

# BIOTECNOLOGÍA DE LAS MICROALGAS MARINAS



## “MARINE MICROALGAE BIOTECHNOLOGY”

**TRABAJO DE FIN DE GRADO  
GRADO EN FARMACIA  
CURSO 2023/24**

Sergio Guedes Pérez  
([alu0101136615@ull.edu.es](mailto:alu0101136615@ull.edu.es))

**Tutora:** María Luisa Souto Suárez  
**Co-Tutora:** Nathália Nocchi

## DATOS REFERIDOS A LA MEMORIA

Número de páginas de la memoria	31
Número de palabras totales de la memoria sin contar resumen, abstract, pie de tablas o figuras y referencias	2976
Número de palabras del resumen	198
Número de palabras del abstract	181

# ÍNDICE

RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	2
1. INTRODUCCIÓN .....	3
1.1 Biotecnología marina.....	3
1.2 Microalgas marinas.....	3
1.2.1 Dinoflagelados .....	4
1.2.2 Género <i>Amphidinium</i> .....	5
2. OBJETIVOS. ....	6
3. MATERIAL Y MÉTODOS. ....	7
3.1 Material biológico. ....	7
3.2 Cultivo y escalado.....	7
3.3 Cosecha y extracción.....	9
3.4 Ensayos de actividad antiproliferativa. ....	11
3.5 Técnicas cromatográficas.....	11
3.5.1 Cromatografía de exclusión molecular. ....	11
3.5.2. Cromatografías líquidas de media y alta resolución.....	12
3.5.3 Cromatografía en capa fina (TLC). ....	13
3.6 Técnicas de elucidación estructural.....	14
3.6.1 Resonancia magnética nuclear (RMN). ....	14
3.6.2 Espectrometría de masas (RM).....	14
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. ....	15
4.1 Estudio bio guiado del extracto celular de AmTF-12. ....	15
4.2 Separación cromatográfica del extracto del medio de cultivo de AmTF-8.....	19
5. Elucidación estructural de los compuestos aislados del extracto del medio de AmTF-8.....	21
6. Conclusiones.....	25
7. Bibliografía.....	26

## RESUMEN

Las microalgas marinas son cruciales como productores primarios debido a su capacidad de realizar fotosíntesis, transformando la luz solar en energía química y produciendo oxígeno. Entre estas microalgas, los dinoflagelados destacan por las sustancias bioactivas que generan, las cuales son de gran interés tanto para la industria farmacéutica como para la alimentaria en el sector pesquero.

Los dinoflagelados del género *Amphidinium* son objeto de creciente interés debido a la gran variedad y cantidad de metabolitos activos que producen y las actividades biológicas que presentan. Recientemente, el grupo de investigación en el que se encuadra esta memoria del trabajo de fin de grado ha realizado una bioprospección de cepas de *Amphidinium* en la isla de Tenerife.

En esta memoria se aborda el estudio del perfil químico de extractos obtenidos del cultivo artificial de dos cepas de *Amphidinium* aisladas en Tenerife (AmTF-8 y AmTF-12) con potencial biotecnológico en la producción de compuestos de alto interés para su uso como patrones en el control toxicológico y como herramientas farmacológicas.

El estudio se llevó a cabo en el grupo de investigación de productos marinos del IUBO-AG en la Universidad de La Laguna.

**Palabras clave:** microalgas, dinoflagelados, *Amphidinium*, aplicaciones biotecnológicas, metabolitos activos, amphidinoles.

## ABSTRACT

Marine microalgae are crucial as primary producers due to their ability to photosynthesise, transforming sunlight into chemical energy and producing oxygen. Among these microalgae, dinoflagellates stand out for the bioactive substances they generate, which are of great interest to both the pharmaceutical and food industries in the fisheries sector.

Dinoflagellates of the genus *Amphidinium* are of increasing interest due to the great variety and quantity of active metabolites they produce and the biological activities they exhibit. Recently, the research group in which this dissertation report is framed has carried out a bioprospecting of *Amphidinium* strains on the island of Tenerife.

This report deals with the study of the chemical profile of extracts obtained from the artificial culture of two strains of *Amphidinium* isolated in Tenerife (AmTF-8 and AmTF-12) with biotechnological potential in the production of compounds of high interest for use as standards in toxicological control and as pharmacological tools.

The study was carried out in the marine products research group of the IUBO-AG at the University of La Laguna.

**Key words:** microalgae, dinoflagellates, *Amphidinium*, biotechnological applications, active metabolites, amphidinols.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Biotecnología marina.

Los océanos cubren más del 70% de la superficie terrestre y albergan una enorme diversidad de especies. De los 35 filos animales identificados taxonómicamente, 34 se encuentran en el medio marino, y muchos de ellos de forma exclusiva. Esta biodiversidad es el resultado de una larga evolución, sometida a las extremas condiciones marinas, que favorecen la producción de una gran variedad de moléculas con estructuras únicas en términos de diversidad, características estructurales y funcionales.

Teniendo en cuenta que se ha explorado menos del 5% de las profundidades marinas (1-2), los recursos marinos constituyen una fuente prometedora de aplicación biotecnológica con gran potencial para lograr nuevos avances en los sectores bioquímico, farmacéutico, cosmético y bioenergético. La Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) define la biotecnología marina como *"la aplicación de nuevas metodologías a los organismos marinos para aumentar la producción de productos del mar, mejorar la seguridad y el control de la proliferación de microorganismos nocivos transmitidos por el agua, desarrollar nuevos medicamentos y cuidados de salud, cosméticos y aplicaciones en la agricultura y productos alimentarios"*(3).

### 1.2 Microalgas marinas

Las microalgas marinas son ideales para producir productos de alto valor y materias primas para energías renovables, debido a su posible cultivo artificial, su adaptabilidad a diversas condiciones externas, su capacidad para producir biomasa sostenible, y la síntesis de compuestos potencialmente bioactivos (4-5).

Las microalgas presentan varias ventajas con respecto a las plantas superiores, como una estructura celular más simple, una elevada productividad de biomasa, una elevada relación superficie celular/volumen, una rápida tasa de crecimiento (100 veces superior a la de las plantas terrestres), una mayor eficiencia fotosintética (tasa de conversión de fotones en biomasa), y la no competitividad de la tierra cultivable y los recursos hídricos (6-7).

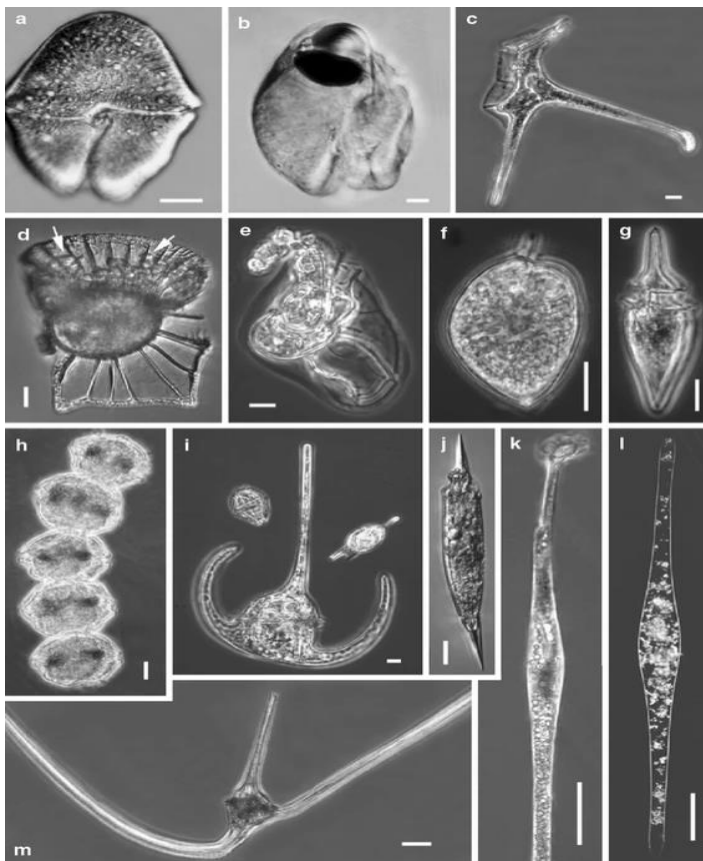
El reto sigue siendo optimizar nuestra capacidad para acceder a ellas, identificarlas y explotárlas, así como crear las condiciones que permitan cultivar la gran mayoría de estos microorganismos para proporcionar una fuente de suministro estable.

### 1.2.1 Dinoflagelados

El filo *Dinoflagellata* engloba una gran diversidad de organismos eucariotas unicelulares (figura 1), incluidos taxones fototróficos, por lo que desempeña un papel fundamental en la cadena biológica. Los dinoflagelados se encuentran actualmente en todos los sistemas acuáticos, principalmente en aguas marinas, donde se conocen al menos 2377 especies. Se dan desde altas latitudes hasta los trópicos y pueden encontrarse incluso en el hielo marino (7).

