



**Universidad
de La Laguna**



Trabajo de Fin de Grado

Búsqueda de productos bioactivos de origen marino

Sergio Ojeda Gil

5º Grado en Farmacia

Curso 2018-2019

Convocatoria: Julio

Tutores:

Manuel Norte Martín

José Javier Fernández Castro

María Luisa Souto Suárez

Departamento de Química

Área de Química Orgánica



RESUMEN

La naturaleza, desde la antigüedad, ha proporcionado remedios para paliar problemas de salud, siendo el reservorio, con más vistas de futuro, en cuanto a la obtención de productos químicos bioactivos para el desarrollo de medicamentos. La aparición de nuevas patologías y la búsqueda de fármacos frente a ellas, ha puesto el punto de mira en el fondo marino. Las algas rojas, destacando el género *Laurencia*, son actualmente una fuente en investigación prometedora en el hallazgo de moléculas con actividad terapéutica. Cuenta con una amplia variedad fenotípica, observándose, por tanto, una gran diversidad metabólica. Este trabajo se fundamenta en el estudio fitoquímico de especímenes de *Laurencia dendroidea* recolectada en el Puerto de la Cruz, al norte de la isla de Tenerife, centrados en la búsqueda de metabolitos secundarios con actividad e interés terapéutico, y/o estructuras novedosas de fuentes marinos, mediante uso avanzado de técnicas cromatografías y espectroscópicas, así como pruebas de actividad biológica.

ABSTRACT

Nature, since ancient times, has provided remedies for health problems, being the most forward-looking reservoir as far as obtaining bioactive chemicals for drug development is concerned. The emergence of new diseases and the search for drugs against them, has put the spotlight on the seabed. Red algae, highlighting the genus *Laurencia*, are currently a source of promising research in the discovery of molecules with therapeutic activity. It has a wide phenotypic variety, therefore, a great metabolic diversity is observed. This work is based on the phytochemical study of a specimen of *Laurencia dendroidea* collected in Puerto de la Cruz, north of the island of Tenerife, investigating the search for metabolites with activity and therapeutic interest, using different chromatography and spectroscopic techniques, as well as evidence of biological activity.

ÍNDICE

1. Introducción.....	4
1.1. El fondo marino como fuente de recursos.....	4
1.2. El género <i>Laurencia</i>	6
1.2.1. Sesquiterpenos propios del género <i>Laurencia</i>	7
2. Objetivos.....	10
3. Material y métodos.....	11
3.1. Material biológico.....	11
3.2. Técnicas cromatográficas.....	12
3.2.1. Cromatografía de Exclusión Molecular.....	12
3.2.2. Cromatografía Líquida en Columna de Media Presión (MPLC).....	12
3.2.3. Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC).....	12
3.2.4. Cromatografía en Capa Fina.....	13
3.3. Técnicas espectroscópicas.....	13
3.3.1. Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	13
3.3.2. Espectrometría de Masas.....	13
3.3.3. Absorción en el Infrarrojo.....	13
3.3.4. Rotación óptica.....	14
4. Resultados y discusión.....	15
4.1. Estudio cromatográfico de extractos de <i>Laurencia dendroidea</i>	15
4.2. Elucidación estructural.....	18
4.2.1. Compuesto 1.....	18
4.2.2. Compuesto 2 y 3.....	25
4.2.3. Compuesto 4.....	31
5. Evaluación biológica.....	32
6. Conclusiones.....	33

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El fondo marino como fuente de recursos

Hoy en día, son muchas las necesidades terapéuticas a cubrir (cáncer, diabetes, obesidad, ...), siendo necesaria la puesta en marcha de nuevas líneas de investigación. Aunque los océanos contienen una biodiversidad superior a la de la tierra, su exploración en el ámbito de búsqueda de nuevos compuestos químicos ha sido pequeña en comparación a su potencial.

Los ecosistemas marinos conforman un suministro continuo de compuestos químicos con bioactividades que pueden conducir a nuevos candidatos a fármacos.¹ En la actualidad, son muchos los productos naturales de origen marino que han mostrado actividad en la mayoría de las dianas celulares y moleculares.¹

Es en el área de la oncología donde la mayoría de los metabolitos marinos actúan, pero no es el único; por ejemplo, las neurotoxinas de dinoflagelados y moluscos ejercen como venenos paralizantes, comercializándose ciertos péptidos para el tratamiento del dolor.²⁻³⁻⁴

Actualmente, son varios los fármacos o compuestos de origen marino que podemos encontrar en el mercado, destacando:⁵

- AZT (Zidovudina): antiviral de importancia en la lucha contra el sida, aunque también sirvió como molde en el desarrollo de análogos para el tratamiento de leucemias (**Figura 1**).



FIGURA 1. Forma comercial y estructura química de AZT

¹ Carrol, A. R.; Copp, B. R.; Davis, R. A.; Keyzers, R. A.; Prinsep, M. R. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.*, 2019, 36, 122–173

² Jiménez, C. Marine Natural products in Medicinal Chemistry. *ACS Med. Chem. Lett.* 2018, 9, 10, 959-961.

³ Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.* 2016, 79, 629–661.

⁴ Patridge, E.; Gareiss, P.; Kinch, M. S.; Hoyer, D. An analysis of FDA-approved drugs: natural products and their derivatives. *Drug Discov. Today*, 2016, 21, 204–207.

⁵ F. de la Calle PS. Fármacos de Origen Marino. *Treballs de la SCB*, 2007, 58, 141-155.

- Manzamina A: presenta efectos citotóxicos, insecticidas y antibacterianos, se emplea en ensayos clínicos frente a malaria (**Figura 2**).

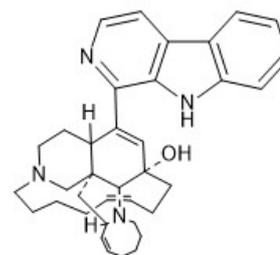


FIGURA 2. Estructura química de Manzamina A

- Ácido okadaico: toxina marina lipofílica producida por microalgas del género *Dinophysis* y *Prorocentrum*. Caracterizado por su actividad citotóxica y por ser buen inhibidor de la actividad de las proteínas fosfatasa de serina/treonina (PPs), siendo un potente antitumoral⁶ (**Figura 3**).

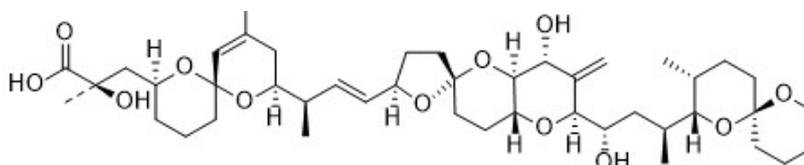


FIGURA 3. Estructura química del Ácido okadaico

- Pseudopterosinas: dipterenos bicíclicos glicosilados, con potente actividad antiinflamatoria⁵ (**Figura 4**).

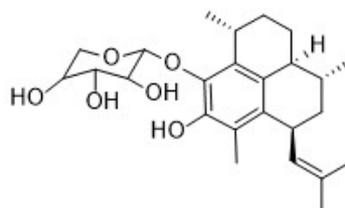


FIGURA 4. Estructura química general de una Pseudopterosina

- Ziconotida (Prialt®): péptido neuroparalizante con aplicación en tratamientos analgésicos en enfermedades terminales, siendo mucho más eficaz y con mejor tolerancia que la morfina⁵ (**Figura 5**).

- ⁶ Fernández, J. J.; Cadenas, M.L.; Souto, M. L.; Trujillo, M. M.; Norte, M. Okadaic Acid, Useful Tool for Studying Cellular Processes. *Cur. Med. Chem.* 2002, 9, 229-262.

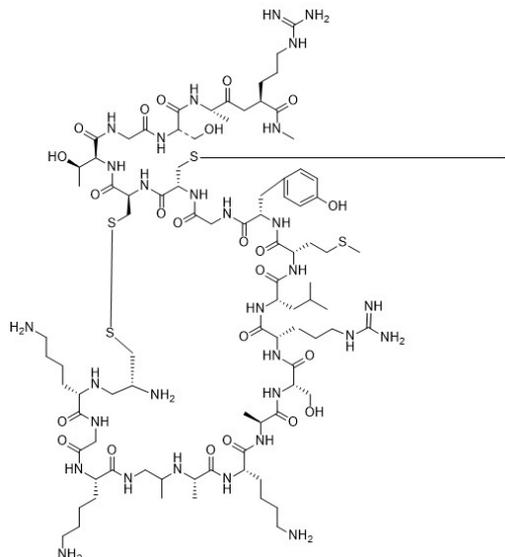


FIGURA 5. Forma comercial (Prialt[®]) y estructura química de Ziconotida

- Ecteinascidinas (ET-743, trabectedina, Yondelis[®]): potente antitumoral, indicado en el tratamiento de sarcomas de tejido blando y, actualmente, en ensayo para su aplicación en cáncer de ovario⁵ (**Figura 6**).

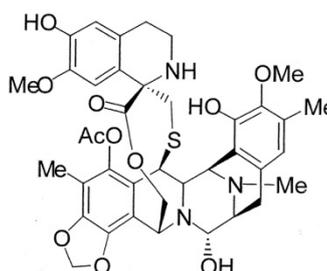


FIGURA 6. Forma comercial (Yondelis[®]) y estructura química de ET-743

Con este trabajo, queremos continuar con la investigación en este campo de los productos naturales bioactivos de origen marino, centrándonos en las algas rojas del género *Laurencia*, concretamente, en la especie *Laurencia dendroidea*.

1.2. El género *Laurencia*

Laurencia dendroidea J. Agardh (**Figura 7**) es una de las 146 especies taxonómicamente aceptadas del género *Laurencia*, perteneciente al orden Ceramiales, familia Rhodomelaceae, tribu Laurencieae.⁷ Esta especie es común en zonas de aguas costeras tropicales, subtropicales y templadas, como es el caso de las Islas Canarias.

Este género cobra gran interés debido a la diversidad de sus metabolitos secundarios, con actividad antitumoral, antibacteriana, antiinflamatoria, etc.^{7,8,9,10}



FIGURA 7. Especimen de *L. dendroidea*

Las especies del género *Laurencia* producen diversos metabolitos secundarios halogenados o no halogenados, clasificados, según su origen, en 2 grandes grupos:

- Terpenoides: en donde podemos diferenciar sesquiterpenos, diterpenos y triterpenos.
- No terpenoides C₁₅: dentro de este grupo encontramos las acetogeninas, derivadas del metabolismo de los ácidos grasos.

1.2.1 Sesquiterpenos propios del género *Laurencia*

Los sesquiterpenos, de varias clases y esqueletos carbonados, son los principales constituyentes de este género.⁷ Entre los más de 50 esqueletos carbonados destacan las chamigranos, por ser las más frecuentes. Se caracterizan por presentar un esqueleto tipo espiro [5.5] undecano que contiene un carbono cuaternario estereogénico en la unión del espirociclo (C-6) (**Figura 8**).

