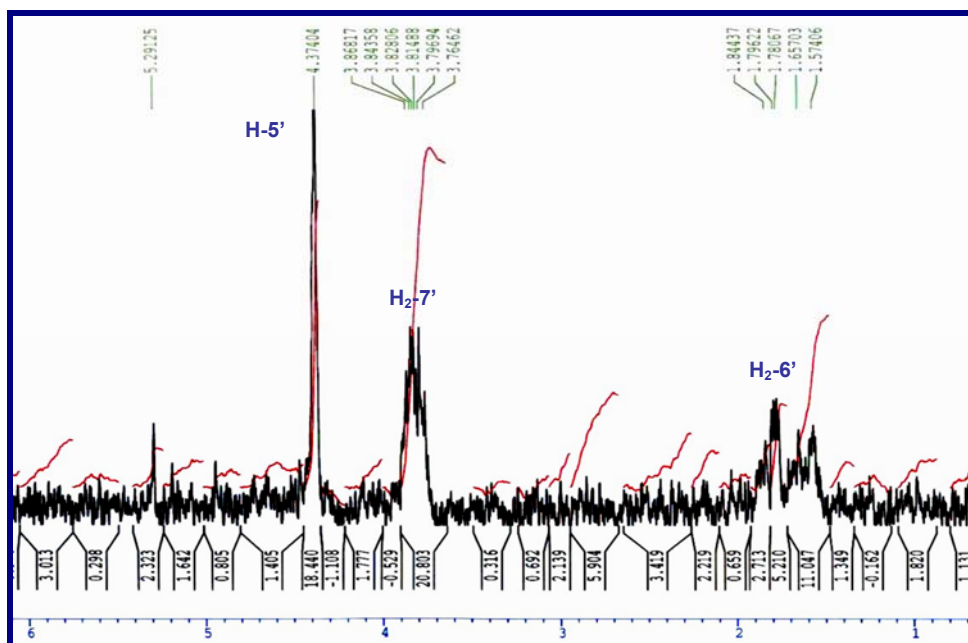


Figura 2.14.- TOCSY-1D de **46**, irradiando H-5'

El experimento de HMBC (**Figura 2.15**) nos ayudó a completar la estructura de la molécula gracias a las correlaciones observadas. Así, el carbono cuaternario C-1 a δ_C 176.0 muestra conectividad con los protones H₂-1', que a su vez se correlacionan con C-2' a δ_C 141.5 y con C-8' a δ_C 116.8. C-2' presenta también conectividad con los protones H₂-3', los cuales son esenciales para establecer la estructura del fragmento, puesto que conectan con los siguientes

carbonos: C-4' a δ_C 149.6; los dos metilenos olefínicos de la molécula C-8' a δ_C 116.8 y C-9' a δ_C 112.5; C-1' a δ_C 67.9 y el carbono que soporta el grupo hidroxilo secundario C-5' a δ_C 74.6.

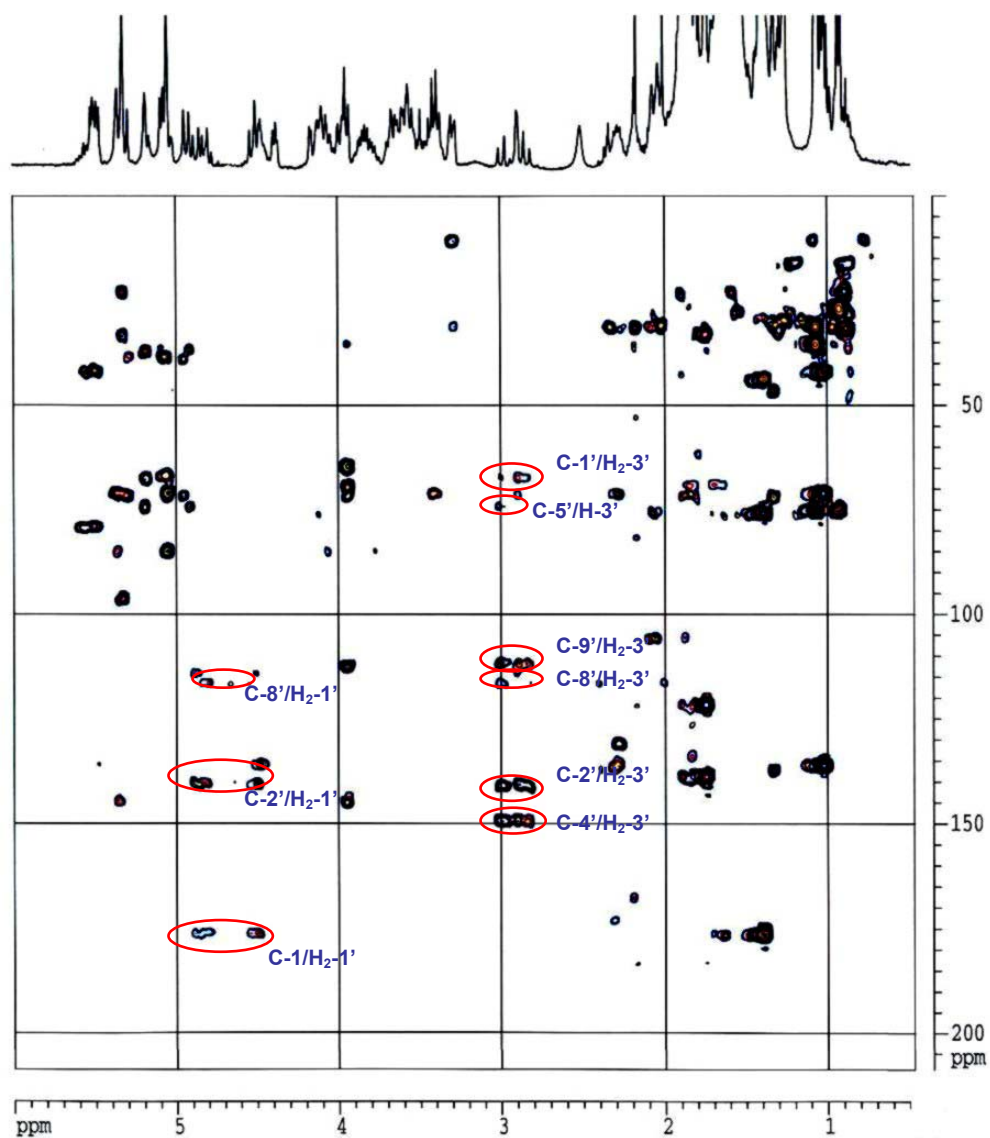


Figura 2.15.- HMBC (400 MHz) de **46**. Mediante círculos rojos se señalan las conectividades más significativas observadas para el nuevo fragmento de la molécula

En la **Figura 2.16** se recogen las conectividades más relevantes encontradas en el experimento HMBC, referentes al fragmento del éster y que permiten establecer su estructura. Asimismo, se identifican todos sus desplazamientos de protón y de carbono. Los datos de RMN de ^{13}C y ^1H están recogidos en la **Tabla 2.6**.

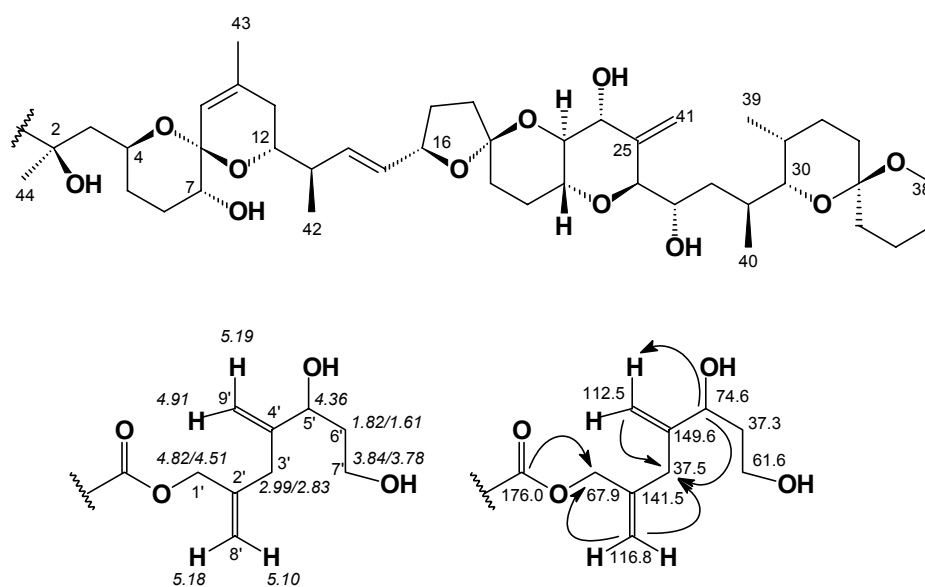


Figura 2.16.- Desplazamientos químicos más representativos de **46**. Mediante flechas se señalan algunas de las conectividades observadas en el experimento de HMBC, que ayudaron a completar la estructura de este nuevo fragmento

Tabla 2.6.- Datos de RMN (CDCl₃) para **46**

Carbono	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Carbono	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
1	176.0	-	28	35.3	0.98/1.30
2	75.5	-	29	31.8	1.97
3	43.9	1.69/2.06	30	75.1	3.29
4	69.0	3.97	31	27.6	1.79
5	31.9	1.34/1.71	32	26.8	1.90/2.00
6	27.3	1.68/1.83	33	30.7	1.39/1.53
7	71.6	3.39	34	95.0	-
8	95.9	-	35	35.9	1.46/1.63
9	122.1	5.32	36	19.0	1.53/1.91
10	138.7	-	37	25.0	1.43/1.57
11	33.1	1.89/1.94	38	60.5	3.56/3.66
12	71.6	3.49	39	10.9	0.92
13	42.2	2.27	40	16.1	1.05
14	136.6	5.50	41	113.4	5.05/5.32
15	131.3	5.47	42	15.9	1.05
16	79.4	4.47	43	23.5	1.74
17	30.8	1.60/2.17	44	27.9	1.38
18	37.7	1.87/2.09	1'	67.9	4.51/4.82
19	105.2	-	2'	141.5	-
20	32.2	1.32/1.41	3'	37.5	2.83/2.99
21	27.0	1.82/1.89	4'	149.6	-
22	70.2	3.59	5'	74.6	4.36
23	76.9	3.43	6'	37.3	1.61/1.82
24	71.3	4.11	7'	61.6	3.78/3.84
25	144.8	-	8'	116.8	5.10/5.18
26	85.1	3.95	9'	112.5	4.91/5.19
27	64.9	4.07			

II.2.G.- 5'-Hidroperoxi-7'-Hidroxi-2',4'-Dimetilen-Heptil Okadaato (47)

Por último, se aisló otro nuevo éster del AO (47) como sólido amorfo de color blanquecino. El hecho de que sea un éster fue confirmado por el espectro de IR donde aparece una ν_{\max} a 1738 cm^{-1} . En este mismo espectro parece apreciarse una banda a 875 cm^{-1} , que nos indica la presencia de un grupo peróxido. Por otro lado, el espectro de masas nos establece una fórmula molecular $\text{C}_{53}\text{H}_{82}\text{O}_{16}$, de acuerdo con el ion que aparece a $m/z\ 996.2\ [\text{M}+\text{Na}]^+$ (calc. 996.5422), que nos confirma la existencia de un oxígeno más que en el compuesto anterior (46).

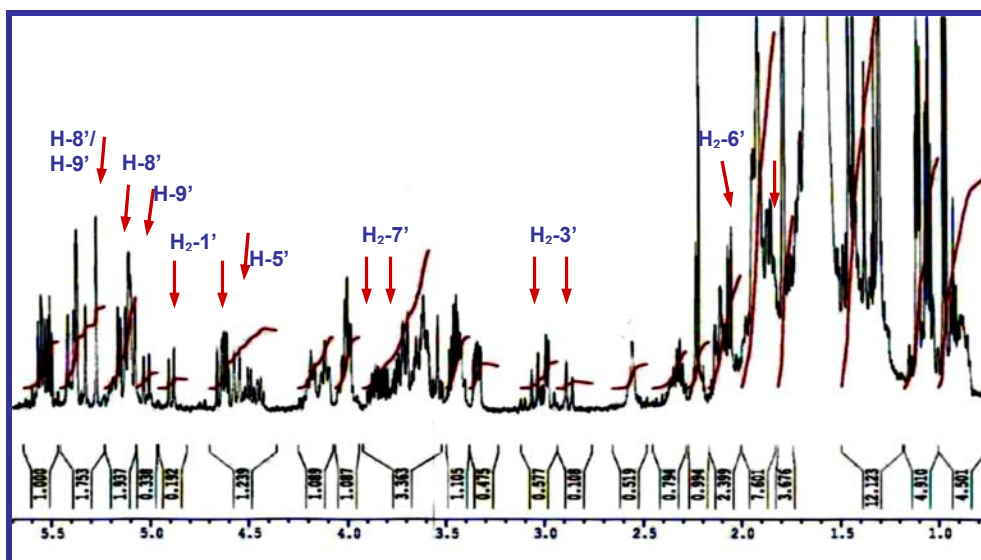


Figura 2.17.- RMN ^1H (500 MHz) de 47. Mediante flechas se señalan las señales pertenecientes a la cadena lateral del éster

Los compuestos **46** y **47**, los encontramos de forma consecutiva en la misma fracción cromatográfica, y de hecho, fue muy difícil su separación. Además, sus espectros de RMN ^1H son bastante similares. Si comparamos el espectro de RMN ^1H de este nuevo metabolito **47** (**Figura 2.17**) con el del AO (**1**) encontramos señales similares a las observadas en **46**, pertenecientes a la cadena lateral del éster. Estas señales corresponden a dos metilenos olefinicos, $\text{H}_{2-8'}$ a δ_{H} 5.12, 5.23 y $\text{H}_{2-9'}$ a δ_{H} 5.04, 5.23; cuatro grupos metilenos, $\text{H}_{2-1'}$ a δ_{H} 4.61, 4.85, $\text{H}_{2-3'}$ a δ_{H} 2.83, 3.01, $\text{H}_{2-6'}$ a δ_{H} 1.78, 1.91 y $\text{H}_{2-7'}$ a δ_{H} 3.73, 3.82. La diferencia estriba en la desaparición de la señal de $\text{H}-5'$ a δ_{H} 4.36 de **46** y la aparición de una señal para un protón geminal a un grupo hidroperóxido, $\text{H}-5'$ a δ_{H} 4.58.

Asimismo, el experimento HSQC (**Figura 2.18**) nos permite establecer los desplazamientos para los carbonos: $\text{C}-1'$ a δ_{C} 67.0, $\text{C}-3'$ a δ_{C} 35.5, $\text{C}-6'$ a δ_{C} 34.5, $\text{C}-7'$ a δ_{C} 60.0, y los de los carbonos de los dos grupos metilénicos olefinicos, $\text{C}-8'$ a δ_{C} 116.0 y $\text{C}-9'$ a δ_{C} 115.0. De nuevo se observa la desaparición de la señal característica del metileno del grupo hidroxilo primario $\text{C}-5'$ (δ_{C} 74.6) en **46**, que es sustituida por el desplazamiento para el carbono $\text{C}-5'$ a δ_{C} 85.9, lo que nos corrobora la existencia del grupo hidroperóxido.

Los desplazamientos de RMN de ^{13}C y ^1H para todos los carbonos y protones del compuesto **47** están recogidos en la **Tabla 2.7**.

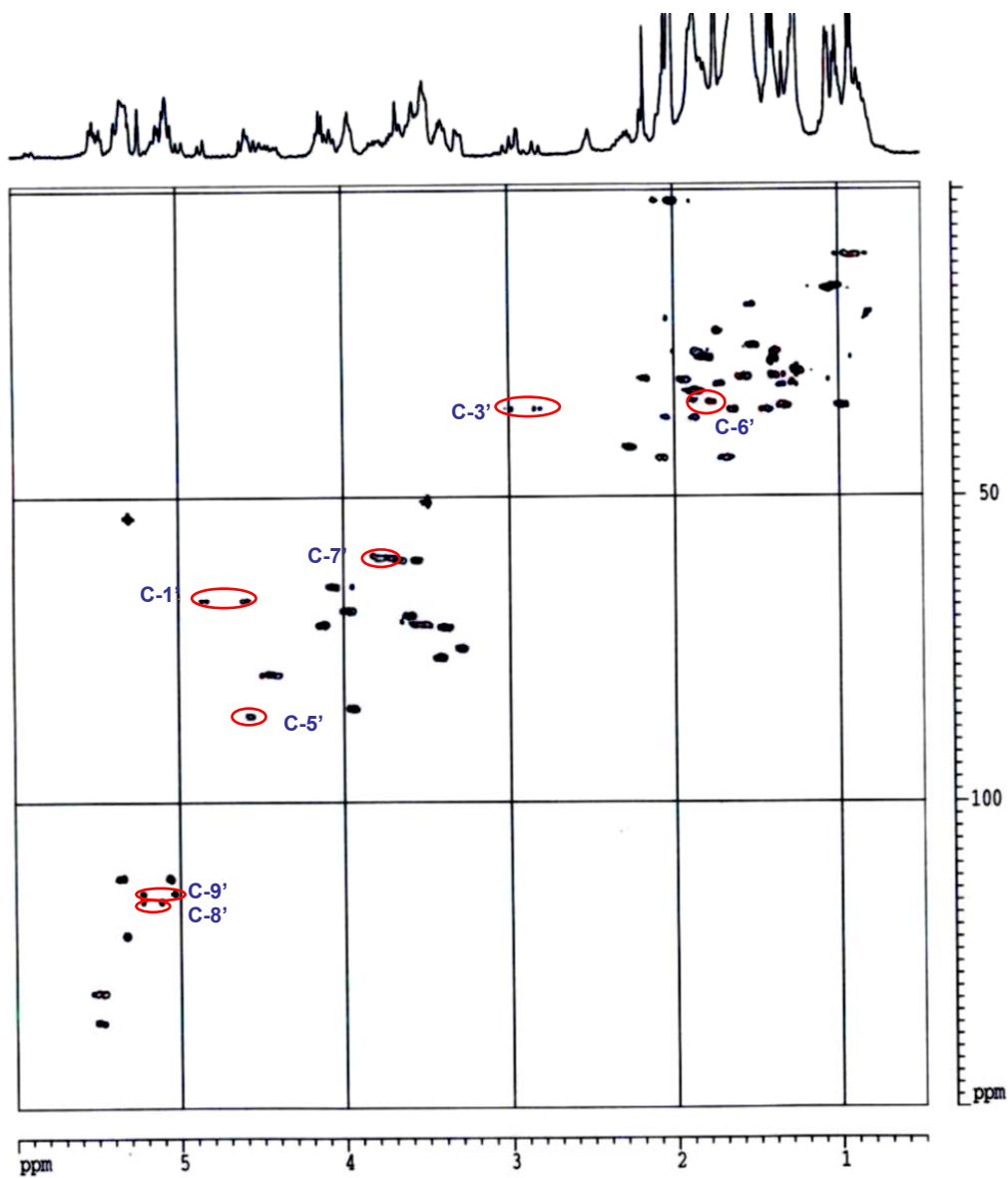


Figura 2.18.- HSQC (400 MHz) de **47**. Mediante círculos rojos se distinguen las conectividades observadas entre los carbonos y protones del nuevo fragmento de la molécula

En la **Figura 2.19** se muestran los desplazamientos para todos los carbonos y protones de la cadena lateral de este nuevo compuesto (**47**), así como las conectividades más representativas observadas en el experimento de HMBC. Gracias a éste, se pudieron terminar de asignar los desplazamientos de los carbonos cuaternarios de la molécula, debido a las conectividades observadas entre el carbono C-1 a δ_C 176.2 con los protones H₂-1', que a su vez se correlacionan con el carbono C-2' a δ_C 140.7. Los protones del metileno olefínico H₂-9' muestran conectividad, además de con los carbonos metilénicos C-3' y C-5', con el carbono cuaternario C-4' a δ_C 144.7.

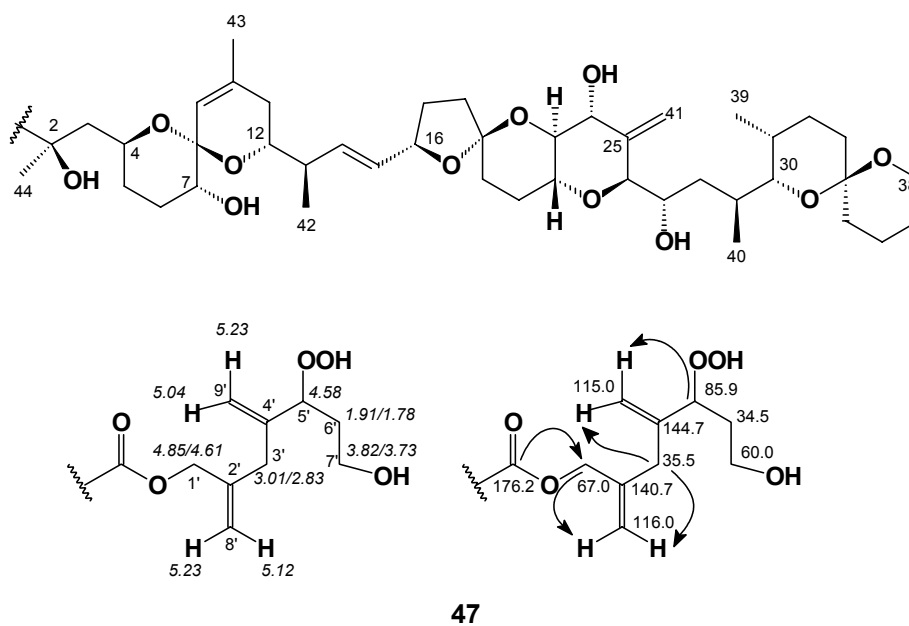
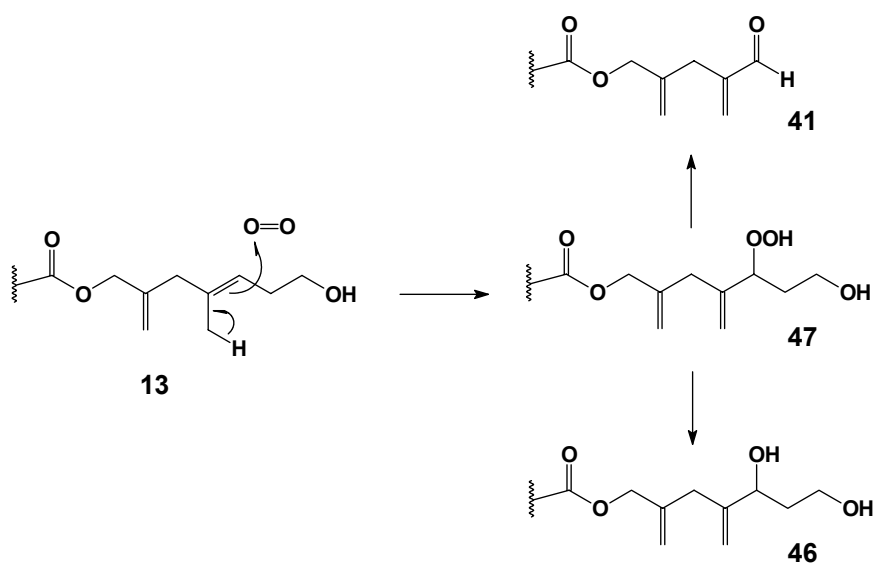


Figura 2.19.- Desplazamientos químicos más significativos de **47**. Se han indicado mediante flechas, las principales correlaciones observadas en el experimento de HMBC para la cadena lateral del éster

Tabla 2.7.- Datos de RMN (CDCl₃) para 47

Carbono	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Carbono	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
1	176.2	-	28	35.1	1.32/0.97
2	75.6	-	29	31.2	1.95
3	44.0	2.07/1.68	30	75.1	3.30
4	68.6	3.99	31	27.5	1.80
5	31.7	1.73/1.34	32	26.4	2.01/1.86
6	26.4	2.01/1.86	33	30.3	1.57/1.40
7	71.8	3.39	34	95.4	-
8	96.5	-	35	36.0	1.65/1.44
9	121.8	5.33	36	18.8	1.90/1.58
10	138.8	-	37	25.3	1.56/1.49
11	33.0	1.90/1.85	38	60.3	3.66/3.57
12	71.0	3.50	39	10.8	0.93
13	42.0	2.28	40	16.2	1.07
14	135.9	5.51	41	112.4	5.35/5.07
15	131.1	5.47	42	15.8	1.02
16	79.1	4.43	43	23.1	1.75
17	30.8	2.17/1.59	44	27.6	1.40
18	37.3	2.05/1.87	1'	67.0	4.85/4.61
19	105.8	-	2'	140.7	-
20	31.8	1.35/1.26	3'	35.5	3.01/2.83
21	27.3	1.83/1.78	4'	144.7	-
22	69.8	3.56	5'	85.9	4.58
23	76.7	3.43	6'	34.5	1.91/1.78
24	71.0	4.15	7'	60.0	3.82/3.73
25	144.5	-	8'	116.0	5.23/5.12
26	84.8	3.96	9'	115.0	5.23/5.04
27	64.6	4.08			

La presencia de un grupo hidropéroxido en este último éster nos sugiere que su posible origen biogénico (**Esquema 2.4**) debe encontrarse en el éster mayoritario **13** obtenido en los extractos acetónicos de la cepa PL2V de *Prorocentrum lima*. Así, este éster **13** se transformaría en el derivado hidropoxidado **47**, mediante una oxidación en el carbono C-5' y probablemente, este compuesto podría ser un intermedio implicado en la formación de DTX6 (**41**) si se produce una fragmentación oxidativa, o bien en la obtención del diol éster **46**, si lo que ocurre es la reducción del grupo péroxido.



Esquema 2.4.- Propuesta de formación de los compuestos **47**, **46** y DTX6 (**41**), a partir del éster **13**

III. ANÁLISIS Y CONTROL DE TOXINAS

III.1.- INTRODUCCIÓN

III.2.- MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE TOXINAS MARINAS

III.2.A.- Métodos de Ensayo

III.2.B.- Métodos Analíticos

III.3.- LC-MS DE LOS METABOLITOS DE *P. LIMA*

III.3.A.- LC-MS de **11**

III.3.B.- LC-MS de **12**

III.3.C.- LC-MS de **13**

III.3.D.- LC-MS de DTX6 (**41**)

III.3.E.- LC-MS de Norokadanona (**42**)

III.3.F.- LC-MS de Metil Okadaato (**43**)

III.3.G.- LC-MS de **44**

III.3.H.- LC-MS de **45**

III.3.I.- LC-MS de **46**

III.3.J.- LC-MS de **47**

III.- ANÁLISIS Y CONTROL DE TOXINAS

III.1.- INTRODUCCIÓN

La prevención de los riesgos tanto para la salud pública, como para los diferentes sectores económicos afectados (industrias de la acuicultura, pesquerías y alimentación), derivada de la presencia de toxinas en alimentos marinos, conlleva la implantación de programas de seguimiento de microalgas potencialmente tóxicas y de programas de control de estas sustancias en los diferentes vectores de transmisión.

En los últimos años, el interés se ha centrado en la búsqueda de un método de detección de toxinas fiable, llegando al punto de un nivel no sólo cualitativo, sino también cuantitativo, y donde el factor tiempo es también bastante importante. Así, se han desarrollado métodos que, en un tiempo reducido, permiten detectar toxinas en los mariscos a niveles muy por debajo de lo que se considera un riesgo. Dichos métodos deben superar grandes dificultades:

- la gran diversidad estructural de estas toxinas que implica diferentes modos de acción y diferentes toxicidades
- la presencia de toxinas en matrices biológicas complejas y de mezclas de congéneres relacionados y con diferentes potencias tóxicas
- la ausencia, en la mayoría de estas sustancias, de grupos cromóforos que faciliten su detección por las técnicas convencionales de espectrofotometría UV-Visible o de fluorescencia
- la aparición de toxinas pertenecientes a diferentes familias en una misma muestra, que representa una complicación adicional a efectos de determinar la toxicidad
- la posibilidad de biotransformaciones de las toxinas a lo largo de su transmisión en la cadena trófica
- las posibles transformaciones durante los procesos de extracción, purificación y análisis

III.2.- MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE TOXINAS MARINAS

La detección de toxinas marinas en sus agentes productores o en sus vectores se aborda a través de la aplicación de dos tipos de métodos, atendiendo a la naturaleza de la información obtenida: métodos analíticos o métodos de ensayo.⁵⁶

Dejando a un lado valoraciones de carácter económico, la elección de la estrategia de detección se realiza en función de los objetivos del estudio a realizar. De esta manera, los métodos químicos instrumentales que diferencian y cuantifican las toxinas ya sea individualmente o por grupos, se utilizan mayoritariamente en programas de investigación que requieran el conocimiento de todas y cada una de las toxinas presentes. Mientras, en los programas de monitoreo o control sanitario se da relevancia al conocimiento de la toxicidad global y por tanto se utilizan métodos de ensayo. Así, los programas de control sanitario requieren ensayos rápidos, sensibles, reproducibles, de bajo coste, fáciles de ejecutar y que permitan el análisis de un gran número de muestras. Además, no deben producir falsos negativos y el número de falsos positivos debe ser tan bajo como sea posible.

III.2.A.- Métodos de ensayo

Los métodos de ensayo son aquellos que proporcionan un valor del contenido total de toxinas basado en la medición de una respuesta única, biológica o bioquímica, que engloba la actividad de todas las toxinas presentes en la muestra. La determinación de la toxicidad se lleva a cabo en función de una curva dosis-respuesta que se realiza normalmente con una de las toxinas representativas del grupo objeto de estudio, expresándose finalmente la toxicidad total en equivalentes de dicha toxina. Dentro de este grupo se encuadran los

⁵⁶ J. J. Sullivan, En *Falconer*, Ed. I.R., *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water*, Academic Press, London, **1993**, 29.

bioensayos *in vivo*: de ratón y rata, y los ensayos *in vitro*: de inhibición enzimática, celulares, de receptor, los inmunoensayos y los electrofisiológicos.

En el caso de las toxinas DSP, en las que centramos nuestra atención, el método de monitoreo más comúnmente utilizado es el bioensayo de ratón, implicando tanto el método de Yasumoto como sus variaciones.^{3,57,58} Para ello se obtienen extractos a partir de los bivalvos contaminados que posteriormente se inyectan a ratones estandarizados de unos 20 g de peso, observando la respuesta de los animales (muerte/supervivencia) en un período de tiempo variable (5-48 h según los países). Desafortunadamente, esta metodología presenta un gran número de inconvenientes, además del aporte ético que supone el uso de animales para estos propósitos. Así, la extracción con acetona utilizada en el bioensayo, aunque se supone adecuada para el control de todas las ficotoxinas liposolubles, puede no ser efectiva en algunos casos. A su vez presenta una pobre reproducibilidad, una limitada capacidad de cuantificación, una baja sensibilidad, y las posibles interferencias con otros contaminantes distintos de las toxinas DSP, que podrían dar lugar a falsos positivos, y menos probablemente, a falsos negativos.

Los estudios desarrollados en los últimos años acerca del mecanismo de acción de estas toxinas, han permitido poner a punto métodos de determinación bastante precisos y fiables. Así por ejemplo, teniendo en cuenta que el AO y algunos de sus análogos ejercen su actividad biológica a través de mecanismos de inhibición de las proteínas fosfatasa PP1 y PP2A, se han establecido diferentes ensayos donde se evalúa precisamente este parámetro de inhibición de las fosfatasas, fundamentalmente de las del tipo PP2A. Otras toxinas del grupo, como la DTX3, los diolésteres y la DTX4, que no presentan esta actividad

⁵⁷ T. Yasumoto, M. Murata, M. Oshima, G. K. Matsumoto y J. Clardy, In *Seafood Toxins*, Ed. E. P. Ragelis, ACS Symposium Series, 262, Am. Chem. Soc., Washington DC, **1984**, 207.

⁵⁸ C. Le Baut, B. Bardin, M. Bardouil, M. Bohec, P. Masselin y P. Truquet, *Report IFREMER DERO-90-02mr*, France, **1990**.

inhibitoria de las enzimas, pueden también ser detectadas por este método si se realiza una hidrólisis alcalina previa.^{59,60}

Los inmunoensayos más frecuentes utilizados para la determinación de ficotoxinas son los conocidos como ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), en los que se mide la interacción toxina-anticuerpo mediante la reacción de una enzima ligada al anticuerpo con un sustrato específico de la misma, reacción que da lugar a un producto coloreado o fluorescente, y por tanto cuantificable. En el caso del AO existe un radioinmunoensayo muy sensible,⁶¹ pero su complejidad evita su uso en la rutina. Además existen dos ELISA desarrollados en forma de kits para la determinación del AO: el “DSP-Check” (Sceti, Tokio, Japón) y el “Okadaic Acid kit” de Rougier Bio-Tech (Montreal). Sin embargo, estos métodos no funcionan con toxinas esterificadas.

En el asunto que nos ocupa, donde se precisa una investigación cualitativa y cuantificativa de todas y cada una de las toxinas presentes en un extracto de uno de los organismos productores, ninguno de estos métodos de ensayo nos podían ayudar.

III.2.B.- Métodos analíticos

Estos métodos realizan una separación, identificación y posterior cuantificación individual de las toxinas en función de una respuesta instrumental. Dicha cuantificación requiere la calibración previa del equipo instrumental con patrones de concentración conocida de cada una de las toxinas objeto de estudio. En este grupo se incluyen los métodos químicos basados en la separación de toxinas por HPLC y detección colorimétrica, fluorimétrica o por espectrometría de masas (MS), así como electroforesis capilar.

⁵⁹ M. L. Fernández, A. Míguez, E. Cacho y A. Martínez, *Toxicon*, **1996**, 34, 381.

⁶⁰ D. O. Mounfort, T. Suzuki y P. Truman, *Toxicon*, **2001**, 39, 383.

