



BIOTECNOLOGÍA MARINA

(el mar como fuente de
sustancias con potencial
biomédico y/o biotecnológico)

Sheila Esther Hernández Hernández
Grado en Farmacia
Curso 2018-2019

Tutor: María Luisa Souto Suárez
Departamento de Química Orgánica
Grupo de Marinos del IUBO Antonio González



ÍNDICE

1. RESUMEN	3
 ABSTRACT	3
2. INTRODUCCIÓN	4
2.1. Biotecnología azul	4
2.2. Género <i>Laurencia</i>	4
2.3. <i>Laurencia microcladia</i> Kützing	5
3. OBJETIVOS	6
4. MATERIAL Y MÉTODOS	7
4.1. Material biológico	7
4.2. Extracción y purificación	7
4.3. Elucidación estructural	8
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	10
5.1. Estudio cromatográfico de los extractos	10
5.2. Elucidación estructural de los metabolitos aislados	15
6. CONCLUSIONES	22
7. BIBLIOGRAFÍA	23



1. RESUMEN

Los fondos marinos son una fuente constante de productos naturales que presentan gran interés biológico. La necesidad de encontrar nuevos productos químicos bioactivos hace que esta búsqueda se centre en organismos marinos y en los metabolitos secundarios que estos generan, con el fin de proporcionar tratamientos eficaces a nuevas patologías. En este caso se destacan las algas rojas del género *Laurencia*, por la producción de nuevos metabolitos secundarios halogenados que se relacionan con su propia defensa química y que constituyen una fuente prometedora de sustancias con potencial bioactivo y biotecnológico. Este trabajo se fundamenta en el estudio fitoquímico de *Laurencia microcladia* recolectada en el noroeste de la isla de Fuerteventura, aplicando técnicas cromatográficas, espectroscópicas y de elucidación estructural.

ABSTRACT

The seabed is a constant source of natural products that have many biological interest. The need to find new bioactive chemicals makes this search focus on marine organisms and secondary metabolites that they generate, in order to provide effective treatments to new pathologies. In this case, the red algae of the genus *Laurencia* stand out, by the production of new halogenated secondary metabolites that are related to their own chemical defense and that constitute a promising source of substances with bioactive and biotechnological potential. This work is based on the phenotypic study of *Laurencia microcladia* collected in the island of Fuerteventura, performing chromatographic, spectroscopic and structural elucidation techniques.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Biotecnología azul.

Los océanos constituyen dos tercios de la superficie del planeta y son fuente de múltiples recursos. Los organismos marinos a lo largo de los años han conseguido adaptarse a condiciones ambientales extremas, logrando desarrollar mecanismos de defensa que posteriormente se ha comprobado cómo los metabolitos secundarios generados presentan gran interés biológico.⁽¹⁾ Por ello en la actualidad los productos marinos son el centro de diversos estudios, dentro de estos está la búsqueda de nuevos metabolitos bioactivos en ecosistemas marinos.⁽²⁾ El estudio y aplicación de los hallazgos encontrados en este medio es lo que se conoce como biotecnología azul.⁽³⁾

2.2. Género *Laurencia*.

El género *Laurencia* engloba en la actualidad unas 146 especies pertenecientes al orden *Ceremiales*, de la familia *Rhodomelaceae*.⁽⁴⁾ Este género está principalmente en aguas costeras tropicales, subtropicales y templadas, además es considerado uno de los géneros más prolíficos donde continuamente salen a la luz nuevas moléculas.

Las *Laurencias* presentan gran capacidad para biosintetizar variedad de metabolitos secundarios siendo principalmente sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, acetogeninas, indoles, compuestos aromáticos y esteroides. De todos ellos, los sesquiterpenos son los más abundantes (**Figura 1**). Los numerosos metabolitos encontrados han sido evaluados en un amplio rango de bioactividades, en los que muchos de ellos han presentado valores notables de actividad. Entre ellas destaca actividad citotóxica, antibacteriana, antiviral, antiparasitaria, antiinflamatoria o antifouling.⁽⁴⁾

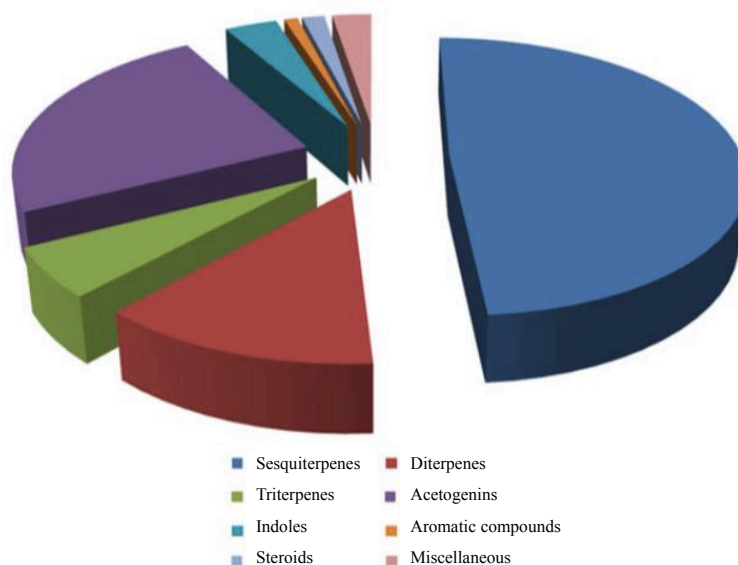


Figura 1. Principales metabolitos del género *Laurencia*.⁽⁴⁾

2.3. *Laurencia microcladia* Kützing

El alga que ha sido objeto de estudio en esta memoria es una muestra de *Laurencia microcladia* recolectada en Fuerteventura (**Figura 2**).⁽⁵⁾

No existen muchos estudios fitoquímicos previos sobre esta especie, pero se debe destacar el aislamiento de una serie de sesquiterpenos citotóxicos de tipo cuparano,⁽⁶⁾ ciclolaurano^(7,8) y bisabolano,⁽⁸⁾ así como un triterpeno antibacteriano⁽⁹⁾ (**Figura 3**).

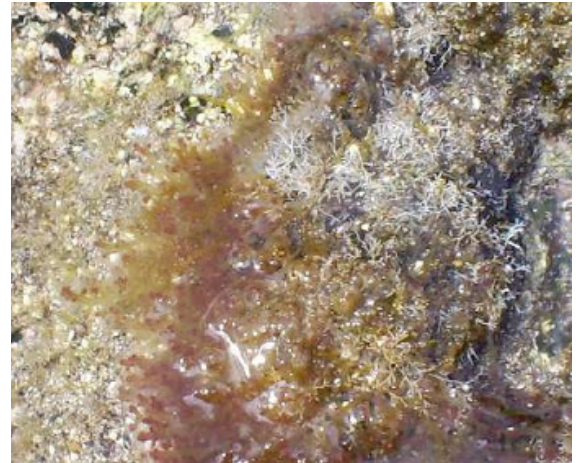


Figura 2. *Laurencia microcladia*

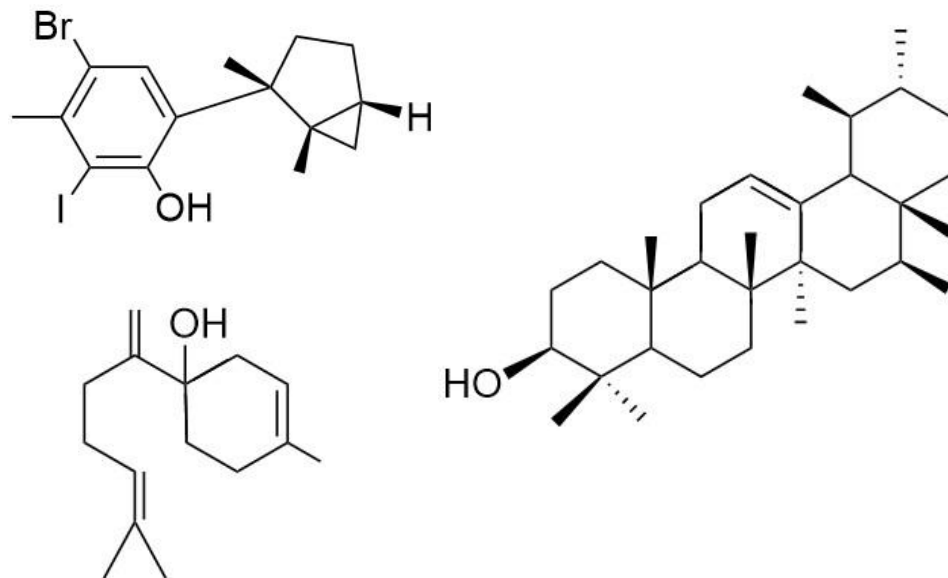


Figura 3. Ejemplos de metabolitos aislados de *Laurencia microcladia* en la literatura.