⁷ Harizani, M.; Ioannou, E.; Roussis, V. The *Laurencia* paradox: An endless source of chemodiversity. In *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*; Kinghorn, A.D., Galk, H., Gibbons, S., Kobayashi, J., Eds.; Springer: Berlin, Germany, 2016; 102, pp. 91–252

⁸ Fuji MT, Cassano V, Stein ÉM, Carvalho LR. Overview of the taxonomy and of the major secondary metabolites and their biological activities related to human health of the *Laurencia* complex (Ceremiales, Rhodophyta) from Brazil. *Rev Bras Farmacogn.* 2011, 21(2):268-82.

⁹ Vairappan CS, Kamada T, Lee W-W, Jeon Y-J. Anti-inflammatory activity of halogenated secondary metabolites of *Laurencia snackeyi* (Weber-van Bosse) Masuda in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *J Appl Phycol.* 2013, 25(6):1805–13.

¹⁰ Vairappan CS. Potent antibacterial activity of halogenated metabolites from Malaysian red algae, *Laurencia majuscula* (Rhodomelaceae, Ceremiales). *Biomol Eng.* 2003; 20(4–6):255–9.

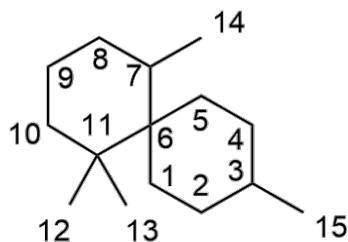


FIGURA 8. Esqueleto tipo chamigranos

Pueden dividirse en cuatro subclases:

- α -chamigranos: con un enlace trisustituido entre C-7 y C-8 (**Figura 9**).



FIGURA 9. Estructuras ejemplo de α -chamigrane

- β -chamigranos: poseen un exometileno en C-7 (**Figura 10**)

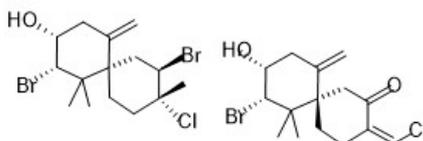


FIGURA 10. Estructuras ejemplo de β -chamigrano con un exometileno en C-7

- Chamigranos con oxigenación en C-7 (**Figura 11**)

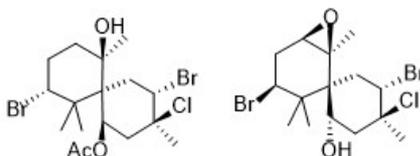


FIGURA 11. Estructuras ejemplo de chamigranos con oxigenación en C-7

- Chamigranos con un sistema epóxidos o de lactona conectando los dos anillos de seis miembros (**Figura 12**).

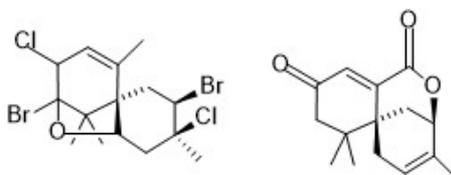


FIGURA 12. Estructuras ejemplo de chamigranos con sistema epóxidos o de lactona conectando los anillos de 6 miembros



Por otro lado, encontramos otros subgrupos como: lauranos y ciclolanos, snyderanos, bisabolanos, perforanos y cicloperforanos, brasilanos, cuparanos, eudesmanos y cicloeudesmanos y aristolanos.⁷

El primer sesquiterpeno reportado del género *Laurencia* fue el Elatol, aislado a partir de un extracto de *Laurencia elata* en 1974, siendo todavía, a fecha de hoy, uno de los terpenos de mayor proyección. Actualmente, hay registrados más de 500 sesquiterpenos diferentes dentro del género *Laurencia*.¹¹

¹¹ Shaza M Al-Massarani Phytochemical and Biological Properties of Sesquiterpene Constituents From the Marine Red Seaweed *Laurencia*: A Review. *Nat Prod Chem Res*, 2014, 2:147. doi:10.4172/2329-6836.1000147



2. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo se basa en la búsqueda de metabolitos secundarios bioactivos y/o estructuras novedosas de ejemplares de *Laurencia dendroidea*, recolectado en el norte de la isla de Tenerife.

Los objetivos específicos principales son:

- Dominio y realización de técnicas de extracción y purificación de principios activos a partir de un extracto de *Laurencia dendroidea* para el aislamiento de metabolitos secundarios.

- Aplicación de diversas técnicas espectroscópicas para la elucidación estructural con especial énfasis en: Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y Espectrometría de masas.

- Evaluación de la actividad biológica de los diferentes metabolitos aislados frente a microorganismos vivos, como amebas o protozoos; y la actividad antiproliferativa frente a varias líneas celulares tumorales.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Material biológico

La muestra de *Laurencia dendroidea* J. Agardh fue recolectada en el Puerto de la Cruz, Tenerife (28.4134; -16.5452 28° 24' 48" N, 16° 32' 43" W) y transportada en neveras hasta el laboratorio, donde se congeló hasta su estudio. Un ejemplar se depositó en el Herbario de la Universidad de La Laguna, Departamento de Biología Vegetal.

3.2. Técnicas cromatográficas

De manera regular, durante el transcurso de los diferentes procedimientos cromatográficos se emplearon disolventes destilados de grado técnico y analítico de diferentes marcas, como Scharlau o Sigma/Aldrich. Para su destilación, se utilizaron rotavapores Buchi R-200[®], equipados a su vez con baño de agua a 40°C y bomba de vacío Buchi B-721[®].

3.2.1. Cromatografía de exclusión molecular

Se utilizó Sephadex LH-20, de SIGMA[®], como fase estacionaria. Las columnas (210 x 20 mm Ø) fueron preparadas humectado el soporte en metanol durante 12 horas y empaquetando por gravedad. Como fase móvil, se utilizó mezclas de diclorometano y metanol en diferentes proporciones o bien, este último, como único disolvente.

3.2.2. Cromatografía Líquida en Columna de Media Presión (MPLC)

Se empleó una columna preempaquetada Lobar[®] LiChropred Si60 (310 x 25 mm Ø) de la casa Merck[®] asociada a una bomba Fluid Metering[®], manteniendo el flujo constante durante todo el proceso cromatográfico. Los disolventes usados como fase móvil fueron n-hexano (n-Hex) y acetato de etilo (AcOEt).

3.2.3. Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC)

Las purificaciones finales se obtuvieron mediante un sistema de HPLC WATERS[®], compuesto por dos bombas y dos detectores, uno UV y otro del índice de refracción. A su vez, se empleó una columna preparativa de fase normal M-Porasil[™] WATERS (150 x 19 mm Ø). El flujo fue variado, dependiendo de la cantidad de muestra, desde 2 a 1 ml/min. Las fracciones, tanto en MPLC como HPLC, se recogieron con la ayuda de un colector automático GIBSON[®] FC203B.

3.2.4. Cromatografía en Capa Fina (TLC)



Las cromatografías en columna se monitorizaron mediante TLC con cromatofolios (20 x 20 cm) de gel de sílice 60 de la casa Merck®. La visualización de las placas se consiguió mediante exposición a radiación ultravioleta a dos longitudes de onda (254 y 360 nm), en un gabinete Spectroline ® modelo CM-10. Así mismo, el revelado de las placas se obtuvo tras la pulverización con una solución al 4% de ácido fosfomolibdico en etanol y posterior calentamiento a 140°C.

3.3. Técnicas espectroscópicas

3.3.1. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Previo a la realización de los experimentos de RMN, las muestras se disolvieron, en su mayoría, en cloroformo deuterado (CDCl₃), aunque también se empleó metanol deuterado (MeOD). Todos los espectros se obtuvieron gracias a los espectrómetros BRUKER ® AVANCE 500 MHz y 600 MHz. Se efectuaron una gran variedad de experimentos:

- Experimentos monodimensionales ¹H y ¹³C
- Experimentos bidimensionales homo- y heteronucleares:
 - COSY (Correlation Spectroscopy)
 - HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation)
 - HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence)
 - ROESY (Rotating-frame Overhauser Spectroscopy)

Todos ellos se procesaron a través del programa informático MestRenova en su versión 9.1.0-14011 y TopSpin versión 3.5 pl7.

3.3.2. Espectrometría de Masas (MS)

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

3.3.3. Absorción en el infrarrojo (IR)

El experimento de IR fue realizado en un espectrofotómetro FT-IR BRUKER®, modelo IFS-55. El espectro fue registrado empleando disolución del producto en CHCl₃ seco sobre una pastilla de NaCl.



3.3.4. Rotación óptica

La determinación de la actividad óptica para el producto se realizó empleando un polarímetro PERKIN-ELMER[®], modelo 241, a una temperatura de 20°C y usando la línea D del sodio ($\lambda = 589$ nm). El producto fue disuelto en CHCl₃ seco y se empleó una celda con longitud óptica de 1 dm.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Estudio cromatográfico de extractos de *Laurencia dendroidea*

