

Curso 1996/97
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS

MARÍA LUISA SOUTO SUÁREZ

**Estudio de productos antitumorales
y toxinas polietéreas de origen marino**

Directores
MANUEL NORTE MARTÍN
JOSÉ JAVIER FERNÁNDEZ CASTRO



SOPORTES AUDIOVISUALES E INFORMÁTICOS
Serie Tesis Doctorales

Los trabajos que constituyen la presente Memoria fueron realizados en las dependencias del Instituto Universitario de Bio-Orgánica "Antonio González", bajo la dirección de los Dres. D. Manuel Norte Martín y D. José Javier Fernández Castro a quienes expreso mi más profundo agradecimiento.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. D. José Gavín Sazatornil por su amistad, inestimable ayuda y disposición para la realización de gran parte de la espectroscopía de RMN que aparece en este trabajo.

Al Dr. Rafael González Pérez que junto a mis directores inició una nueva línea de investigación de la que parte de esta Tesis es heredera, en reconocimiento a las dificultades, esfuerzos, frustraciones y fracasos afrontados, los cuales no se recogen en ninguna tesis ni publicación, pero que han supuesto y aún suponen un gran ahorro de tiempo y “disgustos” a los que venimos detrás.

A los Dres. Alicia Regueiro y Agustín Padilla, así como al Lcdo. Armando Sánchez, por invertir su tiempo en ayudarme a dar mis primeros pasos en el laboratorio.

A todos los que coincidieron en el laboratorio de Marinos y en la Unidad de Servicios durante estos cuatro años por su inestimable ayuda, amistad y apoyo, siendo directamente responsables de que “no haya arrojado la toalla” durante los duros momentos en que estuve sin beca.

Al grupo de investigación que dirige la Dra. Luz Cadenas de Luján por la realización de los ensayos farmacológicos con el complejo del ácido okadaico que se recogen en la presente memoria.

A la Lcda. Marisa Fernández del laboratorio de Sanidad Exterior de Vigo, por su inestimable ayuda durante mi estancia en su laboratorio para el aprendizaje de protocolos de análisis de toxinas en muestras contaminadas.

Al Instituto Español de Oceanografía, Centro Costero de Vigo con mención especial a Isabel Bravo, por las cepas del dinoflagelado *Prorocentrum lima*.

Al Instituto de Salud Carlos III (Ministerio de Sanidad y Consumo) por la beca de Investigación que permitió la realización de parte de este trabajo.

A mi familia

*A todos los que de alguna manera
ayudaron a que esta memoria viese la luz*

INDICE

Página

AGENTES ANTITUMORALES DE *LAURENCIA VIRIDIS*

I. Viridiales, dos Nuevos Diterpenos de *Laurencia*

I.1.	Introducción	3
	A. Labdanos y derivados	5
	B. Ireanos y Pinnaterpenos	9
	C. Obtusanos, Ciclofitanos, Neoireones y Puhukuenos	10
I.2.	Estudio del Viridiol A y del Viridiol B	13

II. Poliéteres Derivados del Escualeno

II.1.	Introducción	23
II.2.	Nuevos poliéteres triterpénicos aislados de <i>L. viridis</i>	27
	A. Aislamiento	27
	B. Estudio de elucidación estructural	29
	B.1. Isodehidrotirsiferol	34
	B.2. 16-Hidroxidehidrotirsiferol	40
	B.3. Tirsanol A y Tirsanol B	44
	B.4. 10-Epidehidrotirsiferol y 10-Epi-15,16-dehidrotirsiferol	51
	B.5. Dehidrovenustatriol y 15,16-Dehidrovenustatriol	57
	B.6. Acetato de Predehidrovenustatriol	62
	C. Origen biogenético	66

III. Estudio Farmacológico

III.1.	Introducción	67
III.2.	Evaluación de la actividad citotóxica	68
	A. Análisis de posibles relaciones estructura-actividad	69
	B. Estudio conformacional	73
III.3.	Actividad inhibitoria enzimática <i>in vitro</i>	78
III.4.	Evaluación de la actividad antiviral	79