Unas 60 especies de dinoflagelados producen potentes toxinas citolíticas, hepatotóxicas o neurotóxicas peligrosas para los seres humanos y otros organismos. Aparte de la toxicidad, la mayoría de los metabolitos elaborados por dinoflagelados tienen un alto valor añadido a través de su uso en estudios farmacológico (8).

La aparición de estas toxinas está asociada con la proliferación de estas microalgas (en inglés Harmful Algal Blooms), comúnmente denominadas mareas rojas (figura 2) por los cambios de coloración que producen en la superficie del agua (9).



**Figura 1:** Micrografías existentes de taxones de dinoflagelados seleccionados que muestran parte de su diversidad morfológica. (a) *Akashiwo sanguinea*, (b) *Erythrospidinium sp.*, (c) *Dinophysis miles var. schroeteri*, (d) *Ornithocercus quadratus*, (e) *Histioneis panda*, (f) *Prorocentrum micans*, (g) *Oxyphysis oxytoxoides*, (h) *Alexandrium catenella*, (i) *Ceratium breve*, (j) *Gonyaulax polygramma*, (k) *Podolampas palmipes*, (l) *Oxytoxum scolopax*, (m) *Pyrocystis fusiformis*, (n) *Ceratium vultur* (10).



**Figura 2:** Marea roja de *Noctiluca scintillans* que tiñó el litoral de la Ría de Vigo en 2020 (11).

### 1.2.2 Género *Amphidinium*

Entre la enorme riqueza de especies de dinoflagelados, el género *Amphidinium* (figura 3) es especialmente relevante (12). Con respecto a otros dinoflagelados que suelen caracterizarse por sus bajas tasas de crecimiento, estos son capaces de crecer rápidamente y generar rendimientos de biomasa altos, en condiciones de cultivo adecuadas (13-14).



**Figura 3:** Microfotografía de *Amphidinium carterae*. Fotografía obtenida de Roscoff Culture Collection (15).

Así mismo, son organismos capaces de sintetizar sustancias de gran interés estructural y farmacológico: amphidinoles, amphidinolidas, amphirioninas, amphidinolactonas, amphidinocétidos. Entre los metabolitos secundarios de este género tienen gran relevancia los amphidinoles (AMs), compuestos con cadenas polihidroxiladas de naturaleza policétida con diversas actividades antifúngicas, citotóxicas y hemolíticas y también frente a patógenos humanos (16-17).



### 1.3 Antecedentes.

Recientemente, el grupo de Productos Marinos del IUBO-AG, llevó a cabo la bioprospección de cepas del género *Amphidinium* en Tenerife. Doce cepas (tabla 1) fueron aisladas y caracterizadas. Las cepas AmTF-8 (*A. carterae*) y AmTF-12 (*A. gibbosum*) fueron seleccionadas para su estudio, por su respectivo potencial en contenido en amphidinolos y actividad antiproliferativa. ( $GI_{50} < 4,5$  microgramos/mL)

Strain ID	Closest neighbor	Ident. (%)	Accession
AmTF-1	<i>Amphidinium carterae</i>	99.6	MZ351939.1
AmTF-2	<i>Amphidinium operculatum</i>	97.4	MZ851805.1
AmTF-3	<i>Amphidinium</i> sp.	93.6	EU046331.1
AmTF-4	<i>Amphidinium massartii</i>	99.8	MZ851799.1
AmTF-5	<i>Amphidinium carterae</i>	99.7	AY460586.1
AmTF-6	<i>Amphidinium carterae</i>	98.2	AY460586.1
AmTF-7	<i>Amphidinium carterae</i>	97.6	AY460586.1
AmTF-8	<i>Amphidinium carterae</i>	98.5	MK605108.1
AmTF-9	<i>Amphidinium massartii</i>	98.6	MZ851799.1
AmTF-10	<i>Amphidinium carterae</i>	99.8	AY460586.1
AmTF-11	<i>Amphidinium massartii</i>	98.9	MZ851799.1
AmTF-12	<i>Amphidinium gibbosum</i>	98.7	AY460587.1

**Tabla 1:** Vecinos más cercano en el *GenBank* para secuencias parciales del gen LSU r-RNA.

## 2. OBJETIVOS.

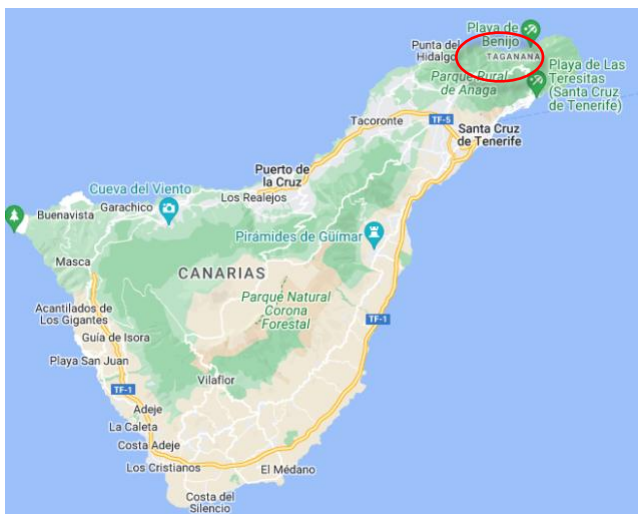
- Estudio del perfil químico de extractos obtenidos del cultivo artificial de dos cepas de *Amphidinium* aisladas en Tenerife (AmTF-8 y AmTF-12) con potencial biotecnológico en la producción de compuestos de alto interés siguiendo dos estrategias:
  - Estrategia de fraccionamiento bioguiado según actividad antiproliferativa del extracto celular de la cepa AmTF-12.
  - Búsqueda, aislamiento e identificación de sustancias de interés de tipo amphidinol (AMs) en el extracto del medio de cultivo libre de células de la cepa AmTF-8.
- Aprendizaje del proceso de cultivos de dinoflagelados y uso de técnicas cromatográficas para la separación y purificación de moléculas.

- Introducción a la interpretación de distintos experimentos de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y Espectrometría de Masas (MS) para la caracterización estructural de moléculas complejas.

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS.

#### 3.1 Material biológico.

Las cepas del género *Amphidinium* objeto de estudio, AmTF-8: *Amphidinium carterae* y AmTF-12: *Amphidinium gibbosum*, fueron aisladas, cultivadas artificialmente y caracterizadas a partir de muestras de fitoplancton recolectadas en diferentes charcos en la zona intermareal en Punta de Hidalgo, noreste de la isla de Tenerife (Figura 4). Las cepas son mantenidas en el laboratorio del IUBO-AG a escala de cultivo de 20 mL en matraces de 50 mL (x3) en las condiciones que se detallan más adelante.



**Figura 4:** Localización Punta de Hidalgo (18).

#### 3.2 Cultivo y escalado.

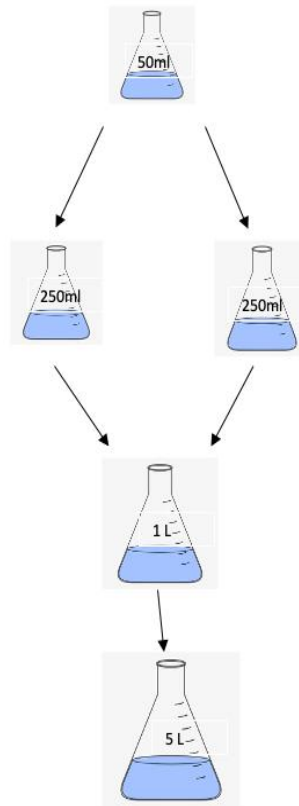
A la hora de realizar un cultivo se debe llevar a cabo la esterilización del material a usar en el autoclave a 121 °C durante 30 minutos.

También es necesario el filtrado del agua del mar que va a servir de base al medio de cultivo. El agua, a la que se le añade un 5% de agua destilada para disminuir la salinidad, se hace pasar por una batería de filtros que van desde las 2.5 micras, 0.65 micras, hasta el más pequeño, 0.2 micras.

Posteriormente se le añade las disoluciones patrón con los nutrientes del medio de cultivo usado, el medio Guillard K modificado. Su composición es la siguiente:  $\text{NaNO}_3$ , 882  $\mu\text{M}$ ;  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 50  $\mu\text{M}$ ;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10  $\mu\text{M}$ ; TRIS, 1 mM;  $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 90  $\mu\text{M}$ ; Fe-Na-EDTA, 14.6  $\mu\text{M}$ ;  $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0.9  $\mu\text{M}$ ;  $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.08  $\mu\text{M}$ ;  $\text{CoSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.05  $\mu\text{M}$ ;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.03  $\mu\text{M}$ ;  $\text{H}_2\text{SeO}_3$ , 0.01  $\mu\text{M}$ ; Tiamina, 0.7  $\mu\text{M}$ ; Biotina, 2.1 nM;  $\text{B}_{12}$ , 0.37 nM.

El Medio Guillard K es un medio mineral estándar para el cultivo de microalgas marinas. La naturaleza predominantemente inorgánica de este medio le facilita como medio de mantenimiento de cultivos axénicos (19).