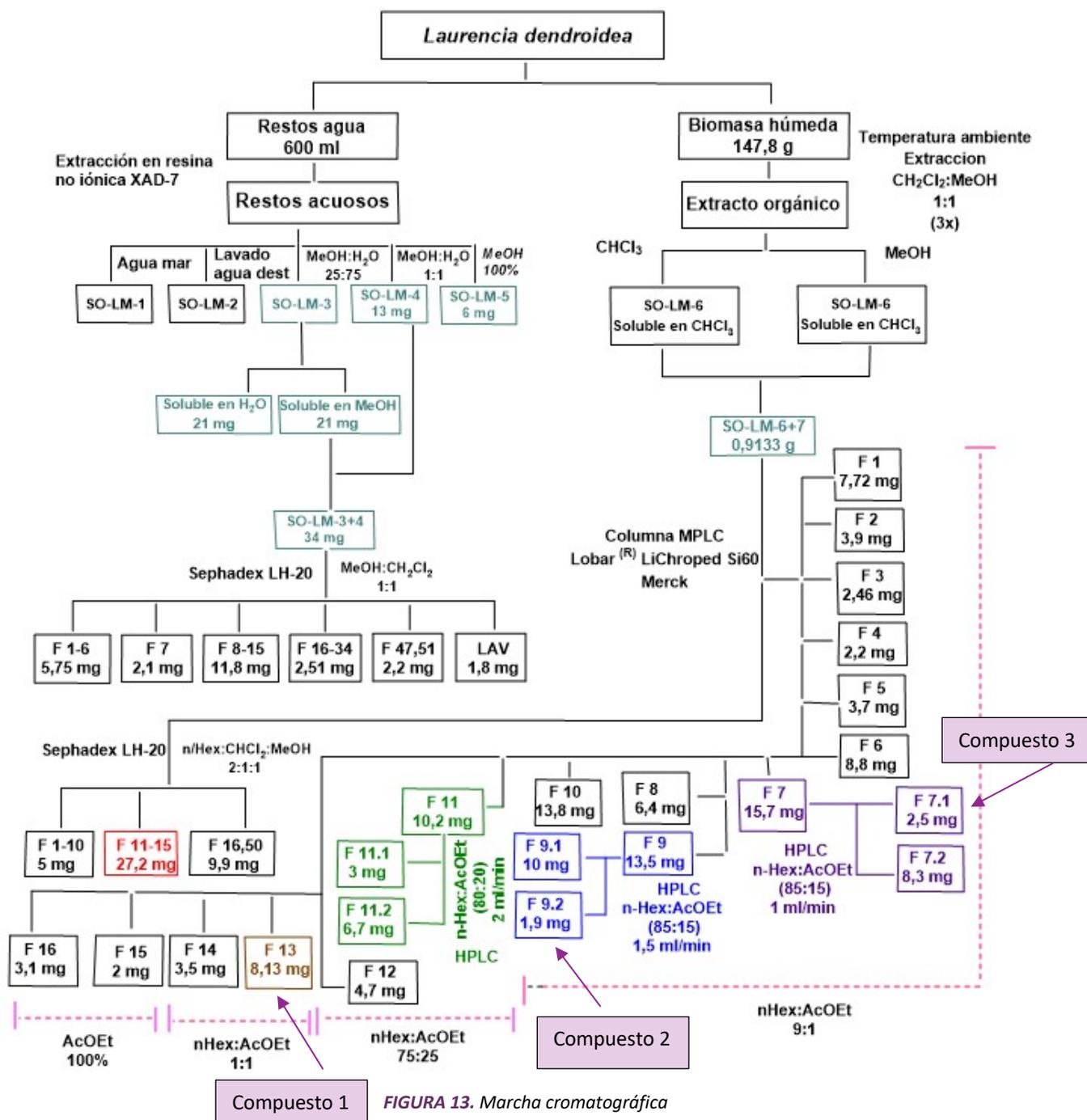


FIGURA 13. Marcha cromatográfica

Una vez descongelados los ejemplares de *L. dendroidea* se observó restos acuosos coloreados que decidimos estudiar por separado (Figura 13). Para ello, se depositó la biomasa de las algas (147.8 g) y el agua coloreada (600 ml) en dos vasos de precipitado.



A continuación, se maceraron las algas en una mezcla de CH_2Cl_2 : MeOH en una proporción 1:1, manteniéndolas tapadas hasta el día siguiente, donde se filtró la mezcla, evaporándose el disolvente a vacío en el rotavapor. Esta mecánica la repetimos tres veces más, consiguiendo así el extracto orgánico.

Los restos acuosos se filtraron por gravedad, asegurando así la ausencia de restos. Antes de proceder a la extracción en resina no iónica XAD-7, ésta se hidrata con metanol (30 minutos) y se lava dos veces con agua destilada. Por cada lavado de agua, se debe esperar unos 5 minutos para eliminar así los restos de metanol. Una vez finalizado el proceso, trasvasamos la resina y el agua a un matraz Erlenmeyer y lo llevamos a agitación, en un orbital, durante 24 horas. Con esto conseguimos que la resina capte todas las moléculas orgánicas que se encuentren en la disolución.

El contenido del matraz lo pasamos a un embudo de decantación donde llevamos a cabo los correspondientes lavados y extracciones:

- 1) Decantar el agua de mar tratada
- 2) Dos lavados con agua destilada
- 3) Elución con MeOH:H₂O (25:75)
- 4) Elución con MeOH:H₂O (1:1)
- 5) Elución (2x) con MeOH

Las muestras 3 a 5 fueron concentradas y, tanto de ellas, como de la resultante de la extracción de la biomasa, se prepararon alícuotas para una evaluación preliminar de actividad biológica y para la realización de espectros de protón de RMN.

En función de los datos de RMN-¹H y del comportamiento en TLC, se decidió reunir y seguir estudiando las fracciones SO-LM-3+4 y SO-LM-6+7.

Atendiendo a la muestra SO-LM-3+4 se decidió llevar a cabo una cromatografía de exclusión molecular en columna abierta, empleando como fase estacionaria Sephadex LH-20 y, como fase móvil, una mezcla de disolventes: metanol y diclorometano en una proporción 1:1. Se recogieron 51 tubos de ensayo más el lavado con metanol de la columna, monotorizándose mediante TLC. Tras la observación de los cromatofolios, se establecieron las siguientes fracciones (**Tabla 1**):

FRACCIÓN	INTERVALO DE TUBOS
1	1-6
2	7
3	8-15
4	16-34
5	47-51
6	Lavado

TABLA 1. Fracciones obtenidas para la muestra SO-LM-3+4

Una vez reunidas las fracciones y concentradas con ayuda del rotavapor, se dispuso a la preparación de tubos para RMN, empleando MeOD como disolvente. Realizamos únicamente espectros de ^1H . Estas muestras las conservamos aún para futuros análisis.

Atendiendo ahora a la muestra SO-LM-6+7, proveniente del extracto orgánico, preparamos otra cromatografía en columna abierta de exclusión molecular de la biomasa. Cabe destacar que no se introdujo toda la muestra, sino una parte. Esta vez, a diferencia de la Sephadex anterior, la fase móvil es una mezcla de tres disolventes, cada uno de una polaridad distinta: n-hexano: CH_2Cl_2 :MeOH en una proporción de 2:1:1, respectivamente.

Se recogieron otros 50 tubos, monitorizándose de la misma forma descrita anteriormente y reuniendo, posteriormente, las fracciones correspondientes:

FRACCIÓN	INTERVALO DE TUBOS
1	1-10
2	11-15
3	16-50

TABLA 2. Fracciones y la relación de tubos en las que se recogieron de la muestra SO-LM-6+7

Tras visualizar el espectro de RMN- ^1H de cada una de ellas, se destacó la fracción número 2 (**Tabla 2**).

Siguiendo con la misma muestra de partida, se dispuso a realizar, en su lugar, una MPLC, eluyendo con una mezcla de n-Hex:AcOEt en una columna preempaquetada Lichroprep Si60. Se obtuvieron 16 fracciones repartidas en 210 tubos. Estas últimas, se determinaron de nuevo por monitorización por TLC.

FRACCIÓN	INTERVALO DE TUBOS
1	1-9 + Inicio
2	10-14
3	15-22
4	23-38
5	39-50
6	51-62
7	63-73
8	74-81
9	82-101
10	102-117
11	118-128
12	129-147
13	148-160
14	161-174
15	175-177
16	178-210

TABLA 3. Fracciones obtenidas de la muestra SO-LM-6+7 en HPLC de fase normal

Además, se hizo de nuevo espectroscopía de ^1H , destacando las fracciones de mayor interés, coloreadas en la tabla superior (**Tabla 3**). Con ellas, se procedió a realizar la purificación final por HPLC en una columna μ -Porasil y mezclas de n-hexano y acetato de etilo, tal como se indica en la marcha cromatográfica (**Figura 13**) ya que a cada una no se aplicó el mismo flujo, ni la misma polaridad en su fase móvil. La **fracción 13** fue la única destacada que no se hizo pasar por una columna de HPLC, al considerar que el producto estaba suficientemente puro para su estudio (**Tabla 4**).

FRACCIÓN	TUBOS	FRACCIÓN	TUBOS	FRACCIÓN	TUBOS
11.1	30	9.1	46,50	7.1	58-61
11.2	31-32	9.2	47,49	7.1	71-74

TABLA 4. Fracciones destacadas en la purificación por HPLC.

Finalmente, tras la observación de sus espectros de protones, se eligieron las fracciones 9.2, 11.1, 7.1 y 13 para la realización de un exhaustivo estudio espectroscópico para su elucidación estructural.

Del mismo modo, alícuotas de estas cuatro fracciones fueron separadas para su evaluación biológica.

4.2. Elucidación estructural de los metabolitos aislados

4.2.1. Compuesto 1

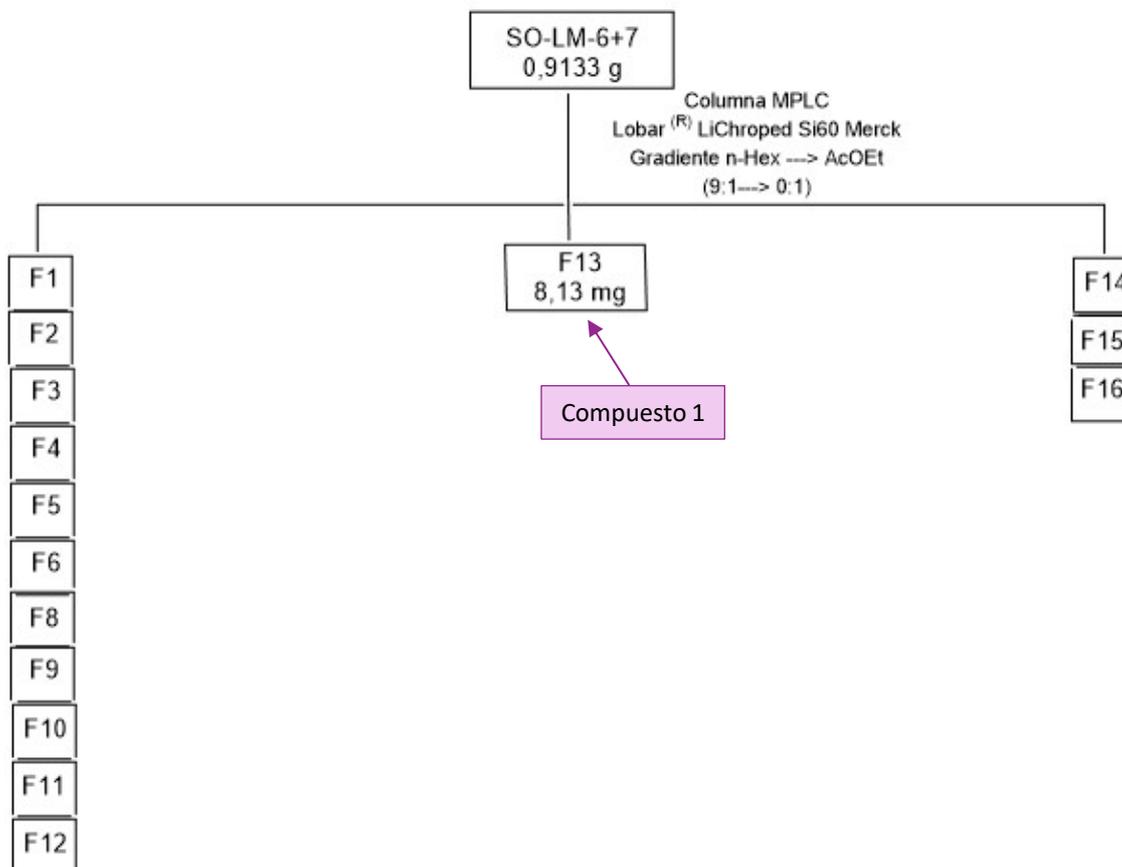


FIGURA 14. Secuencia cromatográfica sintetizada hasta llegar al compuesto 1

El compuesto 1 fue aislado (**Figura 14**) como un sólido incoloro correspondiente a la fórmula $C_{15}H_{23}Br_3O$, indicando tres insaturaciones en la molécula. Su fórmula molecular fue establecida en base a los iones isotópicos pseudomoleculares $[M-H]^-$ a m/z 457.0, 459.0, 460.0, 461.0, 463.0 (43:100:20:70:14) de su espectro de masas de baja resolución ESI-MS.

