

ULL

Universidad
de La Laguna



ESTUDIO FITOQUÍMICO DE DINOFLAGELADOS DEL GÉNERO AMPHIDIINIUM

Trabajo Fin de Grado

MEMORIA

Presentado para aspirar al
Título de Grado en
Farmacia por

Martina Perrero

TUTORES:

José Javier Fernández Castro
Manuel Norte Martín

La Laguna, Julio 2017

AGRADECIMIENTOS

A los Drs. José Javier Fernández Castro y Manuel Norte Martín por darme la oportunidad de participar en este proyecto tan interesante y de aprender varias cosas sobre esta rama de la Química Orgánica.

A Adrian por haber aguantado todas mis dudas e inseguridades, por haber sido un maestro paciente y amable, por haberme animado en los días en los que nada salía bien y porque lo hizo todo agradable, habría estado totalmente perdida sin ti y con mi “maldición peruana”.

A la Doctora M^a Luisa Souto Suárez por seguir paso a paso mi trabajo con competencia y experiencia, por perdonar mis grandes errores y por atenderme siempre con una sonrisa cada vez que necesitaba su ayuda.

Gracias a todos los miembros del grupo de investigación Marinos, del Instituto Universitario de Bio-Orgánica Antonio González, y a los que pasaron por el laboratorio en estos meses, por haber estado siempre pendientes de mi y por haber creado cada día un entorno alegre y sereno; gracias por dedicarme su tiempo y para compartir conmigo sus conocimientos con paciencia y gentileza, en particular a Rosalía.

A mi padre por empujarme siempre hacia adelante cualquier cosa pase y por enseñarme la importancia de lograr mis objetivos.

A mi madre por su presencia constante y no entrometida y por crecerme como una “aquilone”.

A mi hermano por la infinita paciencia que siempre tuvo conmigo y por estar siempre a mi lado cuando lo necesito. A los tres por aguantar cada episodio de agobio y de llanto a lo largo de estos años de la carrera y por hacerme sentir especial y amada en cada momento.

A Andreea, Debora, Elena y Lumi, los años de carrera habrían sido una pesadilla sin vosotras, gracias por haberlo hecho todo fácil y entretenido, que bien lo pasamos.

A “Rivetto” porque desde que te conozco me has alegrado mucho los días.

Y para terminar a Matteo por esperarme y por haber aguantado la distancia con valentía, tenerte a mi lado lo hace todo mejor.

Índice

I. Antecedentes	5
I.1. Productos naturales	6
I.1.1. Introducción	6
I.1.2. Productos marinos	6
I.2. Dinoflagelados	7
I.2.1. Amphidinoles	8
I.2.2. Amphidinolidas	9
I.2.3. Amphirioninas	10
II. Objetivos	11
II.1. Acerca de esta memoria	12
II.2. Objetivos	12
III. Resultados y discusión	13
III.1. Separación cromatográfica	13
III.2. Caracterización estructural	17
IV. Materiales y métodos	24
IV.1. Técnicas cromatográficas	25
IV.2. Técnicas espectroscópicas	26
V. Conclusiones	27

Summary

Throughout the ages, nature has catered to the basic needs of humans, not the least of which is the provision of medicines for treatment of a wide spectrum of diseases.

The impact of natural products, also known as secondary metabolites, in various fields, gives them high relevance and interest within the scientific community, that's why since the last century, much effort has been made to search for biological substances from natural resources. From these efforts, many compounds have been isolated from microorganisms for medical purposes.

Marine environment represents an excellent source of novel molecules for the development of new drugs.

Among marine organisms, of particular interests are dinoflagellates.

Dinoflagellates are widely known to be a rich source of biologically active and structurally unique secondary metabolites.

Some of these unicellular protists are responsible of *Harmful Algal Blooms* (HABs).

A bloom of some species of dinoflagellates can result as visible coloration of the water colloquially known as "red tide". Under such circumstances they can produce toxins that not only affect marine life in the ocean, but the people who consume shellfish and sponges as well, where the toxins reach high levels of accumulation.

Red tides occur worldwide and some reports indicate their occurrence is on the rise, according to the *National Oceanic and Atmospheric Administration* (NOAA).

Apart from prevention of massive human exposure to toxins, the study of marine toxins is becoming relevant for their potential therapeutic applications and possible use as pharmacological tools.

In this report we focus on the phytochemical study of dinoflagellate *Amphidinium Carterae*, using chromatographic and spectroscopic techniques, with the aim to isolate biologically relevant compounds such as amphidinols and amphidinolides. The amphidinols are a series of long-chain polyhydroxypolyene compounds with potent antifungal and hemolytic activities while the amphidinolides have shown pronounced biological activities.

I. Antecedentes

I.1. Productos naturales

I.1.1. Introducción

Los productos naturales pueden definirse como moléculas pequeñas, con peso inferior a los 3000 Da, biosintetizadas por seres vivos por rutas metabólicas que constituyen el metabolismo secundario.

La búsqueda de nuevos productos naturales se justifica por las bioactividades que presentan relacionadas con la complejidad estructural que tienen.

Una de las principales estrategias para empezar el estudio fitoquímico consiste en recurrir a los conocimientos de la medicina tradicional y de la farmacognosia, importante herramienta para la búsqueda de nuevos *hit-to-leads* o nuevas moléculas químicas de aplicabilidad potencial.

De este modo, de los 1135 fármacos aprobados desde 1981 hasta 2010, el 50% son productos naturales o modificaciones de los mismos.^{1,2}

I.1.2. Productos marinos

El medio marino cubre el 70% de la superficie terrestre, albergando al 80% de los organismos vivos conocidos; esta biodiversidad al estar repartida en todo los océanos, incorpora ecosistemas muy diferentes motivo por el que en el medio marino se encuentran nuevas entidades químicas que poseen estructuras totalmente diferentes a las que encontramos en el medio terrestre.

El desarrollo de la investigación biomédica del medio marino ha estado limitado por varios factores, entre los que se encuentra la falta de conocimientos previos que aporta la medicina tradicional, muy importante en el caso de los terrestres; otro aspecto que ha limitado éste desarrollo se debe al avance tecnológico que ha tenido que producirse para facilitar la recolección de muestras, especialmente en el caso de los microorganismos marinos. En este caso, el cultivo de los microorganismos ha sido la única manera de asegurarnos la biomasa suficiente para su estudio. En estos momentos una de las áreas en desarrollo es la correcta identificación genómica de los mismos, necesaria para su adecuada clasificación y lo que explica la variabilidad que se ha producido en la clasificación de los mismos en los últimos años. A pesar de los avances producidos, se considera que en la actualidad el 95% de las especies marinas permanecen inexploradas.

Dado que el estudio de los productos marinos se ha disparado en los últimos años, en la mayor parte de los casos no ha transcurrido el tiempo suficiente para que pudiese producir su incorporación al mercado farmacéutico. Esto solo lo han logrado unos pocos, y hay otros que están a la espera de superar las últimas fases clínicas.

En cualquier caso una variada gama de productos naturales con un amplio panel de bioactividades, tales como antitumorales, anti-microtubulares, anti-proliferativos, fotoprotectores, antibióticos y antiinfecciosos^{3,4} están a la espera de su desarrollo una vez que estos problemas se superen.

¹ Newman D.J.; Cragg, G.M. Natural Products as Source of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.* **2012**, 75, 311-335.

² Bauer, R.A.; Wurst, J.M.; Tan, D.S. Expanding the Range of Druggable Targets with Natural Products-Based libraries: An Academic Perspective. *Curr. Opin Chem Biol*, **2010**, 14,308-314.

³ Molinski, T.F.; Dalisay, D.S.; Lievens, S.L.; Saludes, J.P. Drug Development from Marine Natural Products. *Nat Rev Drug Discov*, **2009**, 8,69-85

⁴ Mishra, B.B; Tiwari, V.K. Natural Products: An Evolving Role in Future Drug Discovery. *Eur J Med Chem.* **2011**, 46, 4769-4807

Entre los productos marinos presentan una gran relevancia las microalgas, la base alimentaria del medio acuático, siendo el alimento de animales filtradores, moluscos bivalvos, larvas de crustáceos, etc. El desarrollo de fitoplancton representa una ventaja para la pesca y la acuicultura porque garantiza el desarrollo de otras formas mayores de vida. Sin embargo, su crecimiento descontrolado puede dar lugar a una excesiva proliferación de microalgas también conocida como

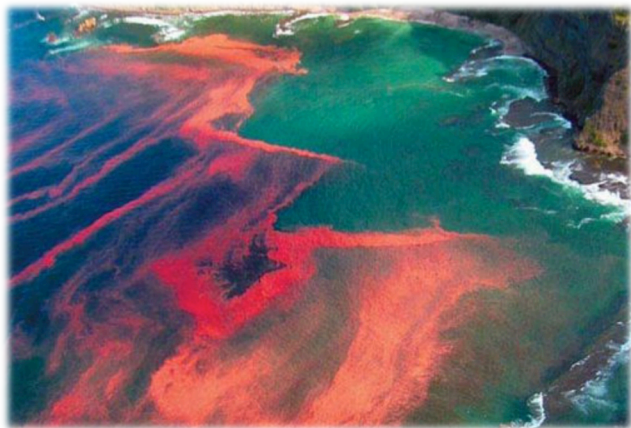


Figura 1. Ejemplo de HABs.

“marea roja” y que en algunos casos constituyen un problema medio ambiental y/o de salud pública. Esto es especialmente cierto cuando esta proliferación se produce en aguas poco profundas ya que se puede generar la muerte masiva de peces o moluscos por anoxia, al consumir las algas todo el oxígeno disponible en el medio. En otros casos, las mareas rojas pueden ser tóxicas y la razón de ello ya no es el consumo de oxígeno, sino que estos organismos unicelulares elaboran toxinas entre sus metabolitos secundarios. Los dinoflagelados del género *Heterosigma* producen toxinas hemolíticas que entran en contacto con las

branquias de los peces que atraviesen la zona de marea roja determinando su muertes masiva. En otros casos los dinoflagelados forman parte de la dieta de microalgas del plancton de los organismos filtradores por lo que sus toxinas se acumulan en los hepatopáncreas de los mismos, volviéndose éstos tóxicos para el consumo humano. Este es un problema de primer grado en los países habituados al consumo de mariscos, lo que ha llevado a que en la Union Europea se hayan establecido directivas para el control de la toxicidad de todos estos tipo de mariscos antes de permitir su comercialización. Podemos por tanto decir, que las mareas rojas son un problema de salud pública y económico de primer orden y por esa razón ha sido objeto preferente de atención por parte de las autoridades sanitarias europeas.