3. OBJETIVOS

El principal objetivo de este trabajo es el estudio y búsqueda de nuevos compuestos en el organismo marino *Laurencia microcladia*, recolectado en la isla de Fuerteventura, con vistas a su posible potencial biomédico o biotecnológico.

Los objetivos específicos son:

- Conocimiento y dominio de las técnicas cromatográficas para la correcta separación, aislamiento y purificación de compuestos con posible interés biomédico o biotecnológico, a partir del extracto de *Laurencia microcladia*.
- Aplicación de diferentes experimentos de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y de Espectrometría de Masas (MS) para la elucidación estructural.
- Obtención de extractos y sustancias puras para su evaluación de actividad biológica frente a microorganismos vivos, como amebas o protozoos, así como la actividad antiproliferativa frente a varias líneas celulares tumorales.*

*Los ensayos de actividad biológica han sido realizados en colaboración con otros departamentos asociados a la ULL, concretamente con el Instituto de Enfermedades Tropicales y Salud Pública de Canarias (Drs. J. Lorenzo–Morales y J. Piñero) y el Biolab en el Instituto Universitario de Bio–Orgánica Antonio González (Dr. J. M. Padrón Carrillo).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Material biológico

Se empleó una muestra de *Laurencia microcladia* Kützing de 213.9 g. La muestra fue recolectada en los primeros metros del litoral de la localidad de El Cotillo, al noroeste de la Isla de Fuerteventura ([28.706068](#), [-14.014908](#)) (**Figura 4**). Los ejemplares fueron transportados en neveras al laboratorio donde se congelaron hasta su estudio. Un ejemplar se depositó en el Herbario de la Universidad de La Laguna, Departamento de Biología Vegetal (TFC Phyc 14446).



Figura 4. Zona de recolección de las muestras de *Laurencia microcladia*.

4.2. Extracción y purificación

En los procesos de extracción y purificación se emplearon disolventes destilados de Sigma-Aldrich® y de Scharlau®. Para la eliminación de estos disolventes y purificación de la muestra se utilizaron rotavapores Büchi R-200, equipados con un baño de agua a 38 °C y bombas de alto vacío Büchi V-700®.

○ CROMATOGRAFÍA DE FILTRACIÓN MOLECULAR EN COLUMNA ABIERTA

Esta cromatografía se realizó en una columna (210 x 20 mm Ø), donde se empleó como fase estacionaria Sephadex LH-20 de la casa Sigma®, usando como eluyente una mezcla de diclorometano y metanol (CH₂Cl₂:MeOH, 1:1).

○ CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE MEDIA PRESIÓN (MPLC)

Se realizó una MPLC en una columna preempaquetada Lobar® LiChropred Si60 (310 x 25 mm Ø) de la casa Merck® asociada a una bomba FLUID METERING® y acoplada a un colector automático GILSON® FC203B, con un flujo constante de 1 ml/min. Se utilizó en la fase móvil la mezcla de disolventes n-hexano (n-Hex) y acetato de etilo (AcOEt) en un gradiente ascendente de polaridad.



○ CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

El aislamiento y purificación final de los productos se realizó con un sistema HPLC WATERS® 1525 con una bomba binaria. La separación se realizó con una columna preparativa de fase normal μ -Porasil (150 x 19 mm \varnothing) de WATERS®. Se empleó como disolvente en la fase móvil una mezcla de n-Hex:AcOEt a diferentes concentraciones en función de la fracción empleada. Se utilizó el mismo colector automático que en la MPLC.

○ CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (TLC)

Para esta cromatografía se utilizaron cromatofolios (20 x 20 cm) de gel de sílice 60 F₂₅₄ Merck®. La visualización y revelado fue posible mediante dos técnicas:

- Por visualización de las placas por exposición a la radiación ultravioleta a $\lambda=254$ nm en un gabinete Spretoline® modelo CM-10.
- Mediante la pulverización de las placas con una solución al 10% de ácido fosfomolibdico en etanol y posterior calentamiento a 140 °C.

4.3. Elucidación estructural

Se emplearon técnicas espectroscópicas que permitieron elucidar la estructura de las moléculas aisladas.

○ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

Para realizar los estudios de RMN se emplearon los espectrómetros BRUKER® AVANCE 500 MHz y 600 MHz, de acuerdo a las necesidades. Los experimentos realizados fueron:

- 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

Los datos de adquisición obtenidos se procesaron con los programas informáticos MestRenova en la versión 9.1.0-14011 y TopEspin versión 3.5 pl17. Además, se empleó como disolvente en casi todos los casos cloroformo deuterado (CDCl₃), excepto en las primeras resonancias realizadas que se empleó metanol deuterado (MeOD). Se utilizó como referencia la señal interna de CDCl₃ residual para ¹H y ¹³C (7.26 ppm y 77.2 ppm respectivamente).