Los cultivos de cada cepa fueron escalados, aproximadamente cada 20 días en matraces de 50 mL, 250 mL, 1 L y 5 L conteniendo respectivamente 20 mL, 150 mL, 500 mL y 3 L de agua de mar enriquecida con medio Guillard K modificado (Figura 5-6). Los cultivos fueron incubados a  $21 \pm 2$  °C bajo una intensidad de luz de  $60 \mu\text{E s}^{-1} \text{m}^{-2}$  y un fotoperiodo luz oscuridad de 18:6.



**Figura 5:** Diagrama general del escalado del cultivo.



**Figura 6.** Fotografías de la cámara de cultivo.

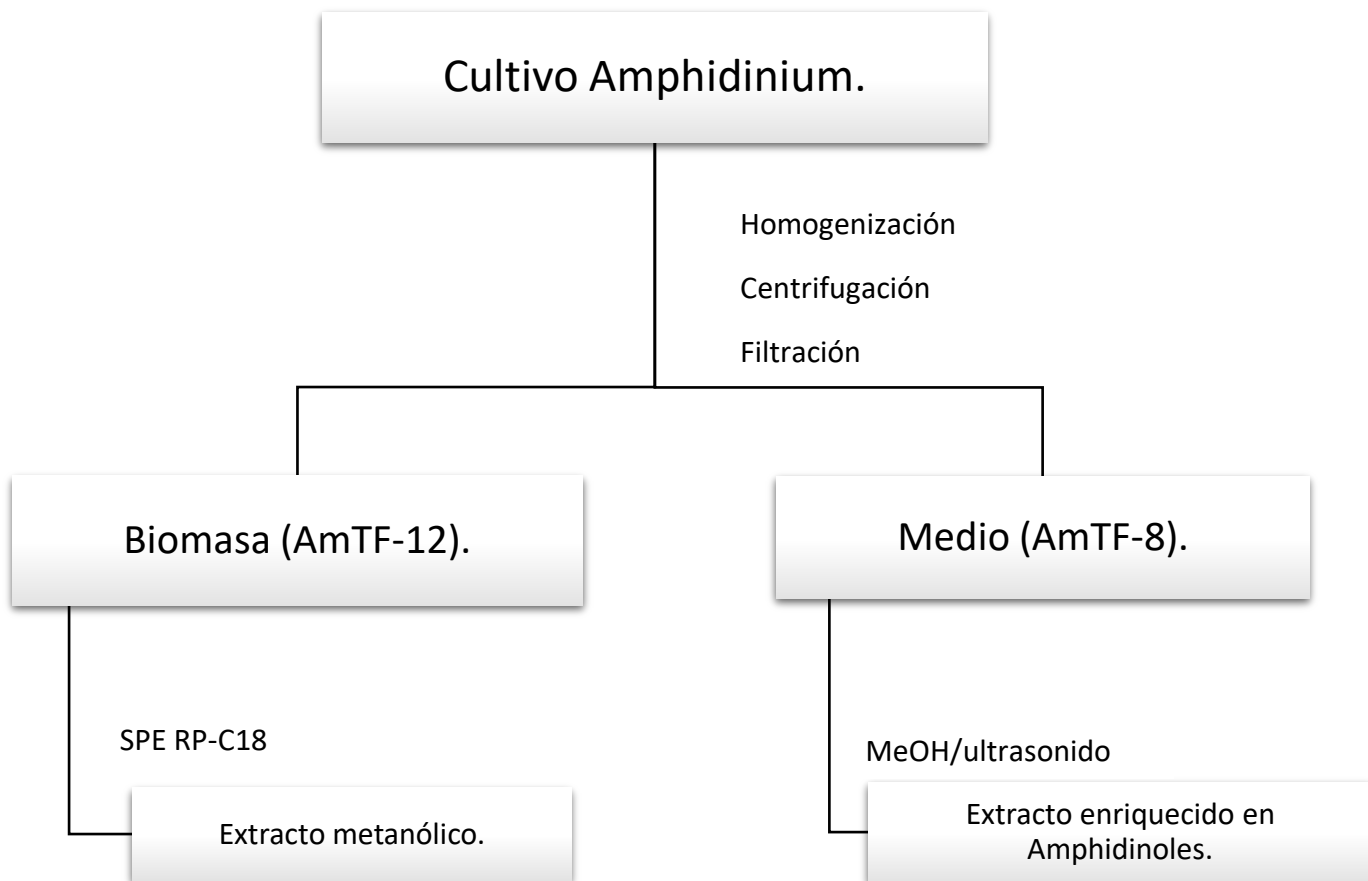
### 3.3 Cosecha y extracción.

Un volumen de 20 litros de cada cepa de *Amphidinium* fue centrifugado (5000 rpm, 15min, Sorvall™ RC SB), y los sobrenadantes filtrados, usando sistemas de filtración al vacío y filtros de borosilicato (GMFA).

La biomasa se extrajo con metanol:tolueno 3:1 bajo sonicación hasta agotamiento. Posteriormente, el extracto se filtró y el disolvente se eliminó al vacío (BÜCHI Rotavapor R-200).

Por su parte el medio de cultivo libre de células se pasó a través de un cartucho SPE RP-C18 acoplado a un recolector de vacío VISIPREPTH SPE (Supelco®) (esquema 1).

Cada 1–2 L, el paso del sobrenadante es interrumpido para retirar la sal del cartucho con agua destilada. Una vez retirada la sal, se procedía a la extracción de los compuestos adsorbidos en el cartucho con metanol. Se concentró el extracto del medio en rotavapor, eliminando el disolvente orgánico (metanol) y residuos de agua proveniente de la extracción.



**Esquema 1:** Diagrama de obtención de extractos de las cepas AmTF-8 Y AmTF-12.

### 3.4 Ensayos de actividad antiproliferativa.

Los ensayos de actividad antiproliferativa se realizaron en colaboración con el grupo de investigación BioLab del IUBO-AG de la ULL. La actividad se evaluó frente a seis líneas celulares tumorales: A549 (células epiteliales basales alveolares de adenocarcinoma humano), HeLa (células de cáncer de cuello uterino), Mia PaCa-2 (líneas celulares tumorales humanas pancreáticas), SW1573 (células de cáncer de pulmón), T-47D (líneas celulares tumorales de cáncer de mama) y WiDr (líneas celulares tumorales de carcinoma de colon).

### 3.5 Técnicas cromatográficas.

#### 3.5.1 Cromatografía de exclusión molecular.

Esta cromatografía se basa en la separación de los componentes en función a su tamaño molecular. La capacidad separadora viene dada por el gel cuya matriz consta de un número muy elevado de esferas porosas microscópicas que forman una red tridimensional.

Utilizamos una columna Sephadex LH-20 (3,5 x 24cm) y como fase móvil metanol y mezclas de n-hexano:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH (2:1:1).



**Figura 7:** Columna de Sephadex LH-20.

### 3.5.2 Cromatografías líquidas de media y alta resolución.

En la cromatografía líquida de media y alta resolución, los componentes de la muestra, previamente disueltos en un disolvente adecuado (fase móvil), son forzados a atravesar la columna cromatográfica gracias a la aplicación de presiones.

El material interno de la columna (fase estacionaria) está constituido por un relleno capaz de retener de forma selectiva los componentes de la mezcla. La resolución de esta separación depende de la interacción entre la fase estacionaria y la fase móvil, pudiendo ser manipulada a través de la elección de diferentes mezclas de disolventes y distintos tipos de relleno. Como resultado final los componentes de la mezcla salen de la columna separados en función de sus tiempos de retención.

Se usaron dos tipos de sistemas. El primero semiautomático, controlado por una bomba de presión media, (Ismatec, Fluid Metering ®) conectada a un inyector y a su vez conectado a la columna LOBAR LiChroprep con fase estacionaria RP-18 y a un espectrofotómetro (BÜCHI C-635) que nos da los valores de absorbancia de las fracciones separadas (Figura 8).



**Figura 8:** Sistema de cromatografía líquida de media presión.

El segundo sistema utilizado fue el HPLC Agilent Technologies Serie 1200 (figura 9), equipado con una bomba cuaternaria (G1311C), un colector de fracciones automático (G1364C), un detector del índice de refracción (G1362A, Infinity™) y un detector UV (2).





**Figura 9:** Sistema HPLC Agilent Technologies Serie 1200.

### 3.5.3 Cromatografía en capa fina (TLC).

Para el seguimiento de las separaciones cromatográficas se utilizaron cromatofolios de gel de sílice 60 F<sub>254</sub> Merck®.

La placa de TLC se coloca verticalmente en una cámara cerrada con un disolvente orgánico (fase móvil). Éste se desplaza hacia arriba por capilaridad y los componentes de la muestra migran distancias variables en función de sus afinidades diferentes por la fase estacionaria y la fase móvil.

Se evalúa el factor de retención de cada componente, ayudándonos también a dilucidar el disolvente o mezcla de disolventes orgánicos óptimo a la hora de llevar a cabo cromatografías líquidas de los mismos. El revelador que se usó fue cloruro de cobalto al 2% en disolución de ácido sulfúrico al 10%.