1.2. Dinoflagelados

Los dinoflagelados son un extenso grupo de protistas flagelados que forman parte del fitoplancton marino y de agua dulce.

Aproximadamente la mitad son fotosintéticos y poseen pigmentos con clorofila a y c₂ y carotenoides.⁵

Al ser su nutrición principalmente autótrofa son productores primarios por lo que, junto a las diatomeas, constituyen el nivel trófico primario en la cadena alimentaria acuática.⁶ En cualquier caso, las diatomeas son mucho más abundantes, por lo que ocupan un lugar secundario respecto de ellas.

Sus poblaciones se distribuyen, dependiendo de los géneros, en

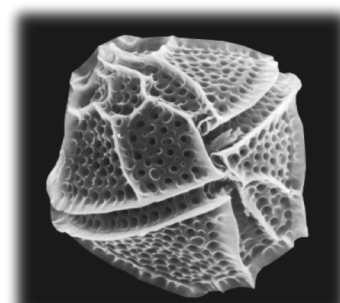


Figura 2. Imagen de un dinoflagelado por microscopía electrónica.

⁵ <https://es.wikipedia.org/wiki/Dinoflagellata>

⁶ Ceruti A.; Ceruti M.; Vigolo G., *Botanica Medica Farmaceutica e Veterinaria con elementi di Botanica Generale*, 1997, Bologna, Zanichelli, 309-311

función de la temperatura, salinidad y profundidad del agua. Generalmente se desarrollan en aguas frías ricas en nutrientes.

Los dinoflagelados poseen características ultraestructurales únicas como su núcleo: no poseen histonas, el núcleo no pierde la membrana nuclear durante la división mitótica y los filamentos de cromatina están permanentemente condensados.

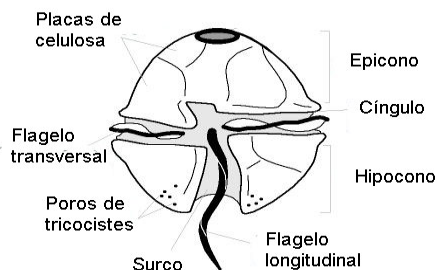


Figura 3. Esquema de un

Las células móviles presentan dos flagelos bien diferenciados, un flagelo transversal y ondulado que se aloja en el cíngulo, y el otro flagelo más convencional, que se dirige posteriormente y está alojado en el surco. Estos dos flagelos desiguales proporcionan a los dinoflagelados un característico movimiento rotacional que da nombre al grupo.⁷

Unas 60 especies de dinoflagelados producen potentes toxinas citolíticas, hepatotóxicas o neurotóxicas peligrosas para los seres humanos y otros organismos. Otros grupos de dinoflagelados han recibido especial atención por su emisión de luz a través de la bioluminiscencia.

En las últimas décadas se ha avanzado en las técnicas de cultivo, lo que puede ayudar a conocer su ciclo de vida, pero son aún pocas las especies que se mantienen en cultivo de forma permanente y no sabemos si los estados de vida y morfología que presentan en cultivos son similares en la naturaleza.

El *Amphidinium Carterae* es una especie productora de metabolitos de interés farmacológico que además puede ser cultivada en el laboratorio en las condiciones apropiadas, por lo que diversos grupos de investigación se interesaron a su estudio.

En función de sus características estructurales, estos metabolitos derivados de *Amphidinium*, se pueden clasificar en diferentes grupos: amphidinoles, amphidinolidas, amphirioninas, amphidinolactonas, amphidinocetidos..

Entre los metabolitos secundarios de esta especie tienen gran relevancia los amphidinoles (AMPs), compuestos con cadenas polihidroxiladas de naturaleza policétida.

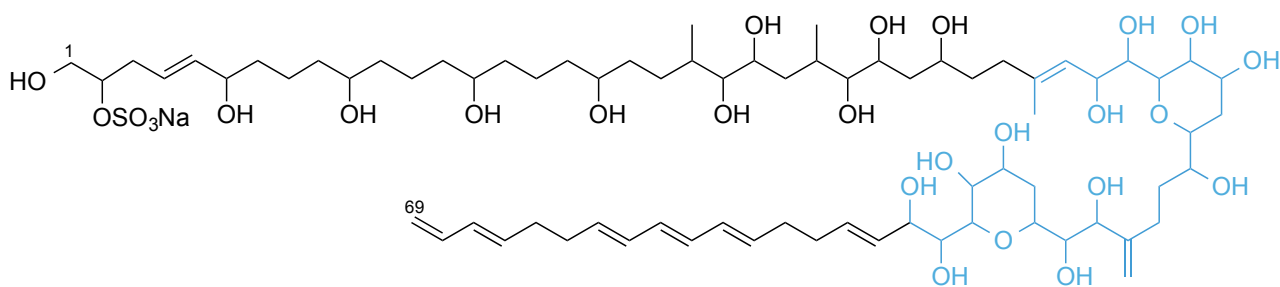
1.2.1. Amphidinoles

El primer ejemplo de esta serie, el amphidinol 1, fue aislado por el grupo del Prof. Yasumoto en 1991 a partir de cultivos de *Amphidinium klebsii*.⁸ A partir de entonces se han aislado un gran número de metabolitos con estructuras relacionadas. Estos productos naturales tienen en común dos anillos tetrahidropiranos separados por una pequeña cadena de seis carbonos, que es la responsable de que estas moléculas adopten conformaciones en forma de horquilla, con la que se relaciona la actividad antifúngica observada. Los miembros de este grupo se diferencian en las cadenas, tanto en la polihidroxilada como en la poliénica.⁹

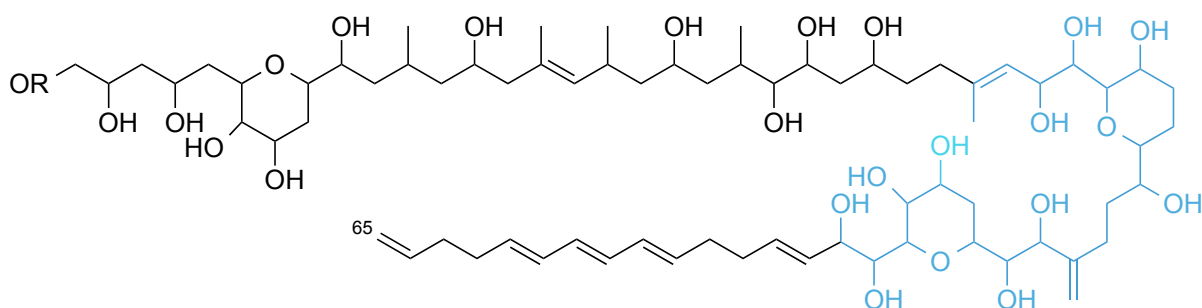
⁷ Gómez, F., Moreira, D., & López-García, P. (2011). Avances en el estudio de los dinoflagelados (Dinophyceae) con la filogenia molecular. *Hidrobiológica*, 21(3), 343-364.

⁸ Satake M.; Murata M.; Yasumoto T.; Fujita T.; Naoki H.J. *Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 9859-9861.

⁹ Cutignano A.; Fontana A.; Nuzzo G.; Sardo A.; Antifungal Amphidinol 18 and Its 7-Sulfate Derivative from the Marine Dinoflagellate *Amphidinium carterae*. *J. Nat. Prod.*, **2014**, 77 (6), pp 1524–1527

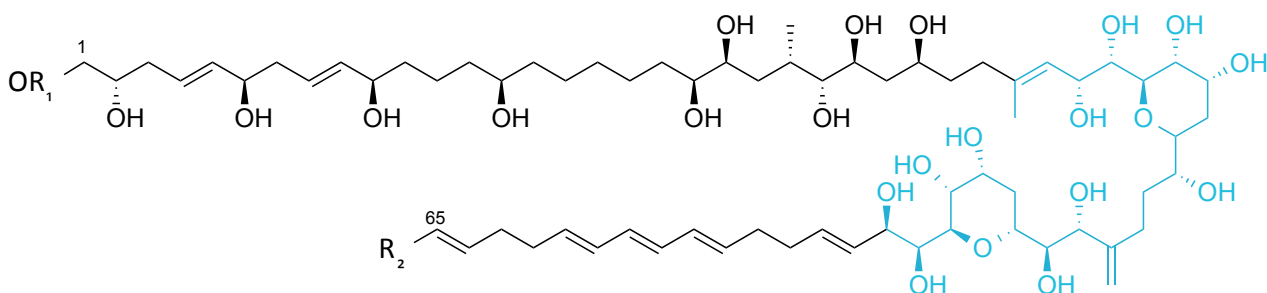


Amphidinol 1



R=H Amphidinol 2

R=SO₃Na Amphidinol 11



R₁ = H R₂ =

Amphidinol 3

R₁ = H R₂ = H

Amphidinol 4

R₁ = SO₃Na R₂ = H

Amphidinol 12

Figura 4. Estructura de algunos analogos de amphidinoles, en azul se evidencia la parte común.

I.2.2. Amphidinolidas

Las Amphidinolidas (APDLs) son otro grupo de metabolitos secundarios producidos por *Amphidium*. Constituyen una familia de macrólidos de los que aislaron unos 40 miembros. Son policétidos cíclicos con una alta variedad estructural, y con tamaños que oscilan entre los 12 y 29 átomos de carbono. En la figura se da un ejemplo de éste grupo, el Amphidinolido 3.

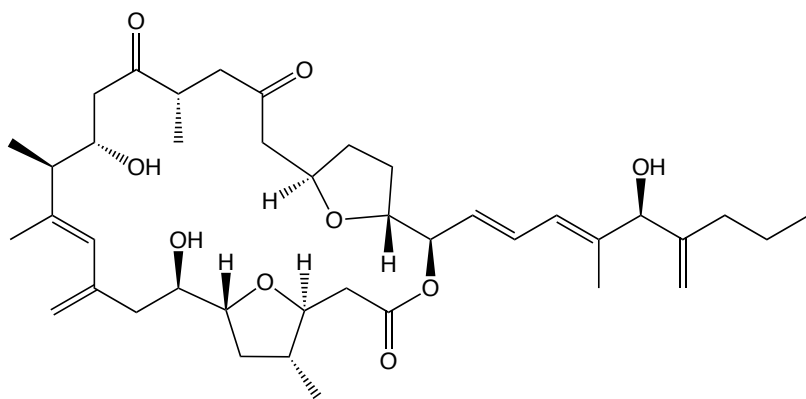


Figura 5. Estructura Amphidinolido 3¹⁰.