⁶¹ L. Levita, H. Fujiki, K. Yamada, M. Ojiva, H. B. Gjika y H. Van Vanakis, *Toxicon*, **1988**, 26, 1123.

Las técnicas de HPLC acoplado a detección fluorimétrica (HPLC-FD) son técnicas ampliamente utilizadas en el estudio de estas toxinas, a pesar de sus limitaciones. Estas técnicas permiten la detección de aquellas toxinas DSP que posean un grupo carboxílico libre en la molécula, es decir, AO, DTX1, DTX2... De hecho, el método de Lee,⁶² que implica el uso de 9-antrildiazometano (ADAM) como fluoróforo, es el método más usado a nivel mundial para la detección de AO y sus homólogos en microalgas y mariscos. La detección de toxinas DSP esterificadas, tales como diolésteres o DTX4, mediante este método, requieren nuevamente una hidrólisis previa, puesto que se utiliza el ácido carboxílico para la introducción del resto con fluorescencia. La identificación de estos ésteres en la naturaleza, ha provocado el establecimiento de sistemas de hidrólisis directos sobre los extractos previamente a la formación de los derivados fluorescentes, asegurando de esta manera la medida de toxicidad total de la muestra. Sin embargo, este método presenta pues el inconveniente de que no permite identificar cuál es el éster causante de la toxicidad.

El desarrollo y la implantación de técnicas como cromatografía líquida asociada a espectrometría de masas (LC-MS y LC-MS/MS) ha sido crucial en mejorar el conocimiento de la producción de estas toxinas, necesitándose cantidades mínimas de sustancia. De esta manera, el espectrómetro de masas tiene potencial para analizar todas las toxinas marinas identificadas en la actualidad y detectar análogos de las mismas, siempre que se posea cierta información previa sobre sus estructuras y pesos moleculares. La HPLC acoplada a MS/MS permite un grado muy alto de especificidad, ya que la detección de la sustancia se basa en el tiempo de retención cromatográfico, en el peso molecular de la sustancia y en la información estructural derivada de la presencia de fragmentos diagnósticos para cada analito.

⁶² J-S. Lee, T. Yanagi, R. Kenna y T. Yasumoto, *Agric. Biol. Chem.*, **1987**, 51, 877.

El coste del equipamiento LC-MS o LC-MS/MS es elevado y por tanto, muchos laboratorios marinos implicados en el monitoreo de biotoxinas e investigación, no pueden permitirse su utilización, pero poco a poco, esta técnica va imponiéndose, y su precio, en relación con las prestaciones, va siendo cada vez más asequible.

III.3.- LC-MS DE LOS METABOLITOS DE *P. LIMA*

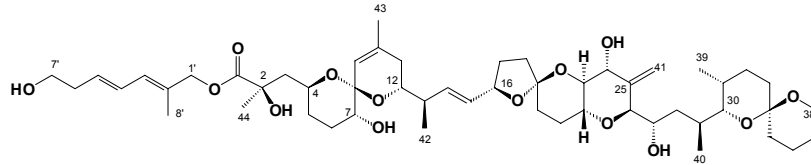
La carencia de información previa sobre el tipo de estructura y pesos moleculares de los metabolitos a analizar, es precisamente el factor limitante de esta técnica, por lo que un estudio de elucidación estructural como el presentado en el capítulo precedente, es primordial.

Con el fin de testar los nuevos estándares mediante LC-MS, en el desarrollo de métodos fiables de determinación de toxicidad, se realizó un estudio con los metabolitos obtenidos de *Prorocentrum lima*, tanto de los tres ésteres ya conocidos **11-13**, como de los nuevos compuestos recogidos en el capítulo previo **41-47**.

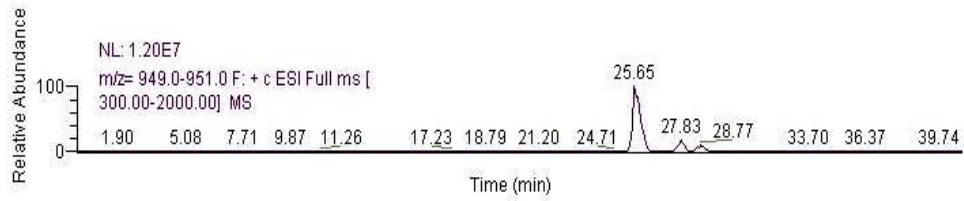
Una muestra de cada uno de estos metabolitos fue enviada al Centro Costero de Vigo, donde se realizó un LC-MS de cada uno de ellos. Las condiciones que se siguieron en estos experimentos se explican detalladamente en la parte experimental.

A continuación se presentan los tiempos de retención de cada uno de los metabolitos en el HPLC, así como sus espectros de masas, en modo positivo y en modo negativo.

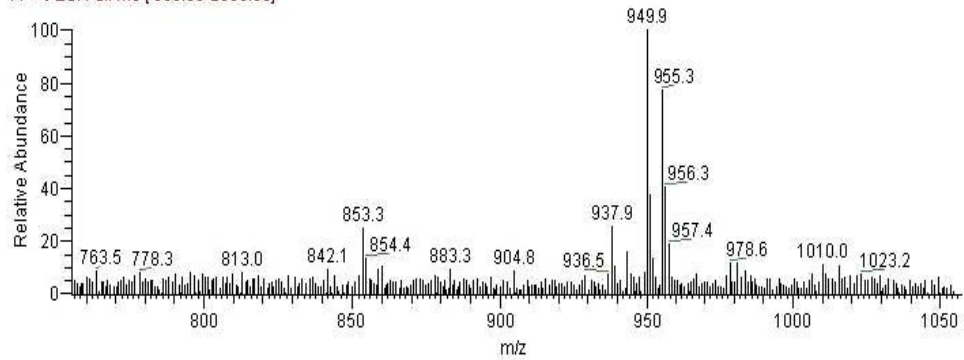
III.3.A.- LC-MS de 11



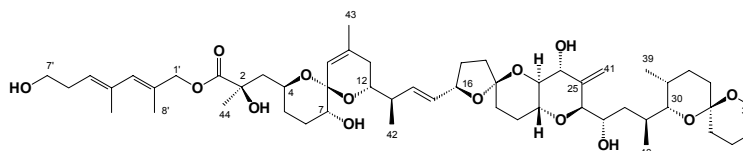
Modo positivo: $[M+Na]^+$ (PM: 950.5367)



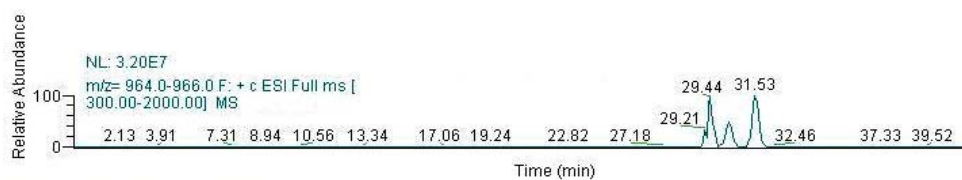
#675-688 RT: 26.19-26.66 AV: 7 NL: 3.38E5
F: + c ESI Full ms [300.00-2000.00]



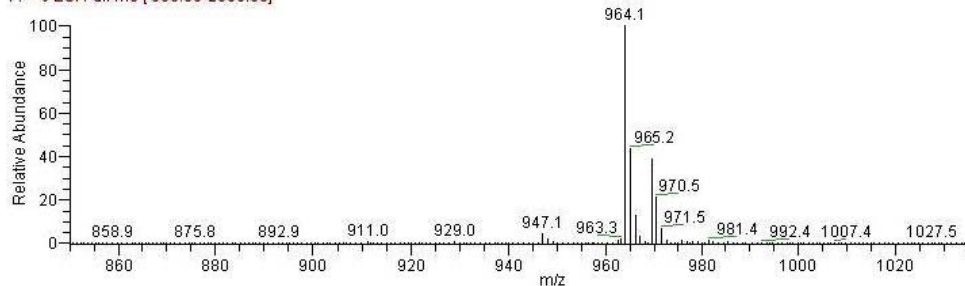
III.3.B.- LC-MS de 12



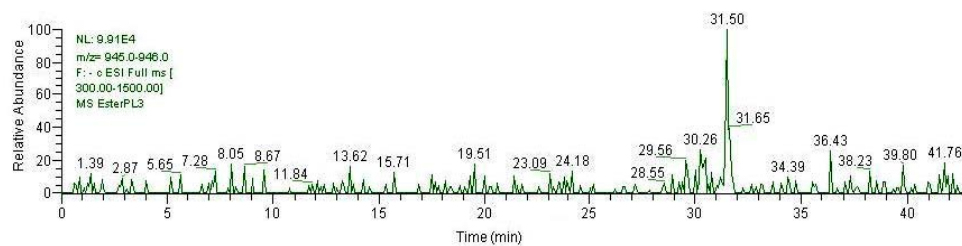
Modo positivo: $[M+Na]^+$ (PM: 964.5524)



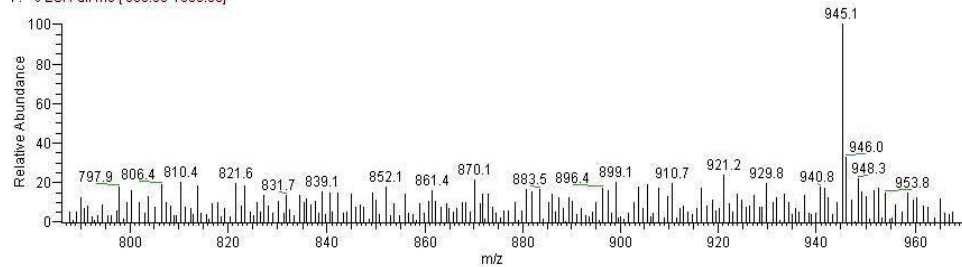
EsterPL3 #751-819 RT: 29.14-31.69 AV: 34 NL: 7.20E6
F: + c ESI Full ms [300.00-2000.00]



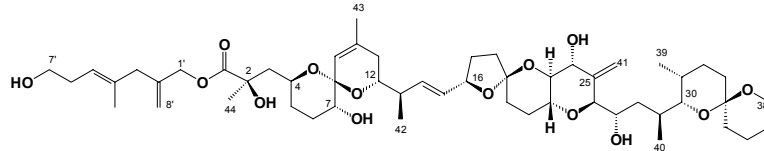
Modo negativo: (PM: 942.5705)



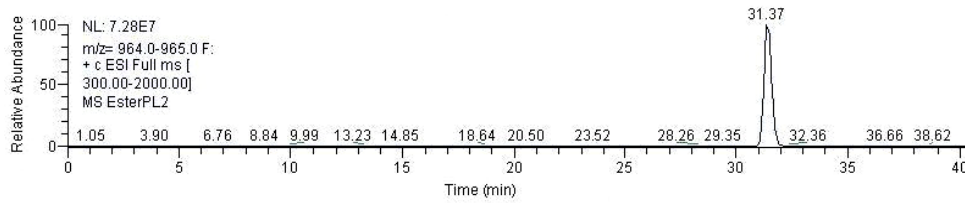
EsterPL3 #783-820 RT: 30.33-31.73 AV: 19 NL: 1.71E4
F: - c ESI Full ms [300.00-1500.00]



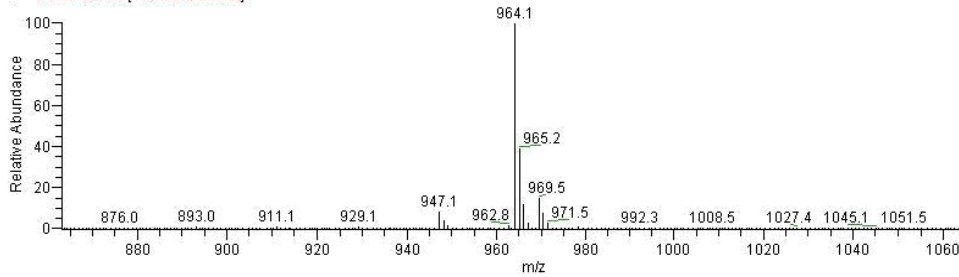
III.3.C.- LC-MS de 13



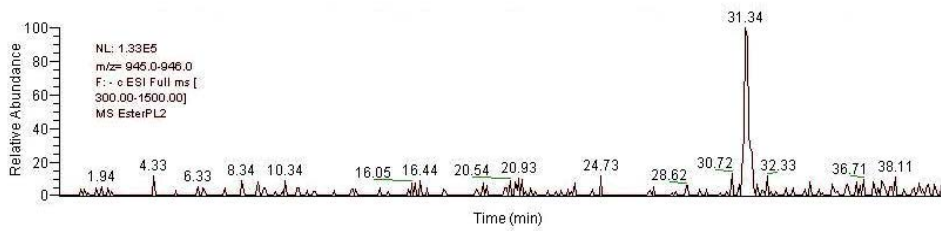
Modo positivo: $[M+Na]^+$ (PM: 964.5524)



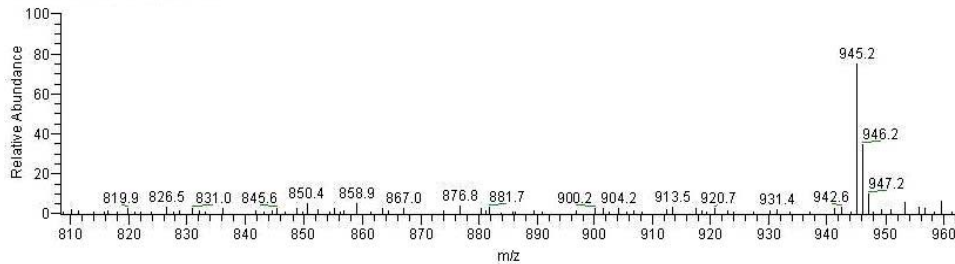
EsterPL2 #802-829 RT: 30.99-31.97 AV: 14 NL: 2.85E7
F: + c ESI Full ms [300.00-2000.00]



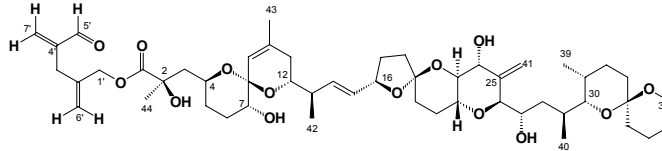
Modo negativo: (PM: 942.5705)



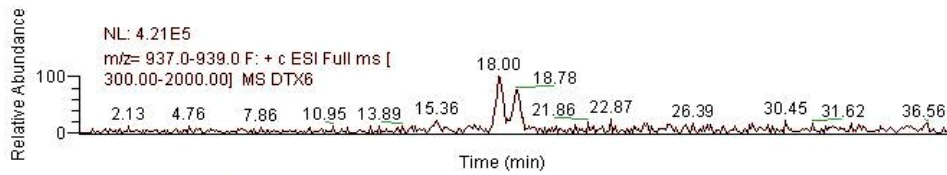
EsterPL2 #804-813 RT: 31.11-31.41 AV: 5 NL: 9.21E4
F: - c ESI Full ms [300.00-1500.00]



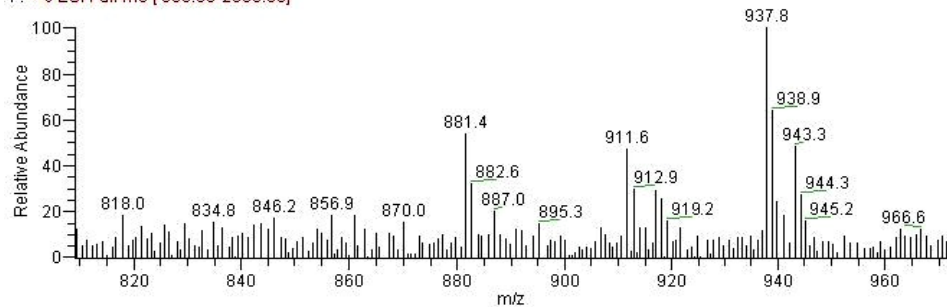
III.3.D.- LC-MS de DTX6 (41)



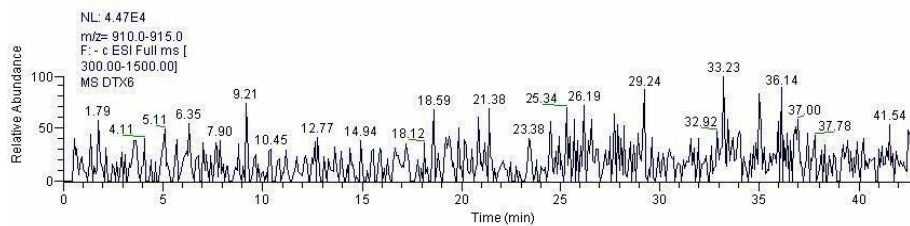
Modo positivo: $[M+Na]^+$ (PM: 934.5055)



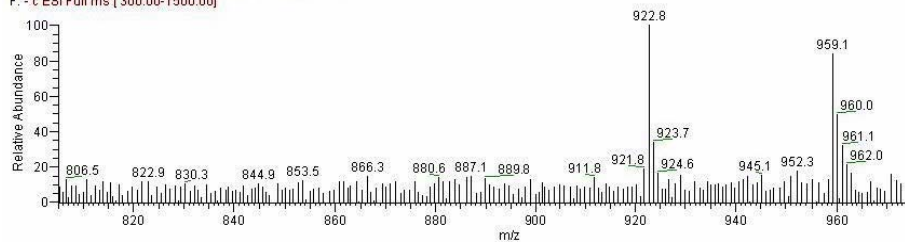
DTX6 #482-493 RT: 18.62-19.01 AV: 6 NL: 1.49E5
F: + c ESI Full ms [300.00-2000.00]



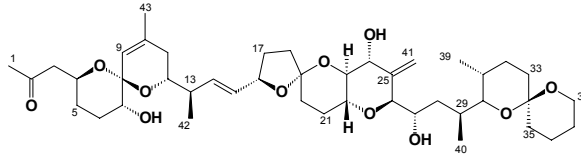
Modo negativo: (PM: 912.5235)



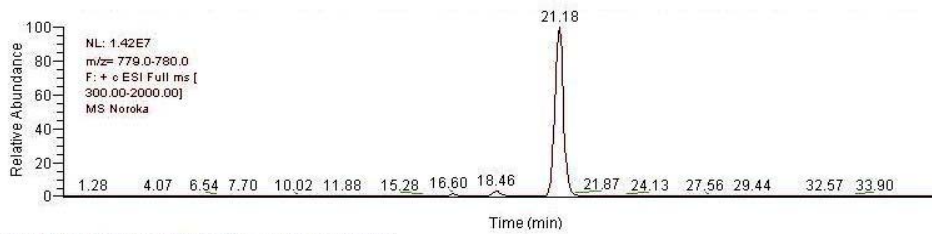
DTX6 #453-593 RT: 17.50-22.92 AV: 71 NL: 1.23E4
F: - c ESI Full ms [300.00-1500.00]



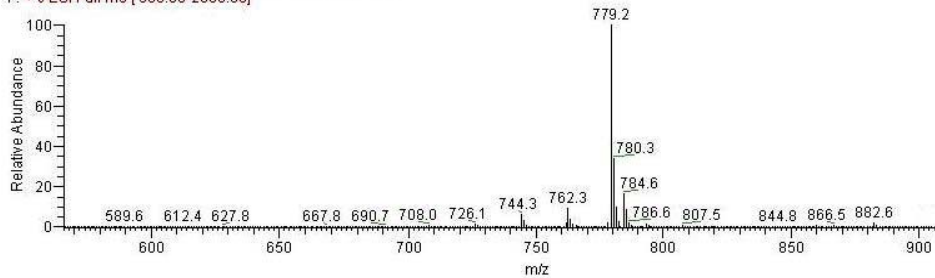
III.3.E.- LC-MS de Norokadanona (42)



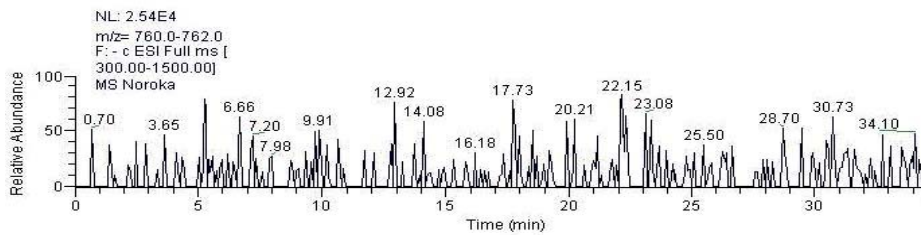
Modo positivo: $[M+Na]^+$ (PM: 766.4268)



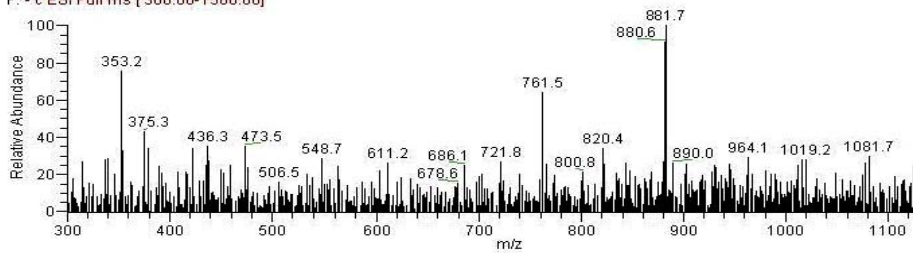
Noroka #531-558 RT: 20.56-21.56 AV: 14 NL: 5.54E6
 F: + c ESI Full ms [300.00-2000.00]



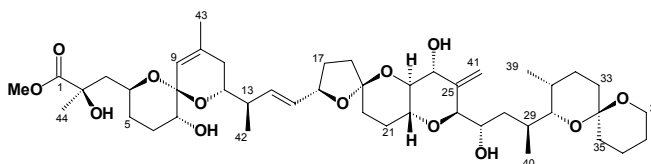
Modo negativo: (PM: 758.4605)



Noroka #566-579 RT: 21.92-22.38 AV: 7 NL: 1.67E4
 F: - c ESI Full ms [300.00-1500.00]



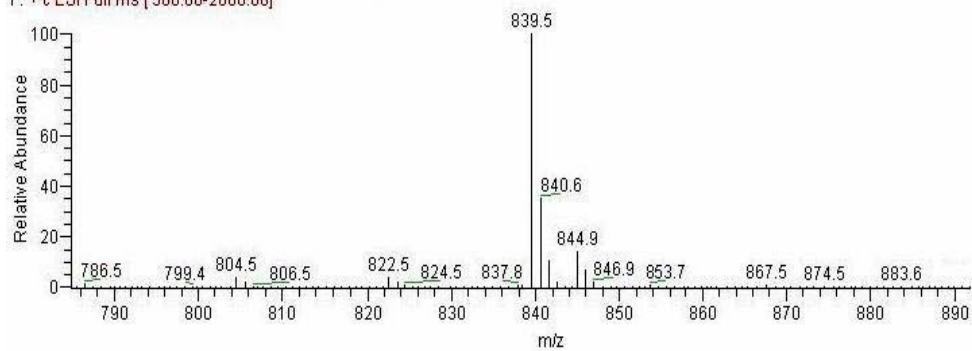
III.3.F.- LC-MS de Metil Okadaato (43)



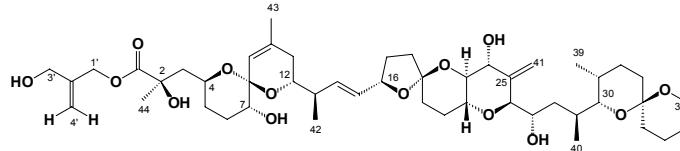
Modo positivo: $[M+Na]^+$ (PM: 840.4636)



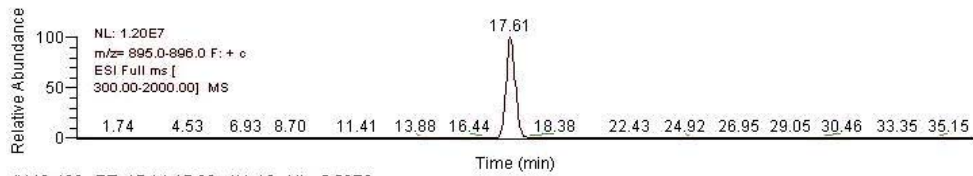
Me-OA #558-575 RT: 21.57-22.18 AV: 9 NL: 1.50E7
F: + c ESI Full ms [300.00-2000.00]



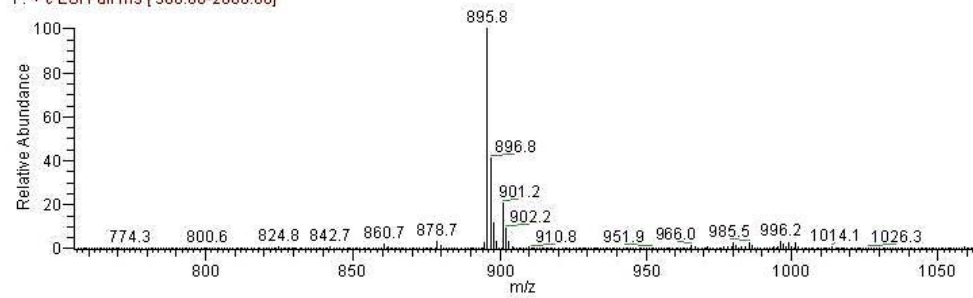
III.3.G.- LC-MS de 44



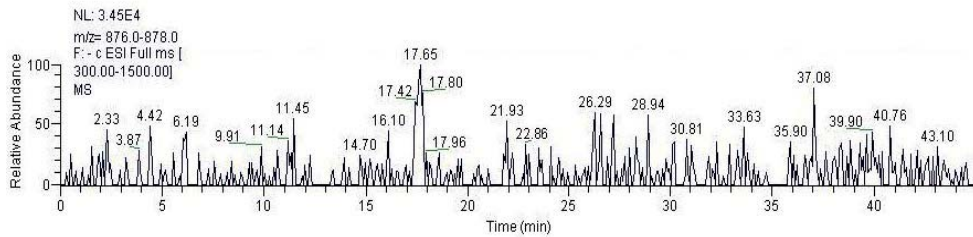
Modo positivo: $[M+Na]^+$ (PM: 896.4898)



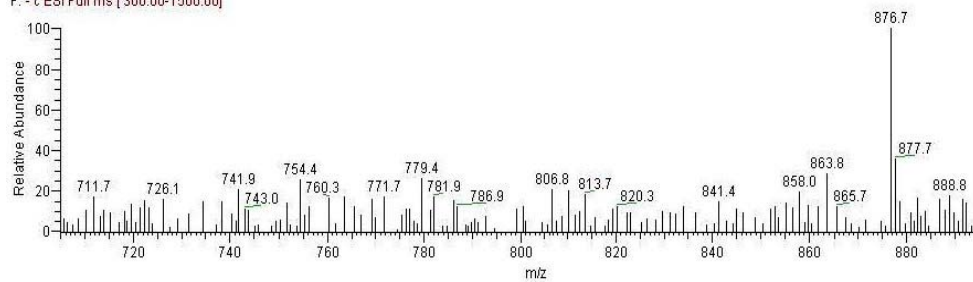
#443-466 RT: 17.14-17.99 AV: 12 NL: 5.58E6
F: + c ESI Full ms [300.00-2000.00]



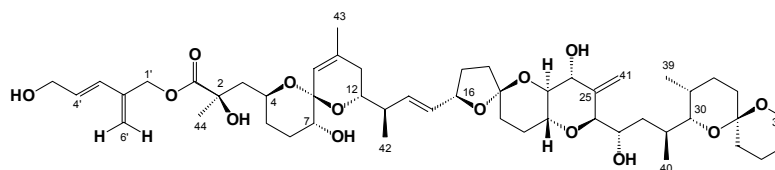
Modo negativo: (PM: 874.5079)



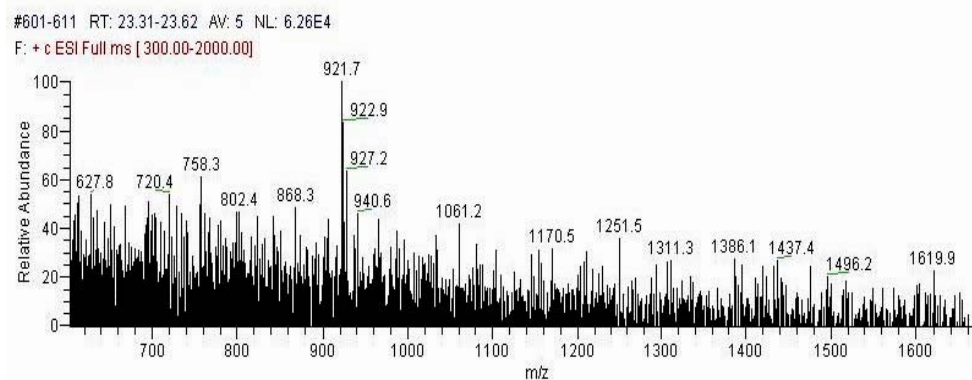
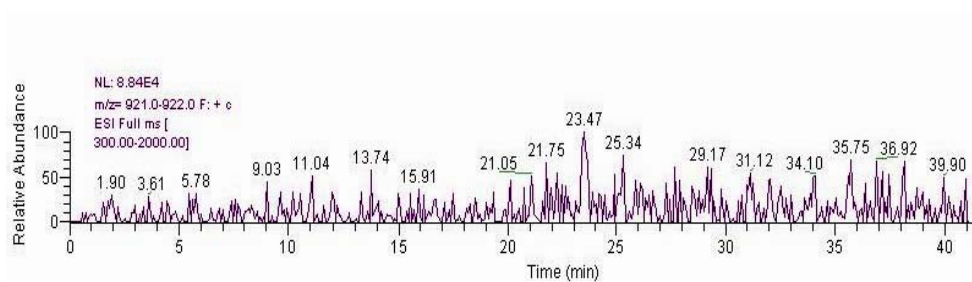
#446-463 RT: 17.26-17.88 AV: 9 NL: 1.38E4
F: - c ESI Full ms [300.00-1500.00]



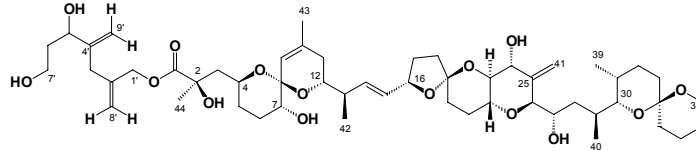
III.3.H.- LC-MS de 45



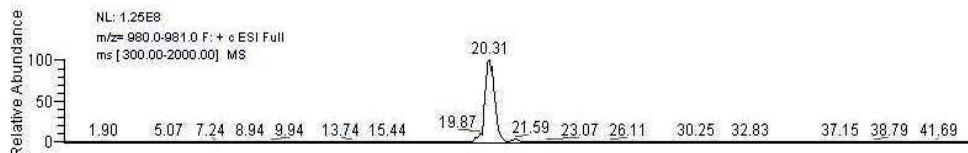
Modo positivo: $[M+Na]^+$ (PM: 922.5055)



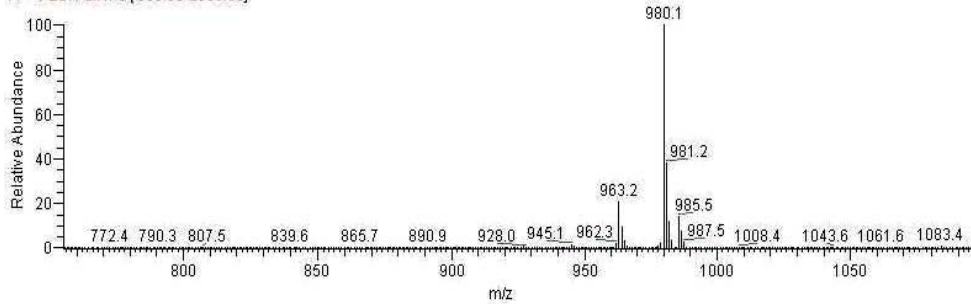
III.3.I.- LC-MS de 46



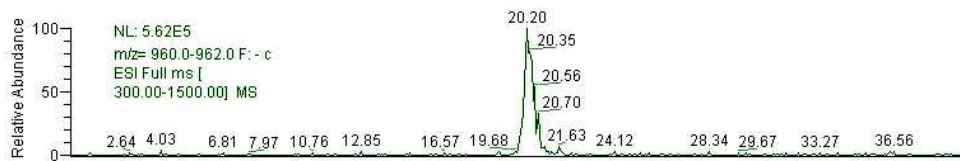
Modo positivo: $[M+Na]^+$ (PM: 980.5473)



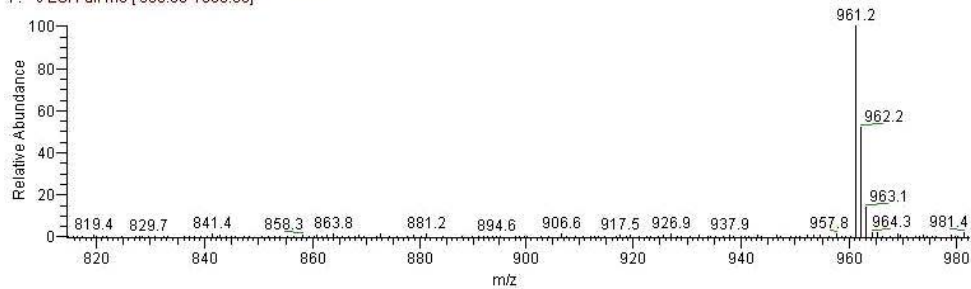
#508-545 RT: 19.64-20.97 AV: 19 NL: 4.99E7
F: + c ESI Full ms [300.00-2000.00]