**Figura 10:** Placas de TLC eluidas con diferentes polaridades de disolventes orgánicos.



## 3.6 Técnicas de elucidación estructural.

### 3.6.1 Resonancia magnética nuclear (RMN).

La aplicación de un campo magnético externo produce desdoblamiento de los niveles degenerados de energía del spin nuclear lo que induce a transiciones entre ellos. La intensidad, forma y posición de las señales obtenidas en el espectro de RMN están relacionadas con su estructura molecular.

En este estudio se emplearon dos equipos (Figura 11), uno de 500 MHz y otro de 600 MHz (BRUKER® AVANCE) y metanol deuterado como disolvente.



Figura 11: Equipos de RMN utilizados.

### 3.6.2 Espectrometría de masas (RM).

Es una técnica analítica que determina la distribución molecular de una sustancia según su masa. Utiliza un espectrómetro de masas para analizar con precisión la composición de elementos e isótopos, separando núcleos atómicos por su relación masa/carga ( $m/z$ ). A menudo se combina con cromatografía de gases (GC-MS).

El dispositivo mide las razones masa/carga de iones vaporizando e ionizando el material del compuesto. El patrón de iones en el detector permite el análisis (21).

Espectros de masas de baja y alta resolución se midieron empleando un espectrómetro LCT Premier XE Micromass (Waters®) en modo electrospray.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

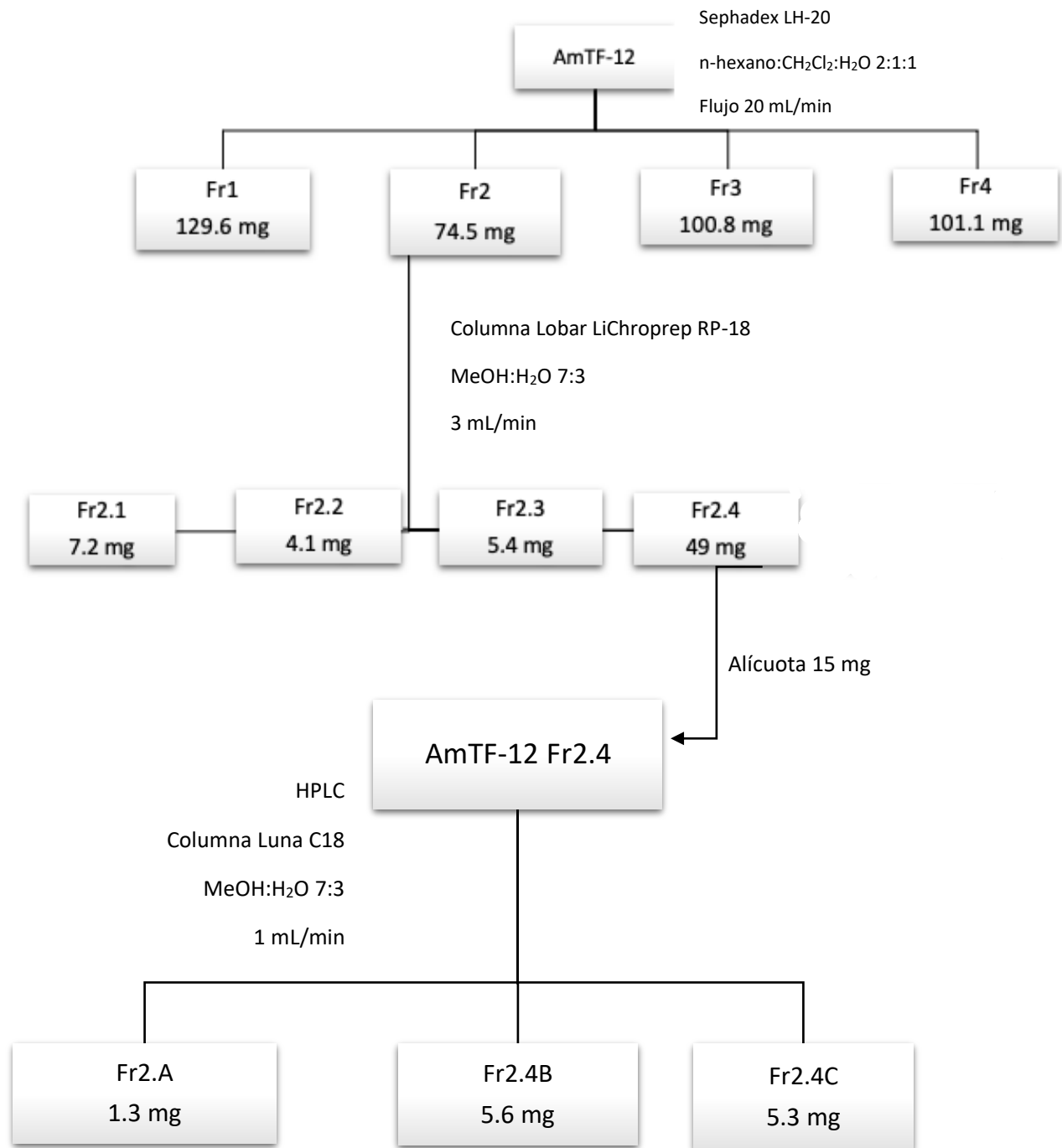
Las separaciones cromatográficas del extracto celular de la cepa de *Amphidinium* AmTF-12 fueron guiadas por evaluación de actividad antiproliferativa de las fracciones obtenidas en cada paso. Los tiempos de espera, desde el envío de las muestras hasta la recepción de los resultados de los ensayos de bioactividad, se dedicaron al aislamiento cromatográfico de los metabolitos presentes en el extracto del sobrenadante del cultivo de la cepa AmTF-8, un extracto enriquecido en amphidinolos. La reunión de las distintas fracciones se realizó analizando el comportamiento en cromatografía en capa fina y por seguimiento de RMN de protón.

### 4.1 Estudio bioguiado del extracto celular de AmTF-12.

El extracto celular del cultivo de AmTF-12 (1.25 g) se hizo pasar por una columna Sephadex LH-20 (65 x 275 mm) (Figura 12), usando como fase móvil una mezcla hexano-diclorometano-metanol (2:1:1) y un flujo de 20 mL/min y se obtuvieron 4 fracciones (Esquema 2).



**Figura 12:** Columna Sephadex LH-20 durante el fraccionamiento del extracto celular de AmTF-12.

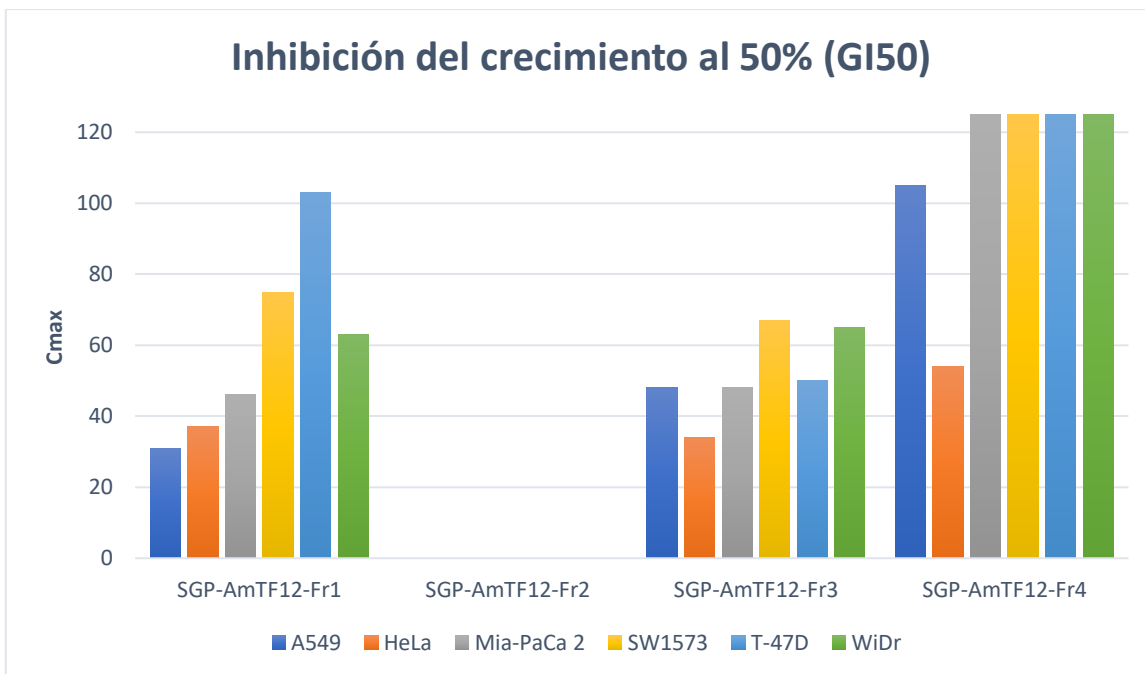


**Esquema 2:** Fraccionamiento del extracto de AmTF-12.

Se tomó aproximadamente 1 mg de cada fracción y se enviaron al grupo de investigación BioLab del IUBO-AG de la ULL. En la tabla 2 se recogen los resultados del ensayo, la fracción 2 del AmTF-12 fue la que mostró mejores resultados inhibiendo el crecimiento en un alto en porcentaje de las seis líneas celulares utilizadas en el ensayo ( $GI_{50} < 1.25 \mu\text{g/mL}$ ) (Tabla 2)

Cmax	Muestra	A549	HeLa	Mia PaCa-2	SW1573	T-47D	WiDr
125	SGP-AmTF12-Fr1	31	37	46	75	103	63
125	SGP-AmTF12-Fr2	<1.25	<1.25	<1.25	<1.25	<1.25	<1.25
125	SGP-AmTF12-Fr3	48	34	48	67	50	65
125	SGP-AmTF12-Fr4	105	54	125	125	125	125

**Tabla 2:** Inhibición del crecimiento al 50% ( $GI_{50}$ ) frente a las distintas líneas celulares tumorales de las fracciones obtenidas del extracto de AmTF-12.