IV. Parte Experimental

IV.1	Técnicas experimentales	87
IV.2	Recolección y extracción del alga <i>Laurencia viridis</i>	89
IV.3	Marcha cromatográfica del extracto	89
IV.4	Datos físicos	92
IV.5	Evaluación de la actividad citotóxica	106
	A. Cultivos de células	106
	B. Ensayos de citotoxicidad	107

TOXINAS POLIETEREAS DE ORIGEN MARINO

I.	Introducción	109
II.	Estudios de Complejación del Acido Okadaico	125
III.	Estudios Biosintéticos de las Toxinas del <i>Prorocentrum lima</i>	139
	III.1. Experimentos de adición de [1,4- ¹³ C ₂] succinato sódico y [2- ¹³ C ₁] butirato sódico	145
	A. Descripción general del experimento biosintético	148
	B. Análisis de los resultados de adición de [1,4- ¹³ C ₂] succinato sódico	149
	C. Análisis de los resultados de adición de butirato sódico	152
	D. Discusión de resultados	157
	III.2. Experimentos de adición de aminoácidos	158
	A. Descripción general del experimento de adición de aminoácidos	168
	B. Análisis de los resultados de la suplementación del medio con aminoácidos	170

IV. Parte Experimental

IV.1.	Técnicas experimentales	181
IV.2.	Estudio de complejación del Acido Okadaico	184
A.	Quelación del Acido Okadaico libre con cationes alcalinos y alcalinotérreos	184
B.	Ensayos de descomplejación del Acido Okadaico con éteres corona	185
C.	Ensayos farmacológicos	185
IV.3.	Experimentos biosintéticos	
A.	Experimentos de adición de [1,4- ¹³ C ₂] succinato Sódico y [2- ¹³ C ₁] butirato Sódico	186
B.	Adición de aminoácidos a cultivos de <i>P. lima</i>	190

CONCLUSIONES

Las fuentes tradicionales de compuestos bioactivos han sido, hasta hace pocos años, las plantas y los microorganismos terrestres de donde se han aislado más de la mitad de las prescripciones farmacéuticas actuales. Sin embargo, estas muestras de organismos terrestres que son fácilmente obtenidas, y han sido por tanto ampliamente exploradas, presentan en la actualidad una gran dificultad para suministrar nuevas moléculas con bioactividad. Sólo una de cada diez mil moléculas sometidas a screening presenta una actividad potencial interesante.

En comparación, el mar ha sido escasamente explorado. Cerca de tres cuartas partes de la superficie de la tierra esta cubierta por los océanos, los cuales contienen 1.8 millones de especies diferentes. El medio marino es mucho más duro y agresivo, y la especies se presentan en una gran diversidad de formas. La mayoría de estas especies, han elaborado para su defensa un gran arsenal de moléculas solubles en agua, muchas de las cuales podrían tener aplicación como fármacos efectivos en el tratamiento de múltiples enfermedades. La investigación de este amplio potencial farmacéutico ha sido una de las mayores ocupaciones en las últimas décadas. Sin embargo, muchas de estas moléculas con elevada actividad son todavía hoy grandes promesas, debido a que la escasa cantidad de sustancia en que han sido aisladas hace muy difícil su comercialización, y constituyen sin lugar a dudas, brillantes problemas que la química sintética aún no ha sabido resolver.

Una de las más importantes contribuciones de la química de los productos marinos es el aislamiento e identificación de las toxinas responsables de las intoxicaciones alimentarias. Estas se producen de forma esporádica e impredecible porque los peces o los mariscos contaminados, no son realmente los productores de las mismas, siendo meros acumuladores dentro de la cadena alimentaria. Muchas de estas toxinas marinas son producidas en muy pequeñas cantidades por microorganismos tales como bacterias o dinoflagelados, y pueden pasar, e ir concentrándose en los diferentes niveles llegando de forma repentina e insospechada hasta el hombre. La extrema toxicidad de estos compuestos, las pequeñas cantidades de tóxico disponibles que se pueden aislar de los alimentos, la impredecibilidad de su aparición, así como la dificultad de identificar y

cultivar los organismos productores, hacen que el estudio de las toxinas marinas sea uno de los grandes desafíos dentro de las áreas de la química.