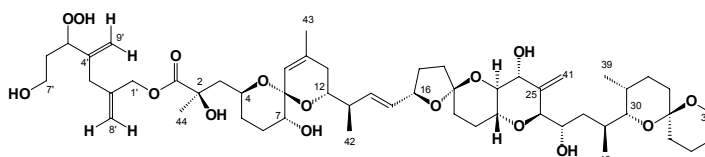
Modo negativo: (PM: 958.5654)



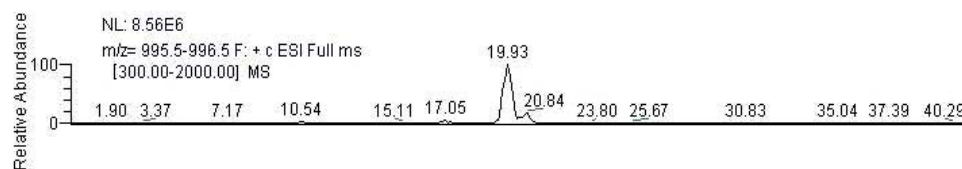
#506-541 RT: 19.61-20.85 AV: 18 NL: 2.06E5
F: - c ESI Full ms [300.00-1500.00]



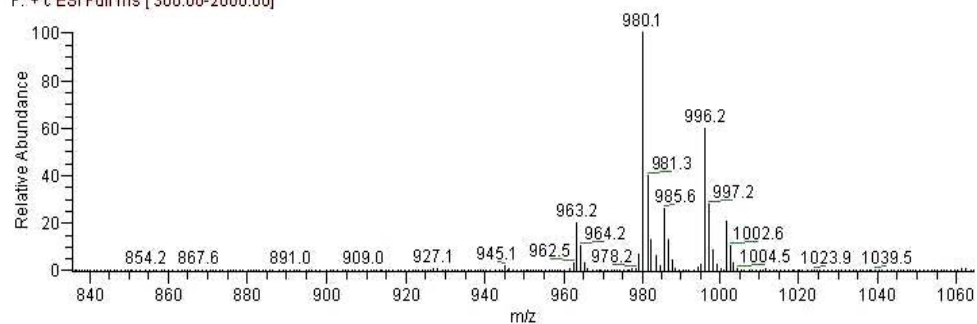
III.3.J.- LC-MS de 47



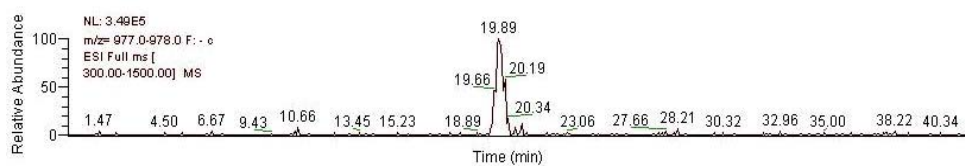
Modo positivo: $[M+Na]^+$ (PM: 996.5422)



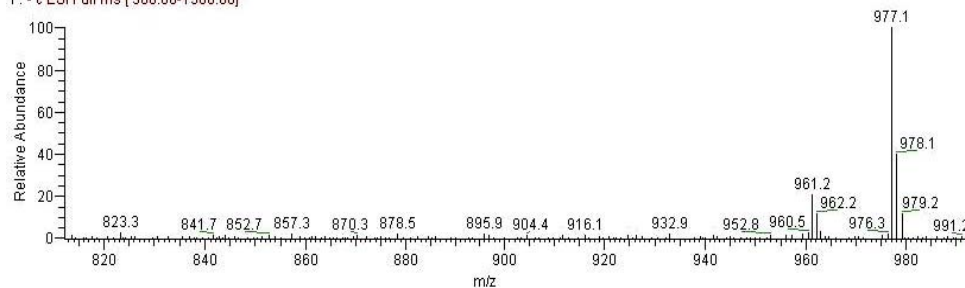
#505-525 RT: 19.54-20.22 AV: 10 NL: 8.82E6
F: + c ESI Full ms [300.00-2000.00]



Modo negativo: (PM: 974.5603)



#504-526 RT: 19.51-20.26 AV: 11 NL: 1.77E5
F: - c ESI Full ms [300.00-1500.00]



IV. ESTUDIOS ESTRUCTURALES SOBRE AO Y DTX1

IV.1.- ANTECEDENTES

IV.2.- ESTUDIOS ESTRUCTURALES DE DTX1

IV.2.A.- NOESY y ROESY de DTX1C

IV.2.B.- Estudios de difusión mediante gradientes de campo magnético

IV.2.C.- Medidas de los coeficientes de difusión

IV.2.D.- Determinación del estado de asociación

IV.3.- ESTUDIO ESTRUCTURAL DEL AO MEDIANTE RAYOS X

IV.- ESTUDIOS ESTRUCTURALES SOBRE AO Y DTX1

IV.1.- ANTECEDENTES

Cuando se aísla en nuestro laboratorio el AO (1) a partir de los cultivos del dinoflagelado marino *Prorocentrum lima*, éste aparece complejo (AOC) con un catión de potasio. Esto podía apreciarse mediante RMN, pues las muestras de AOC presentaban ligeras diferencias en los espectros de RMN ^1H cuando se comparaban con AO libre (Figura 4.1). La presencia del catión metálico fue confirmada por el hecho de que el tratamiento de las muestras de AOC con EDTA disódico permitía obtener AO libre.⁶³ Para determinar la naturaleza del catión se realizó un estudio sobre la capacidad de complejación del AO, preparando complejos del mismo con metales alcalinos y alcalinotérreos y se comprobó que el espectro de RMN ^1H del AO complejo con K^+ era superponible al del complejo obtenido de fuente natural.⁶⁴ Además, el tratamiento con distintos éteres corona demostró que sólo el éter 18/6, que posee una elevada preferencia para iones potasio, produjo la total descomplejación del AOC.

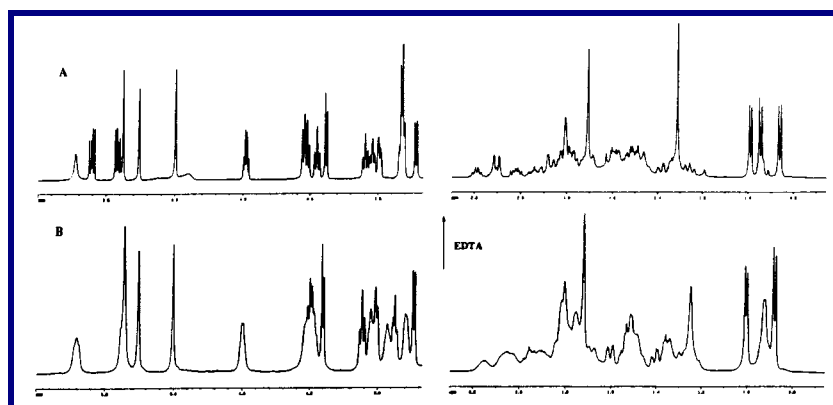


Figura 4.1.- Espectros de RMN ^1H (600 MHz) de AO (A) y de la forma complejada (B) en CDCl_3

⁶³ M. Norte, R. González, J. J. Fernández y M. Rico, *Tetrahedron*, **1991**, 47, 7437.

⁶⁴ M. Norte, J. J. Fernández, M. L. Souto, J. A. Gavín, M. L. Cadenas y P. Auxina, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, 8, 1007.

Estos resultados se completaron con ensayos farmacológicos en los que se midió la contracción muscular que produce este tipo de toxinas en fibras de músculo liso obtenido de útero de rata. Así, cuando se eliminaban del medio extracelular los iones Ca^{2+} o Na^+ , las muestras de AO y de AOC eran igualmente activas. Sin embargo, cuando el K^+ era eliminado, se observaba inactividad con el AO mientras que el AOC mantenía su efecto contráctil.⁶⁴

Una vez identificada la naturaleza del ion y debido a la importancia que parecía poseer en su actividad, se realizó un análisis estructural del AOC. Para ello se llevó a cabo un experimento NOESY (400 MHz a 25 °C) sobre el AOC en CDCl_3 , en el que apenas aparecieron correlaciones espaciales. A la vista de este resultado, se decidió hacer un experimento ROESY en las mismas condiciones, en el que sí fue posible observar señales de correlación. Este hecho sorprendió pues el NOESY del AO en esas condiciones no mostraba este comportamiento, y presentaba NOEs positivos, como era de esperar.

Para poder explicar los resultados anteriores, se recurrió a una de las diferencias existentes entre ambos experimentos. La intensidad y el signo de las señales de correlación dipolar en el experimento NOESY dependen de las distancias internucleares (r), del campo magnético aplicado (ω) y del tiempo de correlación (τ_c), de manera distinta a como lo hacen en el ROESY.

De esta forma para valores de $\omega\tau_c \ll 1$ (moléculas pequeñas) tanto en el ROESY como en el NOESY los picos de correlación cruzada (en adelante llamaremos a estos picos NOEs o ROEs) son de signo positivo. Por el contrario, si $\omega\tau_c \gg 1$ (macromoléculas) los NOEs alcanzan un valor negativo de intensidad máxima en el NOESY mientras en el ROESY mantienen el signo positivo. Ahora, para valores de $\omega_0\tau_c \approx 1.12$ el valor de la velocidad de relajación cruzada es igual a cero, por lo que no es posible medir los NOEs. Esta condición la cumplen aquellas moléculas cuyo peso molecular está comprendido entre 1 KDa y 2 KDa (**Figura 4.2**).

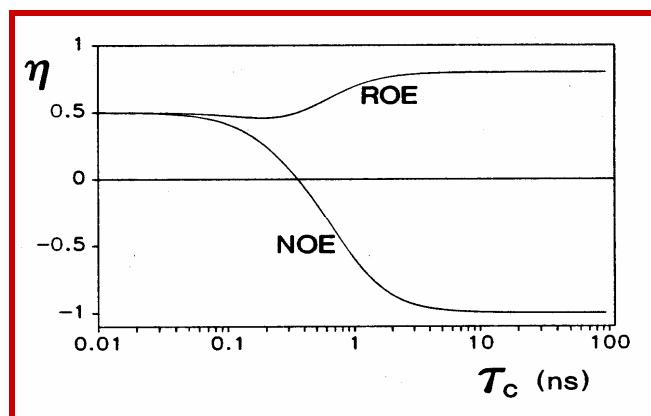


Figura 4.2.- Incremento del NOE (η) en función del tiempo de correlación (τ_c) para el NOESY y el ROESY. Ambas curvas están calculadas para una frecuencia del espectrómetro de 500 MHz y una distancia interprotónica de 2.0 Å

Para evitar que el NOE se anule pueden introducirse cambios en las condiciones experimentales, como variar la viscosidad o la temperatura del disolvente. Así, según estas consideraciones, se realizaron dos experimentos NOESY: el primero utilizando el mismo campo magnético (400 MHz) y variando la temperatura y el segundo trabajando a más alto campo (500 MHz). Como era de esperar, en ambos casos abandonamos la zona de NOEs nulos y se observó un mayor número de correlaciones.

En las condiciones experimentales que se usaron inicialmente para los experimentos NOESY del AOC, las intensidades de las señales que tenderían a anularse corresponderían a moléculas de masa aparente = 1500-1700. Por lo tanto, en el caso del AOC y teniendo en cuenta su peso molecular ($Pm_{AO}=804 + Pm_{K^+}=39$), la casi inexistencia de correlaciones espaciales nos indicaba que debíamos estar en presencia de una especie de ese entorno de peso.

Con el fin de confirmar esta hipótesis, se realizaron experimentos de RMN aprovechando los gradientes de campo magnético, mediante la medida de los *Coefficientes de Difusión (D)* (capítulo IV.3B). El resultado obtenido confirmó la existencia de un dímero para el AO, cuando se compleja con el ion potasio.⁶⁵

⁶⁵ A. H. Daranas, J. J. Fernández, E. Q. Morales, M. Norte y J. A. Gavín, *J. Med. Chem.*, **2004**, 47, 10.

IV.2.- ESTUDIOS ESTRUCTURALES DE DTX1

Una de las sustancias mayoritarias aisladas en nuestro estudio del cultivo artificial de *P. lima* (capítulo II) fue la DTX1 (2). Al realizar la purificación final por cromatografía de dicha toxina, se observó que el espectro de RMN ^1H en CDCl_3 de una de las fracciones resultantes (**Figura 4.3.A**) presentaba en general, una peor resolución y algunas señales desplazadas respecto al espectro de DTX1 aislada en otras ocasiones (**Figura 4.3.B**). Este hecho resultaba equivalente al observado entre el AO y el AOC (**Figura 4.1**), por lo que denominamos a esta fracción DTX1C.

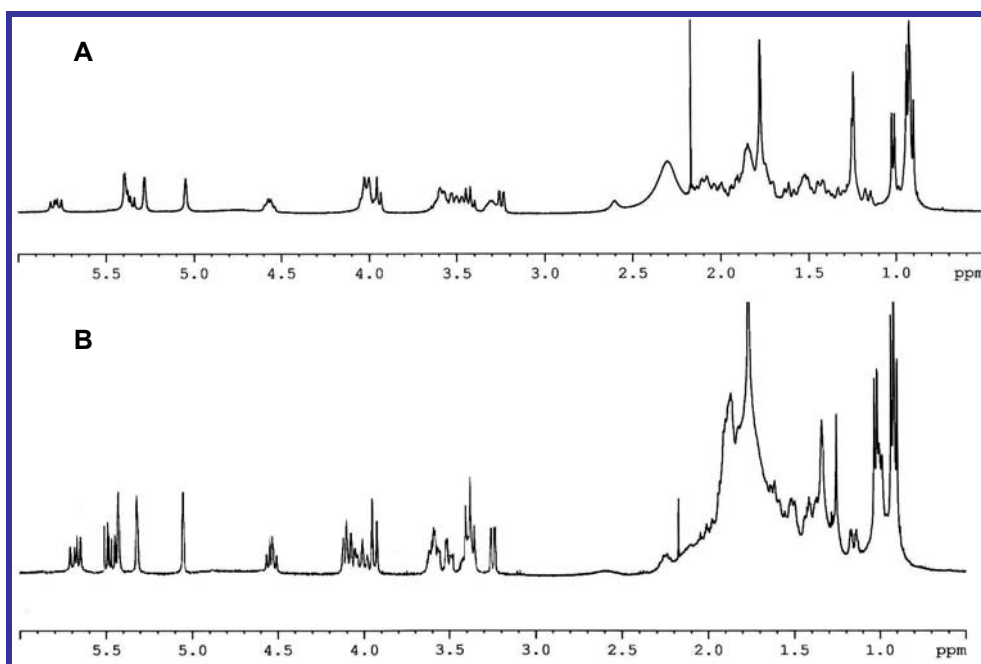


Figura 4.3.- Espectros RMN ^1H (400 MHz) de DTX1C (**A**) y DTX1 (**B**) en CDCl_3

IV.2.A.- NOESY y ROESY de DTX1C

Teniendo en cuenta los resultados observados con el AO, se recurrió a la realización de un experimento NOESY sobre la muestra de DTX1C bajo las mismas condiciones⁶⁵ (Figura 4.4).

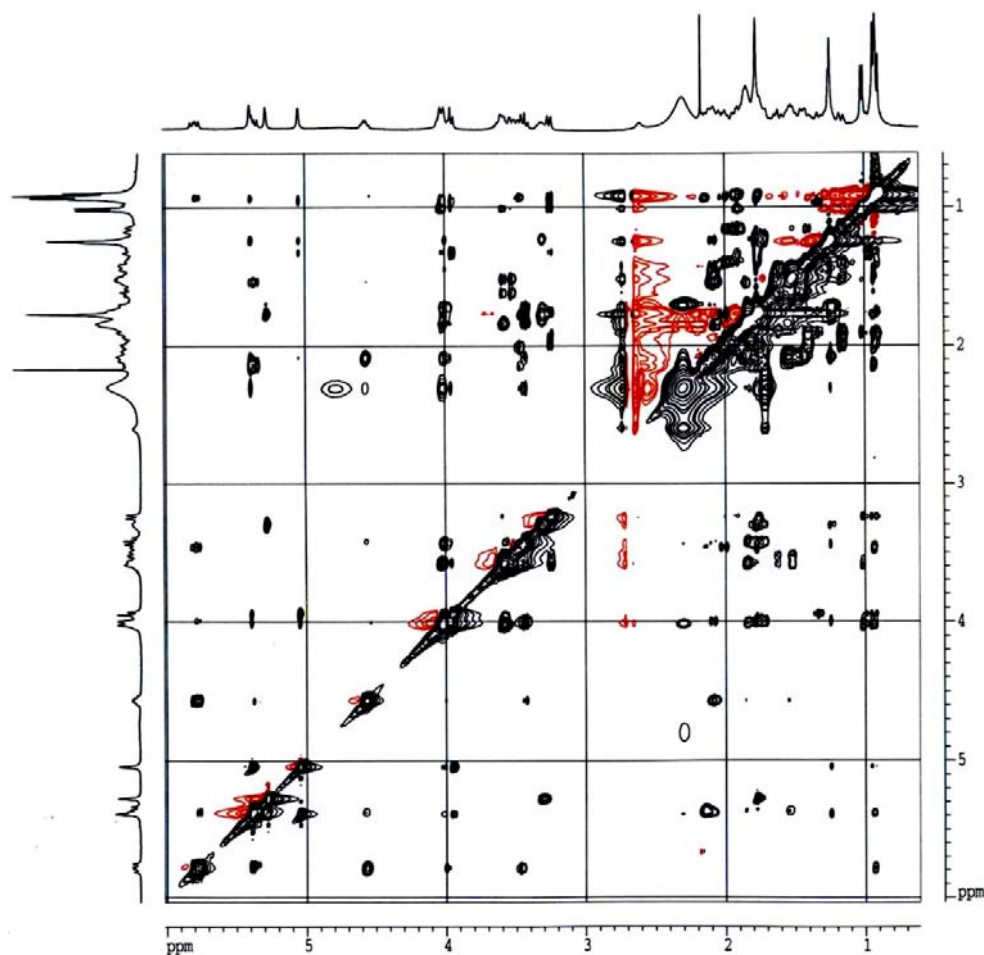


Figura 4.4.- NOESY (400 MHz) de DTX1C en CDCl_3 a 25 °C

Como resultado, no sólo aparecían muchas señales de correlación, sino que además eran del mismo signo que la diagonal, es decir, se había entrado en la zona de NOEs negativos. Dadas las condiciones en las que se llevó a cabo este

experimento parecían indicar que se trataba de una asociación de masa aparente superior a 2 KDa, lo que supone la existencia de un estado de agregación superior a 2 unidades de DTX1.

El experimento ROESY en esas condiciones nos ofrece un espectro muy similar al obtenido para el AOC, con todas las señales de signo positivo (**Figura 4.5**).

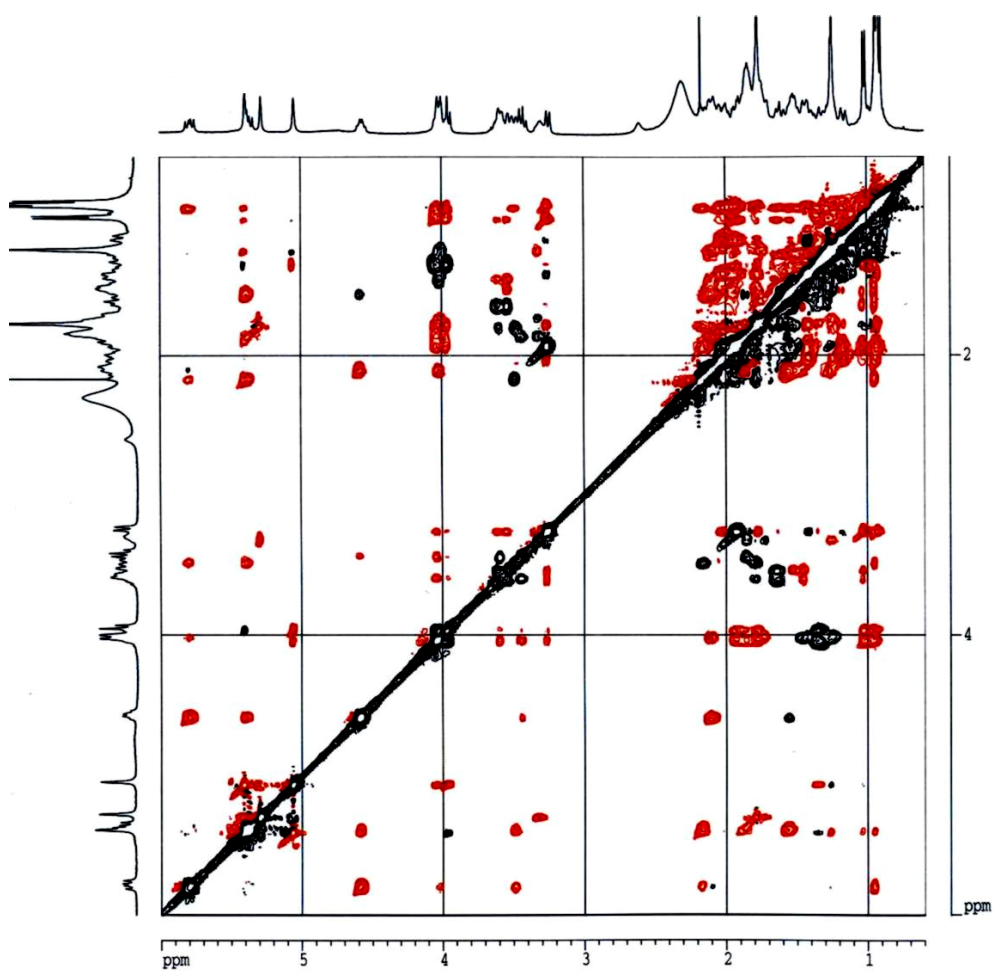


Figura 4.5.- ROESY (400 MHz) de DTX1C en CDCl_3 a 25 °C

A continuación, se realizó un experimento NOESY sobre la muestra de DTX1, observándose señales de correlación correspondientes a NOEs positivos (**Figura 4.6**). Por lo tanto, los resultados muestran el mismo comportamiento que para el AO y el AOC, con la excepción de que DTX1C debe formar un agregado de masa aparente mayor al observado para el AOC.

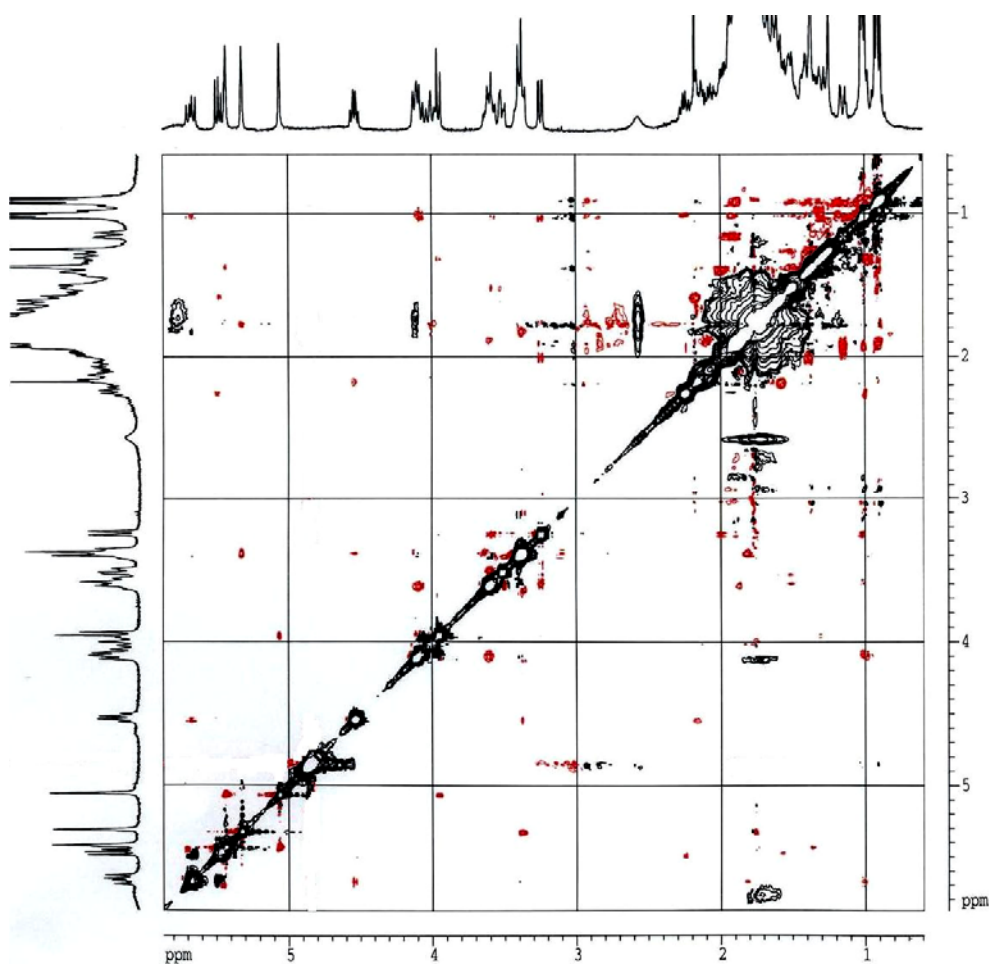


Figura 4.6.- NOESY (400 MHz) de DTX1 en CDCl_3 a 25 °C

IV.2.B.- Estudios de difusión mediante gradientes de campo magnético

Con el fin de confirmar la hipótesis sobre la posible agregación de la DTX1C, se realizaron experimentos de RMN empleando gradientes de campo magnético. Estos ofrecen la posibilidad de diseñar nuevos experimentos de RMN que permiten la obtención de información molecular de una manera diferente a la convencionalmente utilizada para estudios estructurales o dinámicos. En este caso, se trata de la medida de los *Coefficientes de Difusión (D)*⁶⁶ los cuales pueden ser aplicados a estudios de movimiento molecular, estados de agregación o separación espectral en función del tamaño molecular tanto en sistemas químicos como biológicos.

Estos se obtienen comparando la intensidad de una señal de interés en función de la intensidad de los gradientes aplicados en los experimentos de RMN. Se emplearon gradientes rectangulares, con lo que se aplicó la ecuación siguiente:

$$\ln (A / A_0) = - \gamma^2 g^2 \delta^2 (\Delta - \delta / 3) D$$

donde γ es la relación giromagnética (para el caso de $^1\text{H} = 26751 \text{ rad s}^{-1}$), g es la fuerza de los gradientes de difusión (por ejemplo, en nuestro caso alcanzan un

⁶⁶ Esta metodología se basa en la medida de la *autodifusión* que es el movimiento translacional aleatorio de las moléculas (o iones) debido a su propia energía cinética interna. La *difusión translacional* es el mecanismo fundamental de transporte y el responsable de todas las reacciones químicas, ya que las especies reaccionantes deben colisionar antes de reaccionar. La difusión está directamente relacionada con el tamaño de las moléculas, tal y como puede deducirse a partir de la ecuación de Stokes-Einstein,

$$D = kT / f \quad (\text{Ec. de Stokes-Einstein})$$

donde k es la constante de Boltzmann, T es la temperatura y f es el coeficiente de fricción. Para el caso más simple de una partícula esférica con un radio hidrodinámico r_s en una disolución con una viscosidad η , el coeficiente de fricción viene dado por la siguiente expresión:

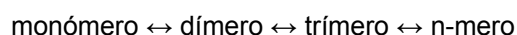
$$f = 6\pi\eta r_s$$

Como generalmente, la forma de las moléculas es más complicada y puede incluir contribuciones de factores tales como la hidratación, la difusión también nos dará información acerca de las interacciones y de la forma de la molécula.

valor máximo de 53.5 G cm^{-1}), D es el coeficiente de difusión de los espines observados ($\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$), δ es la duración total de los gradientes que actúan como desfase (s) y Δ es la separación (s) entre los inicios de los procesos de desfase y de reenfoque provocado por los gradientes. Asimismo, A y A_0 son las intensidades de la señal de interés para las diferentes intensidades de gradiente aplicados y para una intensidad igual a cero, respectivamente.

Hay que señalar que, como en el caso del AO se habían observado una serie de fenómenos de convección debidos a la viscosidad del disolvente empleado, para evitar dichos contratiempos, nuestros experimentos se realizaron a una temperatura constante de $15 \text{ }^\circ\text{C}$.

A todo esto hay que añadir que el fenómeno de agregación es un hecho complejo que puede implicar distintos estados de asociación en equilibrio:



Y por tanto, en cada caso, el valor de D sería:

$$D = x_m D_m + x_d D_d + x_t D_t + x_n D_n$$

donde x_m , x_d , x_t , y x_n serían las fracciones molares correspondientes al monómero, dímero, trímero y n-mero respectivamente, y D_m , D_d , D_t , y D_n sus coeficientes de difusión respectivos.

IV.2.C.- Medidas de los coeficientes de difusión

En la **Figura 4.7** se resumen los resultados de las mediciones hechas. La pendiente de cada una de las rectas de regresión calculadas nos da el valor de D de la molécula. Para DTX1 este valor fue de $5.34 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$, mientras que para DTX1C el valor obtenido fue de $3.04 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$.

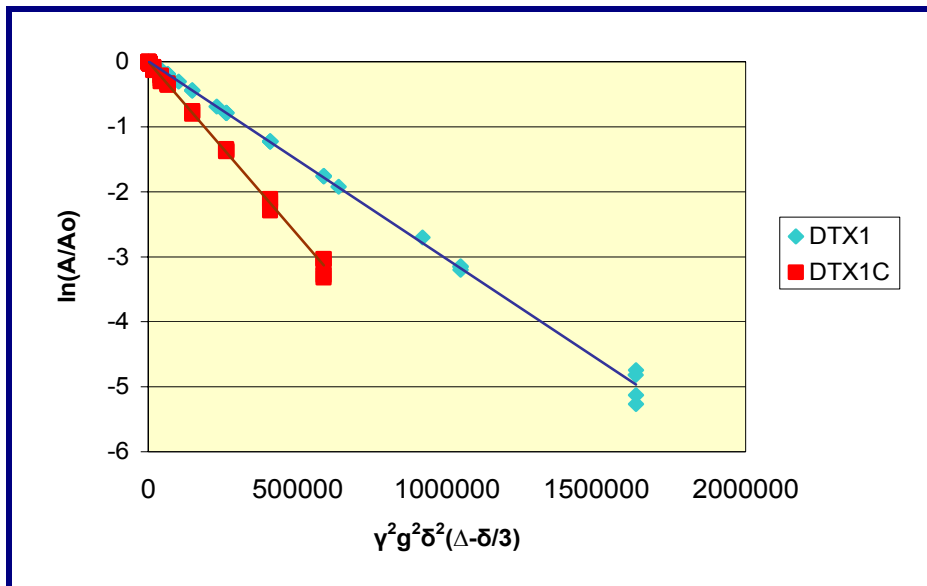


Figura 4.7.- Representación de las medidas tomadas en los experimentos de difusión de DTX1 y DTX1C en CDCl_3

IV.2.D.- Determinación del estado de asociación

La ecuación de Stokes-Einstein,⁶⁷ puede ser usada para relacionar el valor de D con el radio molecular r , que a su vez se considera proporcional a la masa molecular aparente M_{ap} . Considerando una molécula esférica, r es proporcional a $M_{ap}^{1/3}$. Así, si comparamos el *Coefficiente de Difusión* para dos moléculas con una forma esférica similar y en las mismas condiciones experimentales:

$$D_1 / D_2 = (M_{2ap} / M_{1ap})^{1/3} \quad (\text{Ec. de Stokes-Einstein})$$

⁶⁷ C. R. Cantor y P.R. Schimmel, *Biophysical Chemistry, Part II: Techniques for the Study of Biological Structure and Function*, 1980, W. H. Freeman, NY, 539.

Por lo tanto, el coeficiente de difusión de una sustancia de peso molecular conocido puede ser utilizado como un estándar para evaluar el peso molecular aparente de otra, así como los posibles estados de agregación, etc.

En nuestro caso particular:

$$(D_{\text{DTX1}} / D_{\text{DTX1C}})^3 = M_{\text{DTX1C}} / M_{\text{DTX1}} = 5.27$$

Esta relación explica los resultados obtenidos en el experimento NOESY, que suponían un estado de agregación elevado.

Teniendo en cuenta que este estado depende, entre otros factores, de la concentración de la muestra estudiada, realizamos sucesivas diluciones, midiendo en cada caso el coeficiente de difusión (**Tabla 4.1**).

	Concentración			Concentración
	D ($\times 10^{-6}$ cm ² /s)	DTX1C-n/DTX1C-1	$M_{\text{DTX1C}}/M_{\text{DTX1}}$	(mM)
DTX1	-5.29	-	-	5
DTX1C-1	-3.04	1	5.27	12
DTX1C-2	-3.11	1/2	4.91	6
DTX1C-3	-3.06	1/5	5.18	2.4
DTX1C-4	-3.71	1/20	2.92	0.6
DTX1C-5	-4.20	1/40	2.00	0.3
DTX1C-6	-4.89	1/80	1.26	0.15

Tabla 4.1.- Resumen de los resultados obtenidos en el estudio estructural de DTX1C, mediante la medición de los coeficientes de difusión

La baja concentración de la muestra final (0.15 mM) desaconsejó seguir diluyéndola, dada la mala calidad de los espectros obtenidos. En la **Figura 4.8** aparece el espectro de RMN ¹H de dicha muestra. En el experimento NOESY de esta última dilución no aparecían señales de correlación, lo cual podía ser debido a la baja concentración señalada.