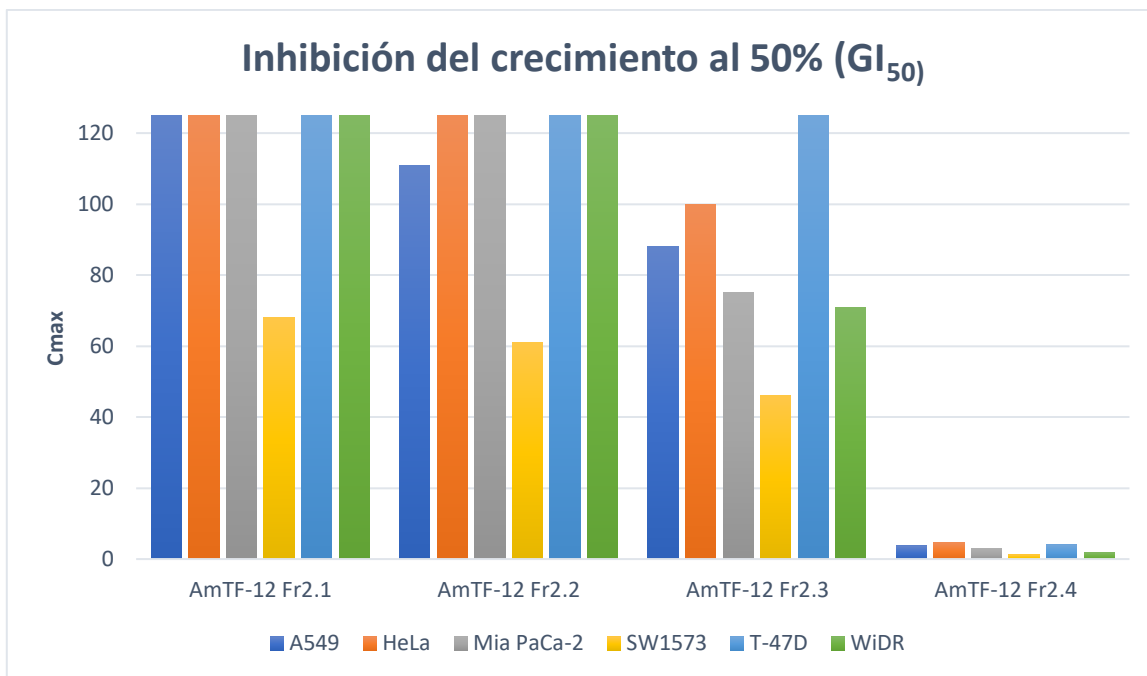
**Figura 13:** valores de  $GI_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ).

La Fr2 fue la que resultó más activa frente a todas las líneas celulares, y con la que se continuó el estudio. El siguiente paso fue realizar una cromatografía líquida de media presión (esquema 2) usando una columna LOBAR LiChroprep con fase estacionaria RP-18 (25 x 310 mm) en metanol:agua en proporción 7:3 y un flujo de 3 ml/min. Se obtuvieron 4 fracciones que fueron nuevamente evaluadas en su actividad.

Con valores de  $GI_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) (Tabla 3) de 3.7  $\mu\text{g/mL}$  para A549, de 3.1  $\mu\text{g/mL}$  para Mia PaCa-2, de 4.7  $\mu\text{g/mL}$  para HeLa, de 1.3  $\mu\text{g/mL}$  para SW1573, de 4.0  $\mu\text{g/mL}$  para T-47D y de 1.9  $\mu\text{g/mL}$  WiDr.

		Líneas celulares					
Cmax	Muestra	A549	HeLa	Mia PaCa-2	SW1573	T-47D	WiDr
125	SGP-AmTF12-Fr2.1	125	125	125	68	125	125
125	SGP-AmTF12-Fr2.2	111	125	125	61	125	125
125	SGP-AmTF12-Fr.2.3	88	100	75	46	125	71
125	SGP-AmTF12-Fr2.4	3.7	4.7	3.1	1.3	4.0	1.9

**Tabla 3:** Inhibición del crecimiento al 50% ( $GI_{50}$ ) en las distintas líneas celulares tumorales de las fracciones derivadas de las Fr2 del AmTF-12.



**Figura 14:** valores de GI<sub>50</sub> (µg/mL).

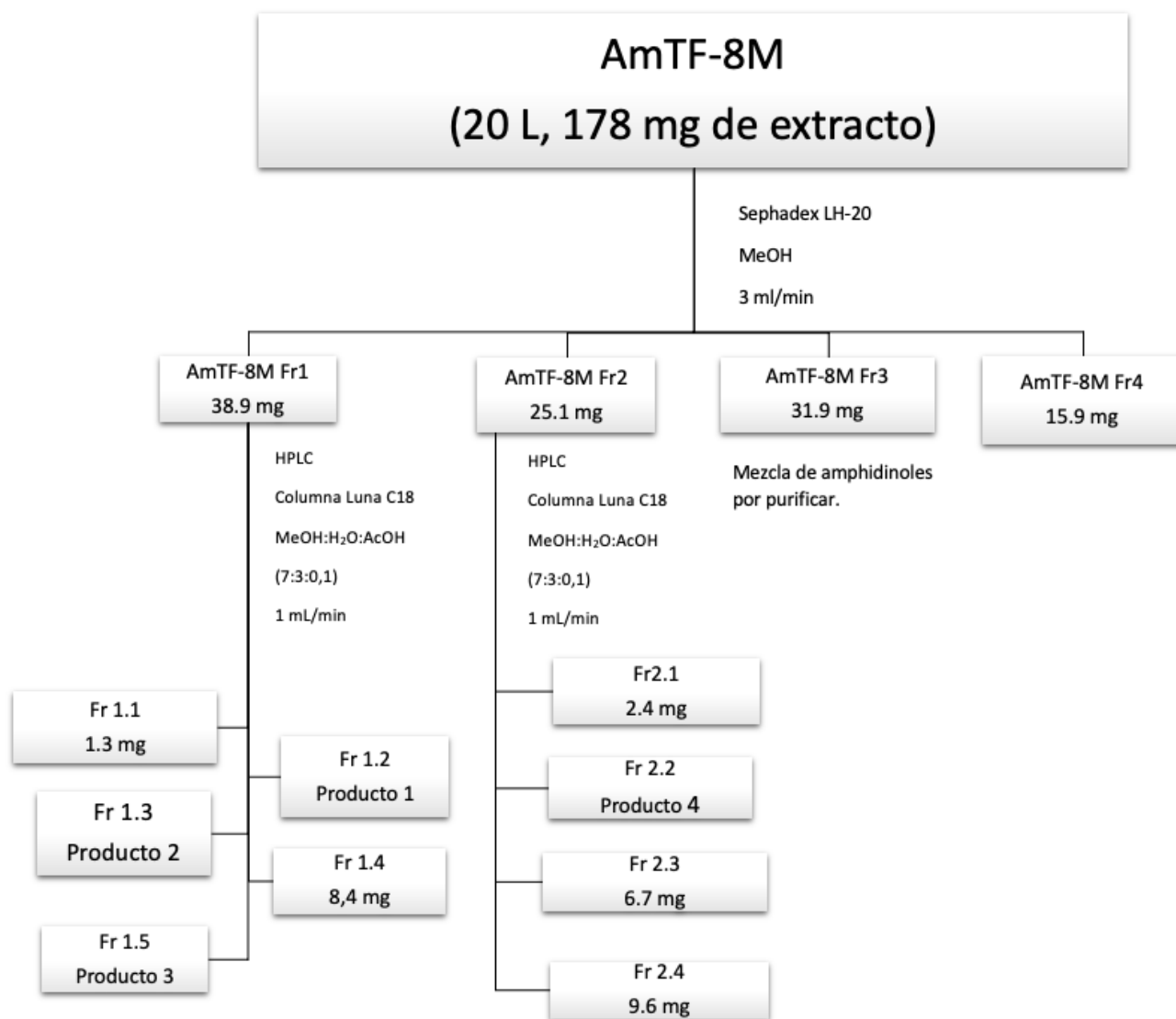
Tras analizar los resultados del ensayo de bioactividad decidimos seguir trabajando con la fracción 2.4. Después de varias cromatografías en capa fina probando diferentes concentraciones se decide utilizar una cromatografía de alta resolución HPLC en una columna Luna C18 Phenomenex™ (250 x 10 mm), con fase móvil metanol:agua 8:2 con un gradiente de concentración hasta alcanzar 100% en metanol en 40 minutos y flujo de 1 mL/min.