1.2.3. Amphirioninas

Las amphirioninas han demostrado tener actividad citotóxica contra células tumorales;^{11,12,13,14} testadas en células HeLa.

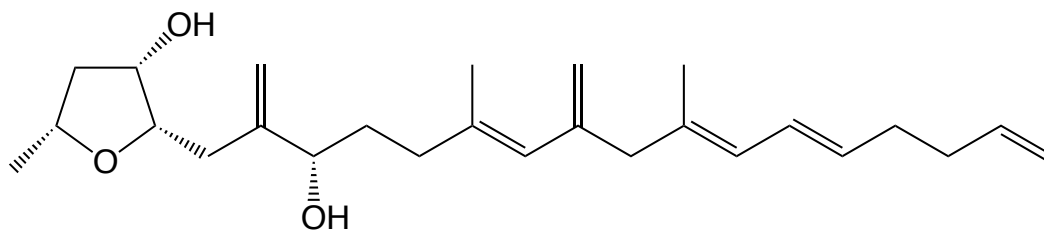


Figura 6. Estructura Amphirionin-4.

¹⁰ Fontana, A.; et al., Dinoflagellate-Related Amphidinolides from the Brazilian Octocoral *Stragulum bicolor*, *J. Nat. Prod.*, **2016**, 79, 1881-1885.

¹¹ M. Satake, M. Murata, T. Yasumoto, T. Fujita, H. Naoki. *J Am Chem Soc*, 113 (1991), pp. 9859–9861.

¹² Y. Yamamoto, K. Yamada, D. Uemura. *Tetrahedron Lett*, 53 (2012), pp. 239–242.

¹³ J. Kobayashi, M. Tsuda. *Nat Prod*, 21 (2004), pp. 77–93

¹⁴ J. Kobayashi, T. Kubota. *J Nat Prod Rep*, 70 (2007), pp. 451–460

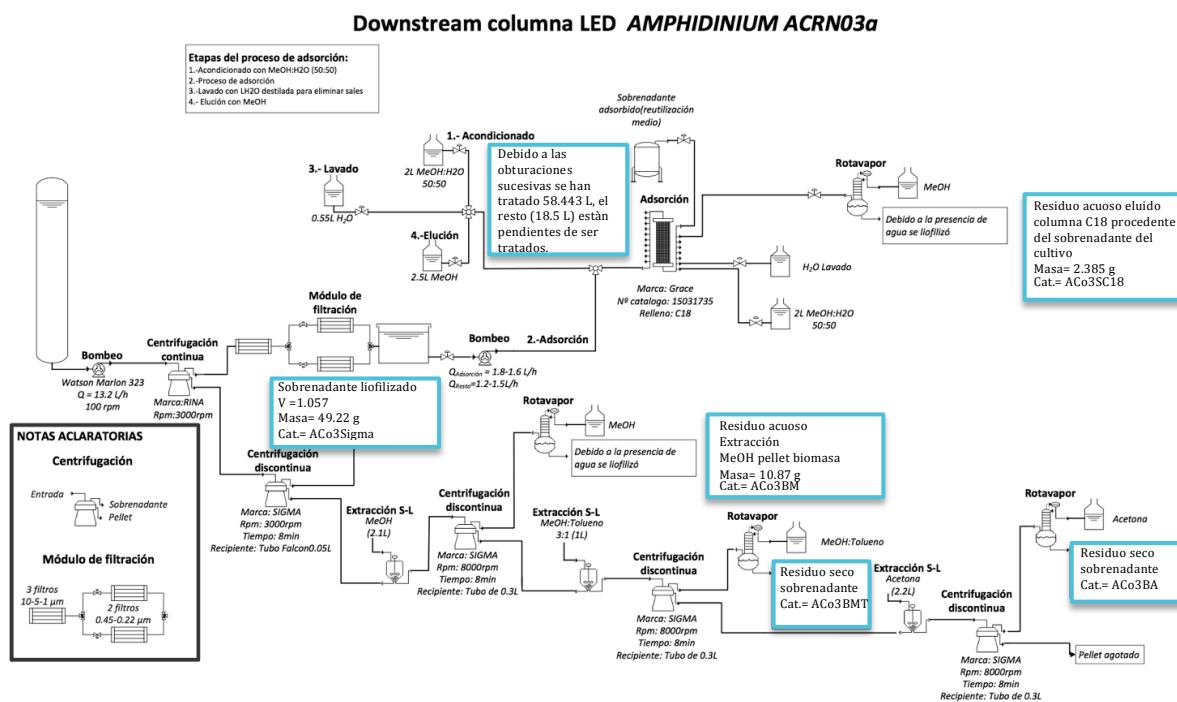
II. Objetivos

II.1. Acerca de esta memoria

Esta memoria ha sido el resultado de mi trabajo en el Instituto de Bio-Orgánica Antonio González, en el laboratorio de productos marinos.

A mi llegada en febrero me he incorporado en la línea de investigación que se encuadra dentro del proyecto BIOTECMAR. Sobre la base de resultados previos se propuso desarrollar las condiciones necesarias para llevar a cabo cultivos a gran escala género *Amphidinium*. El proyecto se realiza en colaboración con la Universidad de Almería donde se ha desarrollado un cultivo semi-industrial de la cepa ACRN03, recolectada en Isla Reunión, y generado distintos extractos (**esquema 1**).

Mi trabajo se centró en el estudio de uno de estos.



Esquema 1. Esquema de extracción de biomasa.

II.2. Objetivos

- Búsqueda de sustancias bioactivas de dinoflagelados genero *Amphidinium* cara al diseño de un bio proceso semi-industrial para su aprovechamiento
- Establecimiento de una marcha cromatográfica óptima para el aislamiento y purificación de metabolitos secundarios de interés.
- Familiarización y uso de distintas técnicas espectroscópicas, cromatográficas y de elucidación estructural.

III. Resultados y discusión

III.1. Separación cromatográfica

En esta memoria se recoge el estudio químico de los metabolitos secundarios del extracto metanólico (10,87g), (AC03BM), obtenido a partir de células del dinoflagelado *Amphidinium carterae*.

Para ello fue necesaria la puesta a punto de una marcha cromatográfica empleando distintas fases estacionarias. El proceso de separación empieza con una cromatografía de exclusión molecular, que permite separar las moléculas en virtud de su tamaño. Se utilizó una columna Sephadex LH-20 eluida en metanol dando lugar a cuatro fracciones de acuerdo con los perfiles observados en cromatografía de capa fina. (Figura 7)



Figura 7. Fases de la cromatografía de exclusión molecular.

Cada una de ellas así como el extracto original fueron evaluada frente a distintas líneas tumorales. (Figura 8 y Tabla 1)

Se observó que presentan actividad citotóxica excepto la última fracción de la Sephadex.