Los progresos son lentos pero los resultados obtenidos hasta el momento han sido espectaculares, así la elucidación estructural de sustancias como las tetrodotoxinas, saxitoxinas, brevetoxinas, ciguatoxinas y maitotoxinas, son hitos dentro del avance de la química. Una vez conocidas sus estructuras químicas, el último gran reto dentro de este campo de investigación de productos marinos lo constituye el poder conocer de forma fehaciente cuales son los procesos biosintéticos que originan este sorprendente tipo de metabolitos.

AGENTES ANTITUMORALES DE LAURENCIA VIRIDIS

I. Viridiales, dos nuevos Diterpenos de *Laurencia*

II. Poliéteres Derivados del Escualeno

III. Estudio Farmacológico

IV. Parte Experimental

I. VIRIDIOLES, DOS NUEVOS DITERPENOS DE LAURENCIA

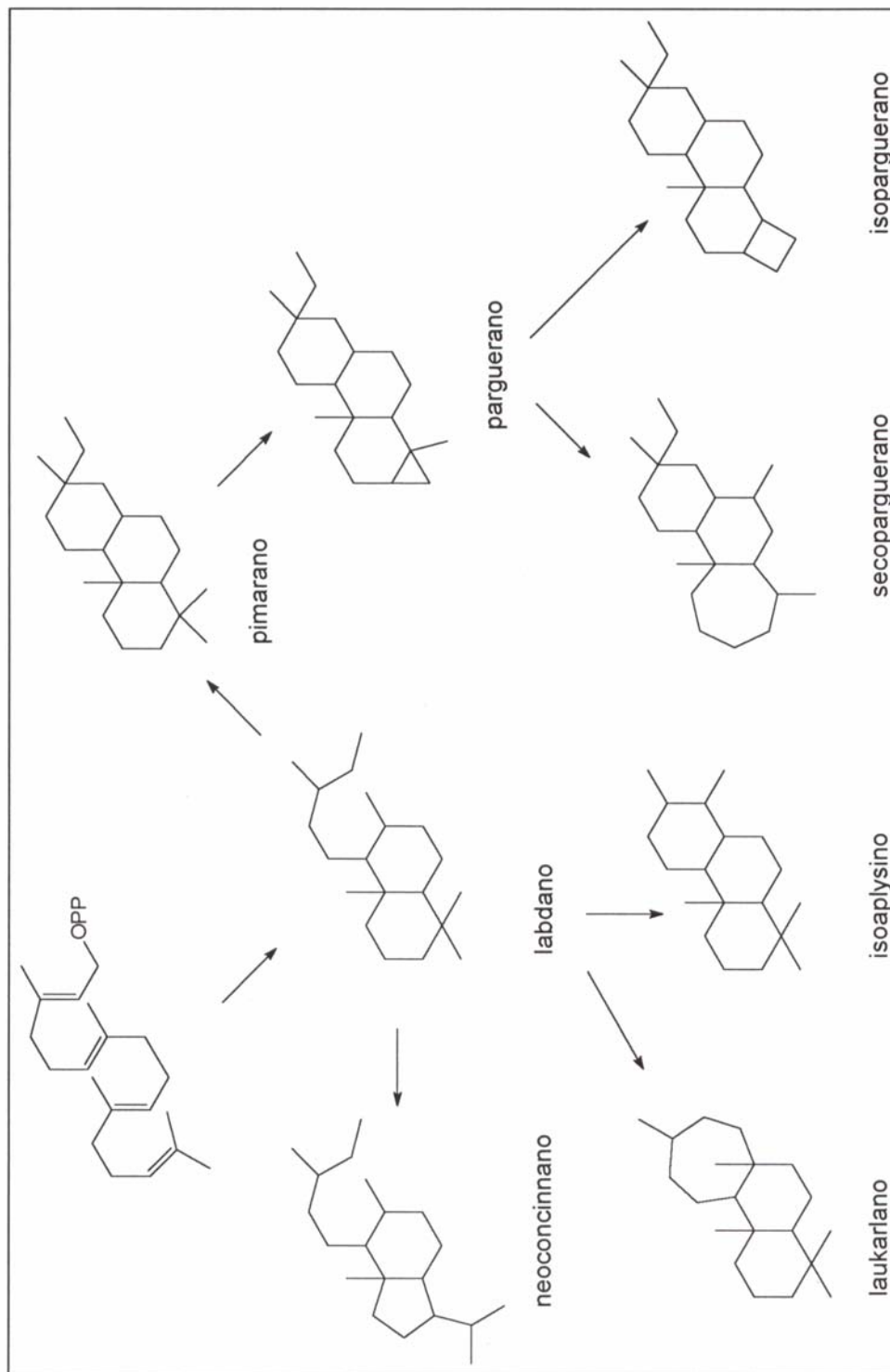
I.1. INTRODUCCIÓN

Las algas rojas del género de *Laurencia* son prolíficas productoras de interesantes metabolitos secundarios. Este interés se encuentra justificado tanto por el elevado número de los mismos como por la gran variedad de esqueletos encontrados. No cabe duda, que esta diversidad es consecuencia de la naturaleza polihalogenada de estas sustancias, una de sus características principales, lo que les permite sufrir fácilmente procesos intramoleculares que alteran sus estructuras. Asimismo, es de destacar las prometedoras actividades farmacológicas que muchas de estas sustancias poseen.