Atendiendo al análisis del espectro de RMN- 1H (**Figura 15**), destaca la presencia de dos protones olefínicos (δ_H 5.43 y 5.10), tres metinos sobre heteroátomos (δ_H 4.76, 4.52 y 4.16) y tres metilos singletes, uno de ellos, desplazado a campos bajos (δ_H 1.88, 1.33 y 1.11).

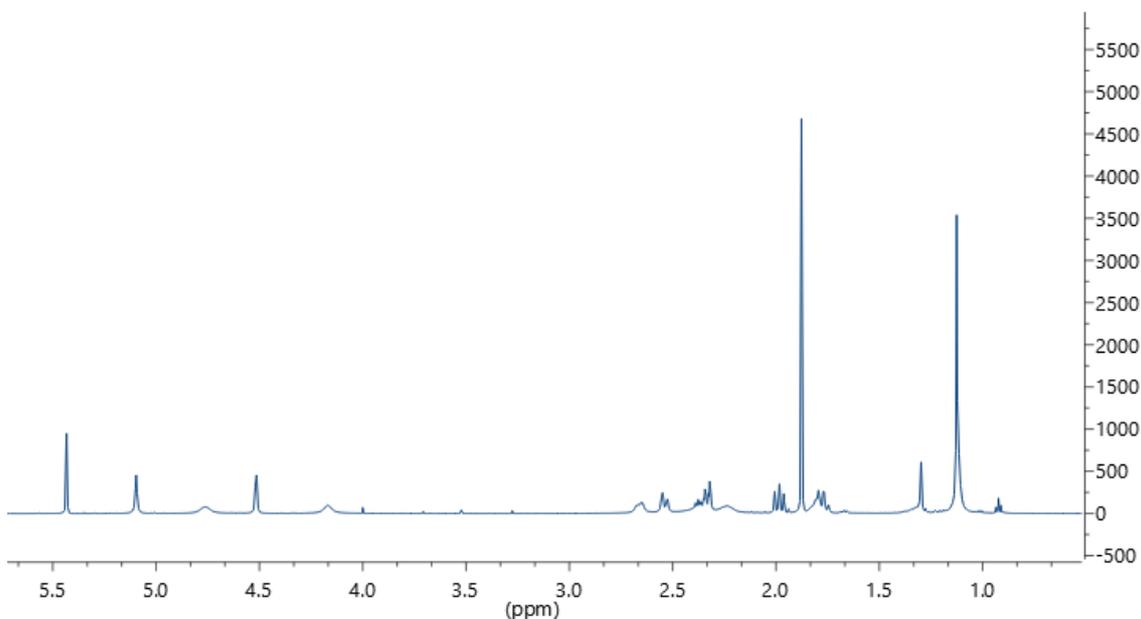


FIGURA 15. Espectro de ^1H -RMN del compuesto 1

Gracias al análisis exhaustivo del espectro de RMN- ^{13}C en conjunción con las correlaciones heteronucleares observadas en el HSQC (**Figura 16**), se determinaron los desplazamientos químicos de los carbonos asociados a cada uno de los protones de la molécula, estableciéndose así la presencia de tres metilos (δ_{C} 24.5, 24.3 y 20.7), cinco metilenos diastereotópicos (δ_{C} 117.6, 40.6, 38.6, 37.2, 25.8), uno de ellos olefínico; tres metinos sobre heteroátomos (δ_{C} 71.8, 70.2, 67.5) y cuatro carbonos cuaternarios (δ_{C} 141.2, 69.3, 49.7, 44.4).

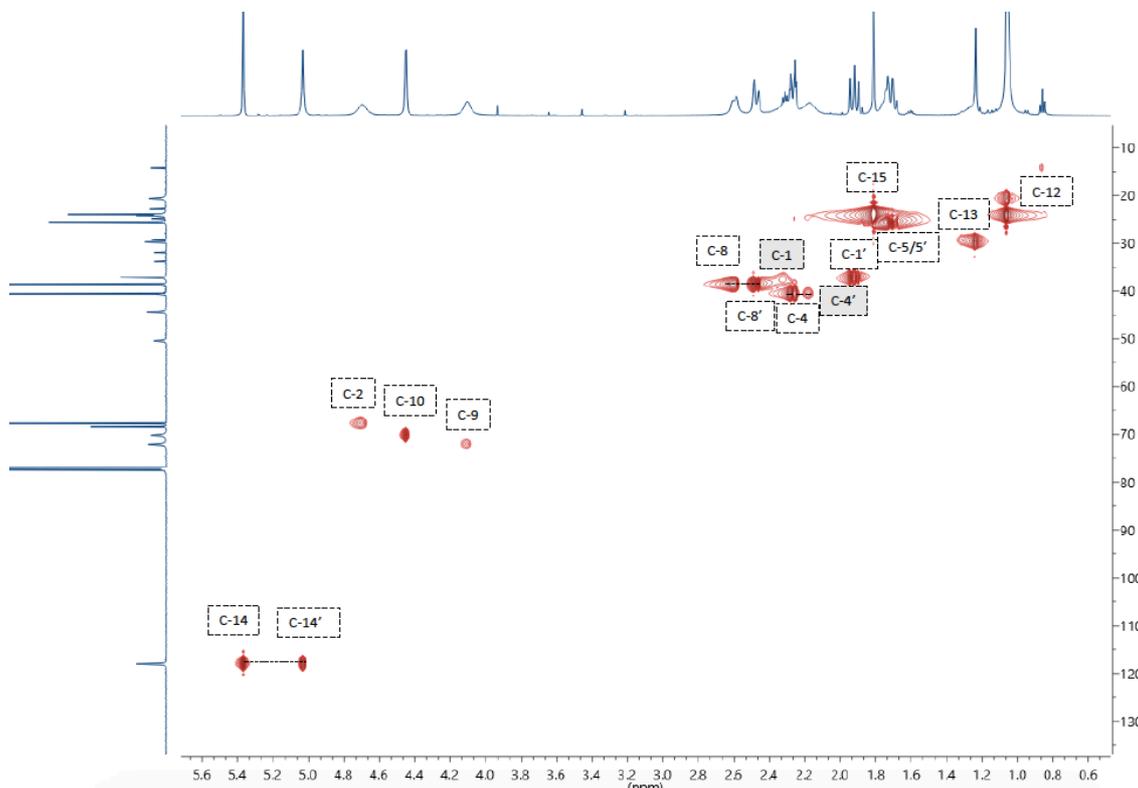


FIGURA 16. Espectro HSQC del compuesto 1

El esqueleto de la molécula (**Figura 17**) fue constituido de acuerdo con los acoplamientos homonucleares observados en el experimento COSY (**Figuras 18-21**), estableciéndose así tres sistemas de espín ^1H - ^1H que explican los fragmentos moleculares C1-C2, C4-C5 y C8 \rightarrow C10

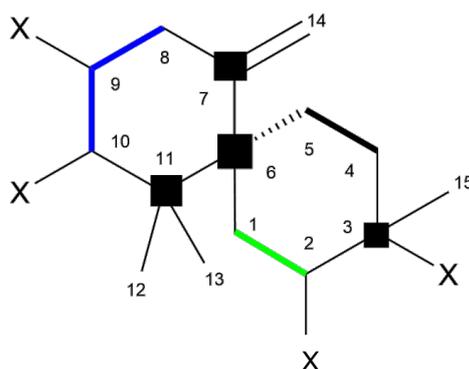


FIGURA 17. Sistemas de espín (trazo grueso) del compuesto 1, elucidado a partir de las correlaciones COSY.

El primer sistema de espín (fragmento C4-C5) ha sido elucidado a partir del metileno a campo alto H₂-5 (δ_{H} 1.80, m/ δ_{H} 1.77, ddd, $J = 2.2; 14.5; 14.5$ Hz), que correlaciona con el metileno H₂-4 (δ_{H} 2.33, dt, $J = 3.5; 3.5; 15.6$ Hz / δ_{H} 2.32, m). La elucidación del segundo sistema (fragmento C1-C2) comienza en el metileno H₂-1 (δ_{H} 2.34, t, $J = 7.5$ Hz / δ_{H} 1.98, dd, $J = 13.8, 12.9$ Hz), conectado con el metino H-2 (δ_{H} 4.76, m). Finalmente, el último sistema (C8→C10) reflejan las correlaciones sucesivas, primero entre el metileno H₂-8 (δ_{H} 2.66, brd, $J = 14.3$ / δ_{H} 2.54, d, $J = 14.3$ Hz) y el metino H-9 (δ_{H} 4.16, m), seguido de la conexión de este último, con el metino H-10 (δ_{H} 4.52, d, $J = 2.7$ Hz).