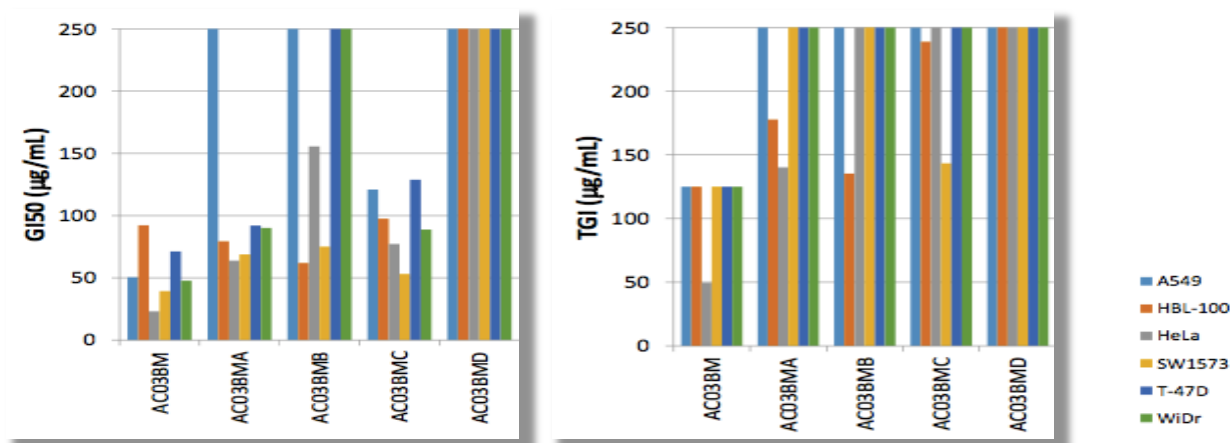


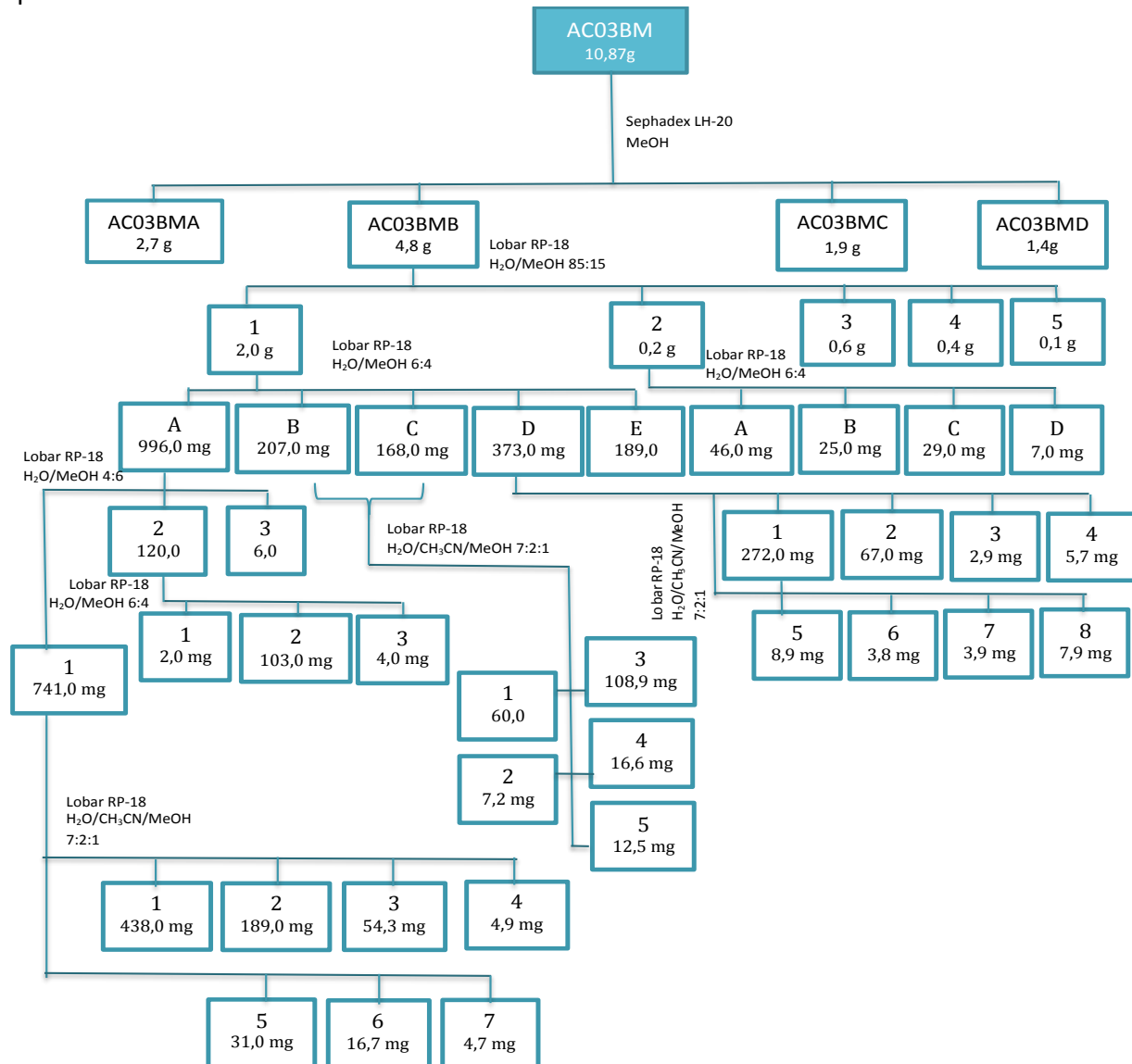
Figura 8. Inhibición de crecimiento de la mitad de población (GI50) y inhibición de crecimiento total (TGI).

		Screening results in GI ₅₀ (micrograms/mL)					
		Cell line					
Cmax	Reference	A549	HBL-100	HeLa	SW1573	T-47D	WiDr
125	AC03BM	51	92	23	39	71	48
250	AC03BMA	250	79	64	69	92	90
250	AC03BMB	250	62	156	75	250	250
250	AC03BMC	121	97	77	53	129	89
250	AC03BMD	250	250	250	250	250	250

		Screening results in TGI (micrograms/mL)					
		Cell line					
Cmax	Reference	A549	HBL-100	HeLa	SW1573	T-47D	WiDr
125	AC03BM	125	125	50	125	125	125
250	AC03BMA	250	178	140	250	250	250
250	AC03BMB	250	135	250	250	250	250
250	AC03BMC	250	239	250	143	250	250
250	AC03BMD	250	250	250	250	250	250

Tabla 1. Valores de GI₅₀. y TGI.

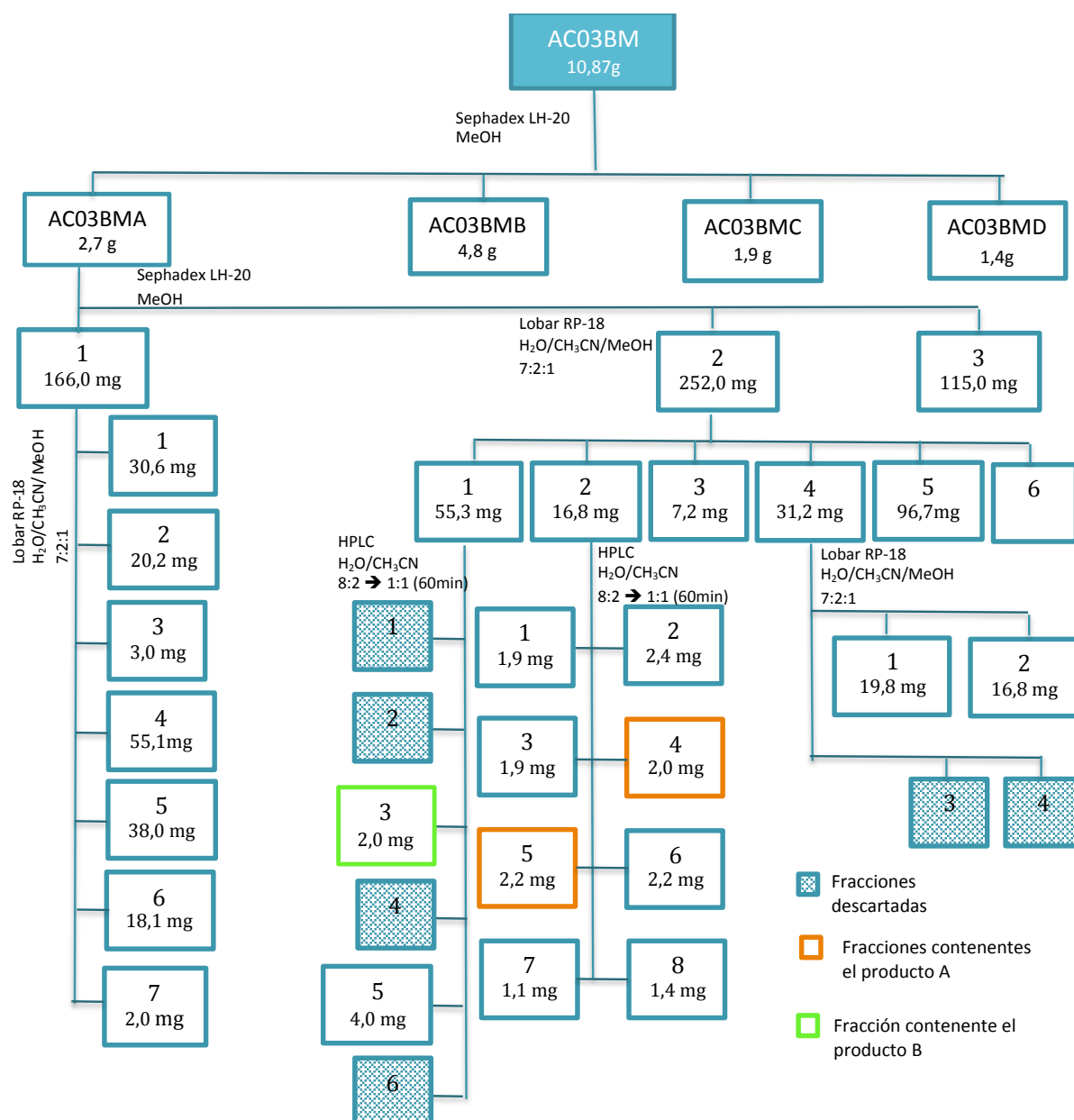
Las dos primeras fracciones fueron sometidas a un exhaustivo tratamiento cromatográfico como se resume en los **Esquemas 2 y 3** mostrando un elevado contenido en metabolitos de elevado peso molecular. En el caso de la primera fracción se llegó a la purificación de dos productos por lo que se detalla a continuación.



Esquema 2.Marcha cromatográfica realizada sobre la fracción AC03BMB.

Así la fracción AC03BMA se volvió a cromatografiar en Sephadex LH-20 y metanol para dar 3 fracciones. Las más interesantes, AC03BMA1 y AC03BMA2, fueron sometidas a una cromatografía de media presión en fase reversa Lobar Lichroprep RP-18 y como fase móvil la mezcla trifásica H₂O/CH₃CN/CH₃OH (7:2:1) que a través de varias pruebas manifestó que garantizaba mejores separaciones. Para el análisis de estas fracciones, los análisis en capa fina no fueron útiles porque aunque revelaban al UV eran productos tan polares que no se movían del punto de aplicación. Por ello decidimos conectar las columnas a un detector ultravioleta y a una longitud de onda de 270 nm. De acuerdo con lo observado, se reunieron las fracciones y se sometieron a análisis RMN-¹H y se decidió seguir el estudio de las fracciones AC03BMA21 y AC03BMA22.

Las dichas fracciones fueron purificadas en HPLC empleándose una columna μBondapak WATERS (19mm-150mm) (2ml/min) y una fase móvil en las siguientes condiciones: 10 minutos isocráticos de H₂O/CH₃CN 8:2, seguido de un gradiente hasta llegar a H₂O/CH₃CN 1:1 en 60 minutos. Como resultado se aislaron dos productos puros, A y B, que fueron sometidos a estudios de elucidación estructural (**Esquema 3**).



Esquema 3. Marcha cromatografica realizada sobre la fracción AC03BMA

III.2. Caracterización estructural

Para poder definir la estructura de la molécula A encontrada es necesario realizar una serie de experimentos de RMN, tanto monodimensionales (RMN- ^1H y RMN- ^{13}C) como bidimensionales (COSY, HSQC, HSQC-TOCSY, HMBC). Para ello se disolvió la muestra en CD_3OD .

El análisis espectroscópico nos permite determinar la presencia de dos carbonos cuaternarios sp^2 , veintisiete metinos sp^3 , doce metinos sp^2 , veintidós metilenos sp^3 , dos metilenos sp^2 y dos grupos metilos.