Los metabolitos secundarios de *Laurencia*, pueden dividirse en dos grandes grupos de acuerdo con su origen biogénico: terpenoides y no terpenoides. De entre los terpenos, los más abundantes son los sesquiterpenos, de los que se han aislado cientos diferentes, siendo el número de los diterpenos y de los triterpenos sensiblemente menor. El segundo gran grupo de metabolitos aislados de estas algas lo constituyen los no terpenoides. Estos productos son C₁₅ acetogeninas y derivan del metabolismo de los ácidos grasos.

Ahora bien, aunque el número de los diterpenos presentes en estas algas no es grande, difícilmente supera la cuarentena, sus estructuras presentan una amplia diversidad de esqueletos que ha llamado la atención debido a lo novedoso de los mismos y a que constituyen la práctica totalidad de diterpenos halogenados aislados de la naturaleza. Estos esqueletos carbonados los hemos clasificado en tres grandes grupos atendiendo a su origen biogénico, partiendo del polieno acíclico geranil-geraniol en su forma activa de éster de pirofosfato como precursor común a todos ellos. Las diferentes ciclaciones de este precursor nos conducen a los diferentes compuestos que se agrupan en la presente memoria según se resumen en los **esquemas 1-3**.

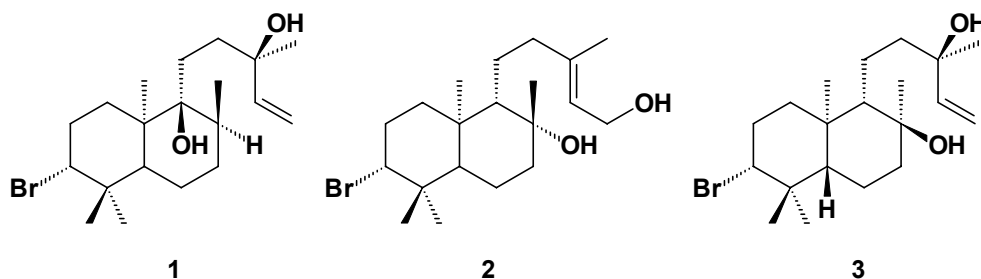
Antes de continuar, puntualizar que los esquemas biogénicos que se presentan para la construcción de los distintos tipos estructurales de diterpenos marinos aislados de algas del género *Laurencia* son en su mayor parte hipotéticos, y por lo tanto, otras vías alternativas tendrían igual validez, aunque también hay que decir, que las transformaciones aquí mostradas son mecanísticamente razonables y en muchas ocasiones constituyen probables aproximaciones a la realidad.