- ESPECTROMETRÍA DE MASAS

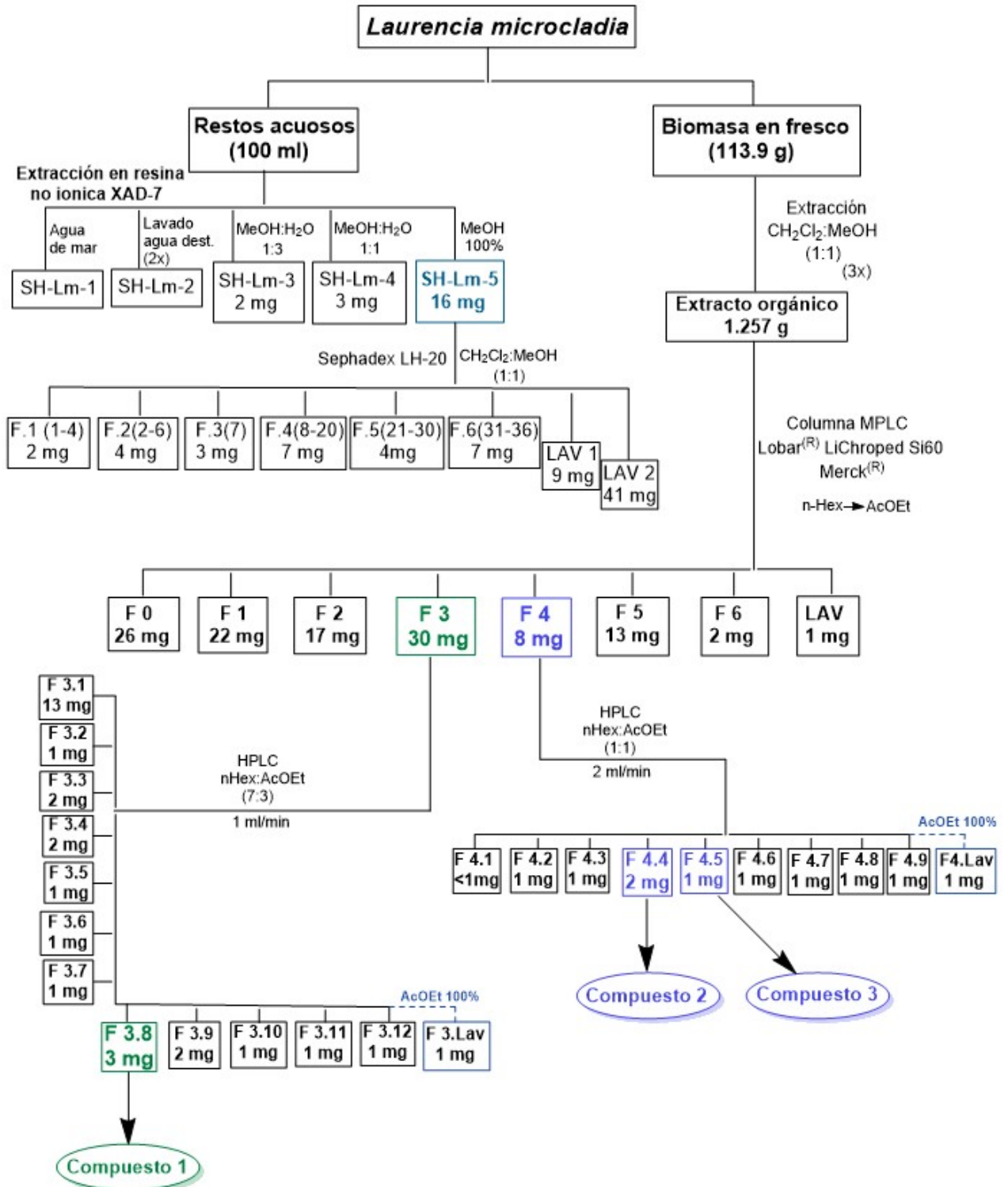
La espectrometría de masas fue realizada en un espectrómetro Micromass modelo LCT-Premier-XE, donde se usó como fuente de ionización electrospray (ESI).

- ROTACIÓN ÓPTICA

Se empleó un polarímetro Perkin-Elmer®, modelo 241, a 25 °C y usando la línea D del sodio ($\lambda = 589$ nm). El producto fue disuelto en CHCl_3 anhidro y se empleó una celda de camino óptico de 1 dm.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Estudio cromatográfico de los extractos de *Laurencia microcladia*.



Esquema 1. Marcha cromatográfica realizada.

La muestra fue descongelada y tras el proceso se observó que con el material biológico había restos acuosos coloreados, por lo que en primer lugar se procedió a la decantación de estos restos acuosos para separarlos del material biológico del alga. A continuación ambos fueron tratados por separado (**Esquema 1**).

Los restos acuosos (≈ 100 ml) se filtraron por gravedad para evitar impurezas en la muestra, a continuación se añadió la resina *Ambelita XAD-7PH* que previamente fue hidratada con metanol (MeOH) y luego lavada con agua destilada (2x). Se puso en contacto con esta resina con el fin de atrapar por un proceso de adsorción los compuestos orgánicos que se pudieran encontrar en disolución. Para ello primero se sometió a un proceso de agitación en una placa orbital durante 24 horas, se trasvasó el contenido del matraz a un embudo de decantación, donde se realizaron los lavados y las extracciones de la resina (**Figura 5**).



Figura 5. Proceso realizado con los restos acuosos de *Laorencia microcladia*.

En primer lugar se decantó el contenido acuoso del Erlenmeyer en el matraz 1, posteriormente se realizaron dos lavados de la resina con agua destilada para eliminar sales, lavados que se recogieron en el matraz 2. La extracción de las moléculas adheridas a la resina comenzó con MeOH:H₂O (1:3) (SH-Lm-3), luego con MeOH:H₂O (1:1) (SH-Lm-4) y finalmente con MeOH (SH-Lm-5). El contenido de estos matraces se concentraron por separado, se pesaron, se analizó el comportamiento en TLC y se realizó espectros de RMN-¹H. Se observó cómo el extracto SH-Lm-5 contenía una mezcla de compuestos que podrían ser interesantes. Por lo que se separaron dos alícuotas para enviar al Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Salud Pública de Canarias y al Biolab para un análisis preliminar de actividad antiparasitaria y antiproliferativa. Así mismo se sometió a este extracto a un primer estudio cromatográfico por filtración molecular en columna abierta, donde en función de los resultados obtenidos en las TLC se reagruparon los tubos recogidos en 8 fracciones. A todas ellas se les realizó espectro de RMN-¹H y se encontró interesante la F3, por lo que se reservó para un estudio posterior.

La obtención de los extractos de la biomasa (BM) se realizó por maceración a temperatura ambiente, en una mezcla de MeOH:CH₂Cl₂ (1:1) (3x) durante cuatro días. Todos los extractos se recogieron en el mismo balón para retirar el disolvente por evaporación y así obtener el extracto de la biomasa (**Figura 6**). Este presentó un aspecto oleoso y de color verde, cuyo peso total fue de 1,257 g. De éste se toma también una pequeña alícuota para el estudio de su actividad, siguiendo el mismo procedimiento que con SH-Lm-5.

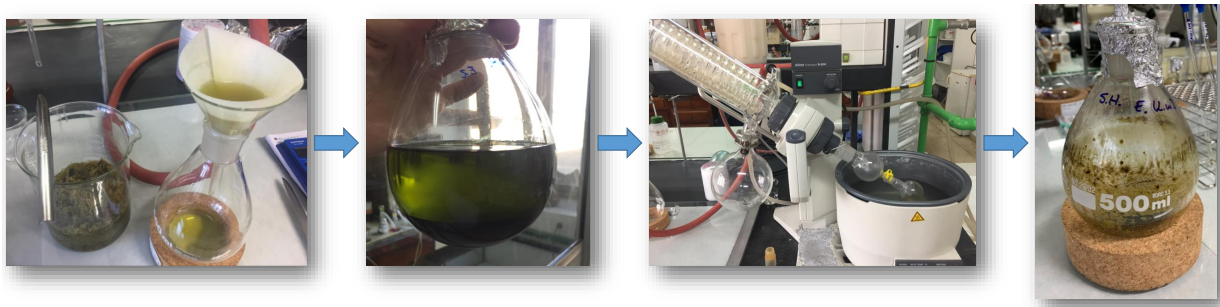


Figura 6. Proceso sometido a la biomasa de *Laurencia microcladia*.

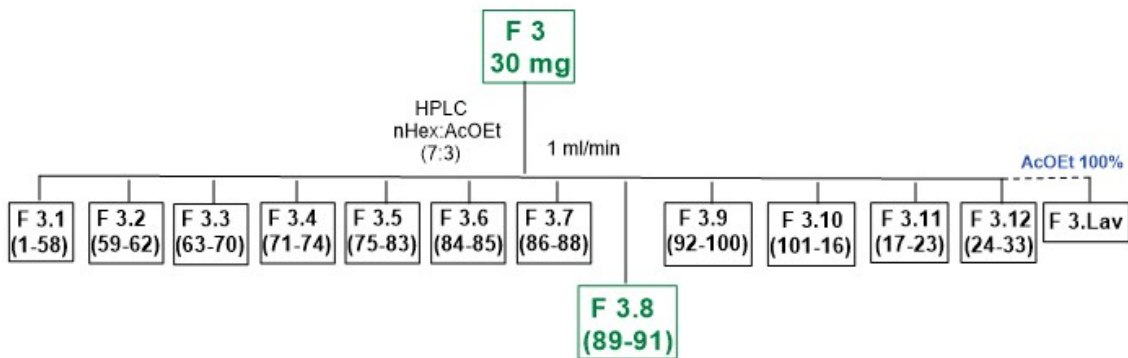
Este extracto denominado BM fue sometido a una cromatografía empleando una columna preempaquetada Lobar Lichropred® Si 60 y empleando como disolvente una mezcla de nHex:AcOEt en un gradiente de concentración desde (9:1) hasta AcOEt 100%, obteniendo de esta manera un total de 245 tubos que fueron reagrupados en siete fracciones diferentes según los resultados observados en las TLC realizadas de cada uno de ellos. Estas fracciones son las que se detallan en el **esquema 1**. Todas ellas fueron analizadas por RMN-¹H.