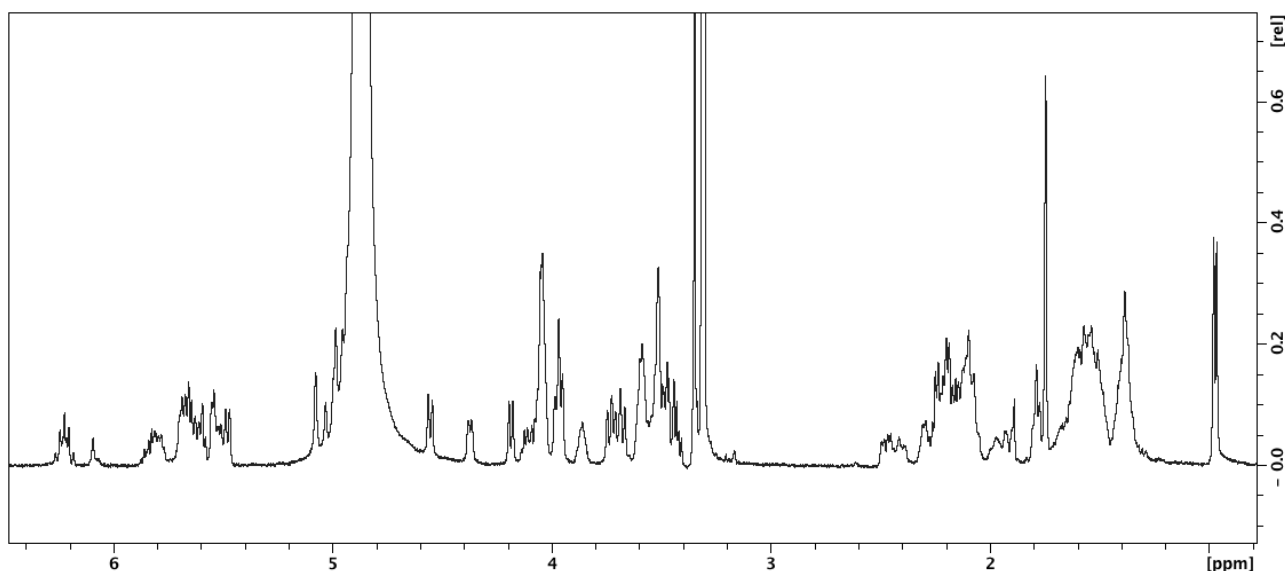


Figura 9. Espectro RMN- ^1H de la molécula A.

A través de los experimentos COSY y HSQC-TOCSY se pudo establecer los siguientes fragmentos de espín ^1H - ^1H : H_2 1- H_2 27, H_2 29- H_2 39, H_2 41- H_2 63. (**Figura 10**).

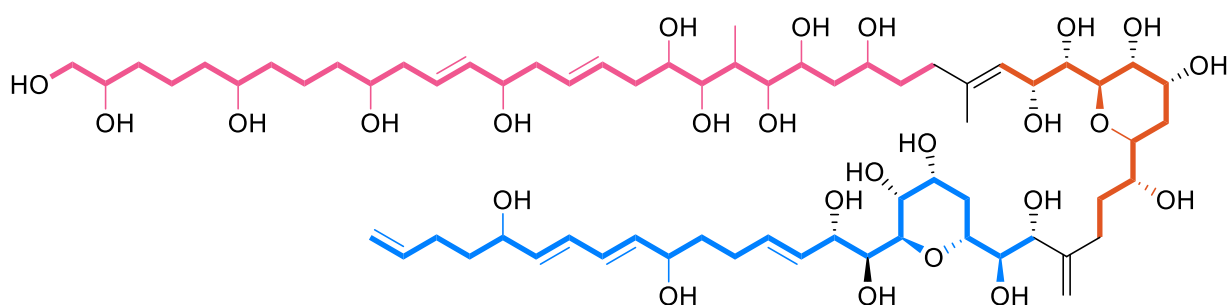


Figura 10. Secuencia observada para la molécula A.

Las señales involucradas en estos fragmentos fueron conectadas a través del experimento HSQC editado con sus respectivos carbonos (**Figura 11-14**).

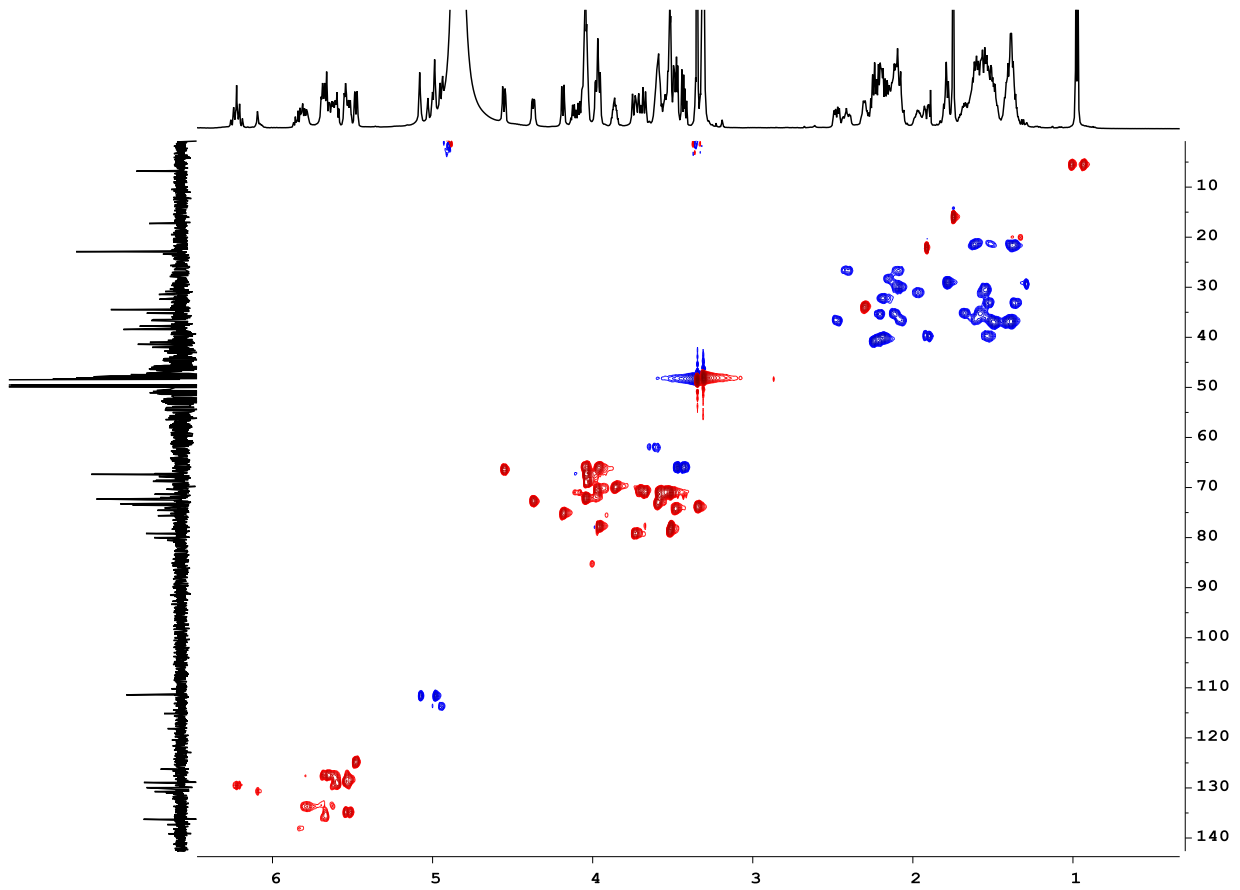


Figura 11. Experimento HSQC

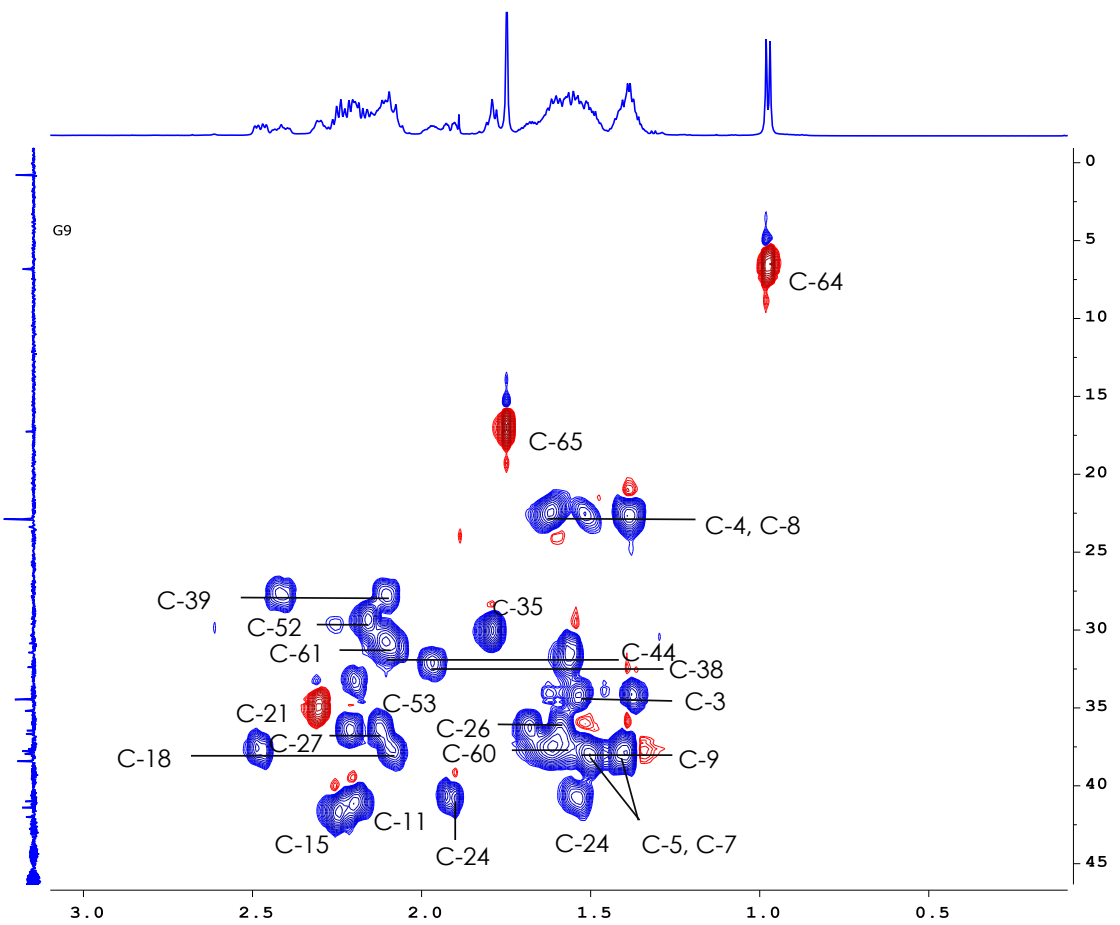


Figura 12. Experimento HSQC, detalle.