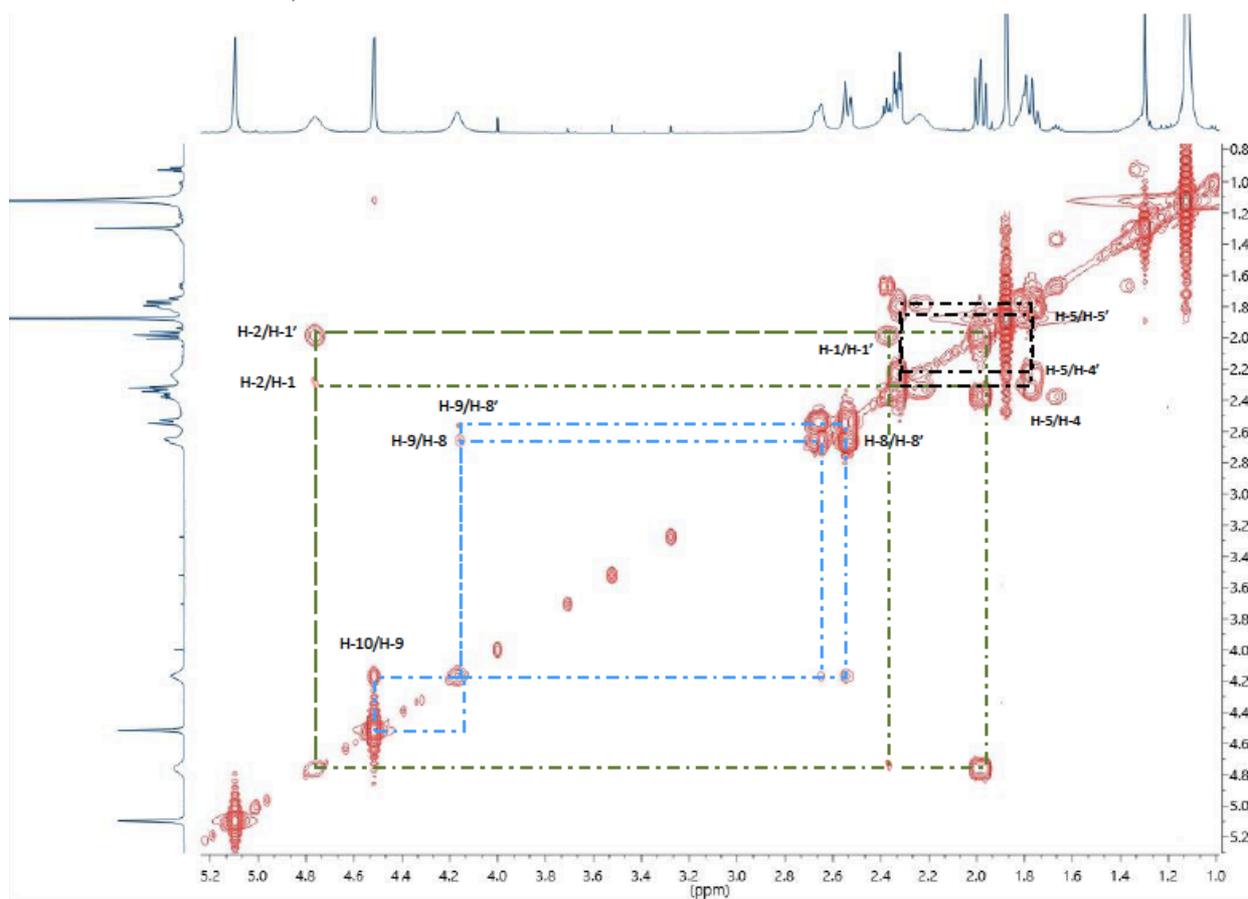


FIGURA 18. Experimento COSY (vista general) del compuesto 1

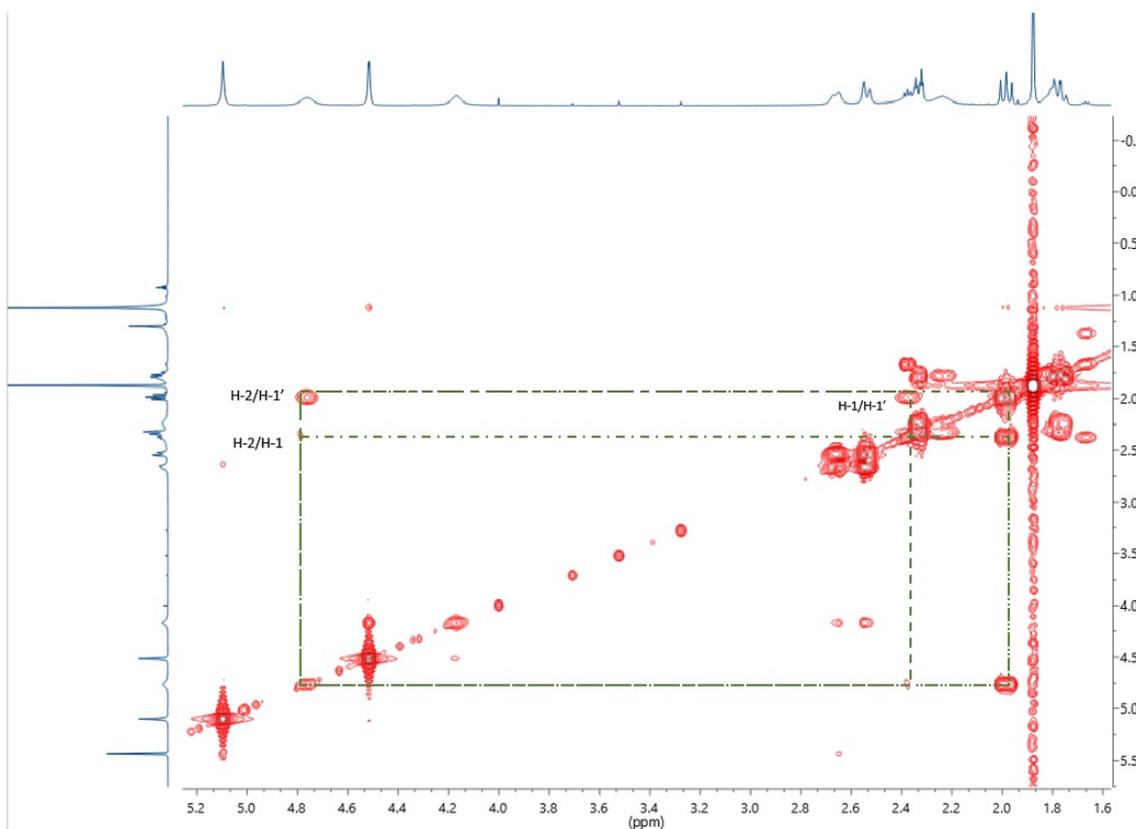


FIGURA 19. Zona ampliada del espectro COSY donde se señalan las conectividades ^1H - ^1H correspondientes a $\text{H}_2\text{-1} \rightarrow \text{H-2}$.

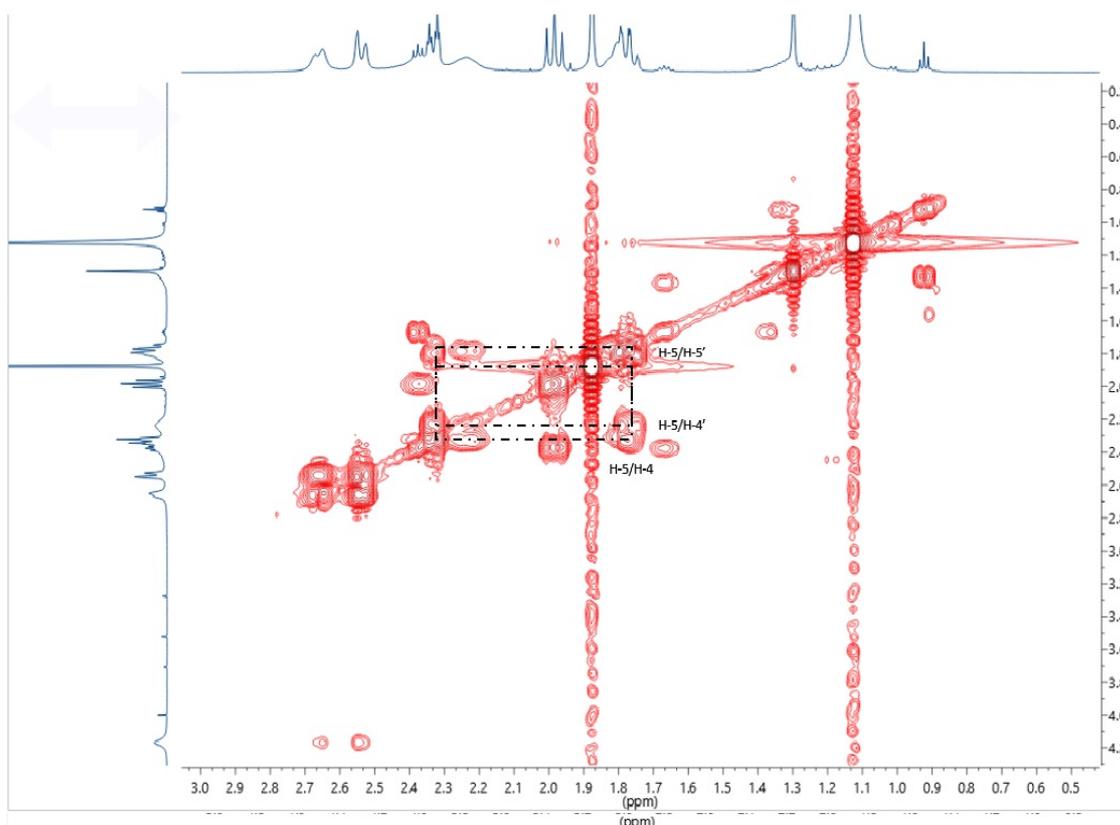


FIGURA 20. Zona ampliada del espectro COSY donde se señalan las conectividades ^1H - ^1H correspondientes a $\text{H}_2\text{-5} \rightarrow \text{H}_2\text{-4}$.

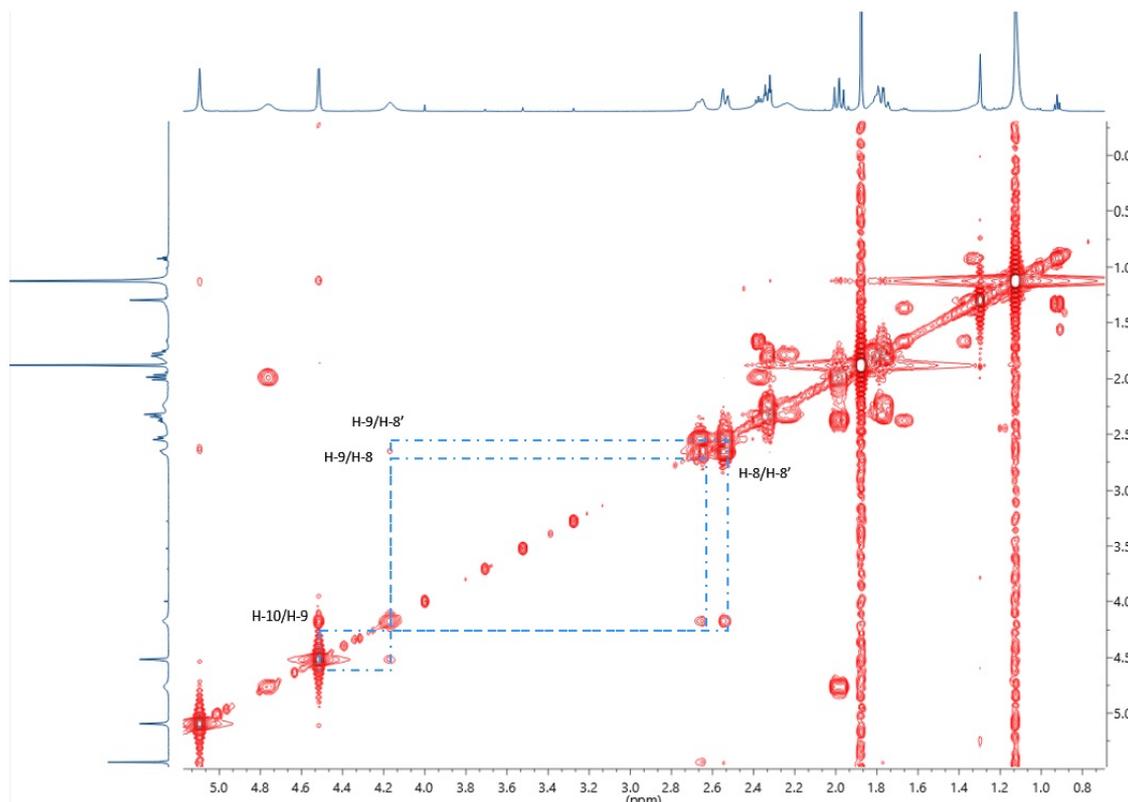


FIGURA 21. Zona ampliada del espectro COSY donde se señala las conectividades ^1H - ^1H correspondientes a $\text{H}_2\text{-8} \rightarrow \text{H-9} \rightarrow \text{H-10}$.