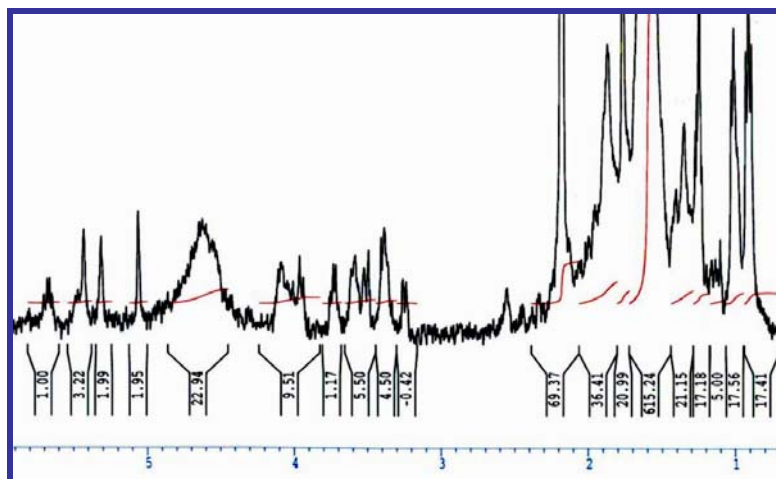


Figura 4.8.- Espectro de RMN ^1H de DTX1C diluida al 1/80

Para mejorar la sensibilidad y resolución de los experimentos, realizamos una serie de ellos en un espectrómetro de 600 MHz. El experimento NOESY de esta última muestra diluida, nos ofreció un espectro con ausencia de señales de correlación (**Figura 4.9**). Para comprobar que este resultado no era consecuencia de una concentración demasiado baja, se realizó un experimento ROESY (**Figura 4.10**), donde sí observamos señales de correlación. Hay que tener en cuenta que en estos experimentos hemos aumentado la intensidad del campo magnético, entrando en la zona de NOEs nulos.

Con el análisis de estos datos, parece que DTX1C es una mezcla de distintos estados de asociación. Las medidas de los coeficientes de difusión nos dan una idea de la media en el momento de la toma de datos. El cálculo matemático de cuál sería realmente la especie agregada predominante, se dificulta en gran medida ya que debemos considerar una serie de variables de las que no disponemos. En cuanto a si DTX1C está realmente complejada, o simplemente se trata de una especie altamente agregada, debemos acudir a experimentos similares a los llevados a cabo con el AOC para poder responder a esta pregunta.

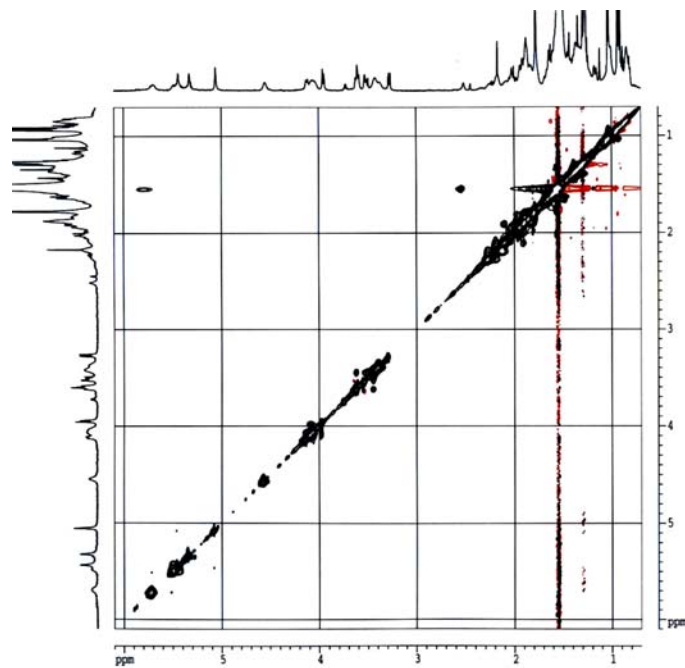


Figura 4.9.- NOESY (600 MHz) de DTX1C diluida al 1/80

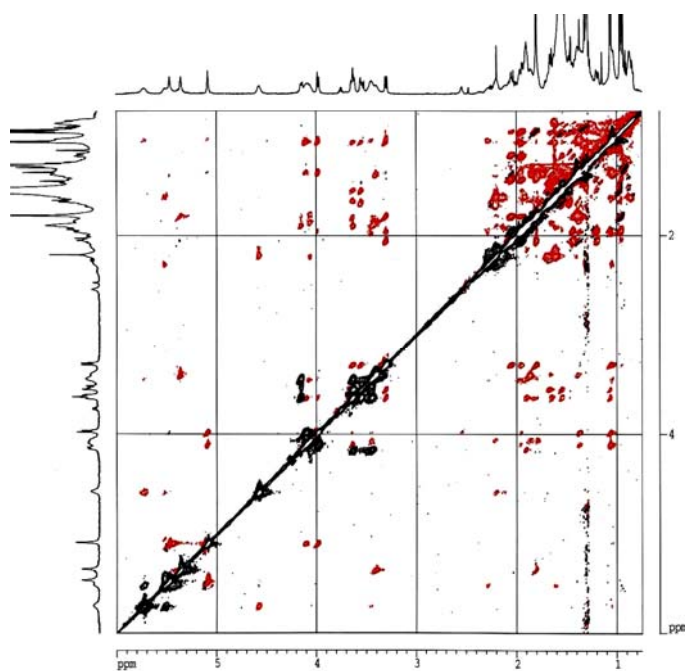


Figura 4.10.- ROESY (600 MHz) de DTX1C diluida al 1/80

IV.3.- ESTUDIO ESTRUCTURAL DEL AO MEDIANTE RAYOS X

Con el fin de continuar la investigación sobre la complejación del AO y poder de esta manera conocer algo más sobre su modo de acción, se recurrió a los 80 mg de AO obtenidos del cultivo artificial de *P. lima*, cantidad suficiente para el desarrollo de estos experimentos. Aún siguiendo el mismo protocolo de cultivo, recolección, extracción y cromatografía, llevados a cabo en nuestro laboratorio en estudios anteriores, las nuevas muestras de AO presentaron espectros de RMN ^1H idénticos a los observados para el AO libre, y no para el complejado.

Uno de los principales objetivos era la obtención de un cristal de AO donde se pudiese confirmar la estructura del AO complejado con su catión K^+ . Pero tras varios intentos de cristalización, con el AO solo y en presencia de sales de potasio, el cristal resultante no presentaba catión alguno.

Se realizaron entonces experimentos con el fin de complejar AO con Ag^+ , un catión que, por su posición en la tabla periódica, es el más afín al K^+ en tamaño, y por tanto sería, tras éste, el más adecuado para llenar la cavidad flexible que forma el AO. Se siguió el siguiente protocolo, que había sido empleado anteriormente con la monensina.⁶⁸

El AO se disuelve en la mínima cantidad de EtOH al 50%. Se tritúa con NaOH hasta alcanzar un pH = 8, y se deja cristalizar. Los cristales así obtenidos se redisuelven en EtOH al 50% y se tratan con un 10% de exceso de AgNO_3 . La cristalización debe permanecer a oscuras con el fin de evitar el ennegrecimiento consecuencia de la elevada sensibilidad del AgNO_3 a la luz. Como último paso, el balón de reacción se mantiene en atmósfera inerte con gas argón, para facilitar la cristalización. Se deja cristalizar durante aproximadamente dos semanas, hasta que los cristales alcancen un tamaño adecuado para poder ser medidos por rayos X.

⁶⁸ M. Pinkerton y L. K. Steinrauf, *J. Mol. Biol.*, **1970**, 49, 533.

Tras este periodo de tiempo, se separó uno de los monocristales así obtenidos, y fue medido por rayos X (**Figura 4.11**). Como podemos observar en esta figura, el AO no aparece complejo con el catión K^+ .

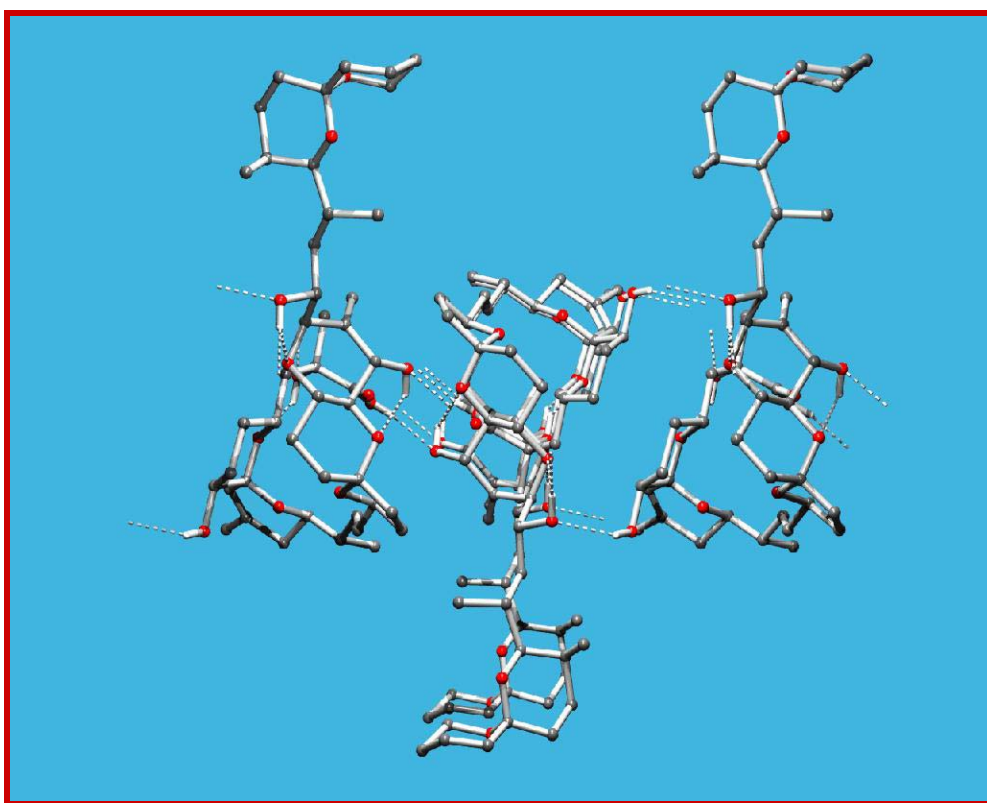


Figura 4.11.- Estructura de un monocristal de AO medido por rayos X

Hasta este momento, habían sido dos los estudios de difracción de rayos X realizados con el ácido okadaico: el primero de ellos fue en el año 1981 sobre el *o*-bromobenzil okadaato, mediante el cual se pudo determinar su estructura, y en segundo lugar, el realizado sobre el complejo AO-PP1.¹² De esta manera, el presente trabajo es el primero que se lleva a cabo con este políéter sin derivatizar ni complejar. En dicho estudio podemos observar que la disposición espacial que

adoptan las moléculas en la red cristalina es muy semejante a la propuesta en el modelo de complejo de AO con K^+ .⁶⁵ Las moléculas se encuentran enfrentadas por las cavidades que forman los fragmentos C-1→C-26, mientras que las cadenas carbonadas C-27→C-38 se extienden en el espacio en sentido contrario, al igual que en el modelo descrito. El otro aspecto a destacar es la complejidad de la red cristalina, ya que cada molécula se halla unida mediante puentes de hidrógeno a otras cinco unidades de AO. De entre todos ellos el más significativo es el formado entre el grupo carboxilo y el grupo hidroxilo presente en C-24; si bien en disolución se supone que éste es un enlace intramolecular, responsable de la forma de “bastón” que adopta la molécula, en el caso del estado sólido, se trata de un puente intermolecular que mantiene unidas las dos cavidades enfrentadas.

La descripción detallada de esta ordenación espacial nos ha servido de base en el desarrollo del estudio estructural de DTX1, cuyos primeros resultados han sido descritos en el capítulo anterior.

V. PARTE EXPERIMENTAL

V.1.- TÉCNICAS EXPERIMENTALES GENERALES

- V.1.A.- Resonancia magnética nuclear
- V.1.B.- Infrarrojo
- V.1.C.- Rotación óptica
- V.1.D.- Masas
- V.1.E.- LC-MS
- V.1.F.- Difracción de rayos X
- V.1.G.- Cromatografía de gel-filtración
- V.1.H.- Cromatografía en columna
- V.1.I.- Cromatografía HPLC
- V.1.J.- Cromatografía en capa fina
- V.1.K.- Filtración y esterilización de material y medios de cultivo
- V.1.L.- Recolección por centrifugación

V.2.- ESTUDIO DEL DINOFLAGELADO *PROROCENTRUM LIMA*

- V.2.A.- Condiciones de cultivo
- V.2.B.- Recolección y extracción
- V.2.C.- Marcha cromatográfica del extracto y datos físicos de los compuestos

V.3.- ESTUDIOS DE DIFUSIÓN

- V.3.A.- Calibración de la fuerza de los gradientes
- V.3.B.- Adquisición de los datos
- V.3.C.- Procesado de los datos

V.4.- ESTUDIOS ESTRUCTURALES DEL AO

V.- PARTE EXPERIMENTAL

V.1.- TÉCNICAS EXPERIMENTALES GENERALES

V.1.A.- Resonancia magnética nuclear

Para la realización de los experimentos de RMN, los productos fueron disueltos en CDCl_3 , usando TMS como referencia interna. Dichos espectros, tanto de ^1H como de ^{13}C , fueron realizados en espectrómetros BRUKER®, AVANCE 300, 400 (**Figura 5.1**) y AMX 500 MHz según las necesidades. Se utilizaron los programas ^1H , ^{13}C , COSY, TOCSY-1D, HMBC, HSQC y ROESY, que fueron suministrados por la casa BRUKER®. Los datos de adquisición obtenidos en el espectrómetro fueron procesados usando el programa XWIN-NMR.



Figura 5.1.- Espectrómetro BRUKER®, AVANCE 400 MHz

V.1.B.- Infrarrojo

Los espectros de IR fueron realizados usando el producto seco en células de NaCl de 4 mm. Se utilizó un espectrofotómetro BRUKER®, modelo IFS 55 (F.T.I.R.).

V.1.C.- Rotación óptica

Las determinaciones de las actividades ópticas se realizaron en un polarímetro PERKIN-ELMER®, modelo 241, a 25 °C, usando la línea D del sodio y en cloroformo seco, usando células de 1 mL.

V.1.D.- Masas

Los espectros de masas de baja y alta resolución fueron realizados en un espectrómetro VG-Autospec FISIONS® (**Figura 5.2**).



Figura 5.2.- Espectrómetro VG-Autospec FISIONS

FAB (Bombardeo con Átomos Acelerados): Se utilizó el mismo espectrómetro de masas, donde las muestras se introdujeron mediante sonda de sólidos calentada de 30 a 280 °C. La temperatura de la fuente de ionización se fijó entre 150-250 °C según la experiencia realizada. Como gas se usó xenón. Como matriz se empleó nitrobenzol (NBA) que se salinizó con NaI.

V.1.E.- LC-MS

Se utilizó una columna Phenomenex, Synergi 4 μ MAX-RP 80A (150 x 2 mm) para la cromatografía, empleando como fase móvil, un gradiente tal que:

min	% Acetato amónico 2 mM	
	pH 5.8	% MeOH
0	30	70
8	30	70
30	20	80
35	20	80
45	30	70

Se mantuvo un flujo constante de 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ y la temperatura de la columna fue de 30 $^{\circ}\text{C}$.

En cuanto a las condiciones de los espectros de masas (LCQ[®] Advantage):

Flujo N_2 : 40 $\mu\text{L}/\text{min}$

Flujo gas auxiliar: 20 $\mu\text{L}/\text{min}$

Voltage spray: 5.5 Kv

Temperatura del capilar: 200 $^{\circ}\text{C}$

2 scan events: modo positivo y negativo. Full MS (300-2000).

V.1.F.- Difracción de rayos X

La medición de los cristales se llevó a cabo con un Difractómetro ENRAF-NONIUS[®] Cad 4 / Mach 3 (**Figura 5.3**), para muestras Monocristalinas. Geometría Kappa. Ánodo de molibdeno.



Figura 5.3.- Difractómetro de rayos X

V.1.G.- Cromatografía de gel-filtración

Para este tipo de cromatografía se usó como soporte Sephadex LH-20, de PHARMACIA FINE CHEMICALS®, y las columnas se montaron siguiendo las instrucciones del fabricante. La mezcla de eluyente utilizada fue cloroformo:metanol:n-hexano (25:25:50).

Se usó una columna de 80 cm de longitud, como se muestra en la **Figura 5.4**.

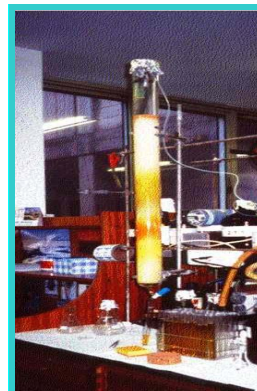


Figura 5.4

V.1.H.- Cromatografía en columna

Las cromatografías de los productos se llevaron a cabo en columnas preempaquetadas LOBAR® GRÖBE B (310-25) LICHROPREP RP-18 (40-63 μm) de la casa MERCK® y bombas de media presión de la casa FLUID METERING®, modelo RP-SY.

V.1.I.- Cromatografía HPLC

En este tipo de cromatografía se utilizó un sistema de HPLC compuesto por una bomba HPLC de LKB® (Mod. 2248) con columnas μ -Bondapak C-18 (D.I. 1.9 cm, longitud 15 cm) para la cromatografía en fase reversa y un detector de fotodiodo 2MD RAPID SPECTRAL, LKB®.

Las cromatografías en gradiente fueron realizadas en un HPLC SHIMADZU®, compuesto por dos bombas LC-7A con mezclador de alta presión, un controlador de gradientes SCL-6B, un detector de fotodiodos modelo SPD-M6A y una columna μ -Bondapak C-18 (D.I. 1.9 cm, longitud 15 cm).

V.1.J.- Cromatografía en capa fina

La evolución de las cromatografías en columna se siguió mediante cromatografía en capa fina con placas de la casa MERCK®, tipo TLC AL, sílica gel 60 F₂₅₄. Las placas fueron siempre eluidas en un sistema formado por la mezcla benceno:acetona:metanol:ácido acético 6N (150:80:19:1).

Para el revelado se pulverizó sobre la placa una disolución al 10% de ácido fosfomolibdico en etanol y posterior calentamiento a 140 °C.

V.1.K.- Filtración y esterilización de material y medios de cultivo

Para la esterilización de agua de mar diluida al 5%, ésta se bombea, utilizando una bomba peristáltica MASTERFLEX® modelo 7521-25, a través de un sistema de filtros de 1 µm, 0.45 µm y 0.22 µm de la marca GELMANS®. Cuando los volúmenes de agua son muy grandes, la filtración esterilizante (0.22 µm) no se lleva a cabo y, en su lugar, se añade lejía comercial al agua de mar, con una posterior neutralización con tiosulfato.

La esterilización de pequeños volúmenes de agua, de las disoluciones stock de nutrientes y de precursores enriquecidos fueron realizadas con filtros NALGENE® de membrana de nylon (0.22 µm) y almacenadas en botellas de poliestireno de 0.5 L COSTAR®.

Para la realización de los cultivos se intentó usar, en la medida de lo posible, material desechable. Cuando esto no fue posible, se sometió a esterilización en autoclave PENTA® a 120 °C durante 30 minutos.

V.1.L.- Recolección por centrifugación

En la recolección de las células se utilizó una centrífuga SORVAL® RC-5B. Todo el proceso se realiza entre 5 °C y 10 °C.

V.2.- ESTUDIO DEL DINOFLAGELADO *PROROCENTRUM LIMA*

V.2.A.- Condiciones de cultivo

Las condiciones idóneas para el cultivo a gran escala del *Prorocentrum lima* fueron establecidas de la forma siguiente:

a) Medio de cultivo

El medio de cultivo empleado fue el *Medio K* descrito por Guillard,⁶⁹ aunque también se cultiva en otros medios como el L1 y el F2. Como soporte para el medio de cultivo, se utiliza agua de mar con un 5% de agua destilada, para evitar que la concentración osmótica aumente demasiado cuando son añadidas las sales minerales y vitaminas que constituyen los nutrientes. Ésta es bombeada a través de un sistema de filtros con una bomba peristáltica con el fin de eliminar toda la materia en suspensión.

Las *disoluciones stock* de *nutrientes*, fueron preparadas disolviendo la cantidad de producto requerida en el 80-90% del volumen final de agua destilada. A continuación, fueron sometidos a agitación o calentamiento en los casos necesarios hasta conseguir la disolución total, para finalmente, añadir agua hasta ajustar al volumen final. Las *disoluciones stock* fueron siempre esterilizadas por filtración a 0.22 μm y, posteriormente, almacenadas en el refrigerador. Las vitaminas deben prepararse antes de cada uso, si bien su almacenamiento en el congelador a -20 °C da buenos resultados.

La naturaleza y concentraciones molares de las soluciones *stock* de nutrientes para la preparación del medio Guillard K se dan en la **Tabla 5.1** y se preparan de tal forma que, tomando 1 mL de solución de nutrientes por litro de medio de cultivo, resulte la concentración deseada.

⁶⁹ R.R.L Guillard, M. Keller, *Dinoflagellates*, Spector, D.L. Ed., Academic Press, New York, 1984.

Compuestos	Concentración (M)	g/L agua destilada
1.- NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	1 x 10 ⁻⁵	1.38
2.- Tris (pH=7.3)	1 x 10 ⁻³	121.14
3.- Minerales		
NO ₃ Na	8.83 x 10 ⁻⁴	75.05
CiNH ₄	5 x 10 ⁻⁵	2.68
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	9 x 10 ⁻⁵	33.6
FeEDTA	1.46 x 10 ⁻⁵	4.3
MnCl ₂ .4H ₂ O	9 x 10 ⁻⁷	0.18
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8 x 10 ⁻⁸	0.02
CoCl ₂ .6H ₂ O	5 x 10 ⁻⁸	0.01
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	3 x 10 ⁻⁸	7 x 10 ⁻³
CuSO ₄ .5H ₂ O	1 x 10 ⁻⁸	2.5 x 10 ⁻³
H ₂ SeO ₃	1 x 10 ⁻⁸	1.3 x 10 ⁻³
4.- Vitaminas		
Tiamina CiH	3 x 10 ⁻⁷	0.1
Biotina	2.1 x 10 ⁻⁹	5.1305 x 10 ⁻⁴
Vitamina B ₁₂	3.7 x 10 ⁻¹⁰	5.0149 x 10 ⁻⁴

Tabla 5.1.- Medio Guillard K.

b) Temperatura óptima de crecimiento

La temperatura idónea de la cámara de cultivos se estableció en 23 °C. Las razones fueron las siguientes: se observó que por debajo de 17 °C el cultivo era notoriamente más lento en su primera fase y que, por encima de 25 °C, las células morían o se enquistaban rápidamente. Además, el crecimiento del cultivo es ligeramente más rápido en una primera fase a 23 °C, aunque cuando son mantenidos durante períodos de tiempo grandes, se alcanza una fase estacionaria, manteniéndose constante la cantidad de cél/mL. Esto es lógico porque cuantas más células hay, más se favorece la reproducción sexual del dinoflagelado, disminuyendo la reproducción vegetativa por escisión, que es la más frecuente cuando el número de cél/mL es muy pequeño.

c) Aireación

En ninguno de los niveles es necesario un aporte extra ya que la cámara de aire que queda en cada recipiente es suficiente para un buen crecimiento.

d) Fotoperíodo

Se utilizó un fotoperíodo de 18:6 horas de luz/oscuridad para conseguir un crecimiento óptimo del cultivo.

e) Intensidad lumínica

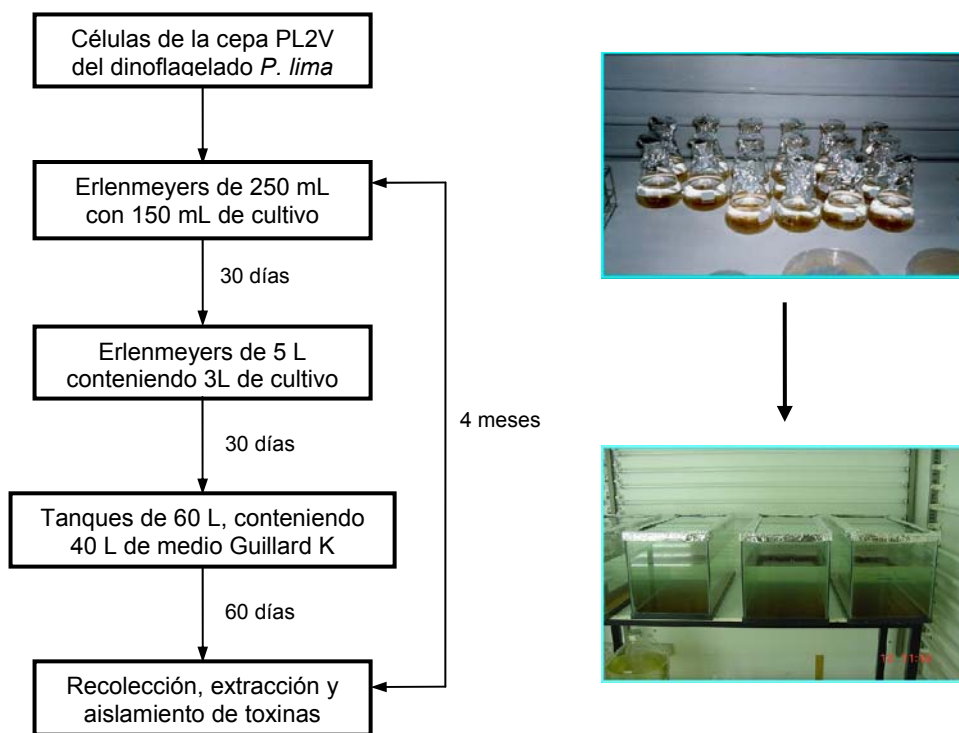
Los mejores resultados se obtuvieron cultivando bajo luz suministrada por tubos fluorescentes de neón, con una intensidad lumínica equivalente al 10% de la existente en la superficie del agua a pleno sol (unos $160 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-2}$). En los casos en los que la intensidad de luz fue superior, se observó una despigmentación progresiva de los microorganismos.

f) Ciclo de cultivo

La primera etapa para realizar los cultivos a gran escala, consiste en poder disponer de una batería de erlenmeyers de 250 mL con 150 mL de medio de cultivo. Transcurridos 30 días desde la inoculación, tiempo en el que el cultivo estabiliza su crecimiento, estos son trasvasados a recipientes de 5 L que contienen 3 L de medio. Una vez concluida esta etapa, que dura también cuatro semanas, comienza el último estadio del cultivo, de sesenta días de duración, en tanques de vidrio de 60 L conteniendo 40 L de medio. Como norma general, el paso de una etapa a otra se hacía tomando tres recipientes del nivel inferior como inóculo en un recipiente de volumen superior conteniendo aproximadamente $2/3$ de medio de cultivo y dejando $1/3$ de su volumen como cámara de aireación. Con todos estos datos, se establece el tiempo aproximado de un *ciclo de cultivo* completo en 4 meses (**Esquema 5.1**)

Para prevenir la contaminación bacteriana se utilizaron, en todo momento, materiales desechables a la hora de transferir las soluciones *stock* de *nutrientes* al soporte estéril. Toda la manipulación se realizó en campana de flujo laminar y bajo llama de mechero, flameando la boca de cada recipiente en cada operación,

cuando el tamaño del recipiente lo permitía. En los casos en que no era posible (tanques de 60 L) la manipulación se hacía en todo momento al lado de la llama de un mechero de gas.

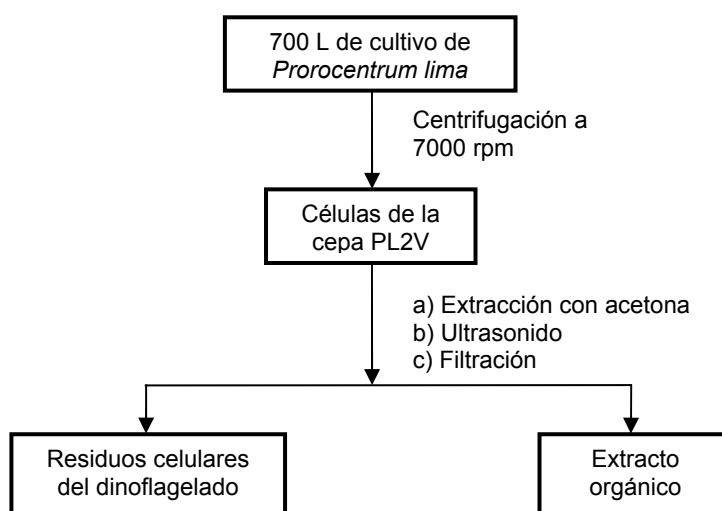


Esquema 5.1.- Ciclo de cultivo

V.2.B.- Recolección y extracción

Dado el carácter bentónico del dinoflagelado *P. lima*, éste se adosa al fondo del recipiente que lo contiene. Cuando se procedió a la recolección de los 700 L de cultivo obtenidos, los fondos de los tanques fueron raspados con cuidado para levantar el dinoflagelado depositado en los mismos. Suspendidas las células, se recolectaron por centrifugación a 7000 r.p.m., y se maceraron durante una hora en acetona al tiempo que fueron sometidas a ultrasonido. Esta operación es necesaria para producir la ruptura del dinoflagelado. Las células se extrajeron

hasta agotamiento y el disolvente fue evaporado, con lo que se obtuvo un extracto de color verde oscuro de 22 g. Este proceso se resume en el **Esquema 5.2**.



Esquema 5.2.- Proceso de recolección y preparación de extractos.

V.2.C.- Marcha cromatográfica del extracto y datos físicos de los compuestos

La ruta cromatográfica seguida comienza con una columna de Sephadex LH-20 de 6.6 cm de diámetro interno y 80 cm de longitud (**Figura 5.3**), que se preparó dejando en maceración con MeOH toda la noche, 685 g de soporte. Luego se estabilizó la columna con el eluyente a utilizar: cloroformo:metanol:n-hexano (25:25:50). Las dimensiones de esta columna permiten cromatografiar entre 5 y 7 g, de forma que tuvo que repetirse unas 4 veces, puesto que comenzamos con 22 g de extracto.

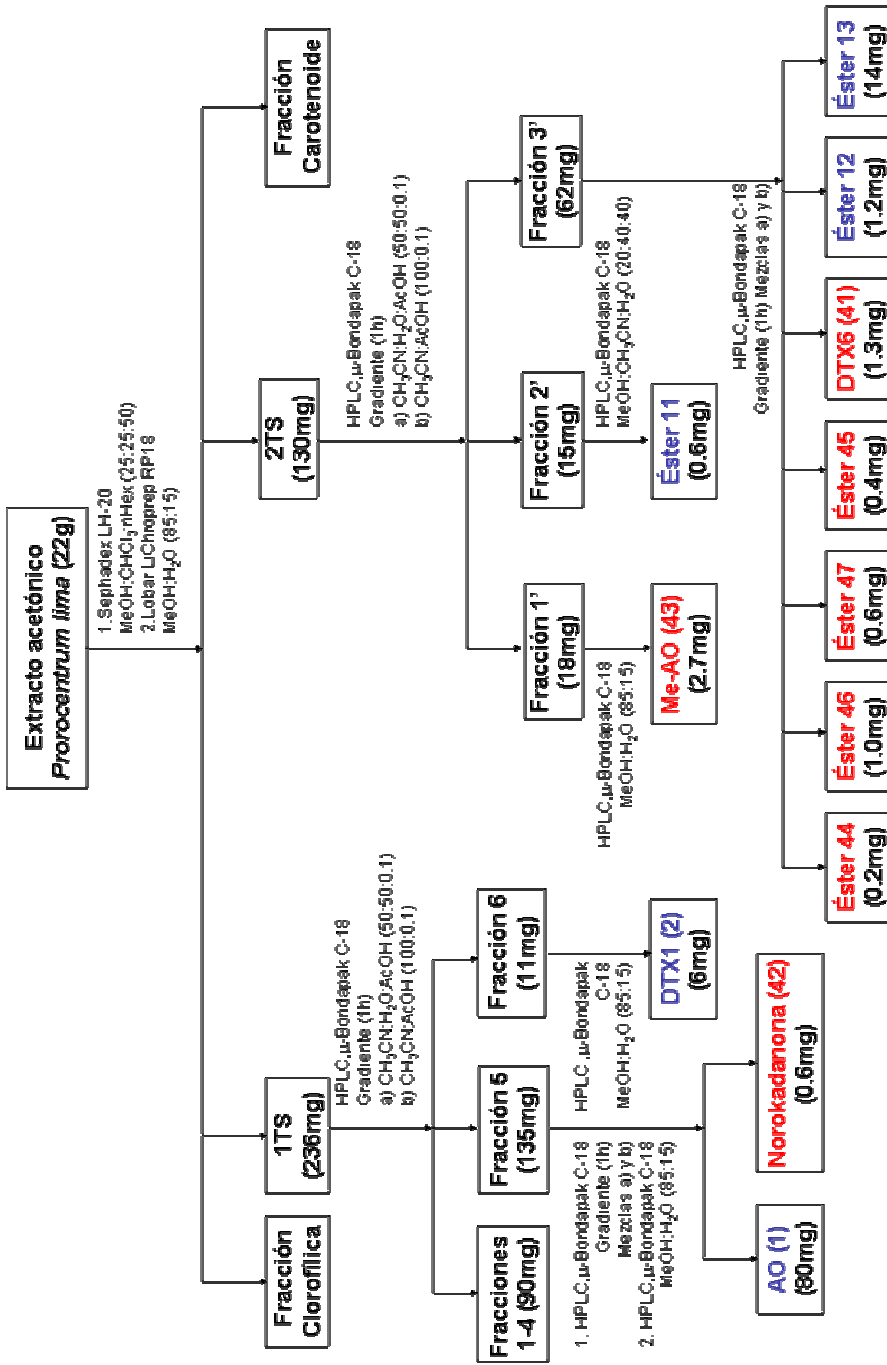
La fracción tóxica resultante, contenía muy pocas cantidades de clorofilas, con lo que se pudo pasar directamente a la cromatografía en fase reversa. Así,

esta fracción tóxica se cromatografió en un sistema de media presión a través de una columna Lobar[®] de fase reversa Lichrorep RP-18 que se eluyó con una mezcla MeOH:H₂O (85:15). Esta cromatografía permite separar los ésteres de AO de la mezcla que contiene AO (1), DTX1 (2) y norokadanona (42), eluyendo en primer lugar, la mezcla de las tres toxinas y en segundo lugar, los ésteres de AO. La purificación de aquella se llevó a cabo en HPLC usando una columna semipreparativa μ -Bondapak C-18 de 5 μ (D.I. 1.9 cm, longitud 15 cm), empleándose en primer lugar cromatografía en gradiente lineal binario. Éste dura una hora y comienza con la mezcla a) acetonitrilo:agua:ácido acético (50:50:0.1) y termina con la b) acetonitrilo:acético (100:0.1), que se mantiene durante 30 minutos adicionales. En segundo lugar se utilizó un sistema isocrático con MeOH:H₂O (85:15). El flujo se mantuvo siempre en 2.5 mL/min. En las condiciones de trabajo con gradiente, los tiempos de retención están en torno a los 35-37 min. para el AO, entre los 40-42 min. para norokadanona, y 45-47 min. para DTX1.