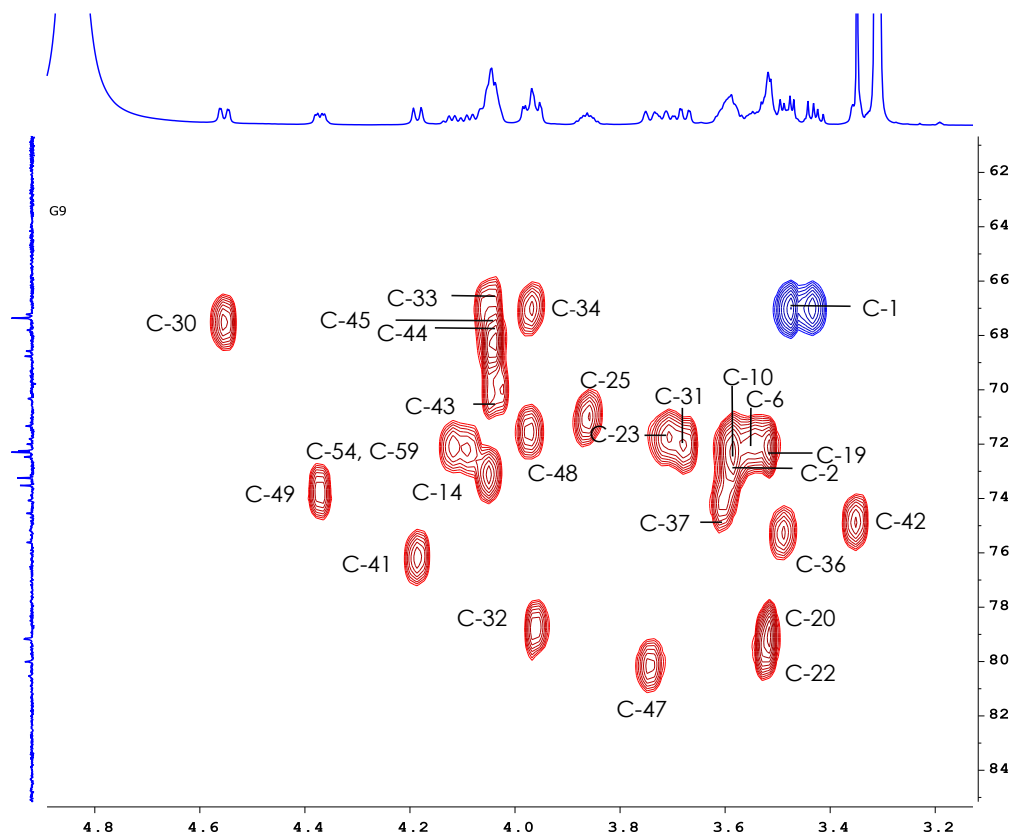


Figura 13. Experimento HSQC, detalle de la zona de los alcoholes.

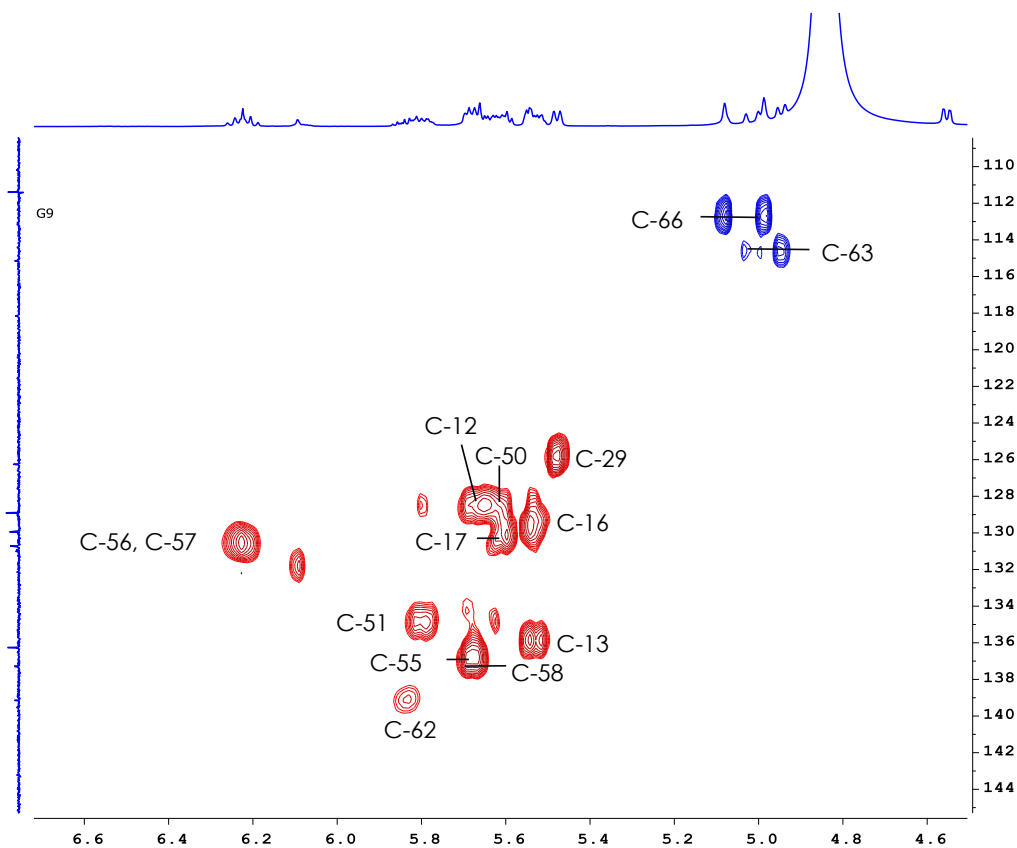


Figura 14. Experimento HSQC, detalle de la zona de doble enlaces.

Una vez establecidos los fragmentos se recurrió al HMBC para unir sistemas de espín y completar la estructura con los dos carbonos cuaternarios, el metilo angular y el *exo*-metileno restantes (**Figuras 16-20**).

- Los protones H₂-66 (δ_H 4.98 y 5.08) y H₄₁ (δ_H 4.19) muestran conectividades con C-39 (δ_C 28.2), C-40 (δ_C 151.4) y entre sí. Asimismo se observa correlación de H₄₁ con C-42 (δ_C 75.3) y C-66 (δ_C 113.2).

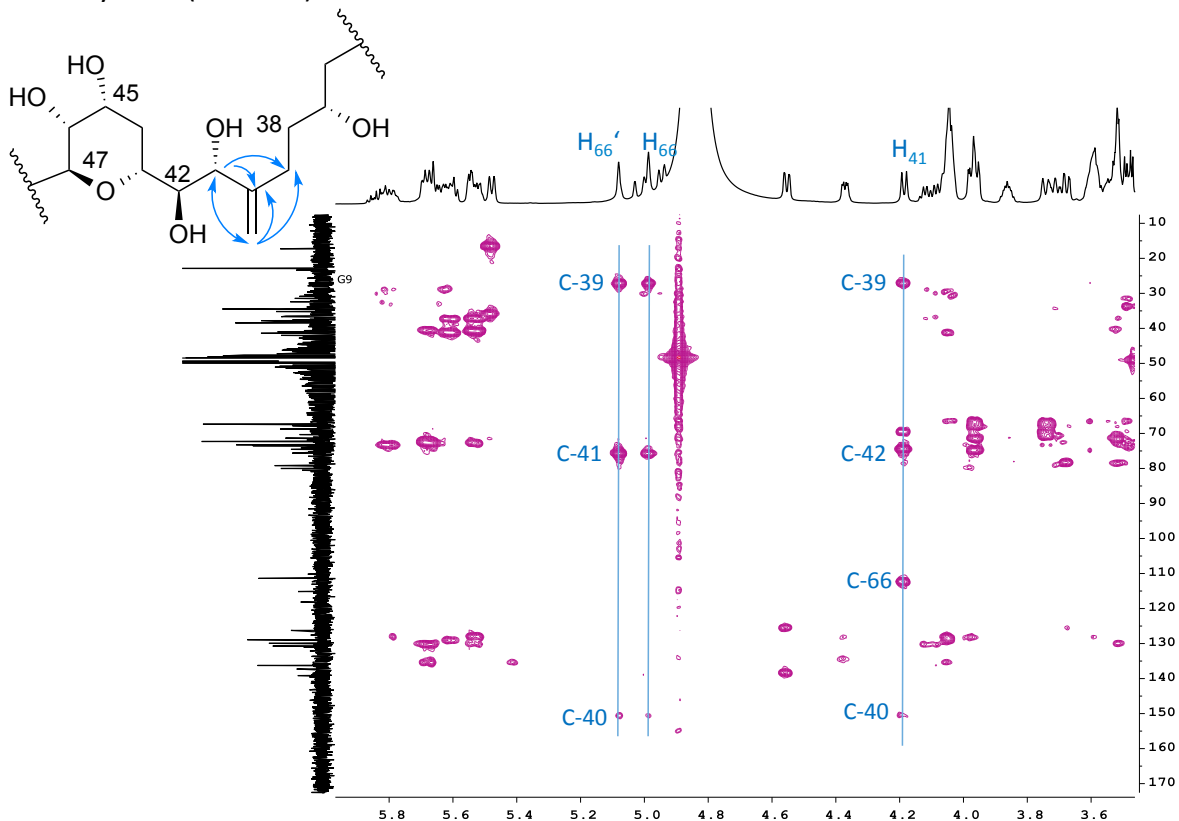


Figura 15. Experimento HMBC, detalle.

- Los protones H₂-27 (δ_H 2.12, 2.21) muestran correlación con los carbonos C-65 (δ_C 17.4) y C-29 (δ_C 126.4). También son significativas las conectividades H₃-65 (δ_H 1.75) / C-27 (δ_C 36.8), C-29 y C-28 (δ_C 139.4); y H₂₉ (δ_H 5.48) / C-27 y C-65.