Esquema 1

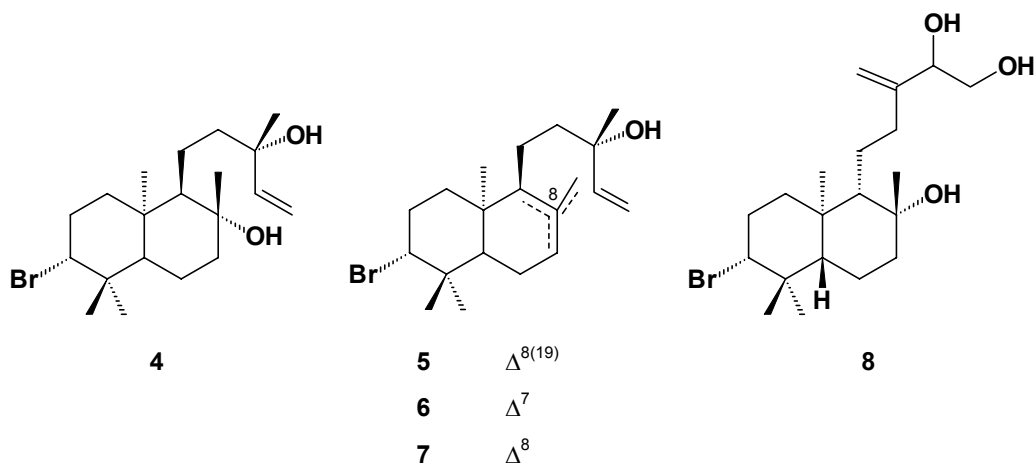
A. LABDANOS Y DERIVADOS

El primer diterpeno bromado con esqueleto de labdano aislado de algas rojas del género de *Laurencia*, fue el concinndiol **1**, metabolito mayoritario de *Laurencia concinna*.¹ Su estructura fue elucidada por análisis de difracción de RX observándose que estaba estrechamente relacionada con la de otro diterpeno, el aplisin-20 **2**, aislado varios años antes de *Aplysia kurodae*.² Esto sugirió la posibilidad de que el aplisin-20 fuese también un metabolito de *Laurencia*, como luego fue confirmado al ser obtenido en especies de las Islas Galápagos.³ El concinndiol se aisló también de *L. snyderae* junto a otro compuesto relacionado, el isoconcinndiol **3**.⁴

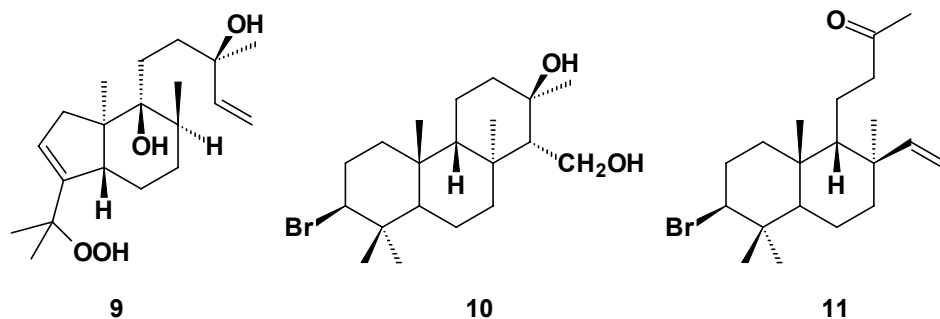


Otros metabolitos con este tipo de esqueleto fueron aislados de algas de este género. Así de *L. pinnata* se aislaron, el pinnatol A **4**, un derivado inusual tipo 9-epi-labdano, y los pinnatoles B-C **5-7** que son los tres posibles productos de deshidratación del pinnatol A en C-8.⁵ Finalmente, de *Laurencia venusta*,⁶ se aisló también un diterpeno de la clase labdano, el venustanol **8** que fue identificado por métodos espectroscópicos.