El tratamiento de la mezcla de ésteres de AO se llevó a cabo mediante HPLC, utilizando la misma columna que para la mezcla de las tres toxinas, y en el mismo sistema de gradiente. La purificación final de los mismos, se realizó eluyendo, en el caso del metil okadaato (43), con MeOH:H₂O (85:15), 11, con MeOH:CH₃CN:H₂O (20:40:40), y para el resto de los ésteres se usó el gradiente lineal binario. En todos los casos, el flujo se mantuvo constante en 2.5 mL/min.

El seguimiento de todas las separaciones se hizo por cromatografía en capa fina, eluyendo las placas con la mezcla benceno:acetona:metanol:ácido acético 6N (150:80:19:1).

En el **Esquema 5.3** se resume la marcha cromatográfica descrita, donde aparecen en rojo los nuevos metabolitos encontrados.



Esquema 5.3- Proceso cromatográfico para la separación de toxinas producidas por el dinoflagelado *P. lima*

**DATOS FÍSICOS Y ESPECTROSCÓPICOS DE 2',4'-DIMETILEN-PENTAL
OKADAATO (DTX6) (41)**

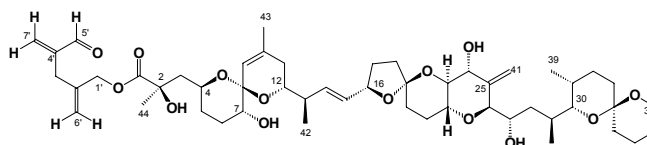
Sólido blanco amorfo

$[\alpha]_D^{25} = +3.3$ (c 0.10, CHCl₃)

UV λ_{max} (EtOH): 242 y 270 nm

IR ν_{max} : 3424, 2954, 2919,
2850, 1738, 1672, 1462, 1378
y 1212 cm⁻¹

RMN ¹³C y ¹H (CDCl₃):



Carbono	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Carbono	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
1	176.2	-	27	64.6	4.04
2	75.3	-	28	35.2	0.98/1.32
3	44.2	1.68/2.06	29	31.0	1.85
4	68.7	3.96	30	75.2	3.26
5	31.7	1.36/1.91	31	27.2	1.76
6	27.3	1.75/1.82	32	26.2	1.86/1.99
7	71.3	3.35	33	30.3	1.36/1.51
8	96.0	-	34	95.5	-
9	121.5	5.31	35	35.8	1.44/1.64
10	138.2	-	36	18.7	1.40/1.61
11	32.9	1.85/1.88	37	25.4	1.50/1.83
12	71.2	3.38	38	60.2	3.54/3.64
13	42.1	2.22	39	10.7	0.90
14	135.8	5.56	40	15.6	1.03
15	130.1	5.47	41	113.1	5.02/5.35
16	79.3	4.68	42	16.0	1.01
17	30.6	1.51/2.15	43	22.7	1.72
18	37.1	1.86/2.04	44	27.6	1.39
19	105.7	-	1'	66.5	4.55/4.66
20	32.7	1.36/1.49	2'	141.6	-
21	26.4	1.76/1.82	3'	33.8	3.01/3.07
22	70.9	3.63	4'	145.7	-
23	76.6	3.41	5'	200.1	9.67
24	70.6	4.09	6'	114.9	4.95/5.12
25	143.9	-	7'	126.5	5.89/6.16
26	85.0	3.92			

FAB HRMS m/z : 912.5237 (calc. 912.5235, C₅₁H₇₆O₁₄)

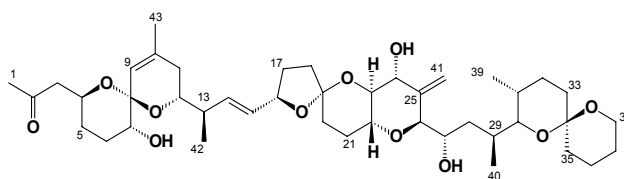
DATOS FÍSICOS Y ESPECTROSCÓPICOS DE NOROKADANONA (42)

Sólido blanco amorfo

$[\alpha]_D^{25} = +9.8$ (c 0.06, CHCl₃)

IR ν_{\max} : 3453, 2929, 1715, 1455, 1381, 1236, 1182, 1076 y 1045 cm⁻¹

RMN ¹³C y ¹H (CDCl₃):



Carbono	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Carbono	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
1	30.9	2.15	23	77.1	3.45
2	207.2	-	24	70.7	4.11
3	49.1	2.42/2.62	25	143.1	-
4	65.8	4.25	26	85.1	3.91
5	30.2	1.25/1.36	27	64.7	4.07
6	27.3	1.73/1.87	28	35.6	0.98/1.32
7	71.7	3.39	29	31.1	1.96
8	95.8	-	30	75.4	3.28
9	122.9	5.34	31	27.6	1.80
10	138.7	-	32	26.5	1.82/1.92
11	33.0	1.87/1.92	33	30.6	1.34/1.52
12	71.2	3.69	34	95.5	-
13	41.9	2.31	35	36.4	1.31/1.46
14	136.9	5.76	36	23.5	1.48/1.65
15	131.5	5.51	37	25.0	1.58/1.82
16	79.7	4.52	38	61.0	3.56/3.66
17	30.7	1.63/2.19	39	10.8	0.92
18	37.5	1.88/2.01	40	16.2	1.06
19	105.5	-	41	113.0	5.02/5.35
20	32.2	1.36/1.53	42	16.2	1.05
21	26.9	1.84/1.90	43	22.6	1.75
22	70.3	3.57			

FAB HRMS m/z : 758.4610 (calc. 758.4605, C₄₃H₆₆O₁₁)

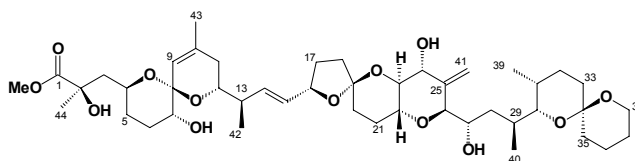
DATOS FÍSICOS Y ESPECTROSCÓPICOS DE METIL OKADAATO (43)

Sólido blanco amorfo

$[\alpha]_D^{25} = +10.0$ (c 0.27, CHCl₃)

IR ν_{\max} : 3444, 2934, 1739, 1681, 1454, 1382, 1236, 1182 y 1077 cm⁻¹

RMN ¹³C y ¹H (CDCl₃):



Carbono	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Carbono	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
1	176.9	-	24	70.8	4.10
2	75.9	-	25	143.9	-
3	43.9	1.68/2.05	26	84.8	3.92
4	68.7	3.93	27	64.5	4.06
5	31.6	1.37/1.70	28	35.2	0.97/1.43
6	27.3	1.82/1.97	29	31.0	1.91
7	71.5	3.36	30	74.9	3.27
8	96.0	-	31	27.2	1.79
9	121.6	5.31	32	27.3	1.91/1.97
10	138.6	-	33	30.3	1.34/1.52
11	32.9	1.85/1.88	34	95.5	-
12	70.9	3.57	35	35.8	1.31/1.48
13	41.8	2.26	36	18.7	1.39/1.61
14	135.4	5.56	37	25.4	1.44/1.51
15	130.5	5.47	38	60.3	3.54/3.64
16	78.9	4.46	39	10.6	0.90
17	30.6	1.58/2.13	40	16.1	1.04
18	37.1	1.86/2.04	41	112.4	5.04/5.38
19	105.7	-	42	15.8	1.01
20	31.5	1.28/1.42	43	22.9	1.71
21	26.4	1.80/1.87	44	27.6	1.34
22	69.5	3.58	1'	52.7	3.79
23	75.5	3.39			

FAB HRMS m/z : 841.4709 (calc. 841.4714, C₄₅H₇₀O₁₃ + Na)

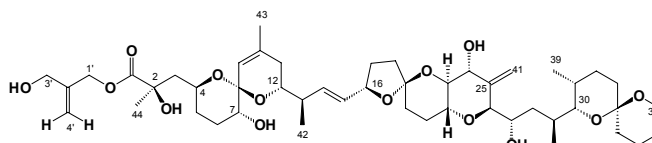
**DATOS FÍSICOS Y ESPECTROSCÓPICOS DE 3'-HIDROXI-2'-METILEN-
PROPIL OKADAATO (44)**

Sólido blanco amorfo

$[\alpha]_D^{25} = -15$ (c 0.02, CHCl₃)

IR ν_{\max} : 3428, 2924, 2852, 1739, 1462, 1379, 1236, 1212, 1112, 1078 y 1045 cm⁻¹

RMN ¹³C y ¹H (CDCl₃):



Carbono	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Carbono	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
1	176.0	-	25	143.8	-
2	75.8	-	26	85.0	3.94
3	44.2	1.71/2.02	27	64.9	4.06
4	68.7	3.97	28	35.2	0.96/1.31
5	31.9	1.36/1.75	29	31.3	1.95
6	27.2	1.85/2.02	30	75.2	3.27
7	72.1	3.38	31	27.4	1.81
8	95.9	-	32	26.0	1.92/1.97
9	122.0	5.32	33	30.2	1.36/1.56
10	138.5	-	34	96.0	-
11	32.9	1.86/1.89	35	36.0	1.31/1.47
12	70.8	3.64	36	20.2	1.45/1.65
13	42.0	2.30	37	25.2	1.51/1.60
14	135.9	5.58	38	60.3	3.56/3.66
15	131.2	5.48	39	11.0	0.91
16	79.2	4.48	40	16.1	1.05
17	30.2	1.58/2.17	41	112.4	5.04/5.35
18	37.3	1.86/2.03	42	16.1	1.03
19	106.0	-	43	23.0	1.73
20	32.0	1.26/1.40	44	27.3	1.39
21	26.5	1.82/1.89	1'	64.6	4.72/4.83
22	69.4	3.59	2'	142.1	-
23	76.8	3.42	3'	63.9	4.15
24	71.2	4.11	4'	114.6	5.19/5.25

FAB HRMS m/z : 874.5156 (calc. 874.5078, C₄₈H₇₄O₁₄)

**DATOS FÍSICOS Y ESPECTROSCÓPICOS DE 5'-HIDROXI-2'-METILEN-
PENTA-3'-ENIL OKADAATO (45)**

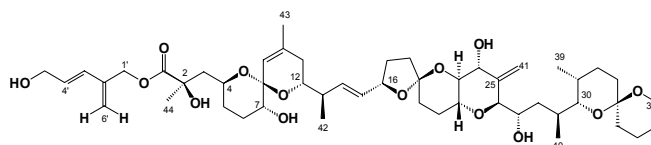
Sólido blanco amorfo

$[\alpha]_D^{25} = +26.6$ (c 0.04, CHCl_3)

UV λ_{max} (EtOH): 205 nm

IR ν_{max} : 3418, 2956, 2854, 2360, 2341, 1732, 1670, 1455, 1380, 1236 y 1215 cm^{-1}

RMN ^{13}C y ^1H (CDCl_3):



Carbono	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Carbono	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
1	176.1	-	26	84.7	3.95
2	76.0	-	27	64.4	4.06
3	44.0	1.70/2.10	28	35.1	0.98/1.35
4	68.4	3.98	29	31.2	1.91
5	32.0	1.38/1.75	30	75.0	3.29
6	26.5	1.85/2.10	31	27.2	1.81
7	71.8	3.39	32	26.2	1.86/1.99
8	96.1	-	33	30.4	1.38/1.53
9	121.8	5.38	34	95.6	-
10	139.0	-	35	35.9	1.46/1.65
11	32.9	1.86/1.88	36	18.7	1.54/1.89
12	71.1	3.53	37	25.6	1.50/1.57
13	42.2	2.26	38	60.7	3.56/3.66
14	136.0	5.52	39	10.9	0.92
15	131.3	5.49	40	16.1	1.05
16	79.1	4.50	41	112.7	5.06/5.35
17	30.5	1.58/2.22	42	15.8	1.01
18	37.1	1.88/2.04	43	23.0	1.74
19	106.0	-	44	28.1	1.41
20	32.2	1.38/1.42	1'	67.7	4.54/5.09
21	26.8	1.76/1.85	2'	149.9	-
22	69.9	3.59	3'	130.3	5.90
23	76.2	3.42	4'	132.8	5.85
24	71.2	4.11	5'	62.8	4.17
25	144.0	-	6'	115.7	4.95/5.13

MS m/z : 921.7 (calc. 922.5055, $\text{C}_{50}\text{H}_{76}\text{O}_{14}\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$)

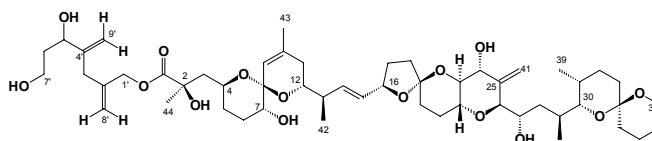
**DATOS FÍSICOS Y ESPECTROSCÓPICOS DE 5',7'-DIHIDROXI-2',4'-
DIMETILEN-HEPTIL OKADAATO (46)**

Sólido blanco amorfo

$[\alpha]_D^{25} = +10$ (c 0.10, CHCl₃)

IR ν_{\max} : 3427, 2932, 1737, 1651, 1455, 1382, 1236, 1160 y 1077 cm⁻¹

RMN ¹³C y ¹H (CDCl₃):



Carbono	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Carbono	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
1	176.0	-	28	35.3	0.98/1.30
2	75.5	-	29	31.8	1.97
3	43.9	1.69/2.06	30	75.1	3.29
4	69.0	3.97	31	27.6	1.79
5	31.9	1.34/1.71	32	26.8	1.90/2.00
6	27.3	1.68/1.83	33	30.7	1.39/1.53
7	71.6	3.39	34	95.0	-
8	95.9	-	35	35.9	1.46/1.63
9	122.1	5.32	36	19.0	1.53/1.91
10	138.7	-	37	25.0	1.43/1.57
11	33.1	1.89/1.94	38	60.5	3.56/3.66
12	71.6	3.49	39	10.9	0.92
13	42.2	2.27	40	16.1	1.05
14	136.6	5.50	41	113.4	5.05/5.32
15	131.3	5.47	42	15.9	1.05
16	79.4	4.47	43	23.5	1.74
17	30.8	1.60/2.17	44	27.9	1.38
18	37.7	1.87/2.09	1'	67.9	4.51/4.82
19	105.2	-	2'	141.5	-
20	32.2	1.32/1.41	3'	37.5	2.83/2.99
21	27.0	1.82/1.89	4'	149.6	-
22	70.2	3.59	5'	74.6	4.36
23	76.9	3.43	6'	37.3	1.61/1.82
24	71.3	4.11	7'	61.6	3.78/3.84
25	144.8	-	8'	116.8	5.10/5.18
26	85.1	3.95	9'	112.5	4.91/5.19
27	64.9	4.07			

MS m/z : 980.1 (calc. 980.5473, C₅₃H₈₂O₁₅Na [M+Na]⁺)

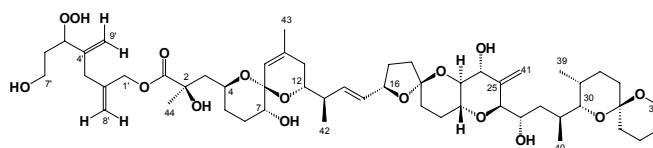
DATOS FÍSICOS Y ESPECTROSCÓPICOS DE 5'-HIDROPEROXI-7'-HIDROXI-2',4'-DIMETILEN-HEPTIL OKADAATO (47)

Sólido blanco amorfo

$[\alpha]_D^{25} = +10$ (c 0.06, CHCl₃)

IR ν_{max} : 3417, 2923, 2851, 2360, 2341, 1738, 1531, 1379, 1235 y 875 cm⁻¹

RMN ¹³C y ¹H (CDCl₃):



Carbono	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Carbono	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
1	176.2	-	28	35.1	1.32/0.97
2	75.6	-	29	31.2	1.95
3	44.0	2.07/1.68	30	75.1	3.30
4	68.6	3.99	31	27.5	1.80
5	31.7	1.73/1.34	32	26.4	2.01/1.86
6	26.4	2.01/1.86	33	30.3	1.57/1.40
7	71.8	3.39	34	95.4	-
8	96.5	-	35	36.0	1.65/1.44
9	121.8	5.33	36	18.8	1.90/1.58
10	138.8	-	37	25.3	1.56/1.49
11	33.0	1.90/1.85	38	60.3	3.66/3.57
12	71.0	3.50	39	10.8	0.93
13	42.0	2.28	40	16.2	1.07
14	135.9	5.51	41	112.4	5.35/5.07
15	131.1	5.47	42	15.8	1.02
16	79.1	4.43	43	23.1	1.75
17	30.8	2.17/1.59	44	27.6	1.40
18	37.3	2.05/1.87	1'	67.0	4.85/4.61
19	105.8	-	2'	140.7	-
20	31.8	1.35/1.26	3'	35.5	3.01/2.83
21	27.3	1.83/1.78	4'	144.7	-
22	69.8	3.56	5'	85.9	4.58
23	76.7	3.43	6'	34.5	1.91/1.78
24	71.0	4.15	7'	60.0	3.82/3.73
25	144.5	-	8'	116.0	5.23/5.12
26	84.8	3.96	9'	115.0	5.23/5.04
27	64.6	4.08			

MS m/z : 996.2 (calc. 996.5422, C₅₃H₈₂O₁₆Na [M+Na]⁺)

V.3.- ESTUDIOS DE DIFUSIÓN

V.3.A.- Calibración de la fuerza de los gradientes

Para calibrar la unidad de gradientes, con una potencia máxima de catálogo de 50 G cm^{-1} , usamos una muestra 100% de D_2O en la que medimos la velocidad de difusión de la señal de HDO residual ($D_{\text{HDO}} = 1.9 \times 10^{-5} \text{ G cm}^{-1}$) y a partir del valor así obtenido recalculamos el valor de g .

Después de realizar las medidas por duplicado, obtuvimos dos rectas de donde se calcularon los siguientes valores del coeficiente de difusión del HDO:

$$\#1 D_{\text{HDO}} = 2.16 \times 10^{-5} \text{ G cm}^{-1} (r = 0.999).$$

$$\#2 D_{\text{HDO}} = 2.20 \times 10^{-5} \text{ G cm}^{-1} (r = 0.999).$$

El valor de G_{max} de la unidad de gradientes calculado de esta manera queda como 53.5 G cm^{-1} .

V.3.B.- Adquisición de datos

En nuestro estudio hemos utilizado la secuencia STE con gradientes rectangulares.

Los parámetros estándar de adquisición fueron:

$$D1 = 2 \text{ s}$$

2 gradientes de forma rectangular de 2 ms de duración (p16) cada uno con un tiempo de recuperación de $100 \mu\text{s}$ (d16).

$$T = 200 \text{ ms}$$

Cada serie se realizó tomando por término medio 12 puntos. Para determinar los coeficientes de difusión, se hicieron 3 series.

V.3.C.- Procesado de los datos

Se mide, para una resonancia en concreto, la intensidad de la señal en valor absoluto en función de la fuerza de los gradientes. Tomando como ejemplo la DTX1C-1 en CDCl_3 y considerando que la máxima potencia de nuestra unidad de gradientes es 53.5 G cm^{-1} , creamos una tabla de la siguiente manera (**Tabla 5.2**) especificando el valor experimental **CNST21** (porcentaje de la potencia máxima de la unidad de gradientes), la fuerza del gradiente **g**, las variables **g²** y **B**, la intensidad de la señal y el valor de **ln(A/A₀)**:

$$\ln(A/A_0) = -\gamma^2 g^2 \delta^2 (\Delta - \delta / 3) D$$

CNST21	g	g ²	B	A	ln(A/A ₀)
2	1.07	1.14	653.3	11587947	0
4	2.14	4.58	2613.0	11502794	-0.007
6	3.21	10.30	5879.4	11351637	-0.021
10	5.35	28.62	16331.6	11117411	-0.041
16	8.56	73.27	41808.8	10205382	-0.127
20	10.70	114.49	65326.2	9626069	-0.185
30	16.05	257.60	146984.0	7450603	-0.442
40	21.40	457.96	261304.9	5275328	-0.787
50	26.75	715.56	408288.9	3408400	-1.224
60	32.10	1030.41	587936.0	1985704	-1.764
80	42.80	1831.84	1045219.5	497884	-3.147
100	53.50	2862.25	1633155.5	101155	-4.741

Tabla 5.2.- Datos para DTX1C-1

La dependencia de la intensidad de la señal en función de la intensidad de los gradientes tiene que dar una función exponencial, tal como se muestra en la **Figura 5.5**.

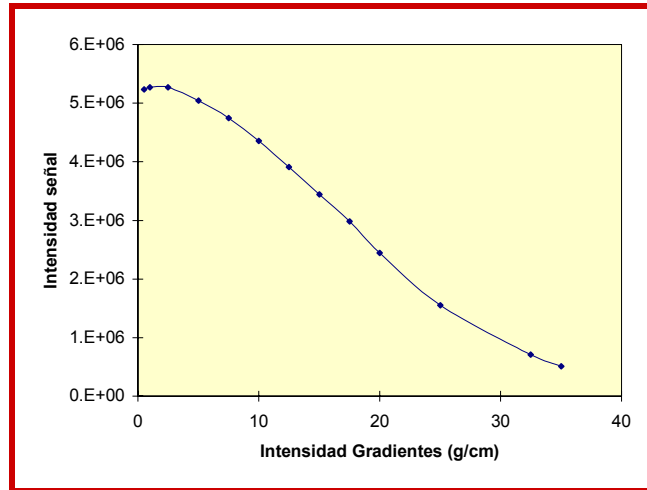


Figura 5.5.- Curva resultante de la representación de la intensidad de la señal vs intensidad de los gradientes

Por otro lado, y de acuerdo con las ecuaciones ya comentadas, la dependencia de $\ln(A/A_0)$ en función de las variables g^2 o B , da como resultado una dependencia lineal de la cual se puede extraer fácilmente el valor del coeficiente de difusión D . Para minimizar errores, se suele hacer una regresión lineal sobre los valores experimentales obtenidos tal como se muestra en la **Figura 5.6**.

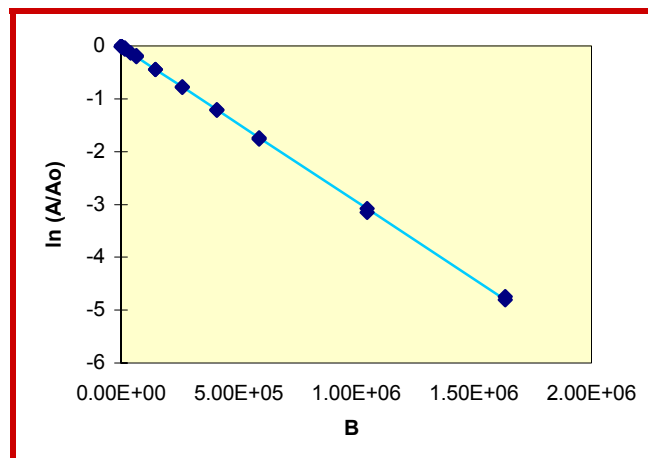


Figura 5.6.- Regresión lineal sobre los valores experimentales de la **Tabla 5.2**

Se partió de una muestra de DTX1C-1 de 4.6 mg en 0.5 mL y se fue diluyendo sucesivamente, de forma que cuando se llegó a la última dilución, DTX1C-6, la cantidad que había en el tubo de resonancia era tan sólo de 0.06 mg. En cuanto a la DTX1, la cantidad con la que se trabajó era de 2 mg. Los datos obtenidos en este experimento se resumen en la **Tabla 5.3**.

	Concentración			Concentración
	D ($\times 10^{-6}$ cm ² /s)	DTX1C-n/DTX1C-1	M_{DTX1C}/M_{DTX1}	(mM)
DTX1	-5.29	-	-	5
DTX1C-1	-3.04	1	5.27	12
DTX1C-2	-3.11	1/2	4.91	6
DTX1C-3	-3.06	1/5	5.18	2.4
DTX1C-4	-3.71	1/20	2.92	0.6
DTX1C-5	-4.20	1/40	2.00	0.3
DTX1C-6	-4.89	1/80	1.26	0.15

Tabla 5.3.- Resumen del cálculo de los D , para las distintas muestras de DTX1 y DTX1C

V.4.- ESTUDIOS ESTRUCTURALES DEL AO

La primera cristalización del AO se intentó con 80 mg. Se disolvieron en unos 4 mL de EtOH en caliente y se añadieron unos 2 mL de H₂O. Se dejó cristalizar durante unos días, al aire. Los cristales así formados no tenían el tamaño adecuado para su estudio por rayos X. Se intentó entonces dejarlo cristalizar en presencia de sales de K⁺, y para ello se disolvió el AO en 2 mL de CH₃CN o MeOH en caliente, y se añadieron 2 mL de agua, que esta vez tenía sales de K⁺ disueltas, como KSCN, y se dejaba en agitación el balón de reacción. Pero en ninguno de los casos se obtuvo complejo.

Para el estudio con sales de plata, se utilizaron, en primer lugar, 10 mg de AO 0.005 N, en EtOH al 50% en H₂O. Para tritiar hasta un pH = 8 se utilizó una disolución de NaOH 0.1 N. Se dejó cristalizar un fin de semana. Los cristales así obtenidos se redisolvieron en 0.2 mL EtOH al 50%, la mínima cantidad en caliente, y se trataron con un 10% de exceso de AgNO₃, es decir, unos 3.4 mg 0.02 N, en H₂O. La cristalización debe permanecer a oscuras con el fin de evitar el ennegrecimiento consecuencia de la elevada sensibilidad del AgNO₃ a la luz. Como último paso, el balón de reacción se mantuvo en atmósfera inerte con gas argón, para facilitar la cristalización. Se dejó cristalizar durante aproximadamente dos semanas, hasta que los cristales alcanzaron un tamaño adecuado para poder ser medidos por rayos X.

VI.- METABOLITOS SECUNDARIOS DEL GÉNERO *PALYTHOA SP*

VI.1.- INTRODUCCIÓN	111
VI.2.- ANTECEDENTES	113
VI.3.- METABOLITOS AISLADOS DE <i>PALYTHOA SP</i>	118
VI.3.1.- AISLAMIENTO	118
VI.3.2.- ESTUDIO DE ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL	120
VI.3.2.A.- Derivados de germacranólido	120
VI.3.2.B.- Derivados de eudesmanólido	132
VI.3.2.C.- Nepthediol (71)	140
VI.4.- PARTE EXPERIMENTAL	142
VI.4.1.- TÉCNICAS EXPERIMENTALES GENERALES	142
VI.4.1.A.- Resonancia magnética nuclear	142
VI.4.1.B.- Infrarrojo	142
VI.4.1.C.- Rotación óptica	142
VI.4.1.D.- Cromatografía de gel-filtración	142
VI.4.1.E.- Cromatografía en columna	142
VI.4.1.F.- Cromatografía HPLC	143
VI.4.1.G.- Cromatografía en capa fina	143
VI.4.2.- RECOLECCIÓN Y EXTRACCIÓN DEL CELENTÉREO <i>PALYTHOA SP</i>	143
VI.4.3.- MARCHA CROMATOGRÁFICA DEL EXTRACTO Y DATOS FÍSICOS DE LOS COMPUESTOS	144

VI.- METABOLITOS SECUNDARIOS DEL GÉNERO *PALYTHOA SP*

VI.1.- INTRODUCCIÓN

Los productos naturales de organismos marinos han atraído la atención de científicos de diferentes campos (químicos, biólogos, farmacéuticos, etc.) durante las últimas décadas. Hace años, el primer objetivo de la química de productos naturales era la caracterización de nuevos metabolitos, preferentemente, toxinas terrestres y moléculas interesantes desde el punto de vista médico. La investigación en productos naturales marinos comenzó en los años 60, debido principalmente a los avances en la instrumentación para la elucidación de estructuras y técnicas de aislamiento, así como la disponibilidad del submarinismo para la recolección de organismos marinos. Todo ello ha permitido avanzar considerablemente en el estudio de productos naturales marinos, cuya revisión evidencia la elevada complejidad estructural y las potentes actividades biológicas que presentan este tipo de sustancias.⁷⁰

Los seres que viven en ecosistemas marinos sometidos a altos niveles de competitividad suelen producir una amplia variedad de compuestos que, por lo general, son bioactivos y por tanto, fármacos potenciales.^{70,71} Un ejemplo de este tipo de organismos es el celentéreo marino del género *Palythoa* (**Figura 6.1**). Éste se encuentra clasificado dentro de la clase *Antozoa*, subclase *Zoantarios*, orden *Zoantidae*, suborden *Brachycnemina*, familia *Sphenopidae*.

Estas curiosas y, al mismo tiempo bellas criaturas son animales coloniales, sedentarios, con simetría radial, y desprovistos de esqueleto. Viven en aguas someras y cálidas, así, aunque son poco exigentes con respecto a la luz, suelen crecer en lugares de luz intensa. La *Palythoa* es fácil de distinguir de otros zoantideos porque los pólipos están conectados entre sí por la base, lo cual le

⁷⁰ D. J. Faulkner, *Nat. Prod. Rep.*, **2002**, 19, 1.

⁷¹ J. W. Blunt, B. R. Copp, M. H. G. Munro, P. Northeote y M. R. Prinsep, *Nat. Prod. Rep.*, **2003**, 20, 1.

confiere el aspecto de coral, como un solo organismo. Esta estera mediante la cual se conectan los pólipos es conocida con el nombre de coenenchyma.



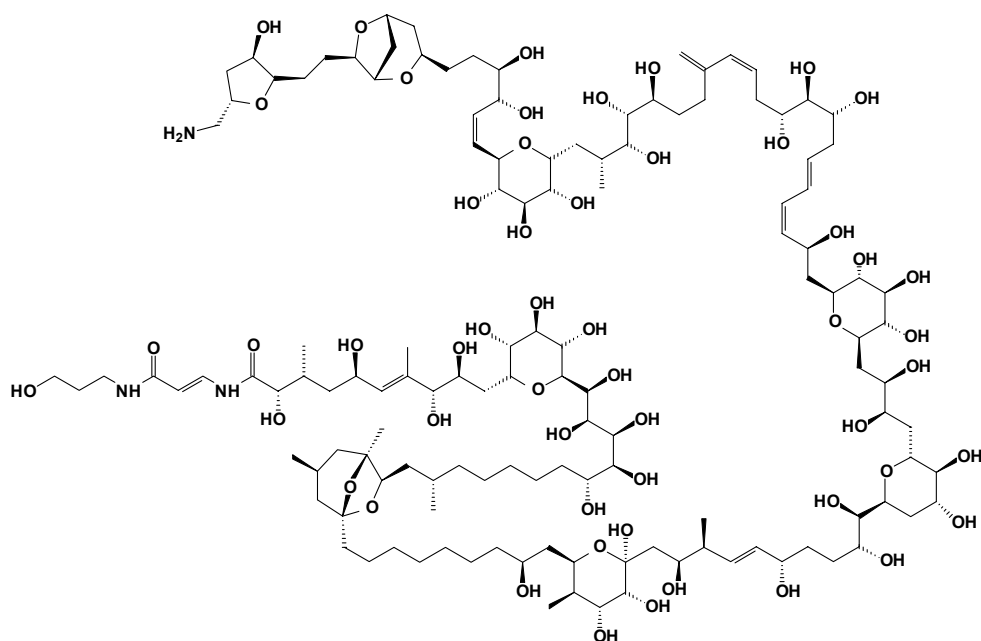
Figura 6.1.- Colonia de *Palythoa sp*

En la morfología del animal distinguimos una zona celular en contacto con el exterior denominada ectodermo, formada por células regulares en algunas de las cuales se distinguen en su base fibras musculares, y células nerviosas unidas entre sí por un retículo nervioso que se extiende por una capa gelatinosa central, más o menos delgada, denominada mesoglea. La parte interior del animal, o endodermo está formada por células de gran tamaño que constituyen el epitelio digestivo. Cuando se siente amenazado, puede retraerse considerablemente gracias al desarrollo de su musculatura, introduciendo los tentáculos en el interior del cuerpo o cavidad digestiva, manteniendo cerrado el orificio bucal por acción de un músculo circular muy potente.

Otra característica de los celentéreos es la presencia de células urticantes llamadas nematoditos, que poseen un cilio sensible que, con el más leve roce, hace que se dispare con gran fuerza un filamento con numerosas espinas. A través de ellas es capaz de paralizar pequeños animales, mediante la inoculación de veneno.