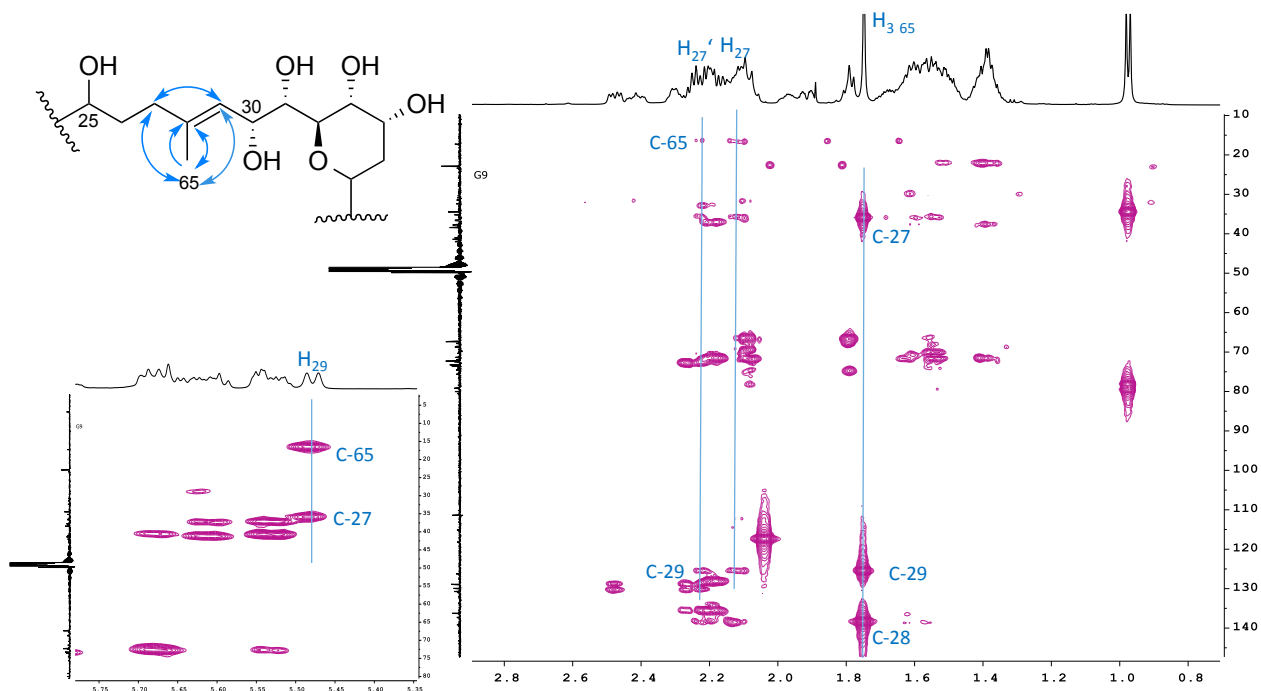


Figura 16. Experimento HMBC, detalle.

Por otro lado, en este experimento resultaron claves las correlaciones a larga distancia del metino H_{32} (δ_H 3.97) con el carbono C-36 (δ_C 75.8) y de H_{47} (δ_H 80.7) con C-43 (δ_C 70.5) que establece la presencia de puentes éter entre esas posiciones constituyendo dos anillos de tetrahidropirano. De esta forma se completa la estructura plana de la molécula. (**Figura 18 y 19**)

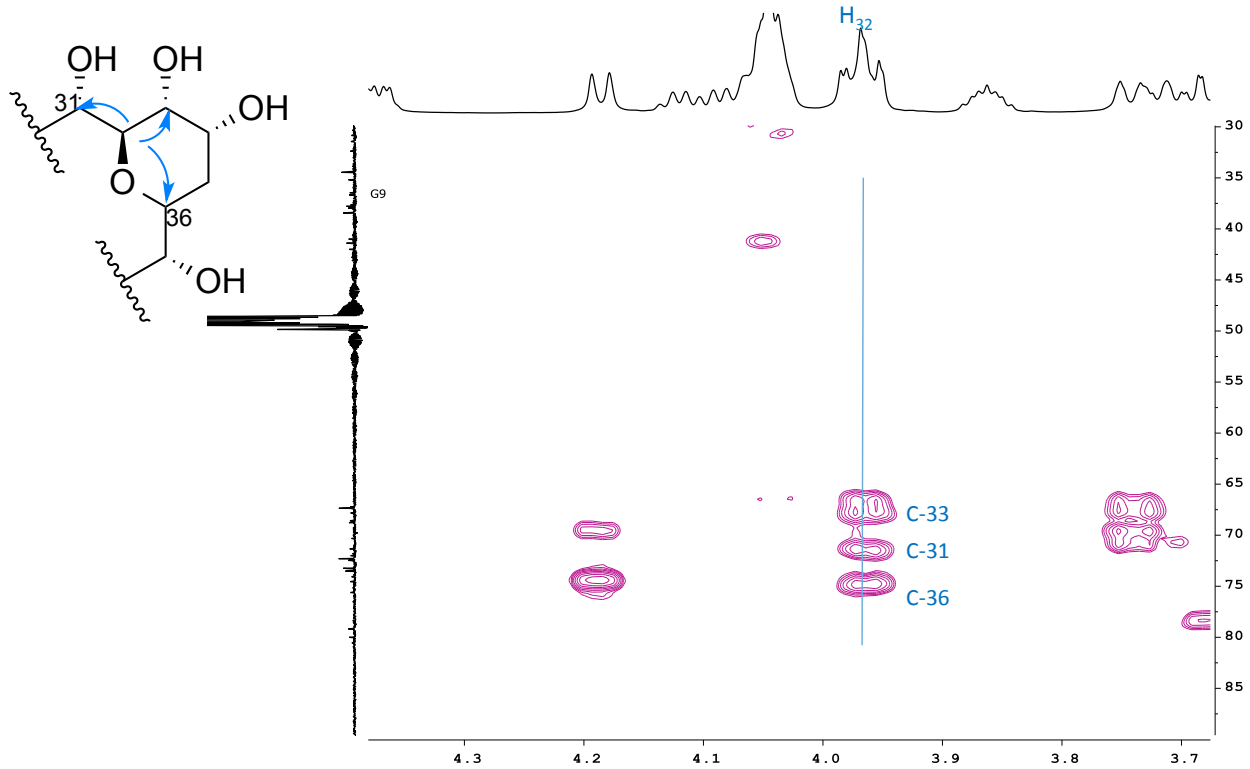


Figura 17. Experimento HMBC, detalle.

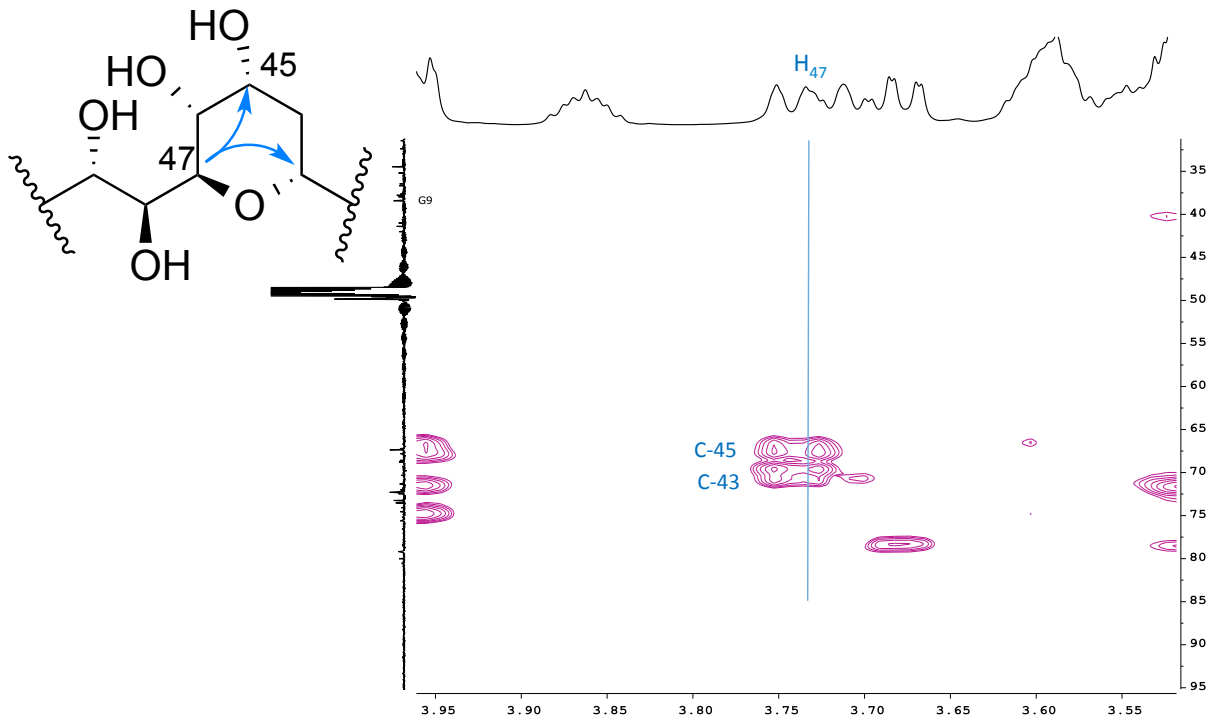


Figura 18. Experimento HMBC, detalle.

Esta estructura coincide con la publicada para el Luteophanol D, aislado previamente por el prof. Kobayashi¹⁵, aunque en esta memoria se recoge por primera vez los datos de desplazamientos químicos en CD₃OD (**Tabla 4**) que servirán como base para la elucidación de los otros derivados.

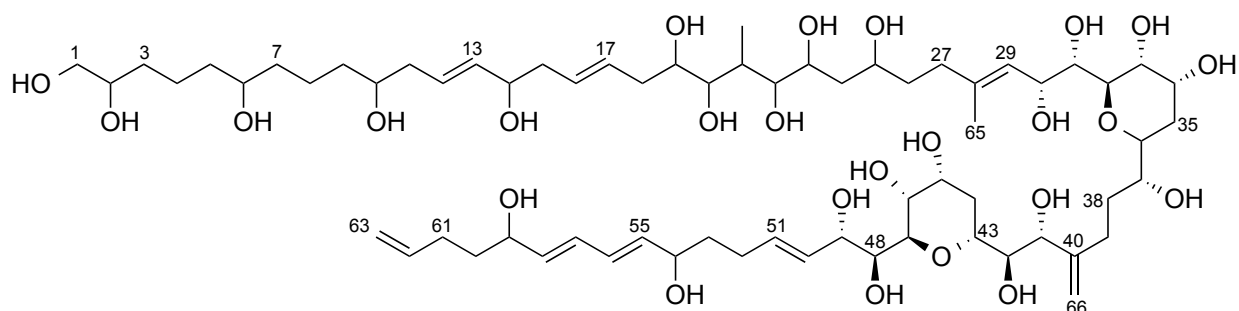


Figura 19. Estructura del Luteophanol D.