Con el análisis de las correlaciones obtenidas en el experimento bidimensional HMBC (**Figura 22**), se consiguen identificar correlaciones entre ^1H y ^{13}C del entorno químico en una longitud que alcanza hasta los cuatro enlaces. De esta forma, se consiguen la asignación de los centros cuaternarios adyacentes al sistema de espín y la unión de estos con distintos fragmentos y metilos (**Figura 23**).

En el experimento se observa la correlación cruzada entre $\text{H}_2\text{-14}$, $\text{H-8}'$, $\text{H-1}'$, los dos protones $\text{H}_2\text{-5}$ y C-7 (δ_c 141.2). A continuación, los protones H-2 , H-4 , H-1 y $\text{H}_3\text{-15}$ se correlacionan con C-3 (δ_c 69.3). A su vez, los protones $\text{H}_2\text{-14}$, H-10 , $\text{H-8}'$ y $\text{H}_2\text{-5}$ presentan correlaciones con los carbonos C-6 (δ_c 49.7) y C-11 (δ_c 44.4) del gem-dimetilo. Por último, en el espectro de HMBC cabe destacar las conexiones de los protones $\text{H}_3\text{-13}$ y $\text{H}_3\text{-12}$ con los carbonos C-6 y C-11 .

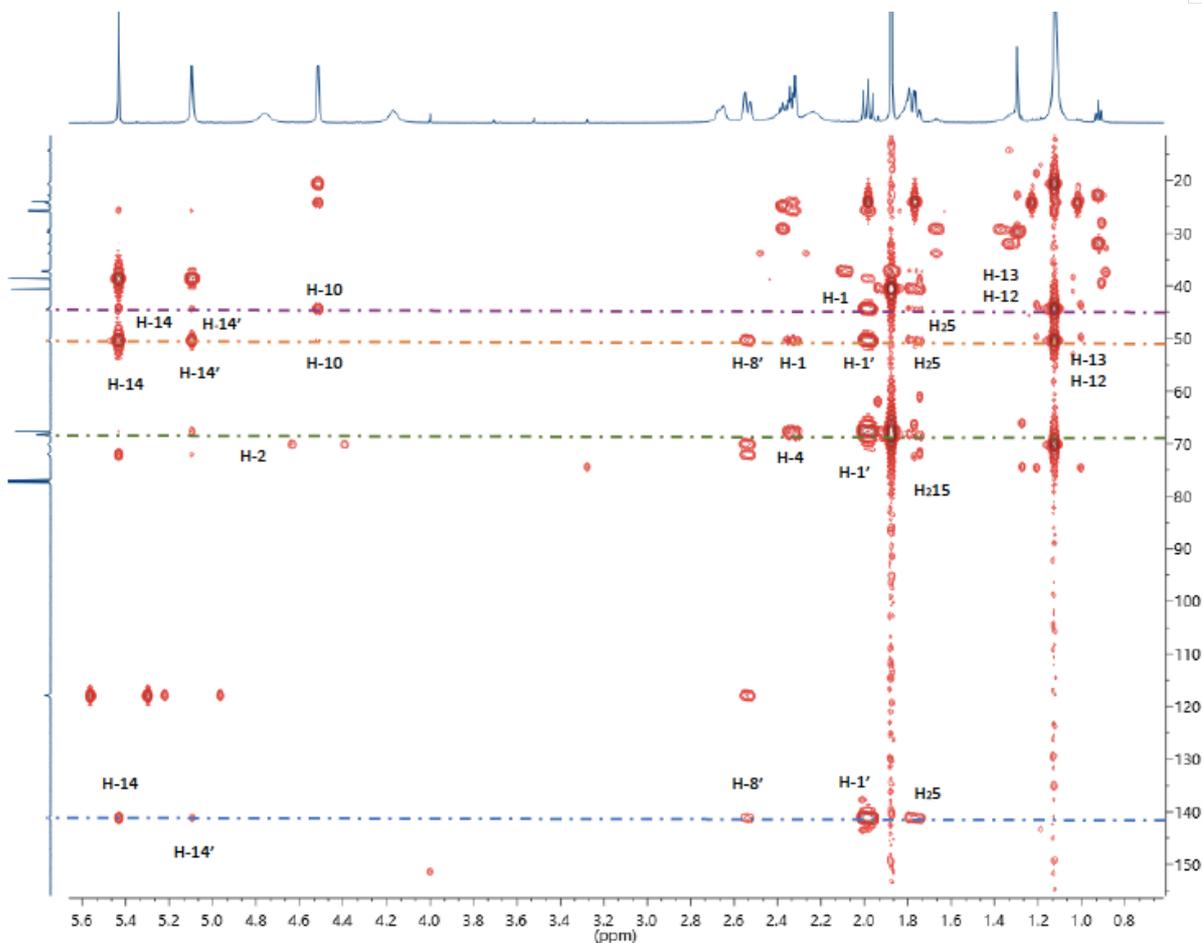


FIGURA 22. Experimento HMBC del compuesto 1.

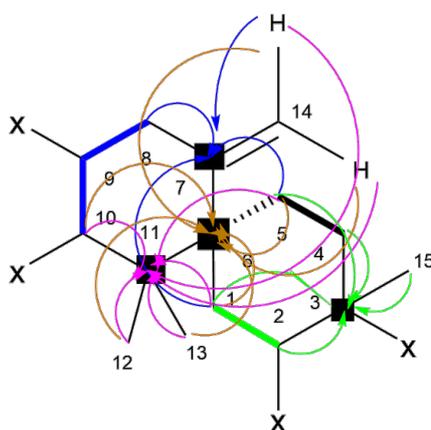
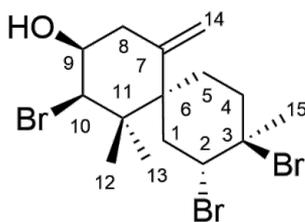


FIGURA 23. Estructura química del compuesto 1 con las correspondientes correlaciones observadas en el experimento HMBC

La identificación y localización de los heteroátomos en las posiciones C-2, C-3, C-9 y C-10 se puede realizar de acuerdo con los datos de masas y los valores de desplazamiento químico de RMN (**Tabla 6**). En este caso, podemos concluir la presencia de átomos de bromo en C-2, C-3 y C-10, así como un hidroxilo en C-9. Este metabolito es nuevo, debido a la carencia de referencias en la literatura del mismo.

En cuanto a la configuración relativa, se realizó en base al análisis de los datos de ROESY, destacando la interacción entre H-10, tanto con el metino H-9 como con los protones del metileno H₂-5; y la ausencia de la correlación clave entre el metilo H₃-15 y el protón H-2. Así se concluye una configuración relativa 2*R*, 3*S*, 9*S* y 10*R*.



Compuesto 1

4.2.2. Compuestos 2 y 3

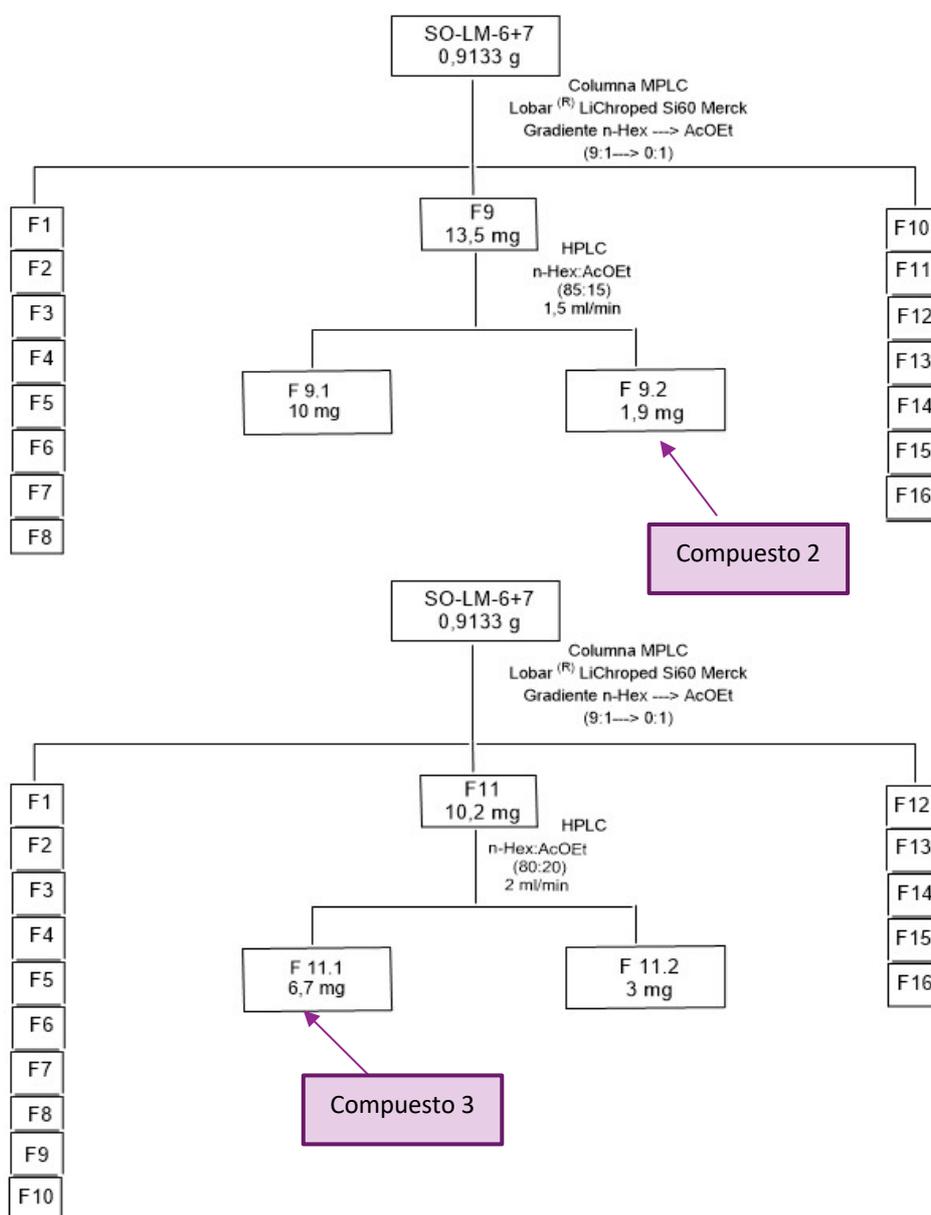


FIGURA 24. Marcha cromatográfica simplificada de los compuestos 2 y 3.