VI.2.- ANTECEDENTES

Una de las toxinas marinas más activas y potentes hasta el momento, la palitoxina (**48**), fue aislada inicialmente del zoanthidio *Palythoa toxica* en 1971,⁷² en Hawai, y debido a su estructura única y a su potente actividad, ha llegado a ser comparada con la estricnina. Exhibe efectos tales como la despolarización de membrana, la estimulación de la liberación de ácido araquidónico, la estimulación de la liberación de neurotransmisores, la inhibición de la Na^+/K^+ ATPasa, la inducción de la contracción de músculo liso así como la actividad promotora de tumores. Sin embargo, los detalles de su mecanismo de acción son todavía desconocidos.⁴



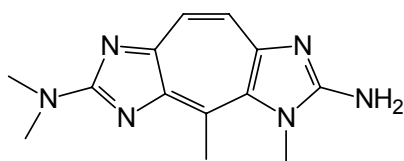
Palitoxina (48)

⁷² P. J. Scheuer y R. E. Moore, *Science*, **1971**, 172, 495.

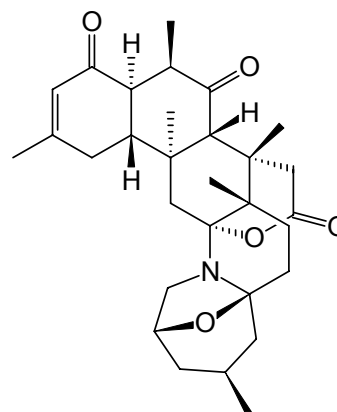
La palitoxina ha sido encontrada en algunos peces tropicales cuya ingestión produjo síndrome ciguaterico, haciendo sospechar su participación en este tipo de intoxicaciones. Con posterioridad, algunos análogos de la palitoxina llamados ostreocinas, han sido aislados de cultivos del dinoflagelado *Ostreopsis siamensis*.⁷³

Sin embargo, los metabolitos secundarios aislados de zoantidios suelen ser principalmente alcaloides y pueden estar divididos en dos grupos dependiendo de sus estructuras químicas:

- a) Alcaloides de la clase zoantoxantina (**49**)⁷⁴, pigmentos fluorescentes naturales.
- b) Alcaloides tipo zoantamina (**50**)⁷⁵ que poseen un esqueleto carbonado singular, aislados principalmente del género *Zoanthus*.



Zoantoxantina (49)



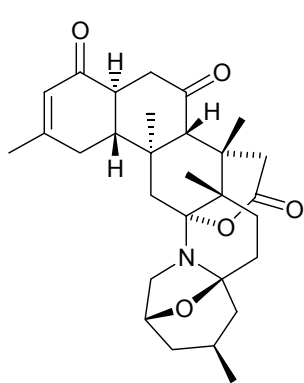
Zoantamina (50)

⁷³ M. Usmi, M. Satake, S. Ishida, A. Inoue, Y. Kan y T. Yasumoto, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117*, 5389.

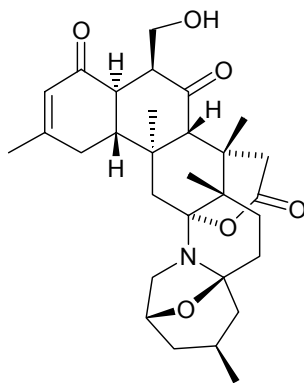
⁷⁴ L. Cariello, S. Crescenzi, G. Prota, S. Capasso, F. Giordano y L. Mazzarella, *Tetrahedron*, **1974**, *30*, 3281.

⁷⁵ C. B. Rao, A. S. R. Anjaneyula, N. S. Sarma, Y. Venkateswarlu, R. M. Rosser, D. J. Faulkner, M. H. M. Chen y J. Clardy, *J. Am. Chem. Soc.*, **1984**, *106*, 7983.

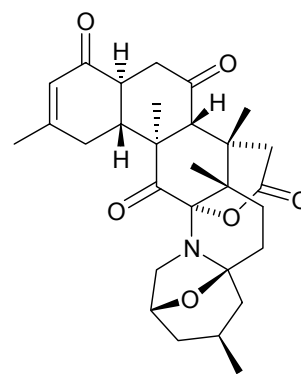
Sobre este grupo de moléculas se han realizado diferentes ensayos de bioactividad. Así se encuentra descrito que la norzoantamina (**51**), la oxizoantamina (**52**), la norzoantaminona (**53**), la ciclozoantamina (**54**) y la *epi*-norzoantamina (**55**) inhiben el crecimiento de líneas de células de leucemia linfocítica de ratón P-388, mostrando IC₅₀ de 24, 7.0, 1.0, 24 y 2.6 µg/mL respectivamente.⁷⁶ También se ha comprobado que estas sustancias inhiben la inflamación inducida por los ésteres de forbol.⁷⁷



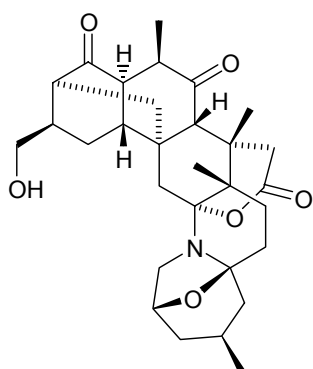
Norzoantamina (51)



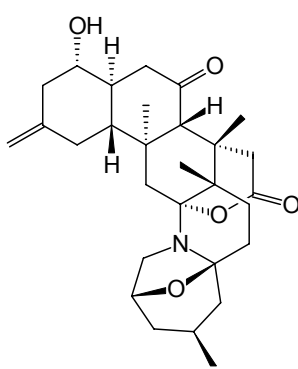
Oxizoantamina (52)



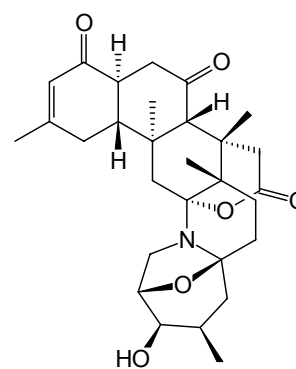
Norzoantaminona (53)



Ciclozoantamina (54)



***Epi*-norzoantamina (55)**



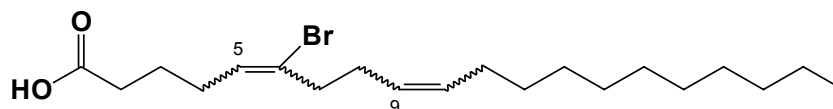
3-Hidroxinorzoantamina (56)

⁷⁶ S. Fukuzawa, Y. Hayashi, D. Uemura, A. Nagastu, K. Yamada y Y. Ljyuin, *Heterocycl. Commun*, **1995**, *1*, 207.

⁷⁷ C. B. Rao, D. V. Rao, V. S. N. Raju, B. W. Sullivan y D. J. Faulkner, *Heterocycles*, **1989**, *28*, 103.

La norzoantamina (**51**), uno de los cabeza de serie de estos metabolitos, posee la actividad farmacológica más interesante, que es su capacidad para inhibir la producción de la interleuquina-6 (IL-6).⁷⁸ Esta última es conocida como un inductor de la formación de osteoclastos, por lo que la supresión de su producción puede prevenir la osteoporosis. Así, la norzoantamina (**51**) y su clorhidrato inhiben la producción de IL-6 con valores de IC₅₀ de 13 y 4.7 µg/mL respectivamente. Por último, se ha encontrado que la 3-hidroxi norzoantamina (**56**) posee una potente actividad inhibitoria específica sobre agregación plaquetaria humana, inducida por diversos agentes estimulantes, lo cual puede conducir a evitar trombosis, embolias, coagulación intravascular y otras enfermedades cardiovasculares.⁷⁹

Recientemente, en diferentes especies de *Palythoa* se han encontrado metabolitos de estructuras químicas muy diversas, como es el caso del ácido 6-bromo-5,9-eicosadienoico (**57**) aislado de *Palythoa caribaeorum*⁸⁰ o de los palitoalones A (**58**) y B (**59**), de naturaleza esteroidea, encontrados en *Palythoa australiae*.⁸¹ Esta clase de compuestos, si bien no tienen mucha importancia desde el punto de vista farmacológico, sí desde el punto de vista estructural, ofreciéndonos la posibilidad de encontrar en los zoantidios, sustancias con esqueletos carbonados de muy diversos tipos, que nos pueden ayudar a entender un poco mejor el metabolismo de estos organismos.



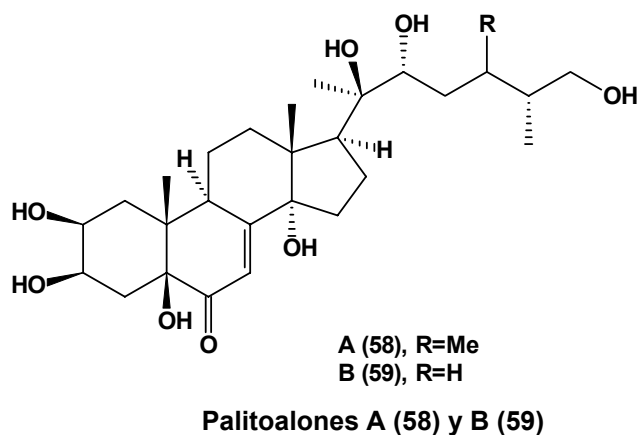
Ácido 6-bromo-5,9-eicosadienoico (57)

⁷⁸ M. Kuramoto, K. Hayashi, K. Yamaguchi, M. Yada, T. Tsuji y D. Uemura, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1998**, *71*, 771.

⁷⁹ R. M. Villar, J. Gil-Longo, A. H. Daranas, M. L. Souto, J. J. Fernández, S. Peixinho, M. A. Barral, G. Santafé, J. Rodríguez y C. Jiménez, *Bioorg. & Med. Chem.*, **2003**, *11*, 2301.

⁸⁰ N. Carballeira y M. Reyes, *J. Nat. Prod.*, **1995**, *58*, 1689.

⁸¹ H. Shigemori, Y. Sato, T. Kagata y J. Kobayashi, *J. Nat. Prod.*, **1999**, *62*, 372.



En nuestro archipiélago canario se han encontrado especies endémicas de estos zoantidios, y en particular, en Órzola, Lanzarote, del género *Palythoa*. Al aspecto endémico, y por tanto exclusivo del organismo, hay que añadir que muy pocos estudios químicos de los componentes de los zoantidios han sido llevados a cabo a nivel mundial hasta el momento.⁸² Por lo tanto, los pocos precedentes pero al mismo tiempo notables, junto con el desafío de investigar una especie única, nos hizo plantearnos el estudio de estos celentéreos y su posible repercusión en la vida marina que les rodea así como la evaluación del riesgo de que algunas de las sustancias que produzcan sean tóxicas para el hombre a través de la cadena trófica.

Asimismo, este estudio tiene una clara vertiente farmacológica en la búsqueda de sustancias relacionadas con la palitoxina (**48**) y principalmente en base a que en estudios preliminares de algunos de los extractos de *Palythoa* sp realizados en nuestro laboratorio, se observó una actividad antitumoral notable (IC₅₀ 0.02 µg/mL). En consecuencia, fue nuestro objetivo llevar a cabo una recolección de la especie localizada en la isla de Lanzarote, y realizar la determinación estructural de los metabolitos de este organismo así como el aislamiento e identificación de los principios activos.

⁸² J. J. Fernández, M. L. Souto, A. H. Daranas y M. Norte, *Current Topics in Phytochem.*, **2000**, *4*, 105.

VI.3.- METABOLITOS AISLADOS DE *PALYTHOA SP*

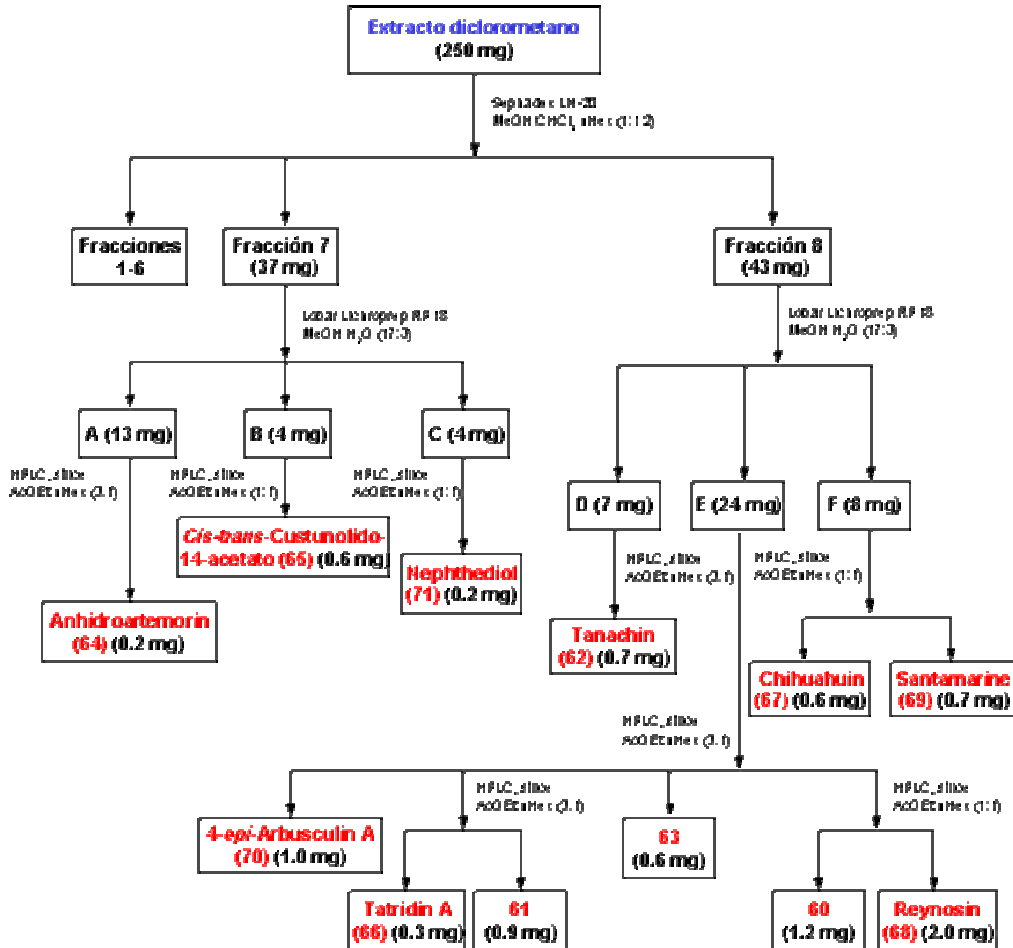
VI.3.1.- AISLAMIENTO

Se recolectó una gran colonia del zoantidio *Palythoa sp*, ejemplar clasificado por el Dr. Alberto Brito, en el Caletón Blanco, Órzola, en la isla de Lanzarote, durante el mes de octubre de 2000. La recolección se realizó a mano durante la bajamar (**Figura 6.2**), tras la cual se congeló la muestra hasta que pudo ser llevada a nuestro laboratorio. Una vez allí, fue macerada repetidas veces a temperatura ambiente con acetona hasta agotamiento de la muestra.



Figura 6.2.- Recolección a mano de *Palythoa sp*

A continuación se repitió el proceso con metanol, también a temperatura ambiente. Por último, el celentéreo doblemente extraído, se secó al aire y se trituró. La última extracción se llevó a cabo en un soxhlet con diclorometano, de donde se obtuvo un extracto amarillento de 250 mg tras evaporación. Este último fue nuestro objeto de estudio, puesto que fue el extracto que mayor actividad citotóxica presentó en estudios preliminares (IC_{50} 0.02 $\mu\text{g/mL}$). Este extracto fue cromatografiado siguiendo la pauta indicada en el **Esquema 6.1**.



Esquema 6.1.- Esquema cromatográfico del extracto de diclorometano de *Palythoa sp*

De este extracto, se separaron inicialmente 8 fracciones, donde las más polares, 7 y 8, fueron las que mejores resultados ofrecieron en cuanto a la cantidad de compuestos encontrados. La purificación de los metabolitos se llevó a cabo en todos los casos mediante HPLC. Y como consecuencia de esta cromatografía, se obtuvo una serie de sesquiterpenos (señalados en color rojo en el **Esquema 6.1**), cuya elucidación estructural detallada se expone a continuación.

VI.3.2.- ESTUDIO DE ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL

VI.3.2.A.- Derivados de germacranólido

El primer metabolito que se aisló como un sólido amorfo de color blanquecino, fue el compuesto **60**. Éste muestra en el espectro de IR bandas características de la presencia de una lactona a 1762 cm^{-1} y de un carbonilo α - β insaturado a 1661 cm^{-1} .

Su estructura fue establecida gracias a los espectros de RMN, tanto mono como bidimensionales. En el espectro de RMN ^1H (**Figura 6.3**) se observan señales para 18 protones: H-1 a δ_{H} 4.46, H₂-2 a δ_{H} 1.78, 2.26, H₂-3 a δ_{H} 2.35, 2.46, H-5 a δ_{H} 3.49, H-6 a δ_{H} 4.20, el protón del grupo alcohol 6-OH a δ_{H} 2.03, H-7 a δ_{H} 3.32, H-8 a δ_{H} 4.06, H₂-9 a δ_{H} 2.62, 2.96, y los tres metilenos olefínicos, H₂-13 a δ_{H} 6.07, 6.24, H₂-14 a δ_{H} 5.13, 5.38 y H₂-15 a δ_{H} 4.95, 4.98. En el de RMN ^{13}C aparecen 15 carbonos, como vemos en la **Figura 6.4**, a excepción de uno de los cuatro carbonos cuaternarios que posee la molécula, que se escapa de la escala de esta figura, observándose a δ_{C} 169.2.

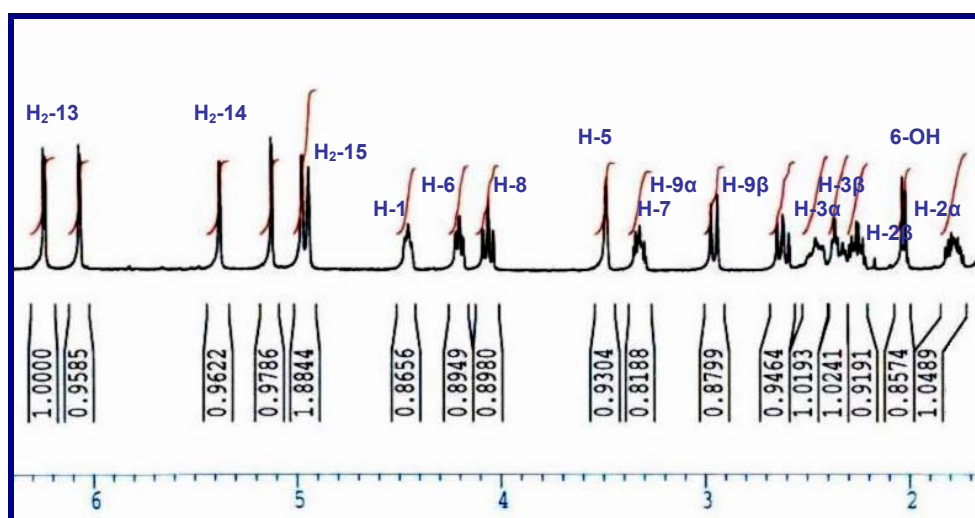


Figura 6.3.- RMN ^1H (400 MHz) del compuesto **60**

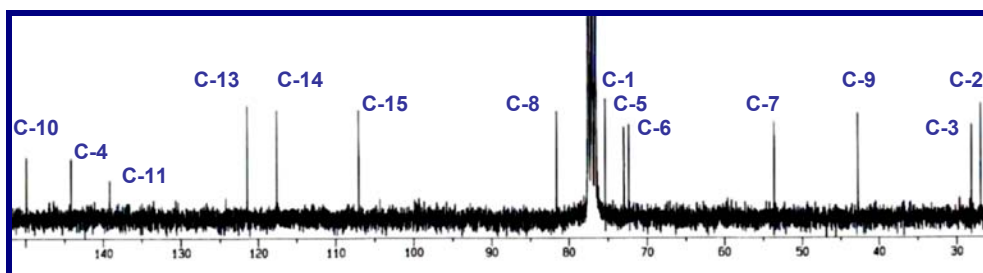


Figura 6.4.- RMN ^{13}C (75 MHz) del compuesto **60**

Con la ayuda del experimento COSY se fue construyendo la estructura, gracias a las conectividades observadas entre los protones continuos en la molécula, (**Figura 6.5**). La asignación comenzó con las señales que aparecen a campos más bajos, es decir, la de los dos protones de metileno olefínico H_2 -13, a δ_{H} 6.07 y 6.24. Estos protones se correlacionan con la señal de H-7 a δ_{H} 3.32 (ddd, $J = 3.5, 7.9$ y 10.4 Hz). A su vez, este protón muestra conectividad con dos nuevas señales, los protones H-6 a δ_{H} 4.20 (ddd, $J = 2.3, 6.8$ y 7.9 Hz) y H-8 a δ_{H} 4.06 (dd, $J = 10.4$ y 10.5 Hz). H-8 se correlaciona con el metileno H_2 -9 a δ_{H} 2.96 (H-9 α , d, $J = 12.7$ Hz) y δ_{H} 2.62 (H-9 β , dd, $J = 10.5$ y 12.7 Hz). Este metileno muestra conectividad con los protones del metileno olefínico H_2 -14 a δ_{H} 5.13 y 5.38, los cuales se correlacionan con el protón H-1 a δ_{H} 4.46 (dd, $J = 5.1$ y 5.7 Hz). H-1 nos lleva a los protones metilénicos H_2 -2 a δ_{H} 1.78, 2.26 y éstos a los H_2 -3 a δ_{H} 2.35, 2.46, que muestran a su vez, correlación con los protones correspondientes a otro metileno olefínico, H_2 -15 a δ_{H} 4.95, 4.98. Este último metileno presenta conectividad con la señal de H-5 a δ_{H} 3.49 (sa) que se correlaciona a su vez con H-6, que al mismo tiempo, además de mostrar conectividad con el protón de alcohol OH-6 a δ_{H} 2.03 (d, $J = 6.8$ Hz), lo hace con H-7 y por tanto, le hemos dado la vuelta a la molécula. Esto nos indica que se trata de un ciclo de 10 átomos de carbono. Todas estas conexiones se muestran en rojo en la **Figura 6.6**.

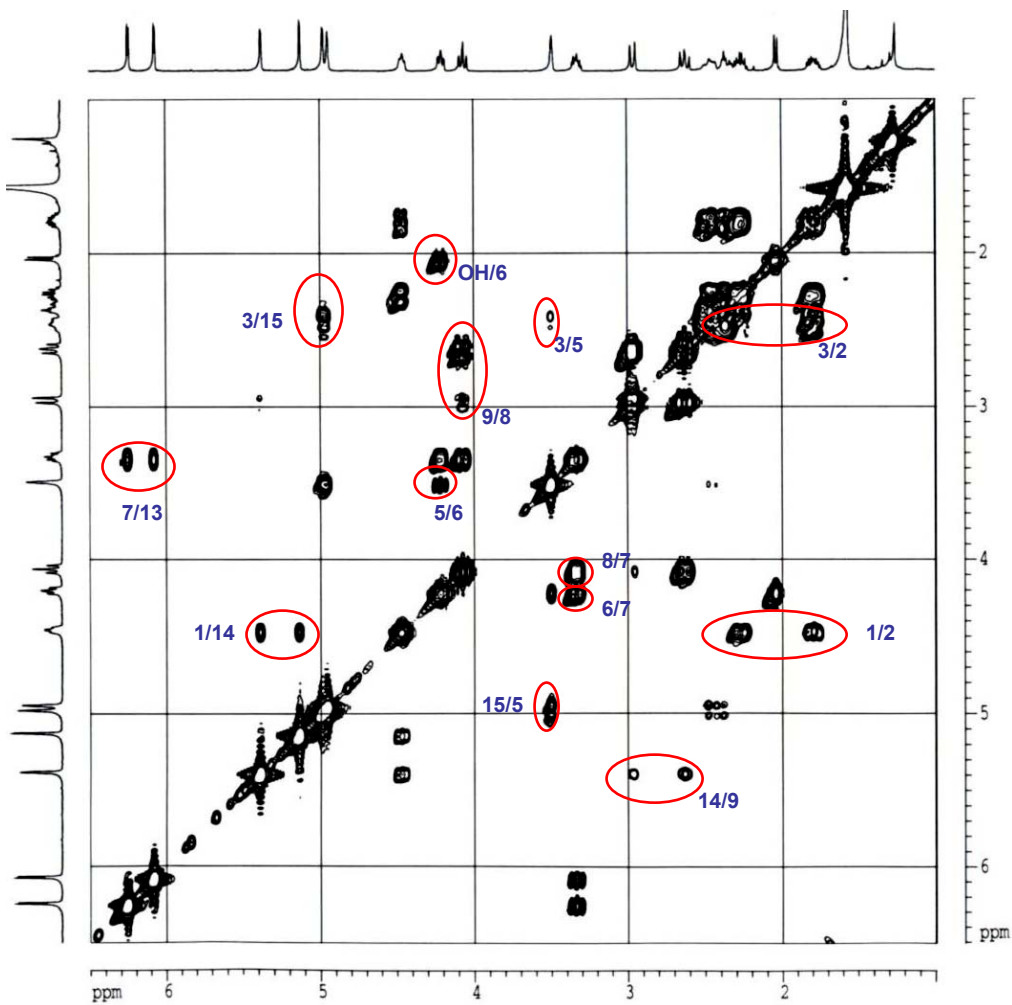


Figura 6.5.- COSY (400 MHz) del compuesto **60**. Rodeadas mediante círculos rojos se encuentran las conectividades que facilitaron la elucidación estructural de este metabolito

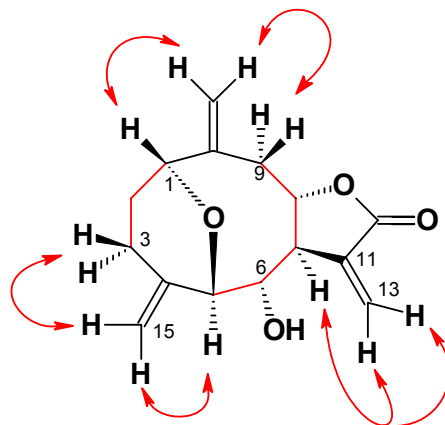


Figura 6.6.- Conectividades observadas en el experimento COSY del compuesto **60**, señaladas mediante trazos de color rojo. Las flechas indican las conexiones a larga distancia

Los protones fueron correlacionados con sus respectivos carbonos en el experimento de HSQC (**Figura 6.7**). Así, se observó que los protones H₂-13 a δ_{H} 6.07 y 6.24 en el espectro de RMN ¹H, pertenecen al carbono C-13, que aparece a δ_{C} 121.4 en el espectro de RMN ¹³C. Lo mismo ocurre con los otros dos metilenos olefínicos: C-14 a δ_{C} 117.6 y C-15 a δ_{C} 107.1. De la misma manera, fueron asignados los desplazamientos para los tres metilenos: C-2 a δ_{C} 26.9, C-3 a δ_{C} 28.1 y C-9 a δ_{C} 42.8. Existen además cinco grupos metino, cuatro de los cuales deben ser geminales a un oxígeno (C-1, C-6, C-8 y C-5), por los desplazamientos que presentan. Por último, los desplazamientos para los cuatro carbonos cuaternarios de la molécula fueron establecidos mediante el espectro de RMN ¹³C (**Figura 6.4**), así como por las conectividades observadas en el experimento de HMBC (**Figura 6.8**).

Fue efectivamente este experimento HMBC (**Figura 6.8**) el que nos ayudó a completar la estructura de la molécula. No sólo se comprobaron los datos arrojados por el COSY, sino que además se establecieron las conectividades con los carbonos cuaternarios y se descubrió una nueva conexión: la existente entre los carbonos C-1 y C-5 (señalada mediante un círculo verde en la **Figura 6.8**), por lo que se dedujo la existencia de un puente éter entre dichos carbonos. Las

correlaciones establecidas en este experimento se muestran en la **Figura 6.9**. Por último, todos los datos de RMN de ^{13}C y ^1H para el compuesto **60** están recogidos en la **Tabla 6.1**.

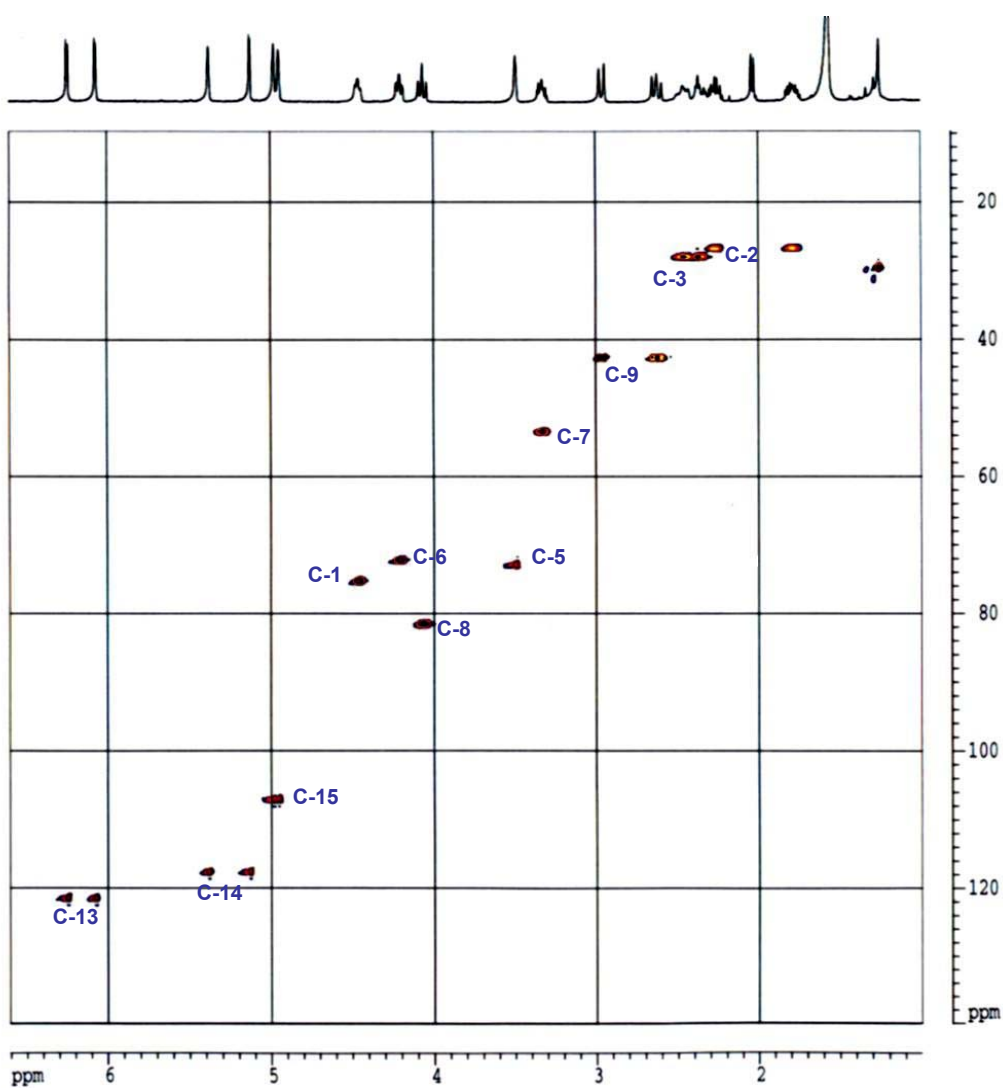


Figura 6.7.- HSQC del compuesto 60

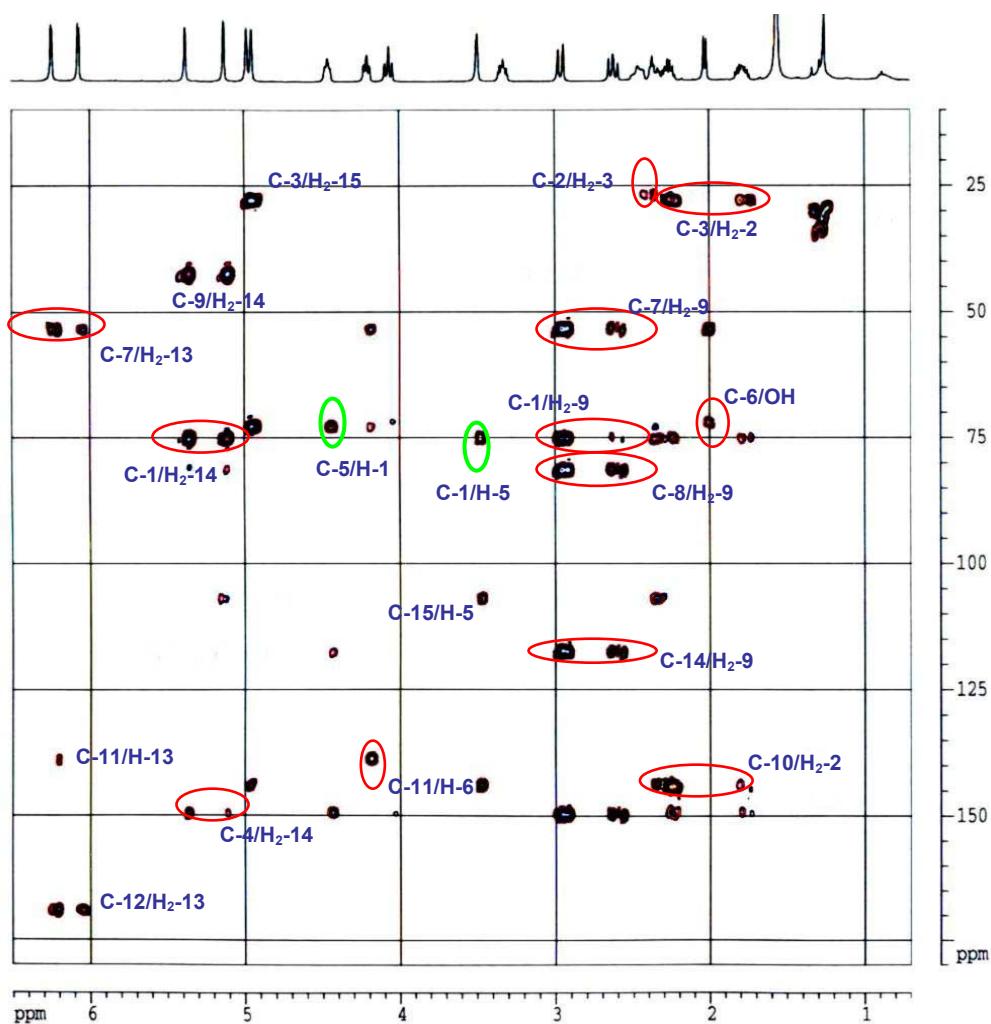


Figura 6.8.- HMBC del compuesto **60**. Mediante círculos de color verde se señalan las conectividades que permitieron el establecimiento de un puente éter entre los carbonos C-1 y C-5. Con círculos de color rojo se muestran las correlaciones que permitieron completar la estructura de este metabolito

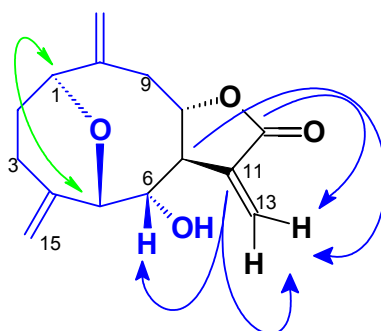


Figura 6.9.- Mediante enlaces y flechas de color azul, se muestran algunas conectividades observadas en el experimento HMBC del compuesto **60**. La flecha verde indica la conexión más significativa, entre C-1 y H-5, y entre C-5 y H-1

Tabla 6.1.- Datos de RMN (CDCl_3) para el compuesto **60**

$n^\circ\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	J (Hz)
1	75.4	4.46	dd	5.1, 5.7
2	26.9	(α) 1.78 (β) 2.26	dddd dddd	2.6, 5.0, 5.3, 15.7 2.6, 5.1, 5.7, 15.7
3	28.1	(α) 2.46 (β) 2.35	m ddd	5.0, 5.3, 15.7
4	144.2	-	-	-
5	73.0	3.49	sa	-
6	72.3	4.20	ddd	2.3, 6.8, 7.9
7	53.6	3.32	ddd	3.5, 7.9, 10.4
8	81.6	4.06	dd	10.4, 10.5
9	42.8	(α) 2.96 (β) 2.62	d dd	12.7 10.5, 12.7
10	149.9	-	-	-
11	139.2	-	-	-
12	169.2	-	-	-
13	121.4	6.07 6.24	d d	3.5 3.5
14	117.6	5.13 5.38	d sa	2.0 -
15	107.1	4.95 4.98	sa d	- 1.9
6-OH	-	2.03	d	6.8

En cuanto a la estereoquímica relativa de los centros quirales C-6, C-7 y C-8, fue establecida en base a los datos extraídos de su experimento de ROESY, que se muestran en la **Figura 6.10**. Así, se observaron correlaciones entre el protón H-6 con H-8 y con H-1, lo que los sitúa del mismo lado de la molécula (β). Lo mismo ocurrió con los protones H-5 y H-7, que se encuentran en la cara α de la molécula.