Luteophanol D

Carbono	δ_c , type	δ_H	Carbono	δ_c , type	δ_H
1	67.5, CH ₂	3.43	34	67.5, CH	3.97
2	72.4, CH ₂	3.58	35	30.5, CH ₂	1.79 (2H)
3	34.6, CH ₂	1.36	36	75.8, CH	3.48
4	23.0, CH ₂	1.53	37	74.6, CH	3.59
5	38.5, CH ₂	1.38	38	32.6, CH ₂	1.56
6	72.4, CH	1.50	39	28.2, CH ₂	1.97
7	38.5, CH ₂	3.55	40	151.4, C	2.09
8	23.0, CH ₂	1.38	41	76.7, CH	2.41
9	38.4, CH ₂	1.62	42	75.3, CH	3.34
10	72.5, CH	1.40	43	70.5, CH	4.04
11	41.5, CH ₂	1.52	44	31.6, CH ₂	1.55
12	129.1, CH	2.20 (2H)	45	68.7, CH	2.08
13	136.4, CH	5.68	46	68.9, CH	4.03
14	73.7, CH	5.55	47	80.7, CH	4.05
15	42.2, CH ₂	4.05	48	72.0, CH	3.73
16	130.4, CH	2.24 (2H)	49	74.2, CH	3.97
17	130.7, CH	5.54	50	129.1, CH	4.37
18	38.1, CH ₂	5.61	51	135.4, CH	5.64
19	72.6, CH	2.08	52	29.8, CH ₂	5.80
20	79.3, CH	2.48	53	33.8, CH	2.15 (2H)
21	35.3, CH	3.52	54	72.6, CH	2.19 (2H)
22	80.2, CH	3.51	55	137.5	4.11
23	72.2, CH	2.31	56	131.1, CH	5.64
24	41.2, CH ₂	3.52	57	131.1, CH	6.23
25	71.5, CH	3.71	58	137.5, CH	6.23
26	36.6, CH ₂	1.54	59	72.6, CH	5.69
		1.93			4.11
		3.86			
		1.58			
		1.68			

Tabla 4. Desplazamientos químicos del Luteophanol D obtenidos de RMN en CD₃OD.

¹⁵ J. Kobayashi, T. Kubota, A. Takahashi, M. Tsuda, *Mar Drugs*, 3, 2005, 113-118

Esta conclusión se reafirma con los datos de espectrometría de masas: donde son evidentes los picos característicos correspondientes a $[M+Na^2]$ a m/z 1329 y a $[M+H^+]$ a m/z 1305.

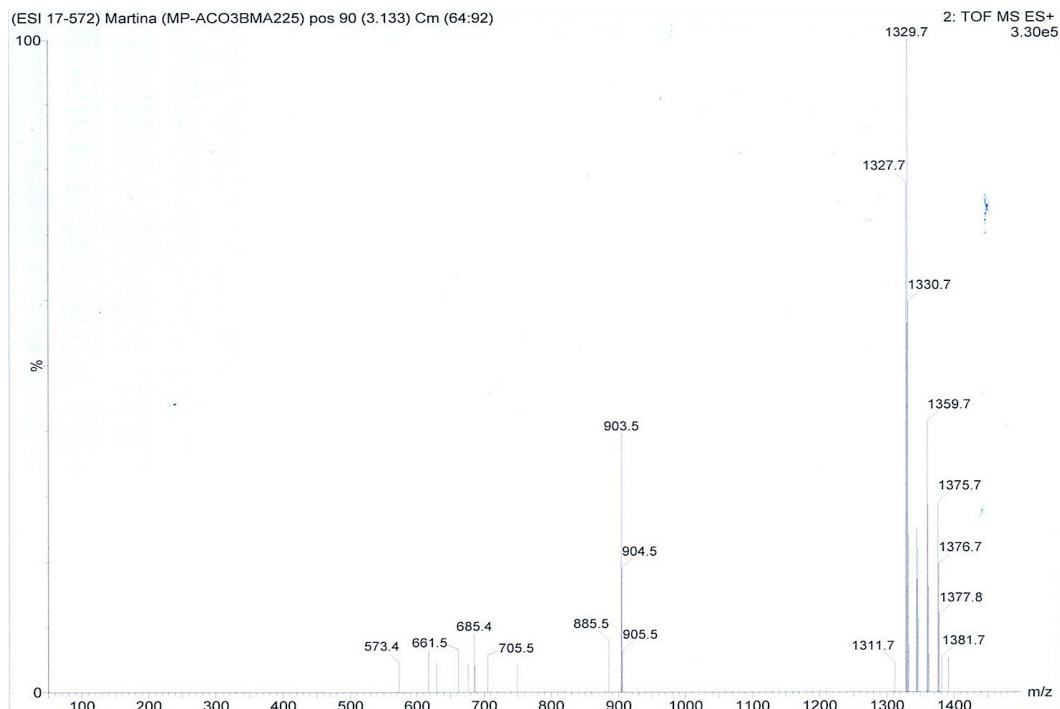


Figura 20. Espectro de masa en modo positivo.

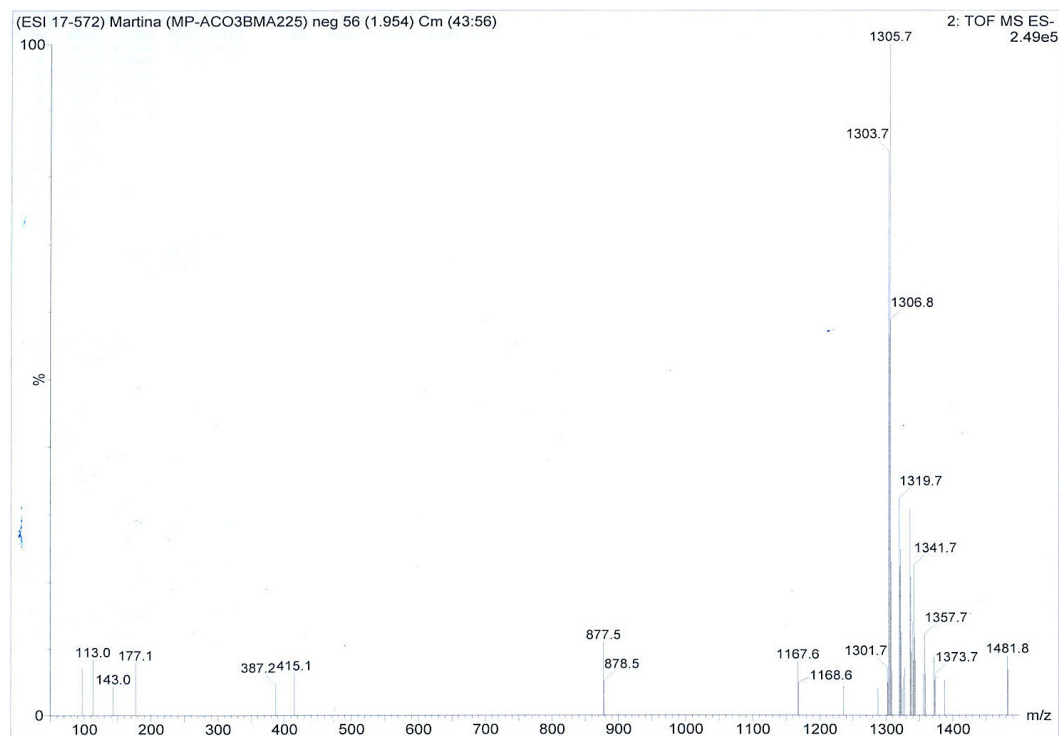


Figura 21. Espectro de masa en modo negativo

En cuanto a la molécula B en fase de estudio, en este momento se puede afirmar que presenta la misma estructura del luteophanol D hasta el carbono 49, y que las diferencias se centran en el final de la cadena.

IV. Materiales y métodos

IV.1. Técnicas cromatográficas

- Cromatografía de exclusión molecular

Se llevó a cabo en una columna SEPHADEX LH-20 SIGMA® (Ø 6,5 x 27,5 cm) en CH₃OH; el eluyente fue bombeado mediante una bomba FLUID METERING®.

- Cromatografía líquida en fase reversa

Se utilizó una columna LOBAR® LiChroprep® RP-18 (40-63 µm) de la casa MERCK®, conectada a una bomba FLUID METERING® por la parte de arriba y conectada por debajo a un detector UV.

Los disolventes empleados como agentes de elución fueron metanol, agua y acetonitrilo en distintas mezclas bifásicas o trifásicas.



Figura 22. Ejemplo de separación en columna de media presión en fase reversa

- Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Se empleó una columna µBondapak WATERS (19mm-150mm) con flujo de 2ml al minuto y las fracciones fueron recogidas mediante un colector automático GILSON® FC203B.

- Cromatografía en capa fina

Se utilizó esta técnica después de las separaciones cromatográficas para decidir como repartir el eluato en fracciones.

Como fase móvil se utilizaron:

- C₆H₆:C₃H₆O: MeOH: ACOHCN 150:80:19:1
- CH₂Cl₂: MeOH 8:2 y 6:4

- BuOH: AcOH:H₂O 4:2:1

Para el revelado y la visualización se pulverizó una disolución al 4% de ácido fosfomolibdico en etanol y posterior calentamiento a 140°C.

IV.2. Técnicas espectroscópicas

- Resonancia magnética nuclear

Se utilizaron los espectrómetros BRUKER® AVANCE 500MHz y 600 MHz para realizar los experimentos de RMN llevados a cabo a lo largo del presente trabajo. Como disolvente se utilizó CD₃OH.



Figura 23. Aparatos de Resonancia Magnética Nuclear utilizados a lo largo de este estudio.

- Espectrometría de masas

Los espectros de masas fueron realizados en un espectrómetro Micromass modelo LCT Premier XE, usando electrospray como fuente de ionización.

V. Conclusiones

V.1. Conclusiones

Los resultados de mi análisis solo han sido posibles por el hecho de tener una gran cantidad de muestra inicial. Por ello, considero muy importante el objetivo del proyecto BIOTECMAR de poner a punto las condiciones necesarias para llevar a cabo cultivos a gran escala de dinoflagelados género *Amphidinium*.

El trabajo en el IUBO me permitió acercarme a técnicas cromatográficas y espectroscópicas fundamentales para cualquier estudio biosintético.

En el momento de la entrega de la presente memoria, trabajo en la elucidación estructural de la molécula de la fracción AC03BMA213, y que continuaré hasta mi regreso a Italia.