Según los datos obtenidos, se decidió continuar el estudio con la F3 y F4, de manera que cada una de ellas fue sometida a una cromatografía líquida de alta resolución en una columna μ -Porasil (**Figura 7**).



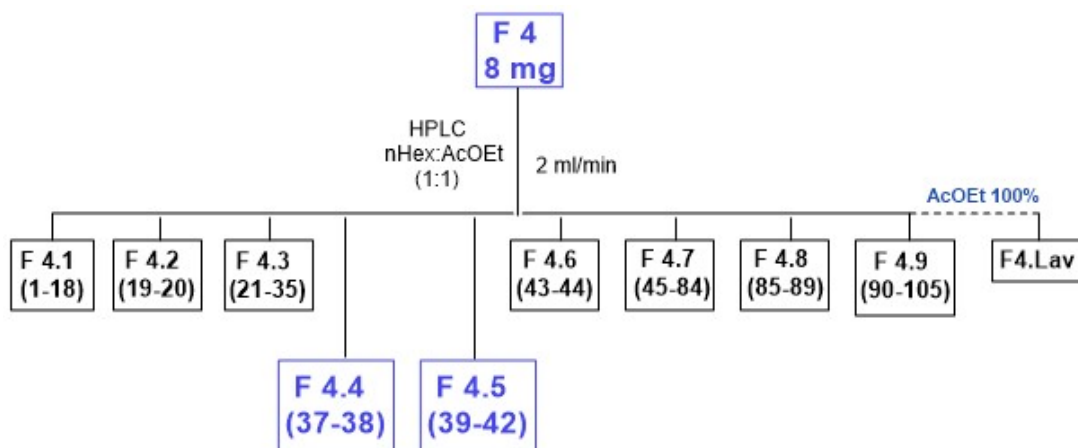
Figura 7. HPLC de la F3 y F4.

En el caso de F3 se empleó una mezcla de disolvente nHex:AcOEt (7:3) y la cromatografía se realizó a un flujo de 1 ml/min obteniendo 12 fracciones que fueron reagrupadas como se detalla en el **esquema 2** según los resultados de las TLC. Estas fracciones fueron analizadas con RMN-¹H encontrando interesante la F 3.8 (89-91) (Compuesto 1).



Esquema 2. Detalle sobre la marcha cromatográfica de F3.8.

Por otro lado F4 fue tratada de la misma manera, realizando una HPLC con la mezcla de disolventes nHex:AcOEt (1:1) en este caso a un flujo de 2 ml/min, donde se obtuvieron 9 fracciones que fueron reagrupadas como se detalla en el **esquema 3**. Tras hacer RMN-¹H de cada una de las fracciones, se decidió continuar con el estudio de la F4.4 (37-38) (Compuesto 2) y de la F4.5 (39-42) (Compuesto 3).



Esquema 3. Detalle sobre la marcha cromatográfica de F4.4.

Este estudio cromatográfico dio lugar al aislamiento de tres sesquiterpenos, compuestos 1-3. Todos son nuevos en la literatura, aunque uno de ellos (Compuesto 1)⁽¹⁰⁾ ya había sido aislado con anterioridad por el grupo (**Figura 8**). Estos tres compuestos serán enviados para estudio de su actividad.

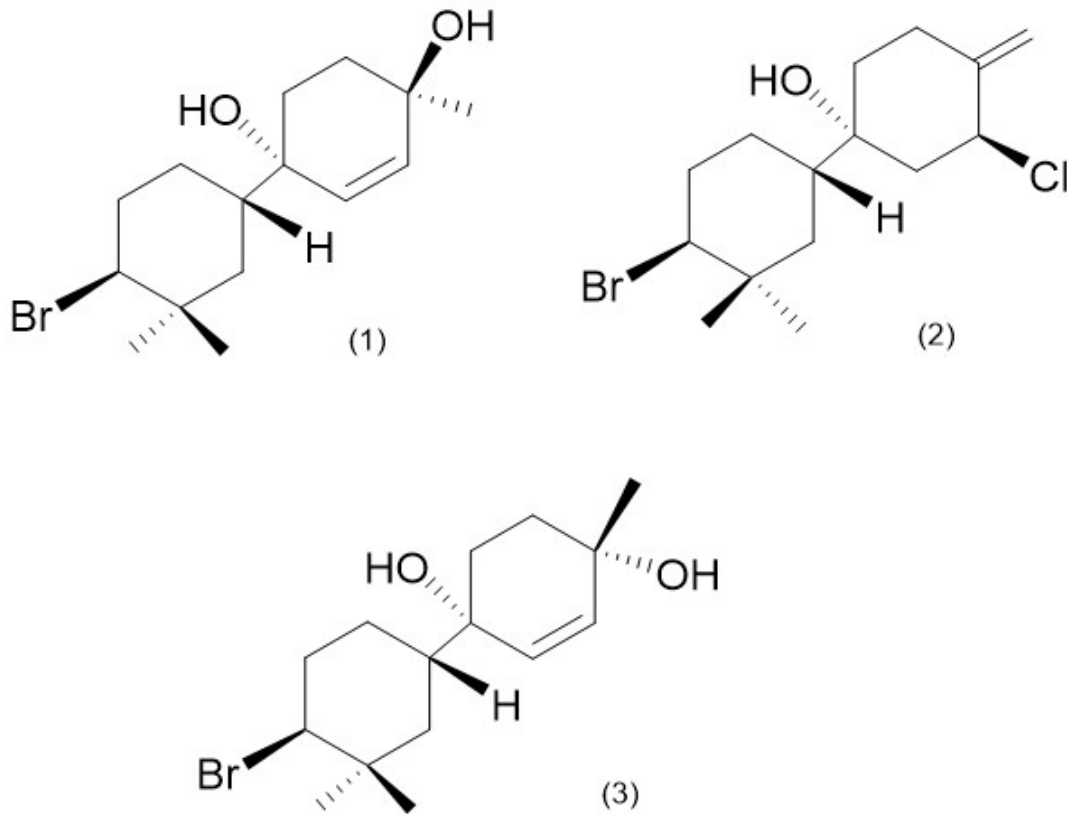


Figura 8. Nuevos compuestos aislados de *Laurencia microcladia*.

5.2. Elucidación estructural de los metabolitos aislados.

La elucidación estructural se hizo principalmente en base a las técnicas de espectrometría de masas y RMN. Se realizó el mismo procedimiento con los tres compuestos y a continuación se procede a detallar la determinación estructural del compuesto 2.

El compuesto 2 se aisló como un sólido incoloro ópticamente activo con $[\alpha]_D^{25} = -4^\circ$ (*c* 0.2, CHCl_3). Su fórmula molecular se estableció como $\text{C}_{15}\text{H}_{25}\text{BrClO}$ de acuerdo a los iones isotópicos pseudomoleculares $[\text{M}+\text{Na}]^+$ observados en el espectro de masas de alta resolución [m/z 357.2040, 359.2204, 360.3445, 361.2240 (13:100:20:10)].

El análisis del espectro $\text{RMN-}^1\text{H}$ permitió distinguir la presencia de un metileno exocíclico (δ_{H} 4.94 y 4.82), además de dos señales de protón en α a un heteroátomo (δ_{H} 4.44 y 3.92), la primera de ellas como un doblete ancho y la segunda como un doblete. (**Figura 9**).