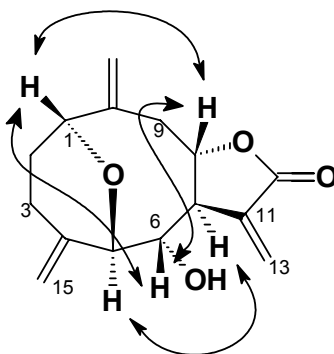


Figura 6.10.- Mediante flechas, se señalan las conectividades más significativas observadas en el experimento ROESY del compuesto **60**

Consultada la bibliografía, encontramos que Robinson y col. publicaron en 1986 el aislamiento e identificación de un nuevo metabolito de *Austroliabum candidum*,⁸³ cuyos datos espectroscópicos y actividad óptica coinciden plenamente con nuestro compuesto **60**. En dicho artículo se publicó además el aislamiento e identificación de otra sustancia con el mismo esqueleto de germacranólido con puente éter, y donde la diferencia radica en la hidratación del doble enlace existente entre C-4 y C-15. Nosotros obtuvimos también el mismo metabolito a partir de este mismo extracto de diclorometano de *Palythoa sp*, y en la misma fracción que el compuesto **60**; se trata del compuesto **61** (**Figura 6.11**). Sus datos de RMN de ^{13}C y ^1H están recogidos en la **Tabla 6.2**.

⁸³ J. Jakupovic, R. N. Baruah, F. Bohlmann, R. M. King y H. Robinson, *Planta Medica*, **1986**, 204.

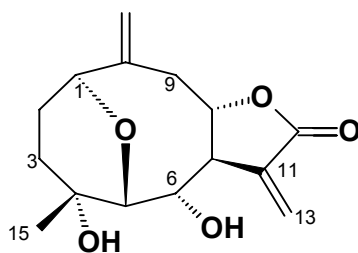
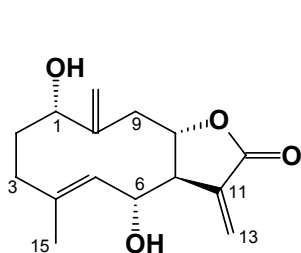
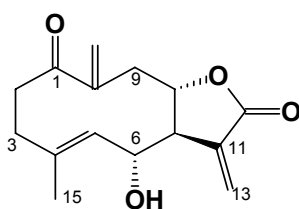
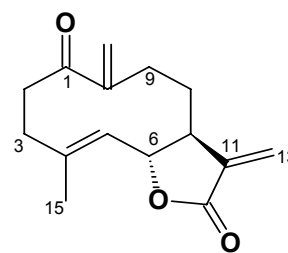
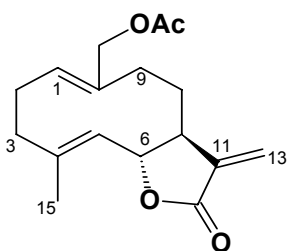
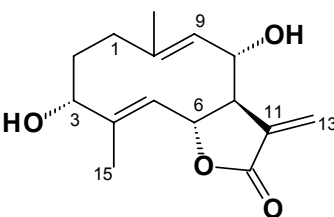
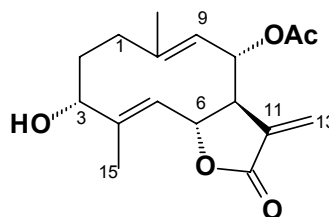


Figura. 6.11.- Compuesto 61

Tabla 6.2.- Datos de RMN (CDCl_3) para el compuesto 61

$n^\circ\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	J (Hz)
1	77.8	4.44	m	-
2	24.4	(α) 1.67 (β) 2.05	m m	- -
3	38.0	(α) 1.67 (β) 2.05	m m	- -
4	70.8	-	-	-
5	77.8	2.86	sa	-
6	72.3	4.22	dd	8.4, 10.3
7	54.8	3.21	ddd	3.5, 9.5, 10.3
8	81.8	4.10	dd	9.5, 12.4
9	42.0	(α) 2.45 (β) 2.95	dd d	12.4, 12.4 12.4
10	145.1	-	-	-
11	127.8	-	-	-
12	169.0	-	-	-
13	121.0	6.02 6.21	d d	3.5 3.5
14	117.5	5.12 5.35	d sa	1.7 -
15	21.7	1.52	s	-

Aislamos e identificamos además otras seis lactonas sesquiterpénicas con esqueleto de germacranólidos que eran idénticas en todo a compuestos previamente encontrados en fuentes terrestres: tanachin (**62**) y su 1-cetoderivado (**63**),⁸⁴ anhidroartemorin (**64**),⁸⁵ *cis-trans*-custunolido-14-acetato (**65**),⁸⁶ tatrudin A (**66**)^{87,88} y chihuahuin (**67**).⁸⁹ En general, tras revisar la bibliografía, no encontramos una asignación completa de las señales de RMN de ^1H y de ^{13}C para las estructuras de estos metabolitos, por tanto y debido a que en nuestro laboratorio se llevó a cabo un estudio exhaustivo de la espectroscopía de estos compuestos, en las **Tablas 6.3** y **6.4** se recogen los datos de RMN de ^{13}C y ^1H , para los metabolitos **62-67**.

Tanachin (**62**)**63**Anhidroartemorin (**64**)*cis-trans*-
Custunolido-14-acetato (**65**)Tatrudin A (**66**)Chihuahuin (**67**)

⁸⁴ F. Bohlmann, J. Jakupovic, M. Ahman y A. Schuster, *Phytochemistry*, **1983**, 22, 1623.

⁸⁵ T. Geissman, *Phytochemistry*, **1970**, 9, 2377.

⁸⁶ P. Kalsi, S. Khurana y K. K. Talwar, *Phytochemistry*, **1985**, 24, 103.

⁸⁷ F. Shafizadeh y N. R. Bhadane, *J. Org. Chem.*, **1972**, 37, 274.

⁸⁸ F. Shafizadeh y N. R. Bhadane, *Phytochemistry*, **1973**, 12, 857.

⁸⁹ W. Renold, H. Yoshioka y T. J. Mabry, *Phytochemistry*, **1970**, 35, 4264.

Tabla 6.3.- Datos de RMN (CDCl₃) para los compuestos **62-64**

n ^o C	Tanachin (62)		63		Anhidroartemorin (64)	
	δ ¹³ C	δ ¹ H	δ ¹³ C	δ ¹ H	δ ¹³ C	δ ¹ H
1	70.4	3.84	203.0	-	204.9	-
2	31.2	(α) 2.17 (β) 2.05	36.5	2.55 3.28	35.3	2.54 3.16
3	34.4	(α) 2.11 (β) 2.26	35.9	2.41 2.55	38.3	2.36 2.54
4	136.0	-	136.8	-	143.0	-
5	131.6	5.05	131.9	5.08	125.3	5.09
6	71.5	4.28	70.1	4.16	81.2	4.33
7	51.9	2.83	50.2	2.74	49.9	2.54
8	79.0	3.97	76.5	3.96	28.1	2.54 (2H)
9	42.0	(α) 2.39 (β) 2.96	40.1	(α) 2.15 (β) 3.42	29.1	1.42 2.24
10	146.7	-	146.3	-	142.4	-
11	137.1	-	135.6	-	136.6	-
12	170.0	-	169.6	-	169.5	-
13	125.7	6.20 6.37	126.2	6.17 6.38	119.2	5.48 6.22
14	115.2	5.12 5.17	125.2	5.79 5.83	123.8	5.66 5.82
15	17.7	1.71	17.3	1.66	17.1	1.76
6-OH	-	1.73				

Tabla 6.4.- Datos de RMN (CDCl₃) para los compuestos 65-67

n ^o C	<i>cis-trans</i> -Custunolide-14-acetato (65)		Tatridin A (66)		Chihuahuin (67)	
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
1	97.6	6.00	35.2	(α) 2.30 (β) 1.93	35.3	(α) 2.30 (β) 1.91
2	31.2	1.79 2.15	27.2	(α) 1.74 (β) 2.00	27.3	(α) 1.76 (β) 2.03
3	37.2	2.31 (2H)	66.7	4.39	66.9	4.40
4	140.7	-	142.2	-	142.9	-
5	123.2	5.18	126.8	5.33	126.4	5.33
6	79.3	4.66	74.0	4.54	74.1	4.62
7	43.9	2.76	52.3	2.80	49.2	3.03
8	25.4	1.69 1.95	71.1	4.47	73.1	5.39
9	31.6	2.14 2.31	129.9	4.99	126.0	4.87
10	157.9	-	135.2	-	137.9	-
11	135.3	-	135.9	-	136.9	-
12	170.1	-	169.3	-	169.1	-
13	118.9	5.46 6.19	123.6	6.21 6.31	122.9	5.75 6.29
14	87.1	4.09 4.20	15.6	1.78	15.6	1.90
15	16.6	1.83	16.7	1.83	16.7	1.83
16 (C=O)	169.6	-	-	-	169.8	-
17 (Me-O-)	21.1	2.09	-	-	21.0	2.09
3-OH	-	-	-	1.47	-	-
8-OH	-	-	-	1.65	-	-

VI.3.2.B.- Derivados de eudesmanólido

El reynosin (**68**) fue el metabolito del que mayor cantidad se obtuvo (2.0 mg). Fue aislado como un sólido amorfo de color blanquecino, y en el espectro de IR muestra una banda característica de la presencia de una γ -lactona a 1768 cm^{-1} .

De la misma manera que el compuesto anterior, su estructura fue también establecida gracias a los espectros de RMN, tanto mono como bidimensionales. El espectro de RMN ^1H (**Figura 6.12**) presenta señales similares a las observadas en el compuesto **60**, por lo que también puede tratarse de una lactona sesquiterpénica. Sin embargo, en este caso, uno de los tres metilenos olefinicos que poseía el compuesto anterior, $\text{H}_2\text{-14}$, aparece aquí como metilo $\text{H}_3\text{-14}$ a δ_{H} 0.82. Además, existen solamente dos señales entre 3 y 4.5 ppm, correspondientes a los protones H-1 a δ_{H} 3.53 y H-6 a δ_{H} 4.03. En la zona de los metilenos aumenta la densidad de señales, con lo que se dificulta su asignación, por tanto, deberemos acudir a los experimentos bidimensionales para poder determinar la estructura de esta molécula.

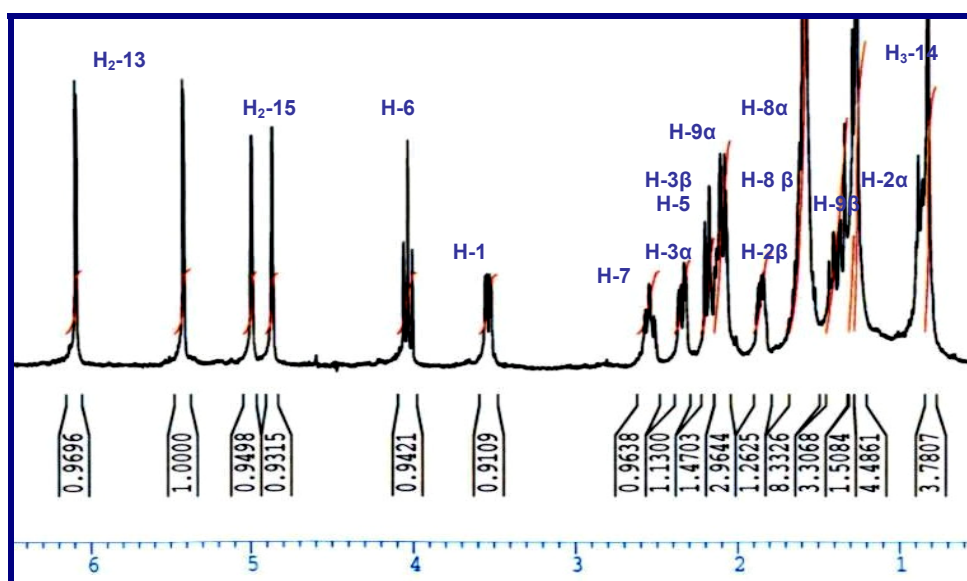


Figura 6.12.- RMN ^1H (400 MHz) de reynosin (**68**)

Nuevamente, se comenzó asignando los protones con las señales que aparecen a campos más bajos, es decir, las de los dos protones del metileno olefínico H₂-13 a δ_{H} 5.42 y 6.09. En el experimento COSY (**Figura 6.13**), estos protones se correlacionan con la señal de H-7 a δ_{H} 2.54 (ddd, $J = 3.1, 10.9$ y 11.2 Hz). A su vez, este protón muestra correlación con H-6 a δ_{H} 4.03 (dd, $J = 10.9$ y 10.9 Hz) y con las dos señales correspondientes a los protones H₂-8, a δ_{H} 2.09 (H-8 α , m) y δ_{H} 1.60 (H-8 β , m). H-6, se correlaciona con H-5 a δ_{H} 2.19 (d, $J = 10.9$ Hz), el cual muestra conectividad con el otro metileno olefínico existente en la molécula, H₂-15, y cuyas señales aparecen a δ_{H} 4.87 (d, $J = 1.0$ Hz) y δ_{H} 4.99 (sa). A su vez, los protones H₂-15 muestran conectividad con el protón H-3 α a δ_{H} 2.14 que nos lleva al H-3 β a δ_{H} 2.34 (ddd, $J = 1.0, 5.1$ y 13.8 Hz) y a los dos H₂-2 a δ_{H} 1.85 y 1.57. Estos dos protones son los únicos que muestran correlación con la señal de H-1 a δ_{H} 3.53 (dd, $J = 4.5$ y 11.5 Hz). Difícilmente se aprecia conexión entre los protones H₂-8 y los H₂-9, situados a δ_{H} 1.36 (H-9 α , ddd, $J = 3.9, 13.1$ y 13.1 Hz) y δ_{H} 2.10 (H-9 β , m). A su vez, se observa una ligera correlación entre H-9 α y los protones H₃-14 pertenecientes al metilo situado a δ_{H} 0.82. A partir de aquí, tendremos que acudir al experimento de HMBC para completar la estructura y saber si se trata de un único ciclo, de varios, o de una cadena lineal. En la **Figura 6.14** se muestran en rojo las conectividades observadas en el experimento COSY.

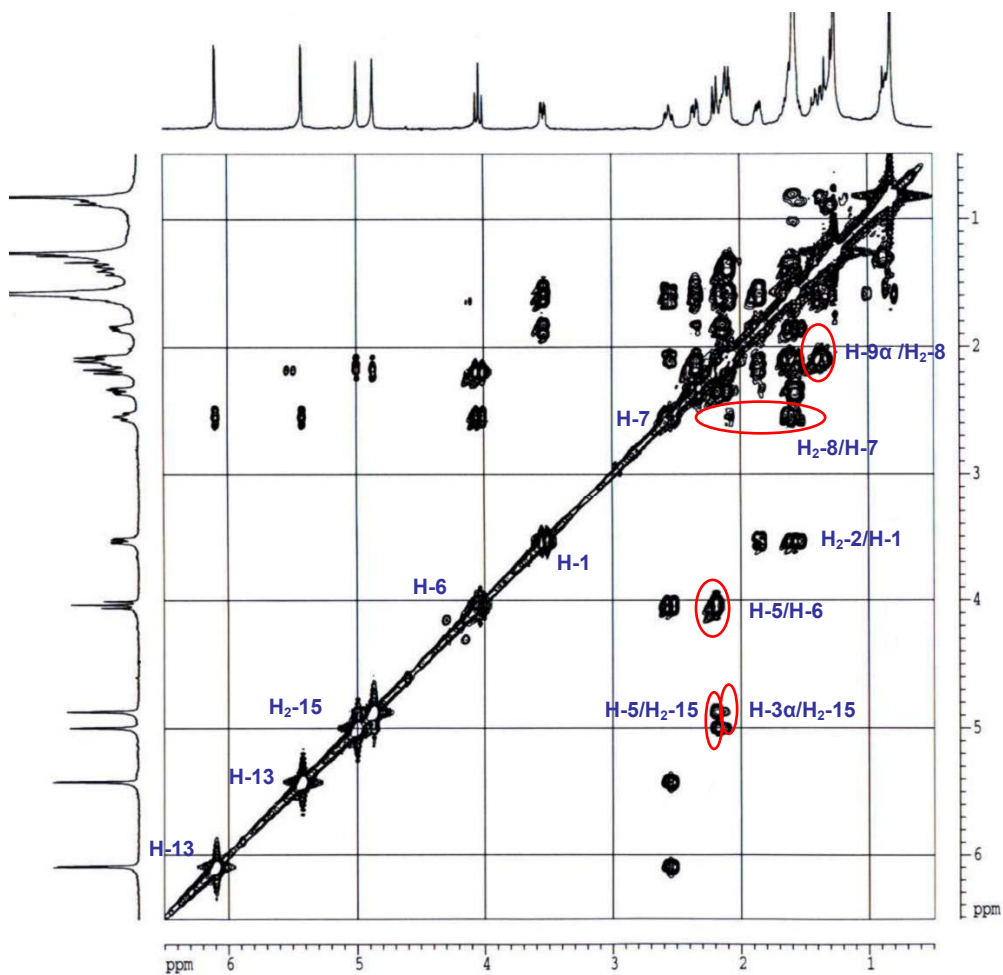


Figura 6.13.- COSY (400 MHz) de reynosin (**68**). Mediante círculos rojos se señalan las conectividades observadas más representativas

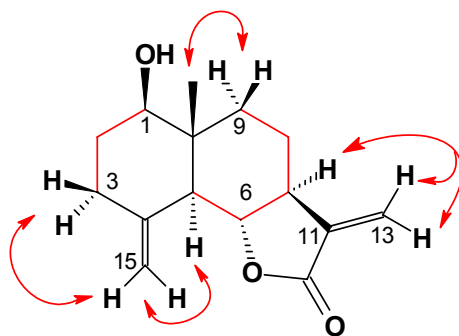


Figura 6.14.- Conectividades observadas para el reynosin (**68**) en el experimento COSY, señaladas mediante flechas y enlaces de color rojo

El HSQC de este compuesto nos permitió establecer los desplazamientos de once carbonos, como se muestra en la **Figura 6.15**.

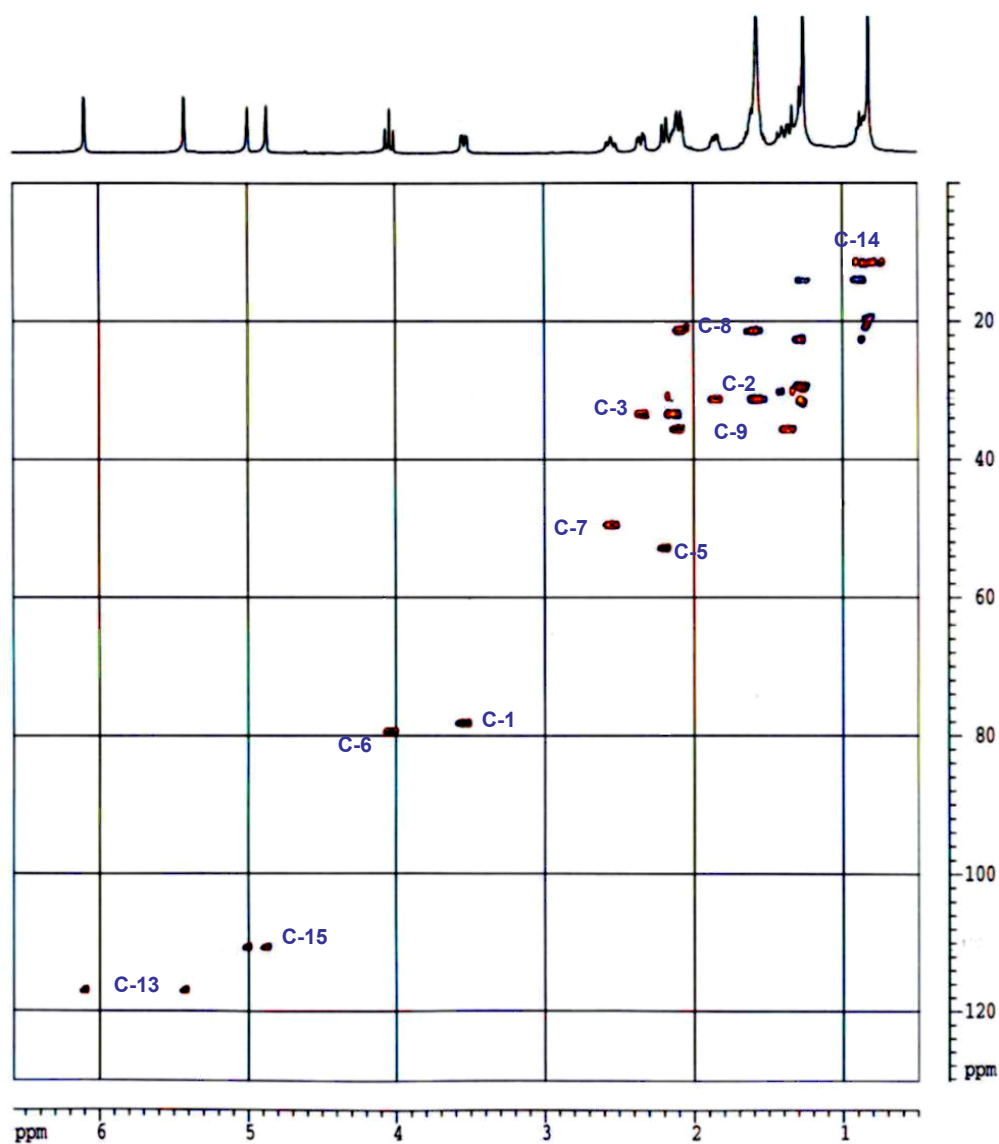


Figura 6.15.- HSQC (400 MHz) de reynosin (68)

Los carbonos cuaternarios de la molécula, fueron definidos en base a las conectividades observadas en el HMBC (**Figura 6.16**). Así, en este experimento, se aprecian correlaciones entre los protones del metileno olefínico H₂-13 con el carbono C-12 a δ_C 170.5, y con el carbono C-11 a δ_C 139.1. El otro metileno olefínico de este compuesto, H₂-15, nos permitió establecer el desplazamiento del carbono C-4 a δ_C 142.3, gracias a la conexión existente entre ellos. El último carbono cuaternario de este metabolito, C-10, aparece a δ_C 42.9, pues existe correlación con los protones del metilo H₃-14. Estos protones a su vez, muestran conectividades con los carbonos C-9, C-10, C-5 y C-1. El carbono C-10, por su parte muestra además de con el metilo H₃-14, conectividades con los protones H-5 y H₂-9, por lo que debe ser el carbono cuaternario mediante el cual se unan C-9, C-1 y C-5, así como el metilo C-14. Este dato fue confirmado gracias a la conectividad que ayudó a completar la estructura de la molécula, la existente entre el carbono C-9 y el protón H-1 (señalada mediante un círculo verde en la **Figura 6.16**). Todas estas correlaciones se muestran en la **Figura 6.17**, donde se muestra la estructura para este compuesto que presenta un esqueleto de eudesmanólido.

Todos los datos de RMN de ¹³C y ¹H aparecen recogidos en la **Tabla 6.5**.

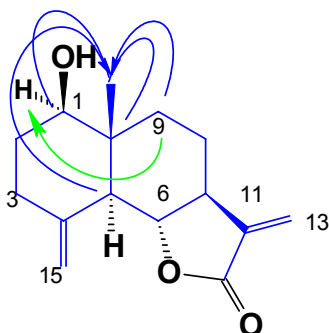


Figura 6.17.- Señaladas mediante enlaces y flechas de color azul se muestran las conectividades observadas en el experimento HMBC del reynosin (**68**)

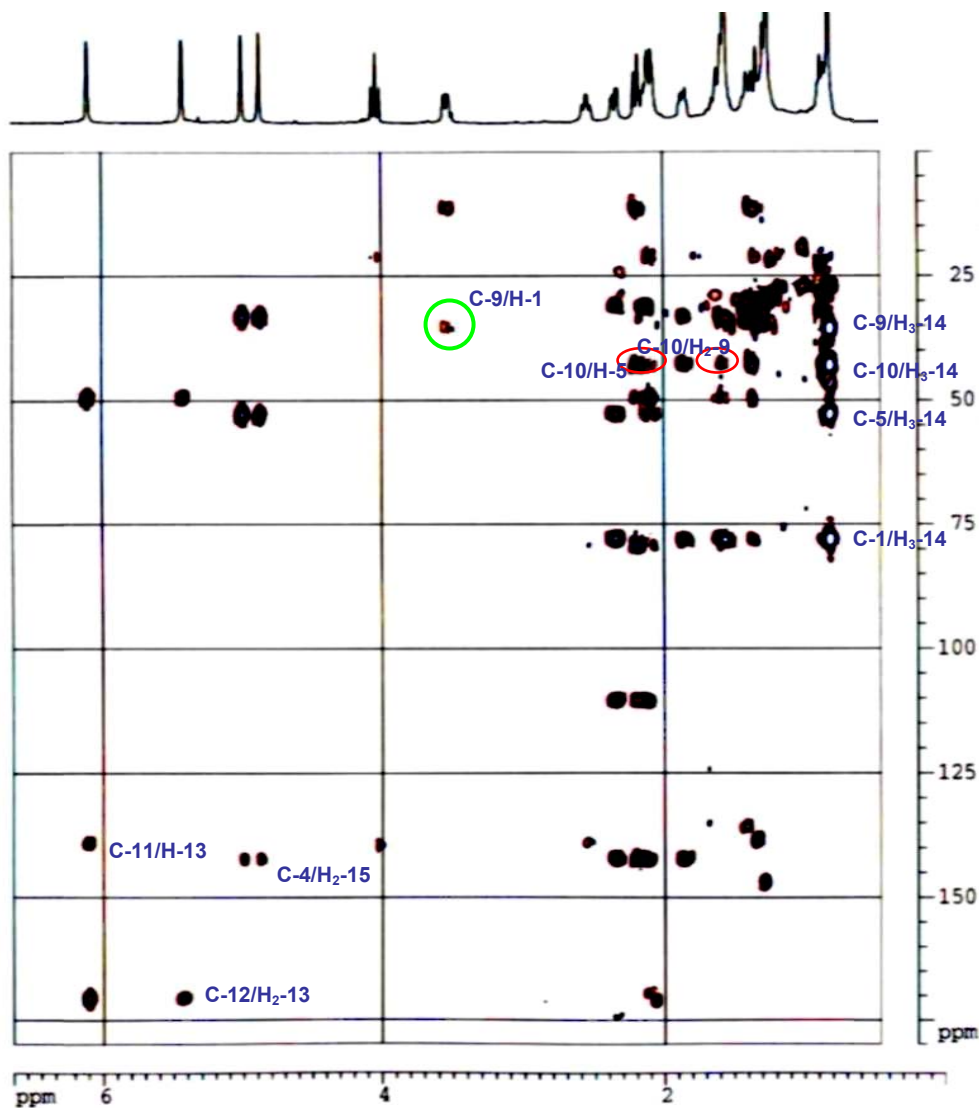


Figura 6.16.- HMBC (400 MHz) de reynosin (**68**). Se señala mediante un círculo de color verde la conectividad más significativa gracias a la cual se pudo establecer la estructura de este metabolito

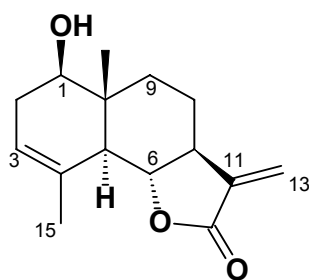
Tabla 6.5.- Datos de RMN (CDCl₃) para el reynosin (**68**)

n ^o C	δ ¹³ C	δ ¹ H	Multiplicidad	J (Hz)
1	78.1	3.53	dd	4.5, 11.5
2	31.2	(α) 1.85 (β) 1.57	m m	- -
3	33.5	(α) 2.14 (β) 2.34	m ddd	- 1.0, 5.1, 13.8
4	142.3	-	-	-
5	52.9	2.19	d	10.9
6	79.6	4.03	dd	10.9, 10.9
7	49.4	2.54	ddd	3.1, 10.9, 11.2
8	21.4	(α) 2.09 (β) 1.60	m m	- -
9	35.5	(α) 1.36 (β) 2.10	ddd m	3.9, 13.1, 13.1 -
10	42.9	-	-	-
11	139.1	-	-	-
12	170.5	-	-	-
13	117.0	5.42 6.09	d d	3.1 3.1
14	11.6	0.82	s	-
15	110.1	4.87 4.99	d sa	1.0 -

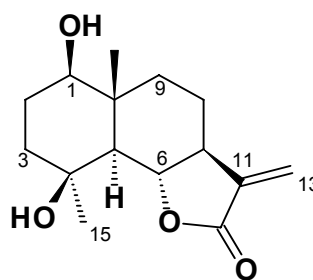
Este compuesto había sido aislado e identificado previamente como reynosin (**68**)⁹⁰ por Mabry y col. de *Ambrosia confertiflora* (Compositae) en 1970. Con el mismo esqueleto obtuvimos en el mismo extracto de *Palythoa sp.*, dos nuevos compuestos que fueron identificados como santamarine (**69**), encontrado previamente también por Mabry y col.⁸⁹, y 4-*epi*-arbusculin-A (**70**),⁹¹ aislado de *Frullania tamarisci subs. obscura* (hepaticae), en 1975 por Aratani y col. Los datos de RMN de ¹³C y ¹H, tal y como los establecimos en nuestro laboratorio, para estos dos compuestos, están recogidos en la **Tabla 6.6**.

⁹⁰ H. Yoshioka, W. Renold, H. Fischer, A. Higo y T. J. Mabry, *Phytochemistry*, **1970**, 9, 823.

⁹¹ Y. Asakawa, G. Ourisson y Y. Aratani, *Tetrahedron Lett.*, **1975**, 45, 3957.