Las fracciones obtenidas tal como se muestra en el esquema 1, y una alícuota aproximadamente de 0,5 mg de cada una, fueron enviadas para un nuevo ensayo de bioactividad, del cual estamos esperando los resultados en el momento de la entrega de la memoria.

#### 4.2 Separación cromatográfica del extracto del medio de cultivo de AmTF-8.

El extracto obtenido del medio de cultivo del AmTF-8 (0.18 g) fue centrifugado con el objetivo de eliminar la sal de la muestra. Una vez hecho esto se hizo pasar por una columna Sephadex LH-20 (figura 7) (240 x 35 mm), usando metanol como disolvente y un flujo de 2.5 mL/min. Se obtuvieron nuevamente 4 fracciones, de las cuales, los espectros de RMN-<sup>1</sup>H, mostraron que las tres primeras contenían amphidinolos (Esquema 3).

La fracción 1 y 2 fueron purificadas por cromatografía de alta resolución HPLC en columna Luna C18 Phenomenex™ (250 x 10 mm), con fase móvil trifásica isocrática metanol:agua:acético 7:3:0.1, y flujo de 1 mL/min. De la fracción 1 se pudieron aislar 3 derivados de amphidinoles puros mientras que de la fracción 2 se obtuvo un cuarto compuesto (Esquema 3).



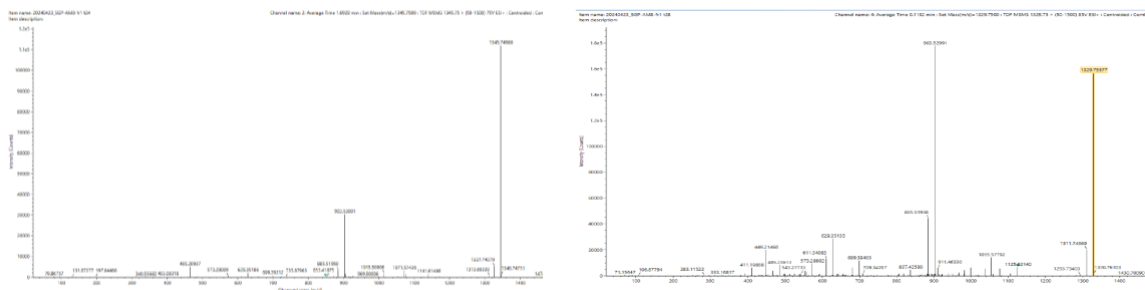
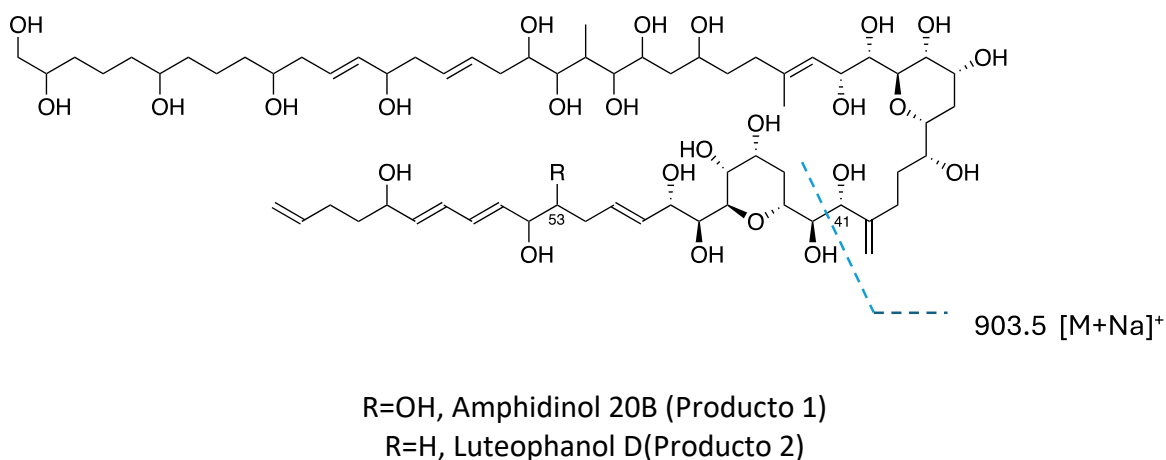
**Esquema 3:** Fraccionamiento del extracto del medio de cultivo de AmTF-8.

## 5. Elucidación estructural de los compuestos aislados del extracto del medio de AmTF-8.

La determinación de la estructura de los productos 1 -4 se llevó a cabo con una serie de experimentos de RMN monodimensionales y bidimensionales ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY, HSQC, HMBC, HSQC-TOCSY, H2BC) y de espectrometría de masas (ESI-HRMS).

El análisis de los datos permitió concluir que los productos 1 y 2 eran productos aislados con anterioridad: Amphidinol-20B (producto 1) y Luteophanol-D (producto 2), mientras que los productos 3 y 4, eran nuevos derivados de amphidinoles.

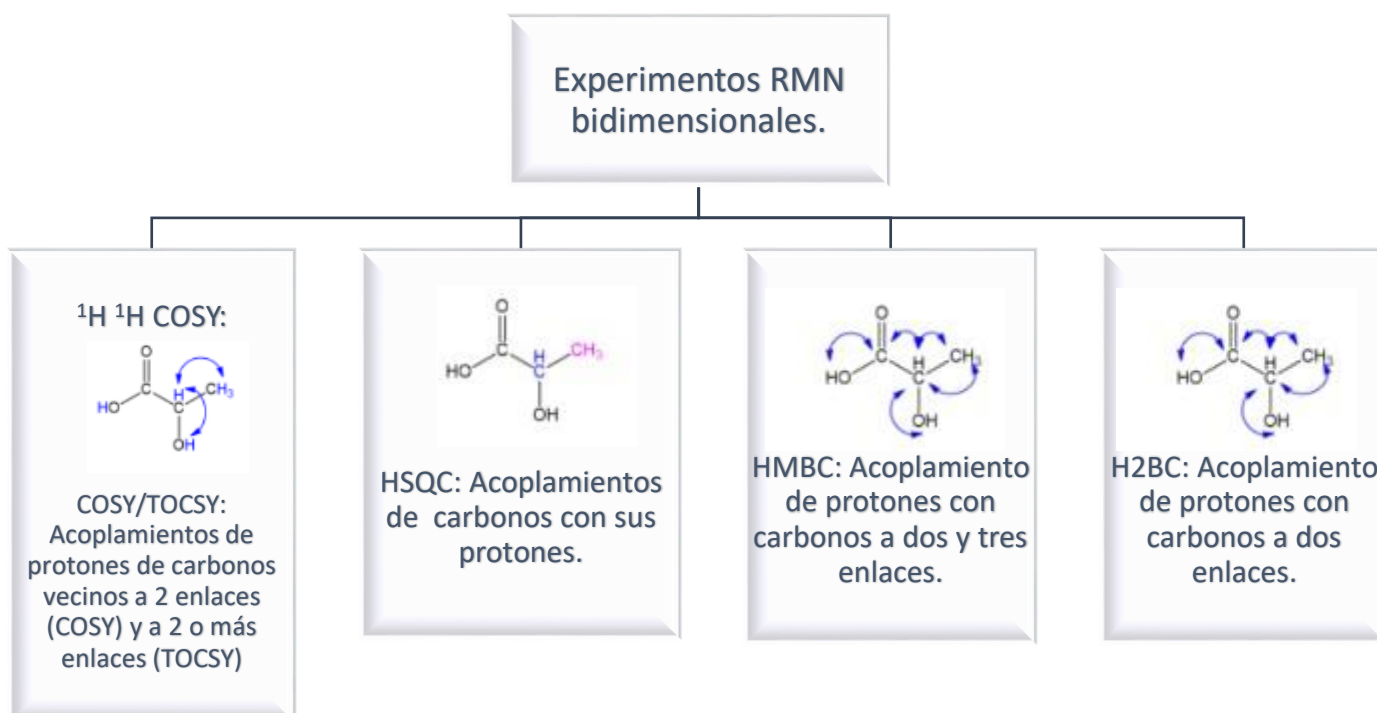
Respecto a los dos primeros, en la figura 15 se muestran sus estructuras, perteneciendo ambos a la misma serie y con la única diferencia de un grupo hidroxilo adicional en el Amphidinol 20B en la posición C-53. Ambos compuestos mostraron en espectrometría de masas HRSIMS los iones moleculares  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  correspondientes, 1345.7498 y 1329.7557 respectivamente, y el fragmento en 903,53 característico de la ruptura entre las posiciones C-41 y C-42 en la estructura de estos derivados.



**Figura 15:** Estructuras de los productos 1 y 2 y sus principales datos de masas.



El compuesto 3 todavía está en proceso de adquisición de datos y estudio de determinación estructural mientras que del compuesto 4 ya se ha llegado a la propuesta de la estructura plana que se describe a continuación. En el esquema 4, se resumen los principales acoplamientos que se observan con el uso de cada experimento bidimensional de RMN para la determinación de la estructura.