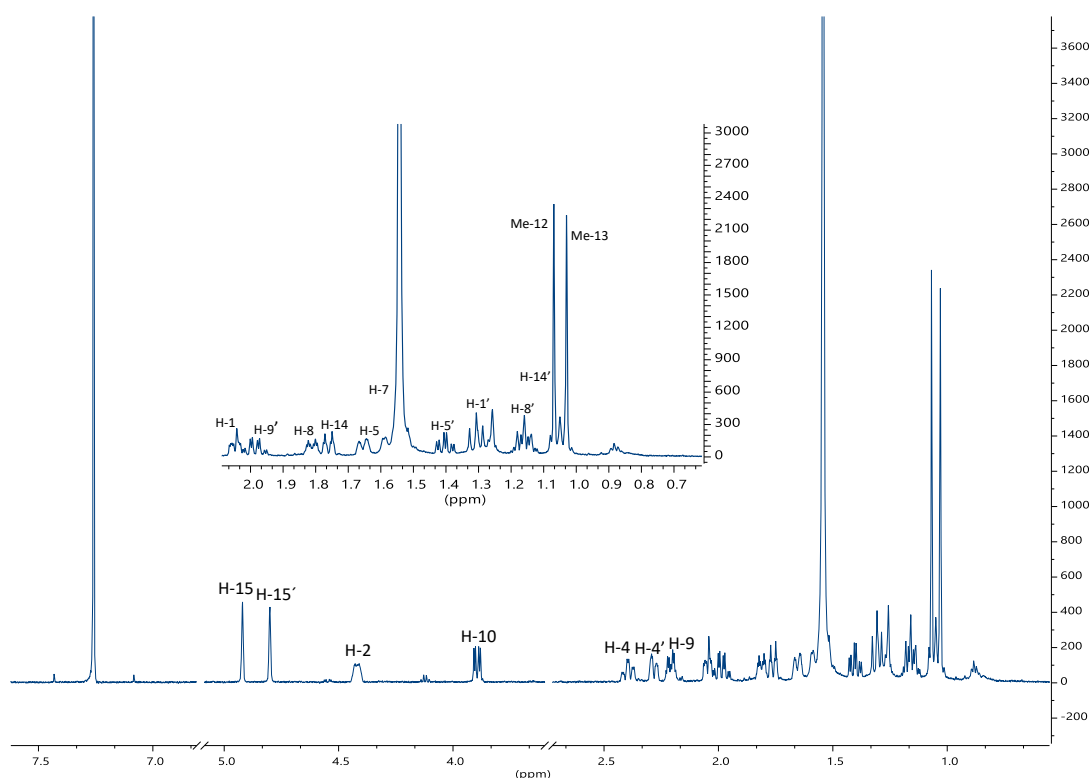


Figura 9. Espectro de $\text{RMN-}^1\text{H}$ del Compuesto 2.

En el estudio del experimento bidimensional HSQC editado (**Figura 10**) se establecieron los desplazamientos químicos de los ^{13}C asociados a cada uno de los protones de la molécula, de manera que se confirmó la presencia de un metileno olefínico (δ_{C} 103.7) y también la presencia de dos metinos en α a un heteroátomo (δ_{C} 69.2, 65.7). Por otra parte se observaron que las señales entre 2.5-1.0 ppm son de seis metilenos diasterotópicos (δ_{C} 45.0, 40.6, 35.7, 34.1, 29.3, 28.3), también la señal de un metino (δ_{C} 43.6) y de dos metilos geminales (δ_{C} 32.1, 20.5).

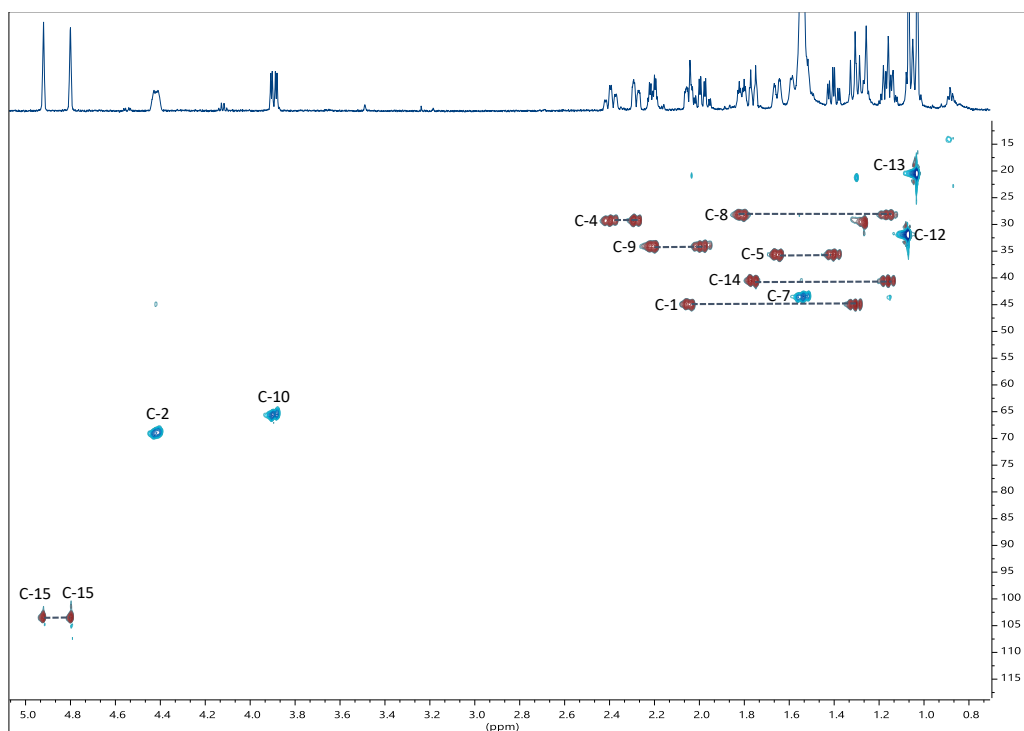


Figura 10. Experimento HSQC editado del Compuesto 2

Parte del esqueleto de la molécula fue construido de acuerdo a los acoplamientos homonucleares observados en el experimento bidimensional COSY, donde se pudieron identificar tres sistemas de espín ^1H - ^1H en la molécula (**Figura 11**). El primero de ellos, indicado como **A** (**Figura 12**), lo conforman los protones del metileno H_2 -1 (δ_{H} 2.07 y 1.33) y el protón del metino en α a un heteroátomo H -2 (δ_{H} 4.44). El segundo sistema de espín **B** (**Figura 13**), se conforma con otros dos metilenos diasterotópicos H_2 -4 (δ_{H} 2.42 y 2.31) \rightarrow H_2 -5 (δ_{H} 1.68 y 1.42). Por último el tercero **C** (**Figura 14**) engloba la correlación de H -10 (δ_{H} 3.92) con el metileno H_2 -9 (δ_{H} 2.24 y 2.01), estos a su vez con H_2 -8 (δ_{H} 1.84 y 1.18) que siguiendo la secuencia de los metilenos pasa a un metino H -7 (δ_{H} 1.56) que concluye en el último metileno H_2 -14 (δ_{H} 1.70 y 1.18). De manera que con ayuda del experimento COSY se pudo establecer el esqueleto del Compuesto 2.

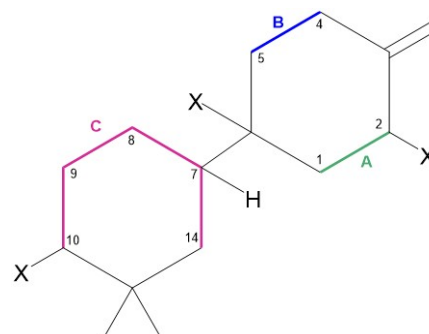


Figura 11. Sistemas de espín del Compuesto 2, elucidado a partir de las correlaciones COSY.