-
1. J.J. Sims, G.H.Y. Lin, R.M. Wing, W. Fenical, *Chem. Commun.*, **1973**, 470.
 2. H. Matsuda, Y. Tomie, S. Yamamura, Y. Hirata, *Chem. Commun.*, **1967**, 898.
 3. B.M. Howard, W. Fenical, *Tetrahedron Lett.*, **1978**, 2453.
 4. a) B.M. Howard, W. Fenical, *Phytochemistry*, **1980**, *19*, 2774; b) S. Fujiwara, K. Takeda, T. Uyehara, T. Kato, *Chem. Lett.*, **1986**, 1763.
 5. a) A. Fukuzawa, M. Miyamoto, Y. Kumagai, A. Abiko, Y. Takaya, T. Masamune, *Chem. Lett.*, **1985**, 1259; b) B.M. Howard, W. Fenical, *J. Org. Chem.*, **1978**, *43*, 4401; c) A. Fukuzawa, Y. Kumagai, T. Masamune, A. Furusaki, T. Matsumoto, C. Katayama, *Chem. Lett.*, **1982**, 1389; d) A. Fukuzawa, Y. Takaya, H. Matsue, T. Masamune, *Chem. Lett.*, **1985**, 1263.
 6. M. Suzuki, E. Kurosawa, K. Kurata, *Phytochemistry*, **1988**, *27*, 1209.



Dentro de los metabolitos con esqueletos relacionados con los labdanos se encuentra en primer lugar el neoconcinndiol hidroperóxido **9**,⁷ que aunque tiene un agrupamiento diferente y no posee bromo en la molécula se cree que deriva del diterpeno bromado concinndiol **1**. Este diterpeno fue aislado asimismo de *L. snyderae* y constituye uno de los pocos ejemplos de diterpenos de *Laurencia* que no presenta en su molécula átomos de halógenos.

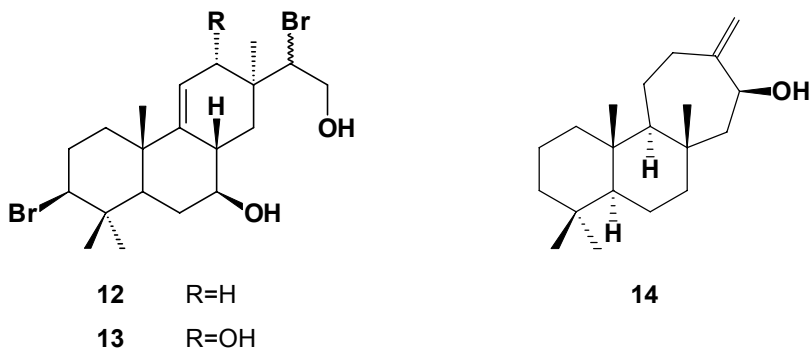


De *L. perforata* se aislaron, junto al isoaplisin-20 **10** (aislado previamente de *Aplysia kurodai*), tres metabolitos relacionados **11-13**, cuyas estructuras se determinaron combinando análisis espectroscópicos y conversiones químicas,⁸ mientras que recientemente, de *L. Karlae* fue aislado el laukarlaol **14**.⁹ Para todos ellos también se supone el origen biogenético en un reagrupamiento del esqueleto de labdano.

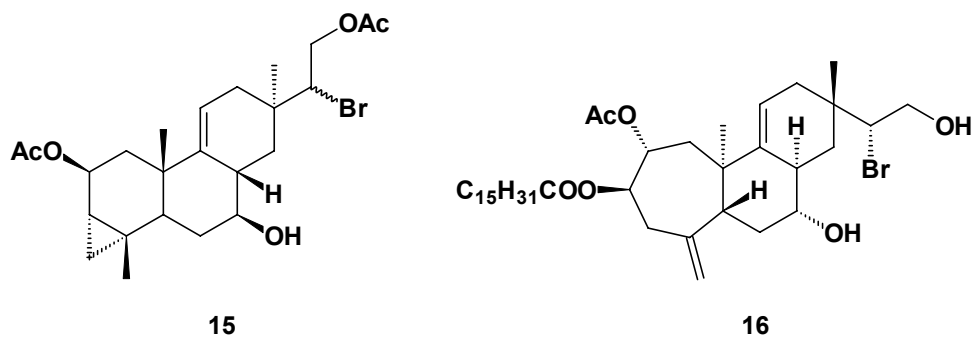
7. B.M. Howard, W. Fenical, J. Finer, K. Kirotso, J. Clardy, *J. Am. Chem. Soc.*, **1977**, 99, 6440.