**Esquema 4:** Acoplamientos que se observan en cada experimento bidimensional de RMN realizado.

El producto 4 se aisló como un sólido amorfo incoloro. El espectro de masas (figura 16) mostró en modo positivo un ion pseudomolecular a  $m/z$  1194.4 del aducto  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  correspondiente con una fórmula molecular  $\text{C}_{53}\text{H}_{85}\text{NaO}_{25}\text{S}$ . Los experimentos de RMN  $^1\text{H}$  y HSQC editado sugirieron la presencia de: dos grupos metilos, doce metilenos  $\text{sp}^3$  (uno de ellos oxi-metileno), un metileno  $\text{sp}^2$ , veintidós metinos  $\text{sp}^3$  (todos menos uno asociados a oxígenos), trece metinos  $\text{sp}^2$  y tres carbonos cuaternarios  $\text{sp}^2$  (Figuras 17-18). Un análisis detallado de los experimentos permitió establecer la estructura plana de este compuesto (figura 19) siendo un derivado nuevo en la literatura y de una serie de amphidinolos distinta a los productos 1 y 2.

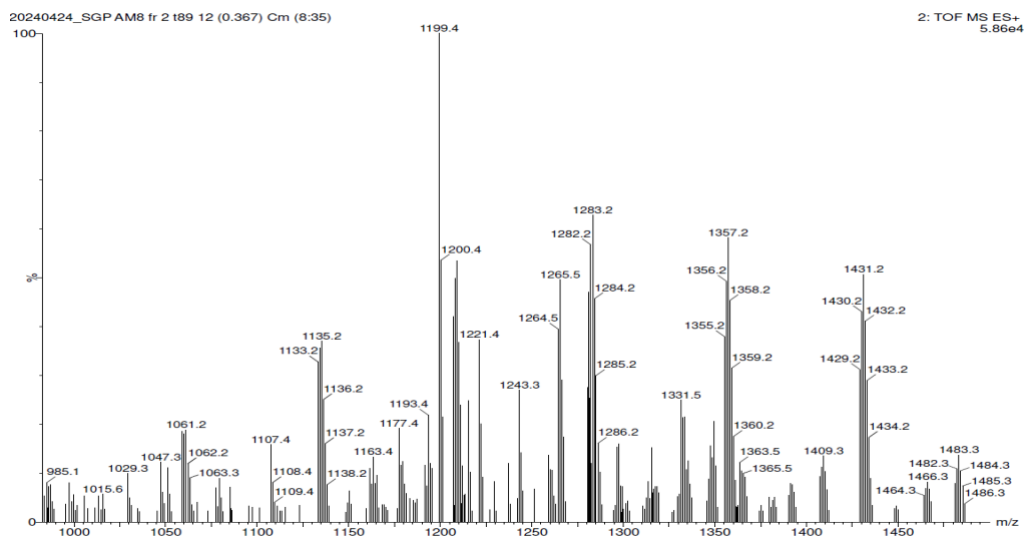


Figura 16: Espectro de masas de baja resolución del producto 4.

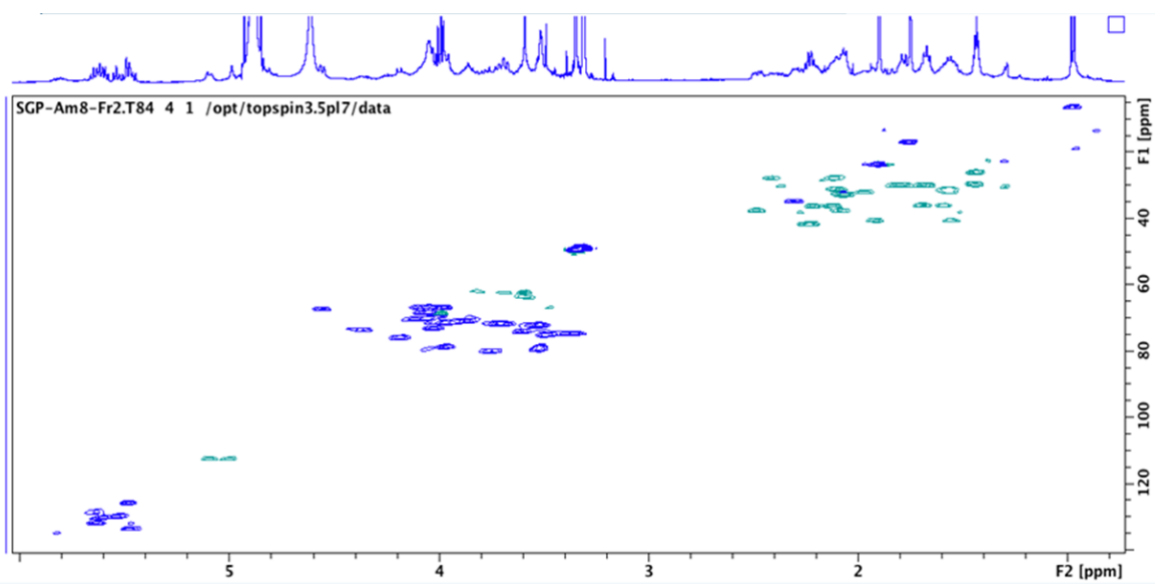
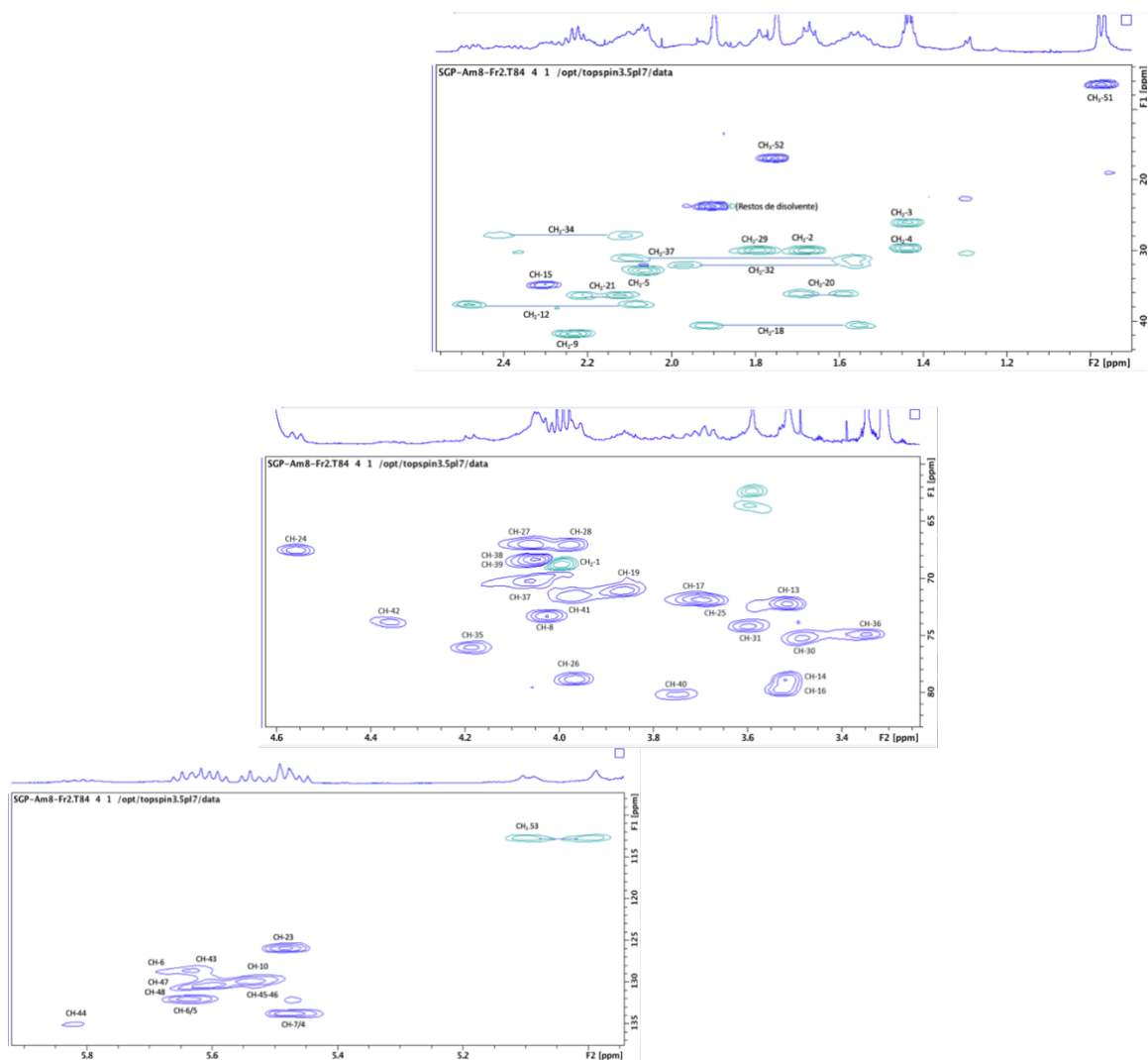
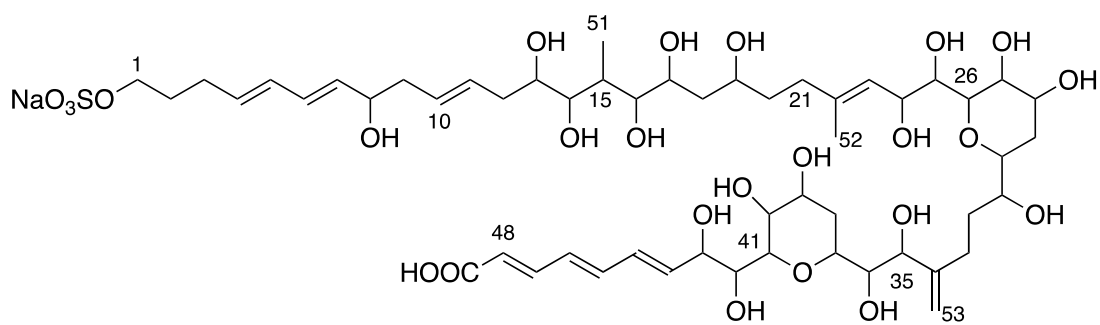


Figura 17: Vista general experimento HSQC del producto 4.