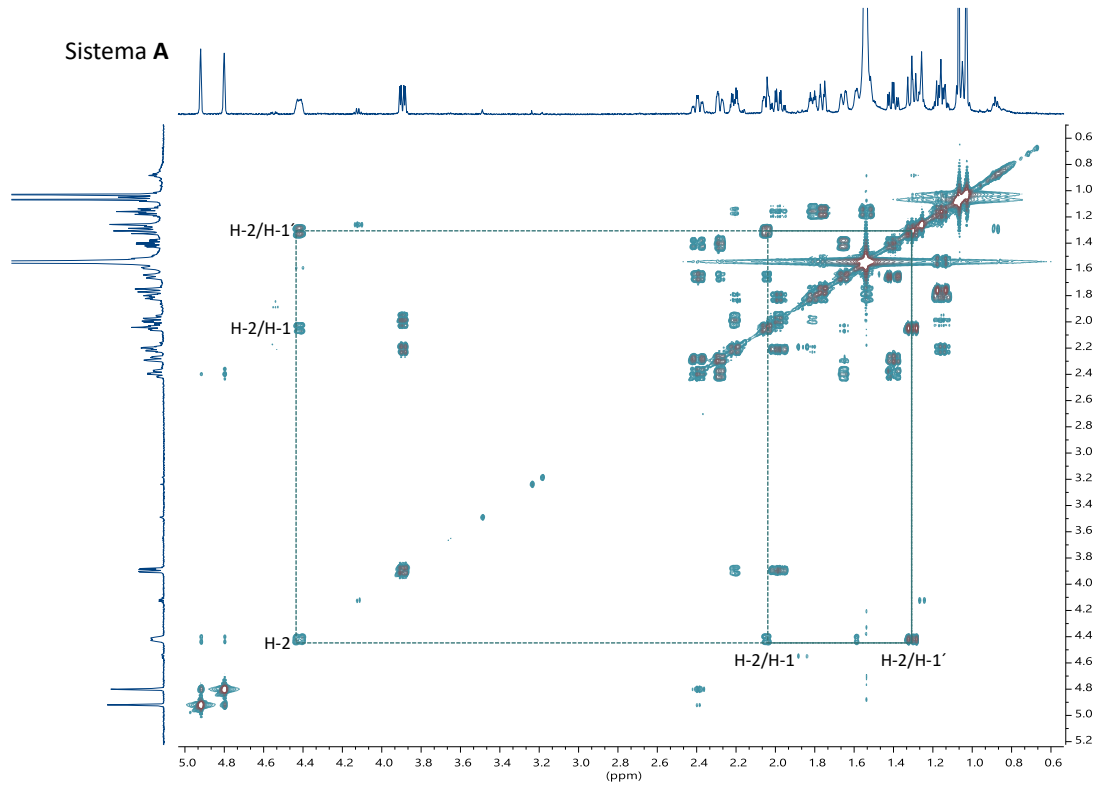


Figura 12. Experimento COSY. Señaladas las conectividades ^1H - ^1H correspondientes al sistema A.

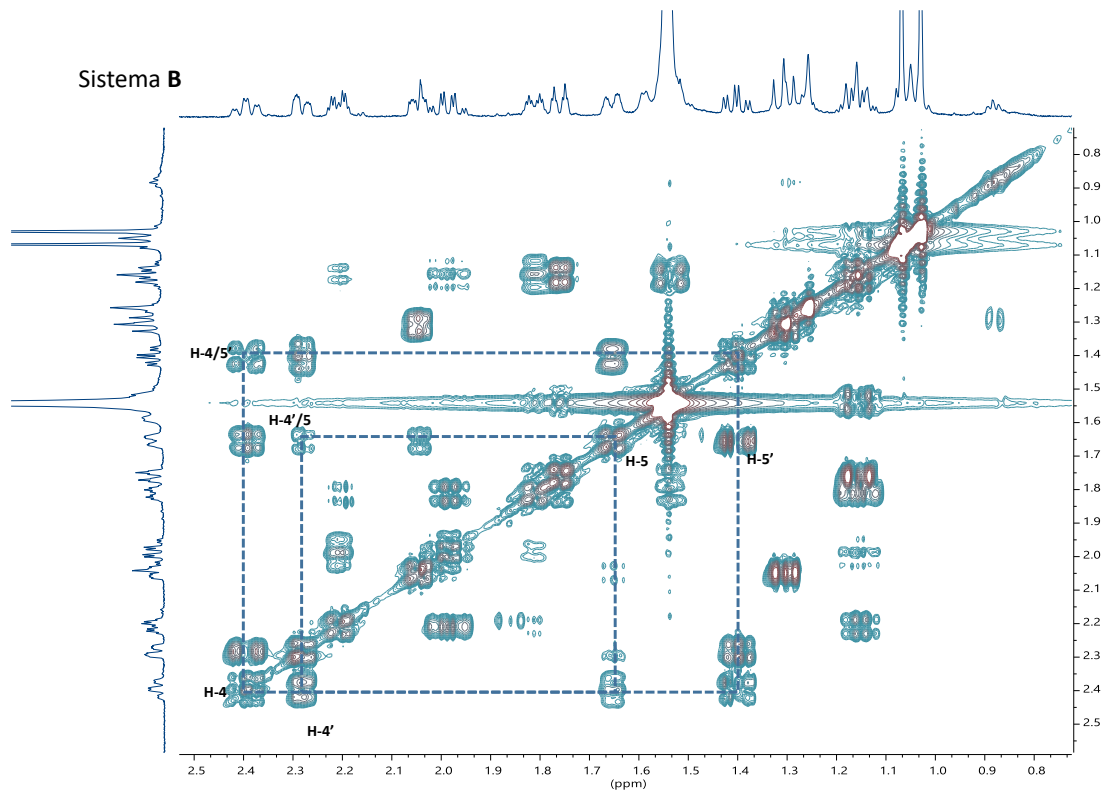


Figura 13. Ampliación del experimento COSY. Señaladas las conectividades ^1H - ^1H correspondientes al sistema B.