Santamarine (69)

4-*epi*-Arbusculin-A (70)Tabla 6.6.- Datos de RMN (CDCl₃) para santamarine (69) y 4-*epi*-arbusculin-A (70)

n ^o C	Santamarine (69)		4- <i>epi</i> -Arbusculin-A (70)	
	δ ¹³ C	δ ¹ H	δ ¹³ C	δ ¹ H
1	75.0	3.68	78.3	3.46
2	32.8	(α) 1.97 (β) 2.40	28.5	(α) 1.64 (β) 1.76
3	21.2	5.35	38.0	(α) 1.64 (β) 1.81
4	133.1	-	71.9	-
5	51.2	2.35	57.1	1.86
6	81.2	3.95	80.8	4.12
7	51.0	2.50	50.7	2.60
8	21.2	(α) 2.10 (β) 1.67	22.0	(α) 2.02 (β) 1.57
9	34.4	(α) 1.31 (β) 2.06	39.1	(α) 1.30 (β) 2.01
10	40.5	-	42.1	-
11	138.5	-	138.9	-
12	170.6	-	171.3	-
13	116.7	5.41 6.08	118.0	5.46 6.13
14	11.0	0.88	13.9	0.98
15	23.2	1.84	24.1	1.37
1-OH	-	1.41	-	-
4-OH	-	-	-	3.09

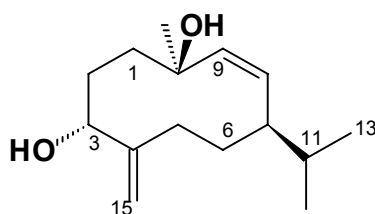
VI.3.2.C.- Nephthediol (71)

Un último compuesto fue aislado de este extracto de diclorometano de la especie marina *Palythoa sp.*, el sesquiterpeno citotóxico nephthediol (71), cuyos datos de RMN de ^{13}C y ^1H se muestran en la **Tabla 6.7**. Este fue el único de esta serie de compuestos que había sido previamente aislado de fuentes marinas, el coral blando *Nephthea sp.*,⁹² en 1987, por Kyogoku y col.

Tabla 6.7.- Datos de RMN (CDCl_3) para nephthediol (71)

n°C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	J (Hz)
1	38.5	1.43	m	-
		1.84	m	-
2	28.3	1.62	m	-
		1.93	m	-
3	78.3	3.94	d	8.7
4	151.1	-	-	-
5	28.2	1.82	m	-
		2.25	dd	12.0, 12.8
6	29.5	1.55	m	-
		1.96	m	-
7	49.7	1.87	m	-
8	130.0	5.30	dd	9.5, 10.2
9	137.4	5.22	d	10.2
10	72.3	-	-	-
11	32.3	1.50	dd	6.7, 6.7
12	20.6	0.89	d	6.7
13	20.5	0.84	d	6.7
14	23.9	1.27	s	-
15	111.4	4.90	s	-
		5.13	s	-

⁹² I. Kitagawa, Z. Cui, B. W. Son, M. Kobayashi y Y. Kyogoku, *Chem. Pharm. Bull.*, **1987**, 35, 124.

**Nepthediol (71)**

La presencia de sesquiterpenos guaiano o eudesmano es normal en celentéreos, sin embargo, éste es el primer caso de lactonas sesquiterpénicas aisladas de un organismo de esta clase, idénticas en todo a conocidos metabolitos de origen terrestre. Se ha sugerido que los invertebrados marinos poseen un elevado porcentaje de productos naturales, pertenecientes a una gran variedad de simbiontes asociados a ellos, lo que significa que dichos simbiontes podrían ser realmente los responsables de su producción. Las interacciones entre huéspedes y simbiontes son poco entendidas en general, por lo que sería necesaria una investigación exhaustiva con el fin de entender estos sistemas biológicos, así como el origen real y la función de estos metabolitos secundarios.

VI.4.- PARTE EXPERIMENTAL

VI.4.1.- TÉCNICAS EXPERIMENTALES GENERALES

VI.4.1.A.- Resonancia magnética nuclear

Para la realización de los experimentos de RMN, los productos fueron disueltos en CDCl_3 , usando TMS como referencia interna. Dichos espectros, tanto de ^1H como de ^{13}C , fueron realizados en espectrómetros BRUKER® AVANCE 300 y 400 MHz según las necesidades. Se utilizaron los programas ^1H , ^{13}C , COSY, HMBC, HSQC y ROESY, que fueron suministrados por la casa BRUKER®. Los datos de adquisición obtenidos en el espectrómetro fueron procesados usando el programa XWIN-NMR.

VI.4.1.B.- Infrarrojo

Los espectros de IR fueron realizados usando el producto seco en células de NaCl de 4 mm. Se utilizó un espectrofotómetro BRUKER®, modelo IFS 55 (F.T.I.R.).

VI.4.1.C.- Rotación óptica

Las determinaciones de las actividades ópticas se realizaron en un polarímetro PERKIN-ELMER®, modelo 241, a 25 °C, usando la línea D del sodio y en disolución de cloroformo seco, usando células de 1mL.

VI.4.1.D.- Cromatografía de gel-filtración

Para este tipo de cromatografía se usó como soporte Sephadex LH-20, de PHARMACIA FINE CHEMICALS®, y las columnas se montaron siguiendo las instrucciones del fabricante. La mezcla de eluyente utilizada fue cloroformo:metanol:n-hexano (1:1:2).

VI.4.1.E.- Cromatografía en columna

Las cromatografías de los productos se llevaron a cabo en columnas preempaquetadas LOBAR® GRÖBE B (310-25) LICHROPREP RP 18 (40-63 μm)

de la casa MERCK® y bombas de media presión de la casa FLUID METERING®, modelo RP-SY.

VI.4.1.F.- Cromatografía HPLC

En este tipo de cromatografía se utilizó un sistema de HPLC compuesto por una bomba HPLC LKB®, modelo 2248, con una columna μ -Porasil (D.I. 1.9 cm, longitud 15 cm) usando un detector de fotodiodo 2MD RAPID SPECTRAL, LKB®.

VI.4.1.G.- Cromatografía en capa fina

La evolución de las cromatografías en columna se siguió mediante cromatografía en capa fina con placas de la casa MERCK®, tipo TLC AL, silica gel 60 F₂₅₄. Para el revelado se siguieron diversos procedimientos:

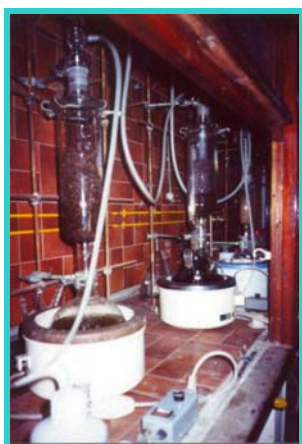
- a) Pulverización sobre la placa de una disolución de H₂SO₄:H₂O:AcOH (1:4:20) y posterior calentamiento a 140 °C.
- b) Pulverización sobre la placa de una disolución de vainillina (3 g): AcOH (40 mL): H₂SO₄ (30 mL): EtOH (450 mL) y posterior calentamiento a 140 °C.
- c) Visualización de la placa a la exposición de luz UV (360 nm).

Las placas fueron eluidas, generalmente, en sistemas formados por mezclas de n-hexano:acetato de etilo.

VI.4.2.- RECOLECCIÓN Y EXTRACCIÓN DEL CELENTÉREO *PALYTHOA SP*

La recolección del celentéreo fue llevada a cabo en el Caletón Blanco, Órzola, en la isla de Lanzarote, durante el mes de octubre de 2000. La recolección se realizó a mano durante la bajamar, tras la cual se congeló la muestra hasta que pudo ser llevada a nuestro laboratorio, donde fue macerada a temperatura ambiente con acetona hasta agotamiento. La evaporación del disolvente procuró

un extracto pardo de 60 g. A continuación se repitió el proceso con metanol, también a temperatura ambiente. Este extracto de 15 g era de color verde oscuro.



Por último, el celentéreo doblemente extraído, se secó al aire y se trituró. La última extracción se llevó a cabo en un soxhlet (**Figura 6.18**) con diclorometano, de donde se obtuvo un extracto amarillento de 250 mg tras evaporación.

Figura 6.18.- *Palythoa sp* triturada, extrayéndose con diclorometano en un sistema soxhlet

VI.4.3.- MARCHA CROMATOGRÁFICA DEL EXTRACTO Y DATOS FÍSICOS DE LOS COMPUESTOS

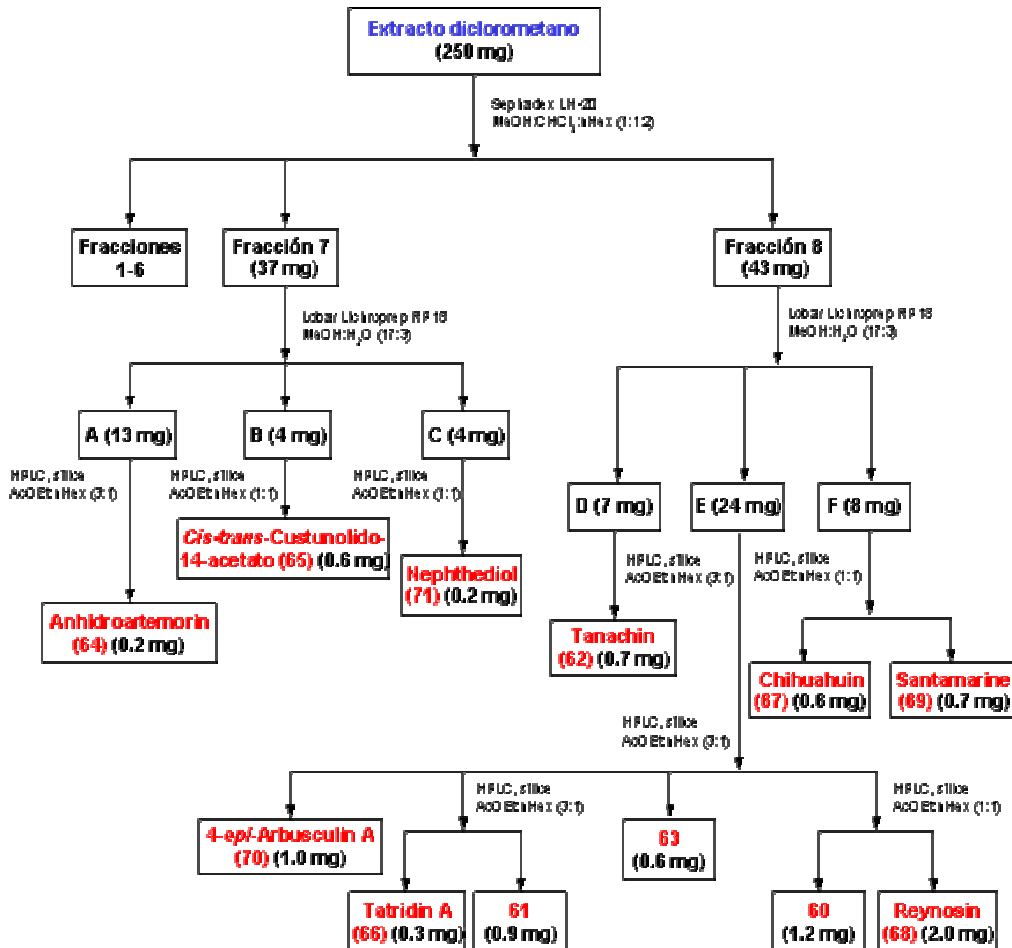
El extracto de diclorometano presentó una actividad citotóxica notable (IC_{50} 0.02 $\mu\text{g/mL}$), muy superior a las observadas en los demás extractos, y por tanto, fue el elegido como objeto de estudio.

Los 250 mg de extracto fueron cromatografiados dando lugar a ocho fracciones, en una columna de Sephadex LH-20 de 1 cm de D.I. x 40 cm de longitud, que se preparó dejando en maceración con metanol durante un día, 60 g de fase estacionaria. La columna se estabilizó con el eluyente que se utilizaría como fase móvil, cloroformo:metanol:n-hexano (1:1:2).

Después de la evaporación del disolvente, los residuos obtenidos de las fracciones 7 y 8, se cromatografiaron cada uno de ellos en una columna de fase reversa Lobar Lichroprep RP 18, usando como eluyente en ambos casos la mezcla MeOH:H₂O (17:3).

Para la purificación de los compuestos se utilizó en todos los casos cromatografía HPLC, con columna μ -Porasil de gel de sílice usando como eluyente distintas proporciones de la mezcla AcOEt:n-Hex según las necesidades. Como resultado de estas cromatografías se obtuvo una serie de doce sesquiterpenos con distintos esqueletos carbonados (60-71).⁸³⁻⁹²

En el **Esquema 6.1** se muestra el esquema cromatográfico seguido.



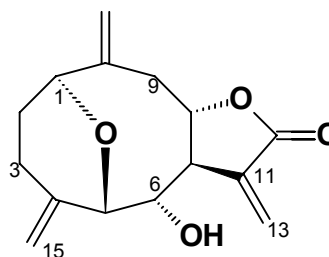
Esquema 6.1.- Esquema cromatográfico del extracto de diclorometano de *Palythoa* sp.

DATOS FÍSICOS Y ESPECTROSCÓPICOS DE 60

$[\alpha]^{25} = +60.0$ (c 0.12, CHCl₃)

IR ν_{\max} : 3457, 2918, 2850, 1762, 1661, 1436 cm⁻¹

RMN ¹³C y RMN ¹H (CDCl₃):



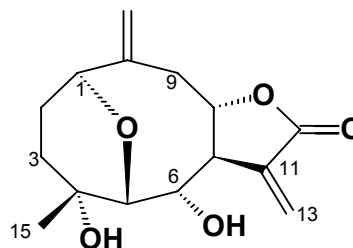
n°C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	J (Hz)
1	75.4	4.46	dd	5.1, 5.7
2	26.9	(α) 1.78 (β) 2.26	dddd dddd	2.6, 5.0, 5.3, 15.7 2.6, 5.1, 5.7, 15.7
3	28.1	(α) 2.46 (β) 2.35	m ddd	5.0, 5.3, 15.7
4	144.2	-	-	-
5	73.0	3.49	sa	-
6	72.3	4.20	ddd	2.3, 6.8, 7.9
7	53.6	3.32	ddd	3.5, 7.9, 10.4
8	81.6	4.06	dd	10.4, 10.5
9	42.8	(α) 2.96 (β) 2.62	d dd	12.7 10.5, 12.7
10	149.9	-	-	-
11	139.2	-	-	-
12	169.2	-	-	-
13	121.4	6.07 6.24	d d	3.5 3.5
14	117.6	5.13 5.38	d sa	2.0 -
15	107.1	4.95 4.98	sa d	- 1.9
6-OH	-	2.03	d	6.8

DATOS FÍSICOS Y ESPECTROSCÓPICOS DE 61

$[\alpha]^{25} = -12.2$ (c 0.09, CHCl_3)

IR ν_{max} : 3362, 2921, 2851, 1766, 1660, 1455 cm^{-1}

RMN ^{13}C y RMN ^1H (CDCl_3):



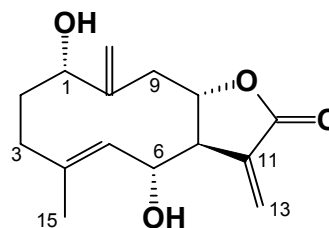
n ^o C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	J (Hz)
1	77.8	4.44	m	-
2	24.4	(α) 1.67 (β) 2.05	m m	- -
3	38.0	(α) 1.67 (β) 2.05	m m	- -
4	70.8	-	-	-
5	77.8	2.86	sa	-
6	72.3	4.22	dd	8.4, 10.3
7	54.8	3.21	ddd	3.5, 9.5, 10.3
8	81.8	4.10	dd	9.5, 12.4
9	42.0	(α) 2.45 (β) 2.95	dd d	12.4, 12.4 12.4
10	145.1	-	-	-
11	127.8	-	-	-
12	169.0	-	-	-
13	121.0	6.02 6.21	d d	3.5 3.5
14	117.5	5.12 5.35	d sa	1.7 -
15	21.7	1.52	s	-

DATOS FÍSICOS Y ESPECTROSCÓPICOS DE TANACHIN (62)

$[\alpha]^{25} = 0$ (c 0.07, CHCl₃)

IR ν_{max} : 3390, 2925, 2855, 1756, 1659, 1446 cm⁻¹

RMN ¹³C y RMN ¹H (CDCl₃):



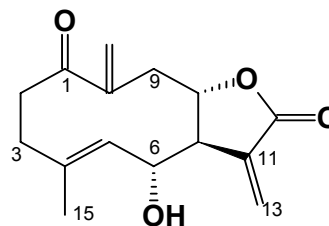
n ^o C	δ ¹³ C	δ ¹ H	Multiplicidad	J (Hz)
1	70.4	3.84	m	-
2	31.2	(α) 2.17 (β) 2.05	m ddd	- 3.8, 8.8, 8.8
3	34.4	(α) 2.11 (β) 2.26	m ddd	- 3.3, 5.5, 8.8
4	136.0	-	-	-
5	131.6	5.05	d	10.0
6	71.5	4.28	ddd	3.3, 10.0, 10.0
7	51.9	2.83	ddd	3.0, 6.5, 10.0
8	79.0	3.97	m	-
9	42.0	(α) 2.39 (β) 2.96	dd d	10.3, 14.0 14.0
10	146.7	-	-	-
11	137.1	-	-	-
12	170.0	-	-	-
13	125.7	6.20 6.37	d d	3.0 3.0
14	115.2	5.12 5.17	sa sa	- -
15	17.7	1.71	s	-
6-OH	-	1.73	d	3.3

DATOS FÍSICOS Y ESPECTROSCÓPICOS DE 63

$[\alpha]^{25} = -23.3$ (c 0.06, CHCl_3)

IR ν_{max} : 3444, 2922, 2851, 1758, 1672, 1443 cm^{-1}

RMN ^{13}C y RMN ^1H (CDCl_3):



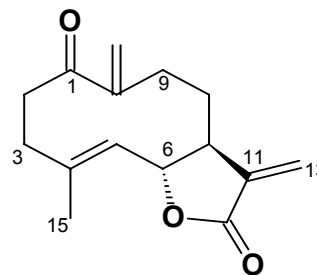
n ^o C	δ ^{13}C	δ ^1H	Multiplicidad	J (Hz)
1	203.0	-	-	-
2	36.5	2.55	m	-
3	35.9	3.28	ddd	5.4, 5.4, 8.6
		2.41	ddd	5.4, 5.6, 8.6
		2.55	m	-
4	136.8	-	-	-
5	131.9	5.08	d	10.3
6	70.1	4.16	ddd	3.0, 10.3, 10.3
7	50.2	2.74	ddd	2.0, 9.7, 10.3-
8	76.5	3.96	m	-
9	40.1	(α) 2.15	dd	11.7, 11.7
		(β) 3.42	d	11.7
10	146.3	-	-	-
11	135.6	-	-	-
12	169.6	-	-	-
13	126.2	6.17	d	2.0
		6.38	d	2.0
14	125.2	5.79	d	1.8
		5.83	sa	-
15	17.3	1.66	s	-

DATOS FÍSICOS Y ESPECTROSCÓPICOS DE ANHIDROARTEMORIN (64)

$[\alpha]^{25} = +60.0$ (c 0.02, CHCl_3)

IR ν_{max} : 2924, 2852, 1765, 1712, 1668, 1454 cm^{-1}

RMN ^{13}C y RMN ^1H (CDCl_3):



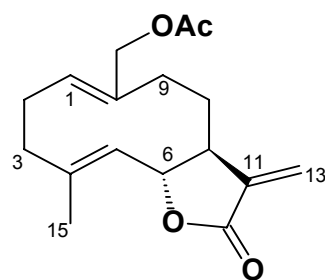
$n^\circ\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	J (Hz)
1	204.9	-	-	-
2	35.3	2.54	m	-
		3.16	m	-
3	38.3	2.36	ddd	2.9, 8.7, 9.3
		2.54	m	-
4	143.0	-	-	-
5	125.3	5.09	d	10.0
6	81.2	4.33	dd	9.7, 10.0
7	49.9	2.54	m	-
8	28.1	2.54 (2H)	m	-
9	29.1	1.42	m	-
		2.24	m	-
10	142.4	-	-	-
11	136.6	-	-	-
12	169.5	-	-	-
13	119.2	5.48	d	3.5
		6.22	d	3.5
14	123.8	5.66	s	-
		5.82	s	-
15	17.1	1.76	s	-

DATOS FÍSICOS Y ESPECTROSCÓPICOS DE *CIS-TRANS-CUSTUNOLIDO-14-ACETATO* (65)

$[\alpha]^{25} = +38.3$ (c 0.06, CHCl_3)

IR ν_{max} : 2925, 2852, 2360, 1766, 1667, 1445 cm^{-1}

RMN ^{13}C y RMN ^1H (CDCl_3):



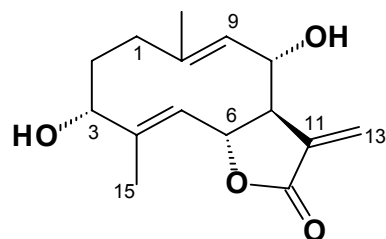
n ^o C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	J (Hz)
1	97.6	6.00	d	9.2
2	31.2	1.79	m	-
		2.15	m	-
3	37.2	2.31 (2H)	m	-
4	140.7	-	-	-
5	123.2	5.18	d	9.5
6	79.3	4.66	dd	9.5, 9.5
7	43.9	2.76	dddd	3.2, 5.8, 5.9, 9.5
8	25.4	1.69	m	-
		1.95	m	-
9	31.6	2.14	m	-
		2.31	m	-
10	157.9	-	-	-
11	135.3	-	-	-
12	170.1	-	-	-
13	118.9	5.46	d	3.2
		6.19	d	3.2
14	87.1	4.09	d	3.0
		4.20	d	3.0
15	16.6	1.83	s	-
16 (C=O)	169.6	-	-	-
17 (Me-O-)	21.1	2.09	s	-

DATOS FÍSICOS Y ESPECTROSCÓPICOS DE TATRIDIN A (66)

$[\alpha]^{25} = -33.3$ (c 0.03, CHCl_3)

IR ν_{max} : 3363, 2918, 2849, 2360, 1759, 1666 cm^{-1}

RMN ^{13}C y RMN ^1H (CDCl_3):



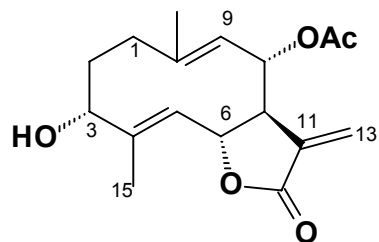
$n^\circ\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	J (Hz)
1	35.2	(α) 2.30	dd	6.1, 11.6
		(β) 1.93	dd	6.1, 11.6
2	27.2	(α) 1.74	m	-
		(β) 2.00	dd	6.2, 12.0
3	66.7	4.39	m	-
4	142.2	-	-	-
5	126.8	5.33	d	10.2
6	74.0	4.54	dd	9.4, 10.2
7	52.3	2.80	ddd	3.1, 9.4, 10.3
8	71.1	4.47	dd	3.4, 10.3
9	129.9	4.99	d	10.3
10	135.2	-	-	-
11	135.9	-	-	-
12	169.3	-	-	-
13	123.6	6.21	d	3.1
		6.31	d	3.1
14	15.6	1.78	s	-
15	16.7	1.83	s	-
3-OH	-	1.47	d	3.0
8-OH	-	1.65	d	3.4

DATOS FÍSICOS Y ESPECTROSCÓPICOS DE CHIHUAHUIN (67)

$[\alpha]^{25} = -26.7$ (c 0.06, CHCl_3)

IR ν_{max} : 3374, 2918, 2850, 1771, 1667, 1438 cm^{-1}

RMN ^{13}C y RMN ^1H (CDCl_3):



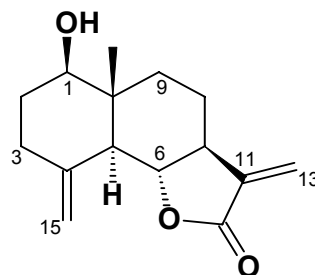
$n^\circ\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	J (Hz)
1	35.3	(α) 2.30 (β) 1.91	dd m	6.7, 12.3 -
2	27.3	(α) 1.76 (β) 2.03	dd dd	6.7, 12.1 6.7, 12.1
3	66.9	4.40	m	-
4	142.9	-	-	-
5	126.4	5.33	d	9.7
6	74.1	4.62	dd	9.4, 9.7
7	49.2	3.03	dd	9.4, 9.9
8	73.1	5.39	dd	9.9, 10.6
9	126.0	4.87	d	10.6
10	137.9	-	-	-
11	136.9	-	-	-
12	169.1	-	-	-
13	122.9	5.75 6.29	d d	3.3 3.3
14	15.6	1.90	s	-
15	16.7	1.83	s	-
16 (C=O)	169.8	-	-	-
17 (Me-O-)	21.0	2.09	s	-

DATOS FÍSICOS Y ESPECTROSCÓPICOS DE REYNOSIN (68)

$[\alpha]^{25} = +82.0$ (c 0.20, CHCl_3)

IR ν_{max} : 3454, 2928, 2851, 1768, 1460, 1413 cm^{-1}

RMN ^{13}C y RMN ^1H (CDCl_3):



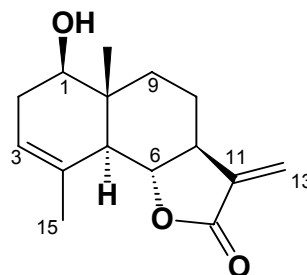
$n^\circ\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	J (Hz)
1	78.1	3.53	dd	4.5, 11.5
2	31.2	(α) 1.85 (β) 1.57	m m	- -
3	33.5	(α) 2.14 (β) 2.34	m ddd	- 1.0, 5.1, 13.8
4	142.3	-	-	-
5	52.9	2.19	d	10.9
6	79.6	4.03	dd	10.9, 10.9
7	49.4	2.54	ddd	3.1, 10.9, 11.2
8	21.4	(α) 2.09 (β) 1.60	m m	- -
9	35.5	(α) 1.36 (β) 2.10	ddd m	3.9, 13.1, 13.1 -
10	42.9	-	-	-
11	139.1	-	-	-
12	170.5	-	-	-
13	117.0	5.42 6.09	d d	3.1 3.1
14	11.6	0.82	s	-
15	110.1	4.87 4.99	d sa	1.0 -

DATOS FÍSICOS Y ESPECTROSCÓPICOS DE SANTAMARINE (69)

$[\alpha]^{25} = +68.6$ (c 0.07, CHCl_3)

IR ν_{max} : 3347, 2918, 2848, 1762, 1439, 1412 cm^{-1}

RMN ^{13}C y RMN ^1H (CDCl_3):



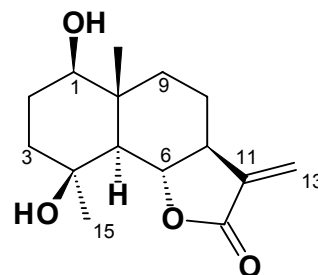
n°C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	J (Hz)
1	75.0	3.68	ddd	5.0, 6.0, 10.0
2	32.8	(α) 1.97 (β) 2.40	m m	- -
3	21.2	5.35	d	2.7
4	133.1	-	-	-
5	51.2	2.35	d	11.0
6	81.2	3.95	dd	11.0, 11.0
7	51.0	2.50	ddd	3.2, 11.0, 12.8
8	21.2	(α) 2.10 (β) 1.67	dddd dddd	3.9, 3.9, 6.4, 12.9 3.4, 12.8, 12.8, 12.9
9	34.4	(α) 1.31 (β) 2.06	ddd ddd	3.9, 12.9, 12.9 4.0, 6.4, 12.9
10	40.5	-	-	-
11	138.5	-	-	-
12	170.6	-	-	-
13	116.7	5.41 6.08	d d	3.2 3.2
14	11.0	0.88	s	-
15	23.2	1.84	s	-
1-OH	-	1.41	d	5.0

DATOS FÍSICOS Y ESPECTROSCÓPICOS DE 4-EPI-ARBUSCULIN A (70)

$[\alpha]^{25} = +15.0$ (c 0.10, CHCl_3)

IR ν_{max} : 3418, 2931, 2871, 1769, 1460, 1411 cm^{-1}

RMN ^{13}C y RMN ^1H (CDCl_3):



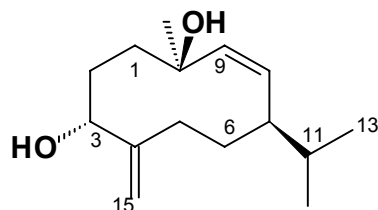
$n^\circ\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	J (Hz)
1	78.3	3.46	m	-
2	28.5	(α) 1.64 (β) 1.76	m dd	- 5.3, 12.0
3	38.0	(α) 1.64 (β) 1.81	m dd	- 3.0, 12.0
4	71.9	-	-	-
5	57.1	1.86	d	11.5
6	80.8	4.12	dd	11.5, 11.5
7	50.7	2.60	dddd	3.1, 3.3, 11.5, 11.5
8	22.0	(α) 2.02 (β) 1.57	ddd m	3.3, 11.5, 13.0 -
9	39.1	(α) 1.30 (β) 2.01	m ddd	- 3.3, 3.3, 13.0
10	42.1	-	-	-
11	138.9	-	-	-
12	171.3	-	-	-
13	118.0	5.46 6.13	d d	3.1 3.1
14	13.9	0.98	s	-
15	24.1	1.37	s	-
4-OH	-	3.09	s	-

DATOS FÍSICOS Y ESPECTROSCÓPICOS DE NEPHTEDIOL (71)

$[\alpha]^{25} = -70.0$ (c 0.02, CHCl_3)

IR ν_{max} : 3314, 2927, 2869, 1723, 1670, 1454 cm^{-1}

RMN ^{13}C y RMN ^1H (CDCl_3):



n°C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	J (Hz)
1	38.5	1.43	m	-
		1.84	m	-
2	28.3	1.62	m	-
		1.93	m	-
3	78.3	3.94	d	8.7
4	151.1	-	-	-
5	28.2	1.82	m	-
		2.25	dd	12.0, 12.8
6	29.5	1.55	m	-
		1.96	m	-
7	49.7	1.87	m	-
8	130.0	5.30	dd	9.5, 10.2
9	137.4	5.22	d	10.2
10	72.3	-	-	-
11	32.3	1.50	dd	6.7, 6.7
12	20.6	0.89	d	6.7
13	20.5	0.84	d	6.7
14	23.9	1.27	s	-
		5.13	s	-
15	111.4	4.90	s	-
		5.13	s	-

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. De un cultivo a gran escala del dinoflagelado *Prorocentrum lima*, llevado a cabo en nuestro laboratorio, se aislan e identifican 7 nuevos metabolitos: 2',4'-dimetilen-pental okadaato (DTX6, **41**), norokadanona (**42**), metil okadaato (**43**), 3'-hidroxi-2'-metilen-propil okadaato (**44**), 5'-hidroxi-2'-metilen-penta-3'-enil okadaato (**45**), 5',7'-dihidroxi-2',4'-dimetilen-heptil okadaato (**46**) y 5'-hidroperoxi-7'-hidroxi-2',4'-dimetilen-heptil okadaato (**47**); además de ácido okadaico (AO, **1**), dinofisistoxina-1 (DTX1, **2**), y varios ésteres ya conocidos: 7'-hidroxi-4'-metil-2'-metilen-hepta-4'-enil okadaato (**13**), 7'-hidroxi-2'-metil-hepta-2',4'-dienil okadaato (**11**) y 7'-hidroxi-2',4'-dimetil-hepta-2',4'-dienil okadaato (**12**).
2. Debido a la importancia que las técnicas de cromatografía líquida asociada a espectrometría de masas están alcanzando en el análisis de toxinas en fitoplancton y mariscos, logrando niveles de detección de parte por billón, a los ésteres obtenidos en este cultivo, tanto los compuestos **11-13** como aquellos aislados por primera vez, **41-47**, se les realizó espectros de LC-MS, estableciéndose las condiciones experimentales para la detección de estas toxinas en muestras contaminadas.
3. Se realiza mediante el cálculo de coeficientes de difusión, **D**, un estudio estructural de una especie denominada DTX1C frente a la toxina DTX1, ambas sustancias obtenidas en la cromatografía del extracto acetónico del *Prorocentrum lima*. El análisis de los datos señala que la DTX1C es el resultado de una mezcla de distintos estados de asociación de la DTX1, en una proporción de agregación superior a la observada en estudios precedentes con el AO.
4. Todos los intentos de obtener un monocristal para la realización de estudios de rayos X con complejos de ácido okadaico tanto con sales de potasio como de plata, resultan infructuosos.

5. Se lleva a cabo un estudio de difracción de rayos X con el ácido okadaico, siendo el primero que se realiza con este políéter sin derivatizar o asociar a proteínas. De dicho estudio se puede concluir que la disposición espacial que adoptan las moléculas en la red cristalina es muy compleja, donde cada molécula está unida mediante puentes de hidrógeno a otras cinco unidades de AO, y que esta disposición es muy semejante a la propuesta realizada por nuestro grupo de investigación sobre el modelo de complejo del AO con K^+ , en las que las unidades del AO se encuentran enfrentadas por las cavidades formadas por los fragmentos C-1–C-26, mientras que el resto de las cadenas carbonadas se encuentran extendidas en el espacio y orientadas en sentidos opuestos.

6. Se estudia el extracto diclorometánico obtenido a partir de especímenes del celentéreo *Palythoa sp* recolectados en una colonia existente en Órzola (Lanzarote), aislándose doce sesquiterpenos con distintos esqueletos carbonados. Además del compuesto citotóxico nephthediol (**71**), aislado previamente de fuente marina, del coral blando *Nephthea sp*, se identificaron una serie de lactonas sesquiterpénicas típicas de fuentes terrestres; ocho germacranólidas: dos ejemplos con puentes éter (**60** y **61**), tanichin (**62**) y su 1-cetoderivado **63**, anhidroartemorin (**64**), *cis-trans*-custonolido-14-acetato (**65**), tatrídriin A (**66**) y chihuahuin (**67**); así como tres eudesmanólidas: reynosin (**68**), santamarine (**69**) y 4-*epi*-arbusculin-A (**70**). Aunque la presencia de sesquiterpenos de esqueleto guaiano o eudesmano no es inusual en celentéreos, sí lo es el aislamiento de lactonas sesquiterpénicas a partir de este tipo de organismos, por lo que no deja de ser sorprendente que resultasen ser idénticas a las aisladas de fuentes terrestres.