**Figura 18:** Espectros de HSQC ampliados con editado de multiplicidad del producto 4.



**Figura 19:** Estructura planar del producto 4.

## 6. Conclusiones.

Se lleva a cabo un estudio de perfil químico de extractos obtenidos del cultivo artificial de dos cepas de Amphidinium aisladas en Tenerife (AmTF-8 y AmTF-12) con potencial biotecnológico en la producción de compuestos de alto interés

Se inicia un estudio bioguiado del extracto celular de la cepa AmTF-12 identificando las fracciones cromatográficas con mayor actividad antiproliferativa frente a distintas líneas celulares, a fin de establecer el proceso cromatográfico óptimo para obtener los metabolitos activos en estudios futuros a mayor escala.

Del extracto del sobrenadante de la cepa AmTF-8 se logran purificar y aislar cuatro derivados de amphidinoles,

Utilizando análisis detallado RMN/MS se lograron identificar el Amphidinol-20B y el Luteophanol-D, además de establecer la estructura plana del compuesto 4.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Jiménez C. Marine Natural Products in Medicinal Chemistry. *ACS Medicinal Chemistry Letters*. **2018** Oct 11;9 (10):959–61.
- (2) Kathiresan, K.; Nabeel, M.A.; Manivannan, S. Bioprospecting of marine organisms for novel bioactive compounds. *Sci. Trans. Environ. Technovation* **2017**, 1, 107–120.
- (3) OECD, *Marine Biotechnology: Enabling Solutions for Ocean Productivity and Sustainability*, OECD Publishing, Paris, **2013** <https://doi.org/10.1787/9789264194243-en>.
- (4) Jairam Selvam, Joyabrata Mal, Sukhendra Singh, Ashish Yadav, Balendu Shekher Giri, Ashok Pandey, Rupika Sinha, Bioprospecting marine microalgae as sustainable bio-factories for value-added compounds, *Algal Research*, Volume 79, **2024** <https://doi.org/10.1016/j.algal.2024.103444>.
- (5) Mimouni, V.; Ulmann, L.; Pasquet, V.; Mathieu, M.; Picot, L.; Bougaran, G.; Cadoret, J.; Morant-Manceau, A.; Schoefs, B. The Potential of Microalgae for the Production of Bioactive Molecules of Pharmaceutical Interest. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2012**, 13, 2733–2750.
- (6) Almaliti, J., & Gerwick, W. H. Methods in marine natural product drug discovery: what's new? *Expert Opinion on Drug Discovery*, **2023**, 18(7), 687–691. <https://doi.org/10.1080/17460441.2023.2214360>
- (7) Abdallah A., Sameh S., Hassan R., Eslam Ibrahim El-Aswar, Reham E., Shih-Hsin Ho, Tamer Elsamahy, Shengnan Li, Mostafa M. El-Sheekh, Michael Schagerl, Michael Kornaros, Jianzhong Sun, Microalgae-based wastewater treatment: Mechanisms, challenges, recent advances, and future prospects, *Environmental Science and Ecotechnology*, Volume 13, **2023**, 100205, ISSN 2666-4984, <https://doi.org/10.1016/j.es.2022.100205>.
- (8) Marret Fabienne, de Vernal Anne, Dinoflagellate cysts as proxies of environmental, ocean and climate changes in the Atlantic realm during the quaternary, *Frontiers in Ecology and Evolution*, Volume 12, **2024**, DOI=10.3389/fevo.2024.1378931
- (9) Assunção J, Catarina Guedes A, Xavier Malcata F. Biotechnological and pharmacological applications of biotoxins and other bioactive molecules from dinoflagellates. *Marine Drugs*. MDPI AG; Vol. 15, **2017**.
- (10) Taylor, F.J.R., Hoppenrath, M. & Saldarriaga, J.F. Dinoflagellate diversity and distribution. *Biodivers Conserv* 17, **2008**, 407–418 <https://doi.org/10.1007/s10531-007-9258-3>

- (11) Rodríguez, F., Escalera, L., Reguera, B., Nogueira, E., Bode, A., Ruiz-Villarreal, M., Rossignoli, A. E., Ben-Gigirey, B., Rey, V., Fraga, S. Red tides in the Galician rías: historical overview, ecological impact, and future monitoring strategies. *Environmental Science: Processes & Impacts*. **2023** <https://doi.org/10.1039/D3EM00296A>
- (12) Yang, X.; Yan, Z.; Chen, J.; Wang, D.; Li, K. Acute Toxicity of the Dinoflagellate *Amphidinium carterae* on Early Life Stages of Zebrafish (*Danio rerio*). *Toxics* **2023**, *11*, 370. <https://doi.org/10.3390/toxics11040370>
- (13) Orefice, I.; Balzano, S.; Romano, G.; Sardo, A. *Amphidinium* spp. as a Source of Antimicrobial, Antifungal, and Anticancer Compounds. *Life* **2023**, *13*, 2164. <https://doi.org/10.3390/life13112164>
- (14) A. Molina-Miras, A. Morales-Amador, C.R. de Vera, L. López-Rosales, A. Sánchez-Mirón, M.L. Souto, J.J. Fernández, M. Norte, F. García-Camacho, E. Molina-Grima, A pilot-scale bioprocess to produce amphidinols from the marine microalga *Amphidinium carterae*: Isolation of a novel analogue, *Algal Research*, Volume 31, **2018**, Pages 87-98, ISSN 2211-9264, <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.01.010>.
- (15) Fotografía obtenida de Roscoff Culture Collection.
- (16) Molina-Miras A, Bueso-Sánchez A, Cerón-García MDC, Sánchez-Mirón A, Contreras-Gómez A, García-Camacho F. Effect of Nitrogen, Phosphorous, and Light Colimitation on Amphidinol Production and Growth in the Marine Dinoflagellate Microalga *Amphidinium carterae*. *Toxins (Basel)*. **2022** Aug 28;14(9):594. doi: 10.3390/toxins14090594.
- (17) Martínez, K.A.; Lauritano, C.; Druka, D.; Romano, G.; Grohmann, T.; Jaspars, M.; Martín, J.; Díaz, C.; Cautain, B.; de la Cruz, M.; et al. Amphidinol 22, a New Cytotoxic and Antifungal Amphidinol from the *Dinoflagellate Amphidinium carterae*. *Mar. Drugs* **2019**, *17*, 385. <https://doi.org/10.3390/md17070385>
- (18) Fotografía obtenida de Google Maps
- (19) Martelli, Antonela, Zualet, Tania-Vanina, Miras-Gagliardi, Maria-Belén, & Rubilar, Tamara. Fitorremediación de efluentes acuícolas mediante el uso de seis microalgas marinas: aportes de sustentabilidad en la industria acuícola del erizo de mar en Argentina. *Revista de Biología Tropical*, **2024**, *72* (Suppl. 1)
- (20) Xuejiao Liu, Bin Fu, Jierong Chen, Zhenyu Sun, Dongdong Zheng, Zhonghua Li, Bing Gu, Ying Zhang, Haojie Lu, High-throughput intact Glycopeptide quantification strategy with targeted-MS (HTiGQs-target) reveals site-specific IgG N-glycopeptides as biomarkers for hepatic disorder diagnosis and staging, *Carbohydrate Polymers*, 10.1016/j.carbpol.2023.121499, **2024**, *325*, (121499),

(21) Morales-Amador, A.; Molina-Miras, A.; López-Rosales, L.; Sánchez-Mirón, A.; García-Camacho, F.; Souto, M.L.; Fernández, J.J. Isolation and Structural Elucidation of New Amphidinol Analogues from *Amphidinium carterae* Cultivated in a Pilot-Scale Photobioreactor. *Mar. Drugs* **2021**, *19*, 432. <https://doi.org/10.3390/md19080432>

(22) Morales-Amador A.; Souto ML.; Hertweck C.; Fernández JJ.; García-Altare M. A Rapid Screen for Polyol Polyketides from Marine Dinoflagellates, *Analytical Chemistry*. **2022**