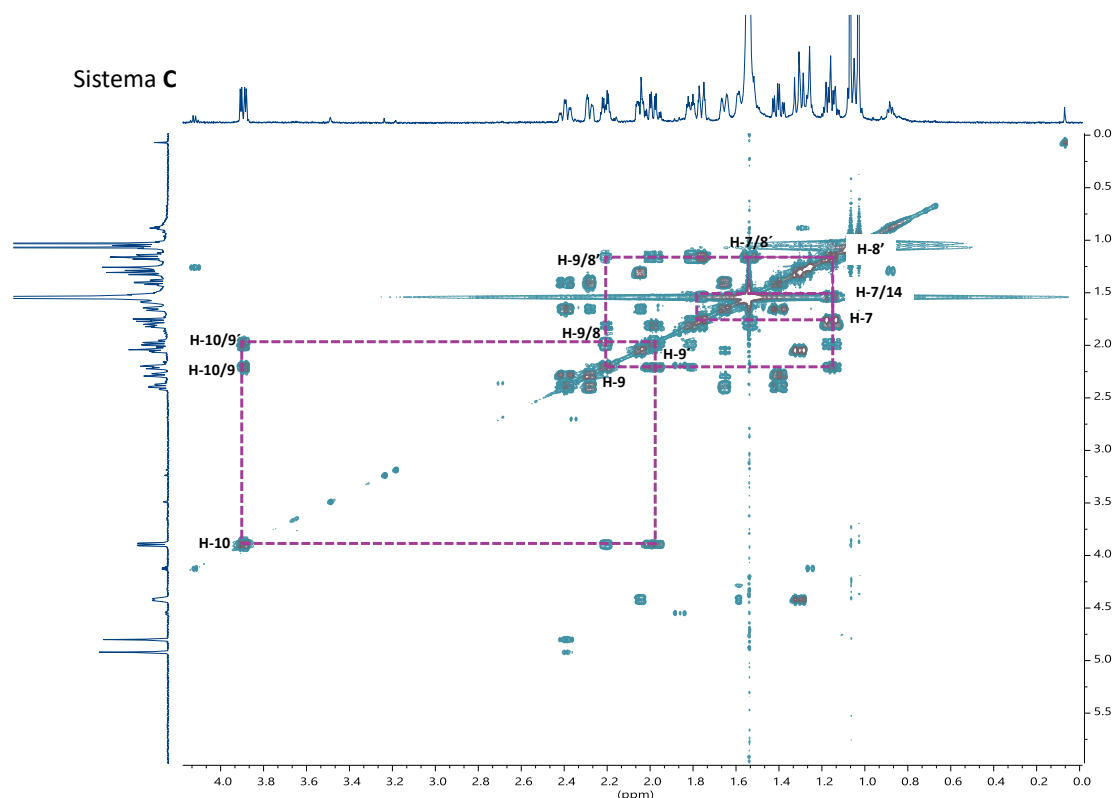


Figura 14. Ampliación del experimento COSY. Señaladas las conectividades ^1H - ^1H correspondientes al sistema C.

El análisis del experimento bidimensional HMBC (**Figura 15 y 16**), permitió identificar las correlaciones entre ^1H y ^{13}C del entorno químico en una longitud que alcanza una distancia de hasta cuatro enlaces. De manera, que este experimento hizo posible la asignación de los carbonos cuaternarios adyacentes a cada sistema de espín. Esto permitió establecer la conexión entre el sistema de espín **A** y **B**, que se unen por la correlación de H-2 y H₂-4 con el carbono cuaternario C-3 (δ_{C} 150.5), sobre el que se sitúa el metileno olefínico H₂-15 (δ_{H} 4.94 y 4.82). De la misma manera se identificaron correlaciones entre H₂-1 y H₂-5 con el segundo carbono cuaternario C-6 (δ_{C} 74.3), adyacente a un grupo hidroxilo. De esta manera se completa uno de los anillos de la molécula, que además se conecta con el sistema de espín **C** por una correlación entre H-7 y C-6. Por otro lado, los sistemas de correlación HMBC de los metilos H₃-12 (δ_{H} 1.09) y H₃-13 (δ_{H} 1.05) con el último carbono cuaternario C-11, los posiciona como metilos geminales, además se llegó a esta estructura con ayuda de las correlaciones que a su vez se establecen entre el metino H-10 y el metileno H₂-14 con el C-11.

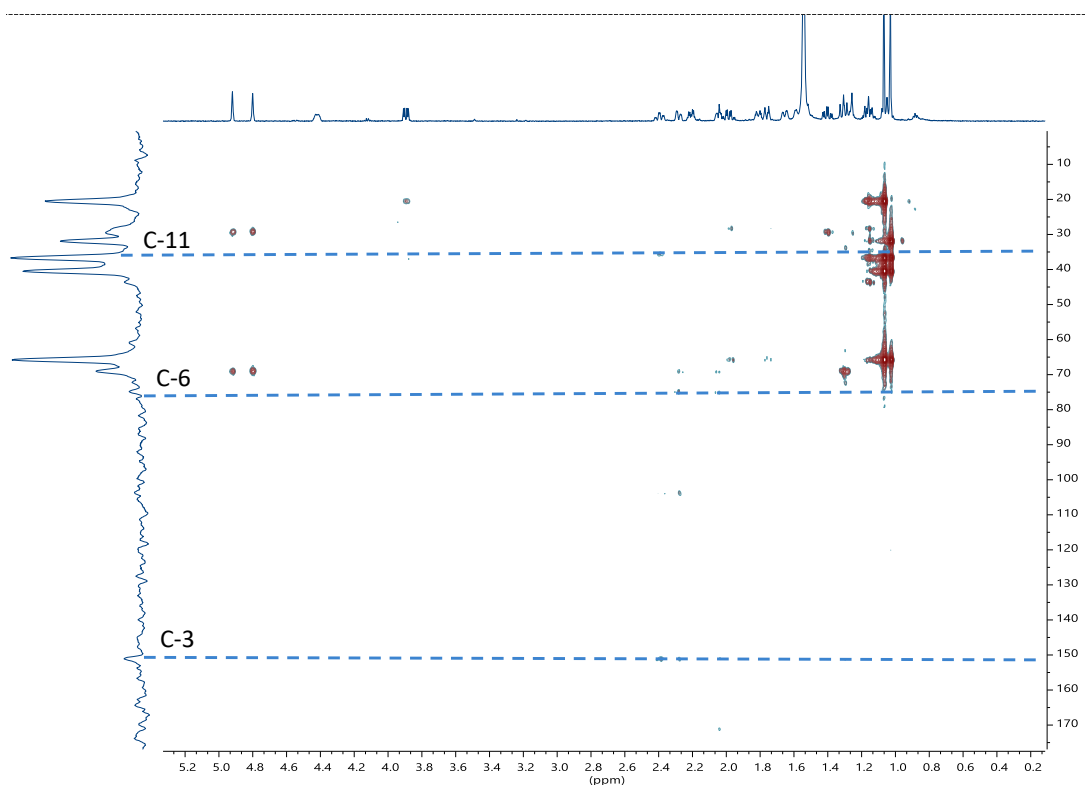


Figura 15. Experimento HMBC con las principales correlaciones observadas.

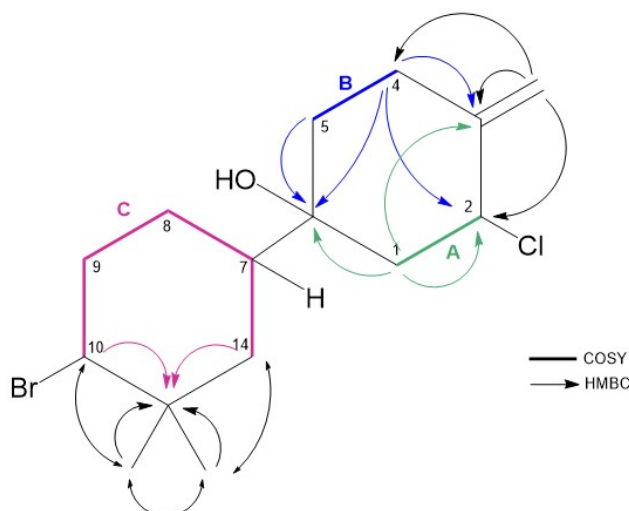


Figura 16. Principales conectividades HMBC y COSY observadas para el compuesto 2

La disposición relativa de los sustituyentes en C-7, C-10 y C-2 fue asignada en base a las constantes de acoplamiento y las correlaciones observadas en el experimento ROESY. Así la disposición del átomo de bromo en C-10 fue establecida como ecuatorial en base a los valores de las constantes de acoplamiento de H-10, $J_{H-H} = 4.3$ y 12.6 Hz, sólo compatibles con una orientación axial. Por otro lado, una correlación ROE intensa de H-10 con uno de los protones de H-14 ($\delta_H 1.79$) y la constante de acoplamiento de este último con H-7 ($J_{H-14\alpha, H7} = 13.2$ Hz) indica una disposición trans-diaxial de H-14 α y H-7. La disposición espacial del sustituyente en

C-2 fue asignada como ecuatorial en base a las constantes de acoplamiento mostradas por el metino axial H-2 ($J = 4.2; 10.7$ Hz) con los dos protones del metileno H₂-1. De manera que se completa la estructura del compuesto 2 (**Figura 17**).