Dichos compuestos fueron aislados (**Figura 24**) como sólidos incoloros. La elucidación estructural se realizó de forma similar al compuesto 1.

Se adjuntan, a continuación, tanto los espectros de RMN- ^1H como de HSQC (**Figuras 25 y 28; 26 y 29**, respectivamente), así como las principales correlaciones observadas en el experimento HMBC (**Figuras 27 y 30**):

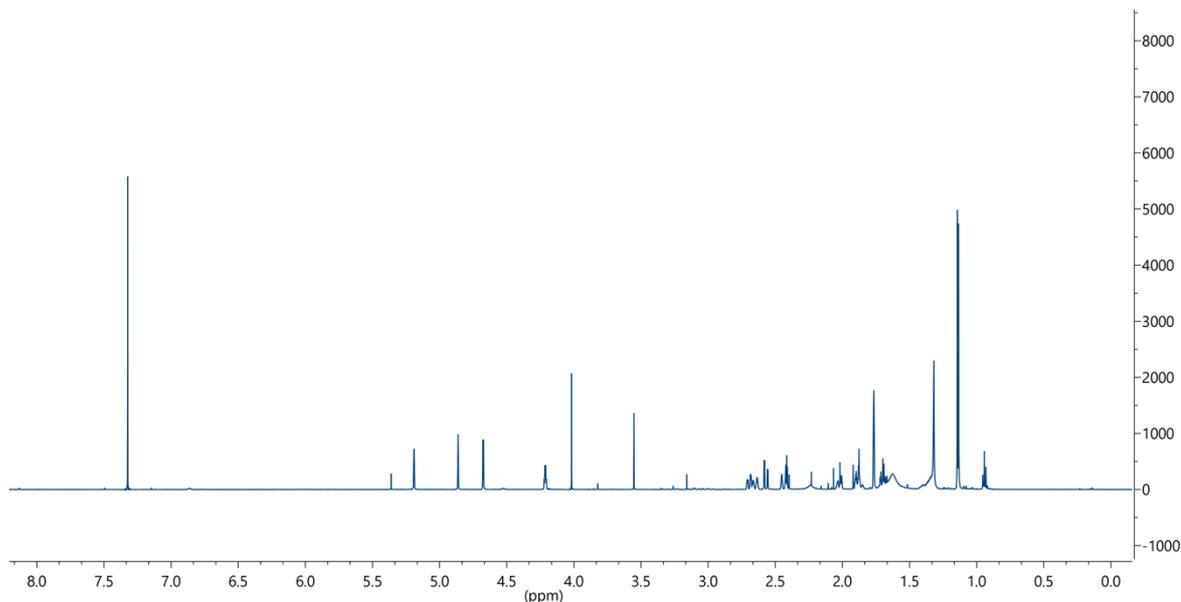


FIGURA 25. Espectro RMN- ^1H del compuesto 2.

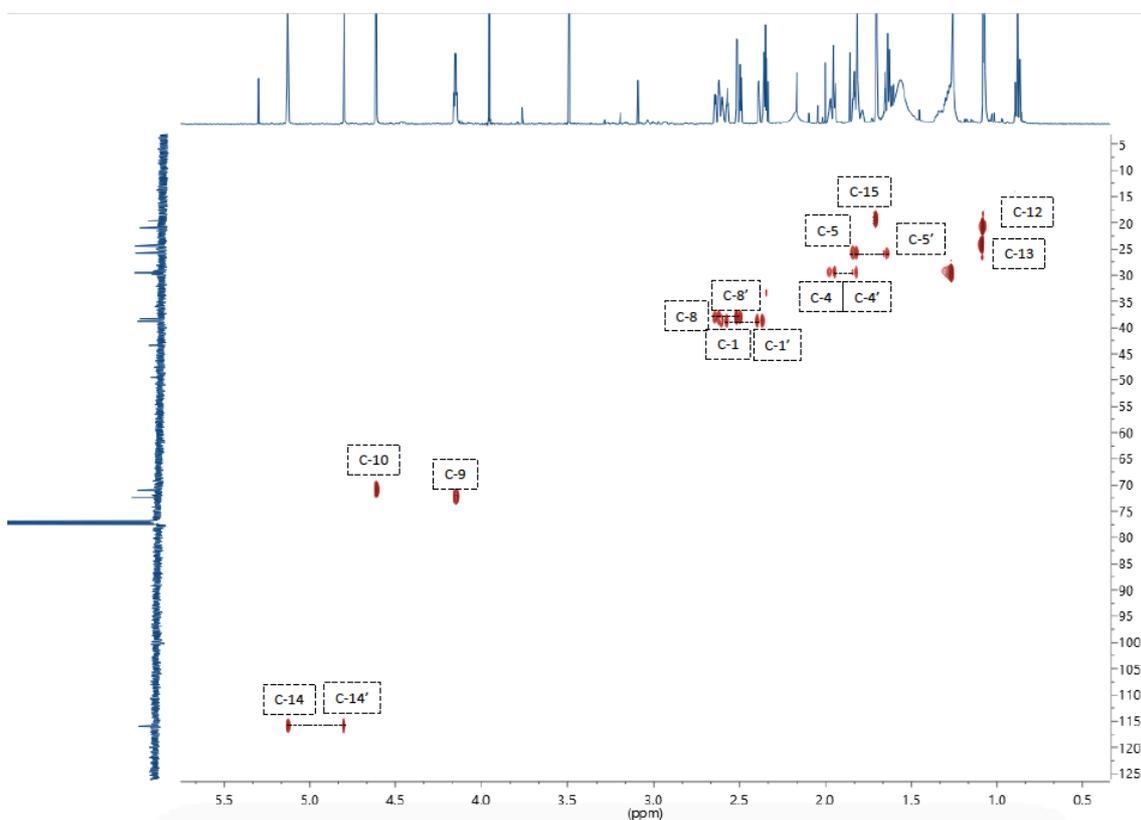


FIGURA 26. Espectro HSQC del compuesto 2

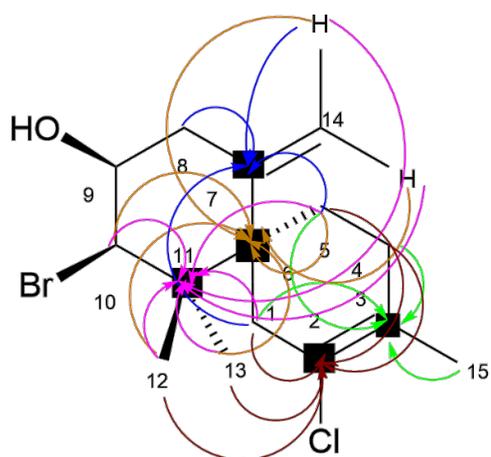


FIGURA 27. Estructura química del compuesto 2 con las correspondientes correlaciones observadas en el experimento HMBC