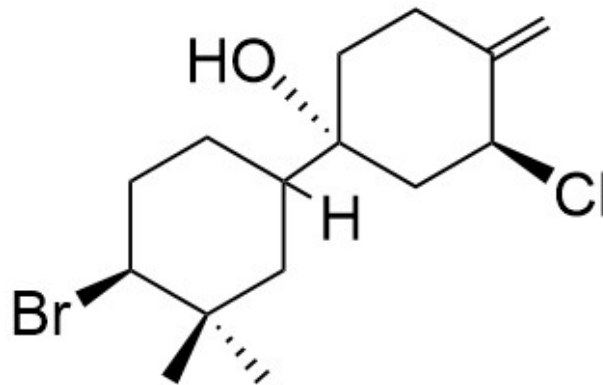


Figura 17. Compuesto 2.

Se estableció por tanto la asignación de los desplazamientos químicos de carbono y de protón para el compuesto 2, tal y como se recoge en la **tabla 1**.

Nº C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	45.0	2.07	br dd	4.2; 12.6
		1.33	dd	10.7; 12.6
2	69.2	4.44	br d	10.7
3	150.5	-		
4	29.3	α 2.42	ddd	4.5; 13.5; 13.5
		β 2.31	ddd	2.4; 4.6; 13.5
5	35.7	α 1.68	ddd	2.4; 4.5; 13.4
		β 1.42	ddd	4.6; 13.4; 13.5
6	74.3	-		
7	43.6	1.56	m	
8	28.3	β 1.84	dddd	3.5; 3.5; 13.0; 13.0
		α 1.18	m	4.1; 13.0; 13.0; 13.0
9	34.1	α 2.24	dddd	4.0; 4.0; 4.3; 13.4
		β 2.01	dddd	4.1; 12.6; 13.1; 13.4
10	65.7	3.92	dd	4.3; 12.6
11	36.7	-		
12	32.1	1.09 (3H)	s	
13	20.5	1.05 (3H)	s	
14	40.6	β 1.79	ddd	2.3; 2.8; 13.2
		α 1.18	br dd	13.2; 13.2
15	103.7	4.94	s	
		4.82	s	

Tabla 1. Datos de RMN ^1H y ^{13}C del Compuesto 2 en CDCl_3 . (J = constante de acoplamiento, s = singlete, d = doblete, m = multiplete, br = “broad” (banda ancha)).

El compuesto 1 se aisló como un sólido incoloro cuya fórmula molecular fue determinada como $C_{15}H_{25}BrO_2$, en base a su espectro de masas de alta resolución ($[M+Na]^+$ [m/z 339.0911, 341.0928 (100:69)]). De igual forma el compuesto 3 resultó ser un isómero del compuesto 1 ($[M+Na]^+$ [m/z 339.0940, 341.0922 (100:76)]). Los datos con el desplazamiento químico de carbono y protón para cada uno de los compuestos se recoge en la **tabla 2**.

N° C	$\delta^{13}C$ (ppm)	δ^1H (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
Compuesto 1				
1	136,7	5.80	d	10.1
2	130.7	5.70	d	10.1
3	78.9			
4	28.5	β 2.09 α 1.69	m m	
5	28.3	α 1.74 β 1.51	ddd ddd	3.7; 12.8; 13.7 3.7; 4.8; 13.7
6	72.6			
7	42.6	1.74	dddd	2.8; 3.2; 13.1; 13.3
8	27.9	β 1.90 α 1.22	dddd dddd	2.8; 3.1; 4.0; 13.2 4.4; 13.0; 13.2; 13.3
9	34.1	α 2.21 β 2.01	dddd dddd	3.1; 4.1; 4.4; 13.4 4.0; 12.7; 13.0; 13.4
10	65.8	3.94	dd	4.1; 12.7
11	36.7			
12	32.0	1.08 (3H)	s	
13	20.4	1.09 (3H)	s	
14	40.7	β 1.68 α 1.17	ddd dd	2.9; 3.2; 13.3
15	24.9	1.04 (3H)	s	13.1; 13.3
Compuesto 3				
1	135.7	5.76	dd	1.4; 10.1
2	133.0	5.61	dd	1.5; 10.1
3	67.2			
4	28.0	β 1.93 α 1.59	ddd dddd	3.5; 13.3; 13.7 1.5; 3.2; 4.6; 13.7
5	33.6	α 1.86 β 1.77	ddd dddd	3.2; 13.3; 13.5 1.4; 3.5; 4.6; 13.5
6	70.8			
7	42.4	1.73	m	
8	27.9	1.93	dddd dddd	3.1; 3.4; 4.1; 13.1 4.1; 12.7; 13.1; 13.2
9	34.1	α 2.24 β 2.03	dddd dddd	3.3; 4.1; 4.2; 13.3 4.1; 12.7; 13.1; 13.3
10	66.0	3.94	dd	4.2; 12.7
11	37.0			
12	31.9	1.09 (3H)	s	
13	20.5	1.08 (3H)	s	
14	41.1	1.69 1.19	ddd br dd	3.2; 3.2; 13.0 13.0; 13.0
15	29.8	1.35 (3H)	br s	

Tabla 2. Datos de RMN 1H y ^{13}C del compuesto 1 y compuesto 3 en $CDCl_3$.



6. CONCLUSIONES

- ✓ Se realizó el estudio fitoquímico preliminar de la especie *Laurencia microcladia*, recolectada al noroeste de la isla de Fuerteventura.
- ✓ El análisis cromatográfico del extracto procedente de la biomasa supuso el aislamiento de productos puros que resultaron ser sesquiterpenos halogenados.
- ✓ Utilizando técnicas espectroscópicas (fundamentalmente Resonancia Magnética Nuclear y espectrometría de masas) se establecieron las estructuras resultando ser metabolitos nuevos en la literatura, aunque uno de ellos había sido aislado previamente en el grupo de Marinos.
- ✓ Las muestras de los extractos estudiados así como de los productos puros han sido enviadas para analizar su posible potencial bioactivo.



7. BIBLIOGRAFÍA

- (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) Comisión Europea, asuntos marítimos [Sede Web] [Consultado el 26 de julio de 2019]. Disponible en:
https://ec.europa.eu/maritimeaffairs/policy/biotechnology_es
- (4) Harizani M., Ioannou E., Vassilios R. The Laurencia paradox: An endless source of chemodiversity. *Prog Chem Org Nat Prod.* 2016; 102: 91-252.
- (5) Aylagas E., Souto M. L., Machín-Sánchez M., Gil-Rodríguez M. C. *Laurencia microcladia* en Canarias II. Estudio preliminar químico. *Rev. Acad. Canar. Cienc.*, 2011; XXII (Núm. 3): 37-51.
- (6) Kladi M., Vagias C., Furnari G., Moreau D., Roussakis C., Roussis V. Cytotoxic cuparene sesquiterpenes from *Laurencia microcladia*. *Tetrahedron Letters.* 2005; 46(34): 5723-5726.
- (7) Kladi M., Xenaki H., Vagias C., Papazafiri P., Roussis V. New cytotoxic sesquiterpenes from the red algae *Laurencia obtusa* and *Laurencia microcladia*. *Tetrahedron.* 2006; 62(1): 182-189.
- (8) Kladi M., Vagias C., Papazafiri P., Furnari G., Serio D., Roussis V. New sesquiterpenes from the red alga *Laurencia microcladia*. *Tetrahedron.* 2007; 63(32): 7606-7611.
- (9) Abdel-Raouf N., Al-Enazi N. M., Al-Homaidan A. A., Ibraheem I. B. M., Al-Othman M. R., Hatamleh A. A. Antibacterial β -amyryn isolated from *Laurencia microcladia*. *Arabian Journal of Chemistry.* 2015; 8(1): 32-37.
- (10) Gutierrez A. Estudio de metabolitos secundarios de Rhodophytas y Phaeophytas. Servicio de publicaciones de la ULL. 2013.