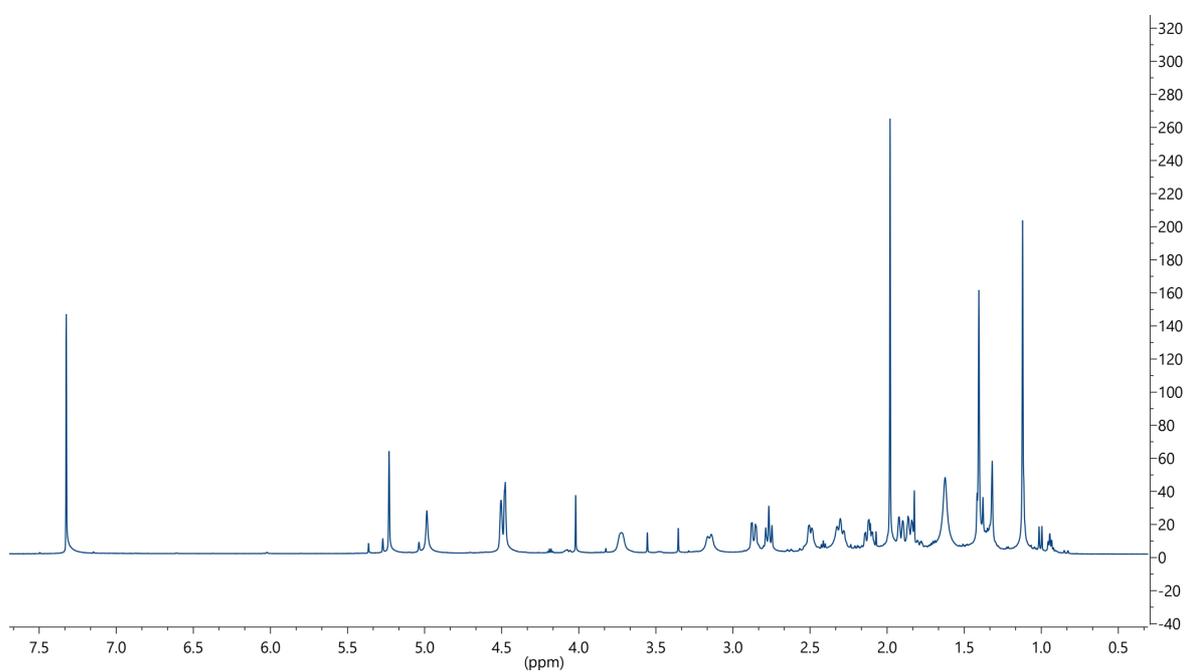


FIGURA 28. Espectro RMN-¹H del compuesto 3

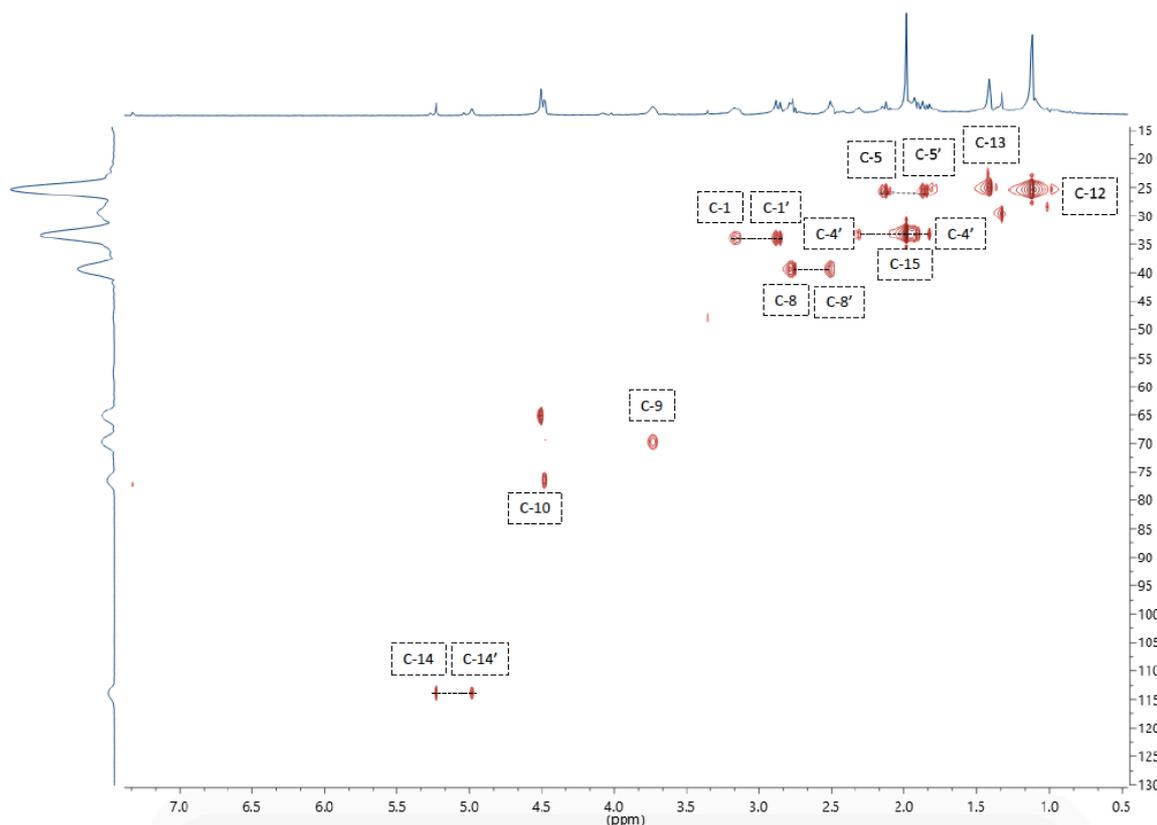


FIGURA 29. Espectro HSQC del compuesto 3

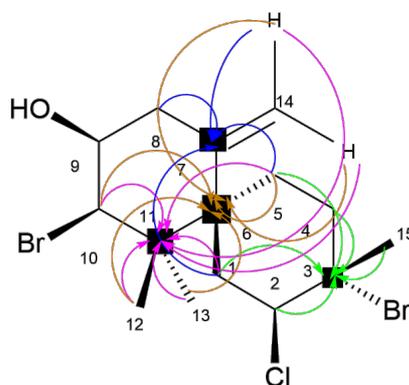
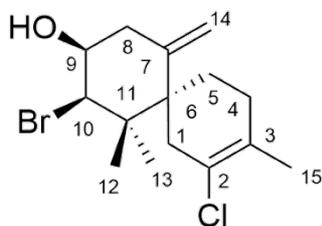


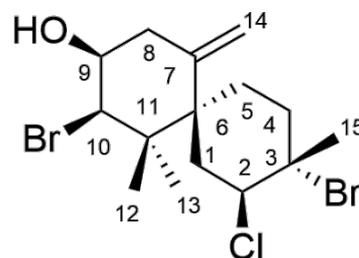
FIGURA 30. Estructura química del compuesto 3 con las correspondientes correlaciones observadas en el experimento HMBC.

Finalmente, se adjunta una tabla donde se recogen todos los desplazamientos (δ) de cada uno de los C e H de los productos aislados, así como su multiplicidad (m) y las constantes de acoplamiento (J) oportunas (**Tabla 6**).

Estos datos de RMN indican que las estructuras de los compuestos 2 y 3 coinciden con las del **elatol**¹² y el **isobtusol**¹³, respectivamente, lo que se confirma también por espectrometría de masas.



Compuesto 2



Compuesto 3

¹² Sims, J.J.; Lin, G.H.I.; Wing, R.M. Marine natural products X elatol, a halogenated sesquiterpene alcohol from the red alga *Laurencia elata*. *Tet. Lett.* 1979, 39, 3487-3490.

¹³ González, A. G.; Martín, J. D.; Martín, V. S. X ray of sesquiterpene constituents of the alga *L. obtusa* leads to structure revision. *Tet. Lett.* 1979, 39, 2717-2718.

n° C	Compuesto 1				Compuesto 2				Compuesto 3			
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	m	J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	m	J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	m	J (Hz)
1	37.2	1.98	dd	12.9, 13.8	34.0	2.86	dd	3.2,15.2	38.8	2.45	brd	17.5
		2.34	t	7.5		3.15	brd	5.2		2.65	dddd	2.0, 2.0, 5.6, 17.4
2	67.5	4.76	m		65.4	4.47	brs		124.2	-		
3	69.3	-			69.4	-			128.2	-		
4	40.6	2.32	m		33.4	1.91	ddd	1.9,4.87, 14.7	29.4	1.88	m	
		2.33	dt	3.5,3.5, 15.6		2.30	brs	12.4, 14.7		2.02	m	
5	25.8	1.77	ddd	2.2,14.5, 14.5	25.7	1.85			25.7	1.70	dd	3.1, 11.9
		1.80	m			2.12				1.89	m	
6	49.7	-			43.8	-			49.3	-		
7	141.2	-			147.7	-			140.9	-		
8	38.6	2.54	d	14.3	39.4	2.50	brd	11.9	38.1	2.49	dd	3.0, 14.7
		2.66	brd	14.3		2.77	t	11.9		2.62	dddd	1.5,1.5, 3.3,14.7
9	71.8	4.16	m		69.8	3.72	m		72.5	4.21	ddd	3.0, 3.0,3.3
10	70.2	4.52	d	2.7	76.5	4.48	d	3.2	71.2	4.67	d	3.0
11	44.4	-			43.8	-			43.3	-		
12	20.7	1.11	s		25.3	1.12	s		20.8	1.14	s	
13	24.5	1.13	s		25.0	1.39	s		24.8	1.15	s	
14	117.6	5.10	s		113.8	4.99	s		113.8	4.86	s	
		5.43	s			5.23	s			518	bs	
15	24.3	1.88	s		33.4	1.39	s		19.4	1.77	s	

TABLA 6. Sumario de datos de los desplazamientos (δ) de los C e H, multiplicidad (m) y constante de acoplamiento (J) de cada compuesto aislado. s = singlete; d = doblete; m = multiplete; brd = "broad" (banda ancha)

4.2.3. Compuesto 4

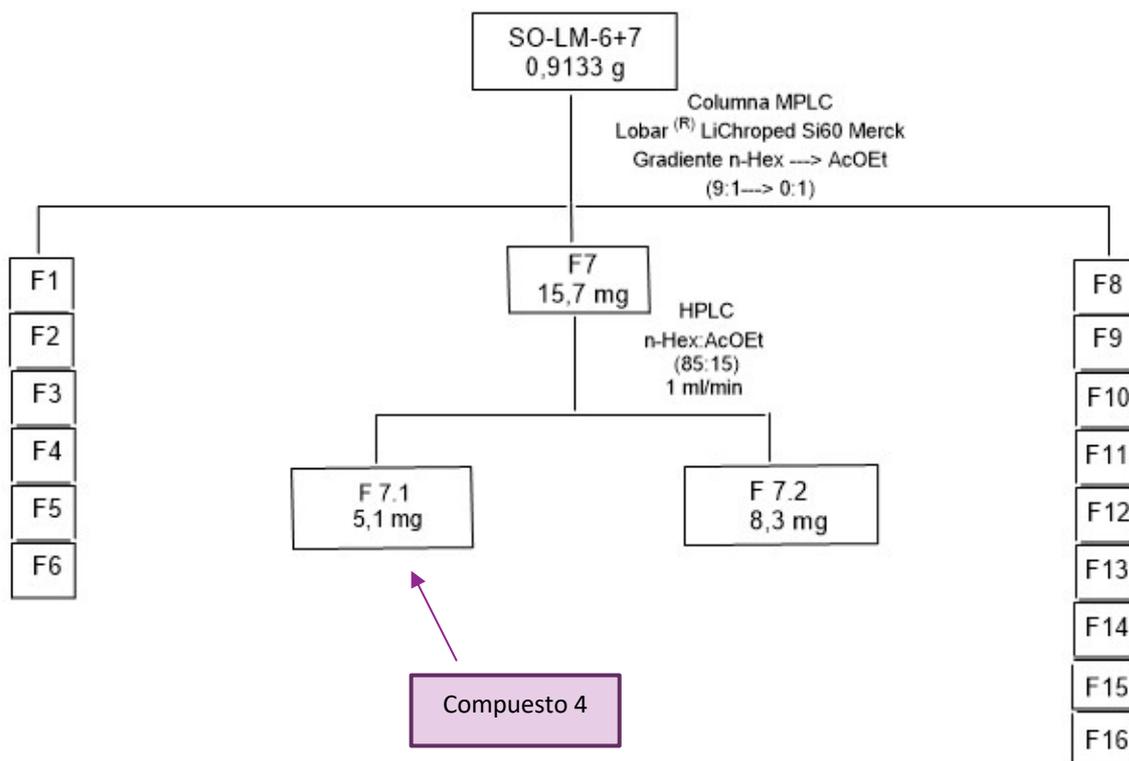


FIGURA 31. Marcha cromatográfica simplificada del compuesto 4

La elucidación estructural de este compuesto está en proceso de realización, aunque se sabe que es un sesquiterpeno halogenado.



5. EVALUACIÓN BIOLÓGICA

Uno de los objetivos perseguidos en este trabajo es el de explorar las posibilidades terapéuticas de los metabolitos de *L. dendroidea*. Para ello, alícuotas de los diferentes extractos y de los productos aislados, se han enviado para su evaluación biológica en colaboración con los siguientes grupos de trabajo:

- a) Actividad frente a parásitos → Grupo del Dr. Jacob Lorenzo Morales, Instituto de Enfermedades Tropicales, ULL.
- b) Actividad antiproliferativa frente líneas celulares tumorales → Grupo del Dr. José Manuel Padrón, Biolab, IUBO.

Los análisis están en fase de realización, esperando adelantar algunos resultados en la exposición de la memoria.



6. CONCLUSIONES

- Se realizó el estudio fitoquímico preliminar de la especie *Laurencia dendroidea*, recolectada en el Puerto de la Cruz.
- El análisis cromatográfico del extracto de la biomasa supuso el aislamiento de cuatro productos puros, que resultaron ser sesquiterpenos de naturaleza halogenada.
- Utilizando técnicas espectroscópicas de Resonancia Magnética Nuclear y Espectrometría de Masas, se logró identificar tres de ellos, resultando ser un metabolito nuevo en la literatura y dos conocidos. Un cuarto sesquiterpeno está un proceso de determinación estructural.
- Muestras de los extractos iniciales, así como de los cuatro productos puros han sido enviados para su evaluación biológica.