8. A.G. González, J.F. Ciccio, A.P. Rivera, J.D. Martín, *J. Org. Chem.*, **1985**, 50, 1261.

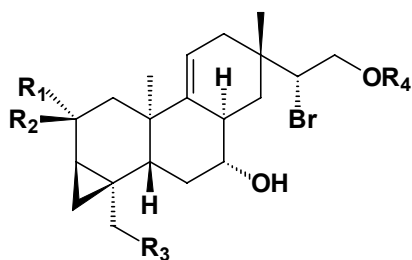
9. Y.-Y. Su, Y.-L. Zhong, L.-M. Zeng, H.-M. Wu, K. Ma, *Phytochemistry*, **1995**, 40(1), 195.



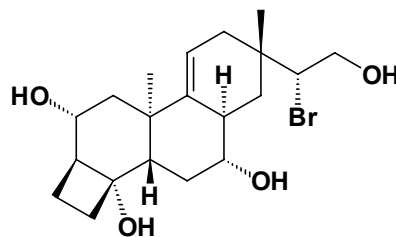
Sin duda, el grupo de diterpenos derivados de labdano más numeroso de los que se conocen actualmente, es el grupo de los pargueranos. Estos compuestos, como se observa en el **esquema 1**, son derivados de la ciclación de pimaranos. El primer ejemplo de esta clase fue aislado de *L. obtusa*, el 15-bromo-2,16-diacetoxi-7-hidroxi-9(11)-parguerene **15** y su estructura fue asignada por su interconversión con un metabolito que había sido aislado de *Aplysia dactylomela*.¹⁰ Posteriormente fueron aislados nuevos diterpenos de ejemplares de Hokkaido, Japón, que presentaron propiedades citotóxicas y esqueletos relacionados con el compuesto **15**. El 2-acetoxi-15-bromo-7,16-dihidroxi-3-palmitoil-neoparguera-4(19),9(11)-dieno **16**, con un esqueleto nuevo de seco-parguerano, y del que se ha propuesto que su biosíntesis envuelve un reagrupamiento ciclopropil carbonil homoalilo,¹¹ cuatro derivados de pargueranos **17-20** y un derivado de isoparguerano **21**.¹² Recientemente también ha sido aislado otro compuesto de este tipo, el parguereno **22** de *Laurencia filiformis*.¹³



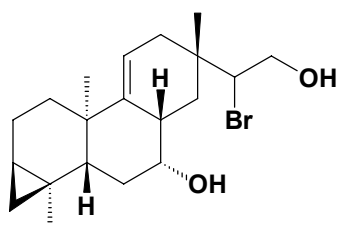
-
10. M.D. Higgs, D.J. Faulkner, *Phytochemistry*, **1982**, *21*, 789.
 11. S. Takeda, T. Matsumoto, K. Komiyama, E. Kurosawa, T. Suzuki, *Chem. Lett.*, **1990**, 277.
 12. a) T. Suzuki, S. Takeda, N. Hayama, I. Tanaka, K. Komiyama, *Chem. Lett.*, **1989**, 969; b) S. Takeda, E. Kurosawa, K. Komiyama, T. Suzuki, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1990**, *63*, 3066.
 13. S.J. Rochford, R.J. Capon, *Aust. J. Chem.*, **1996**, *18(1)*, 19.



- 17 $R_1=OH, R_2=R_3=R_4=H$
 18 $R_1=R_3=OAc, R_2=H, R_4=Ac$
 19 $R_1,R_2=O, R_3=OH, R_4=H$
 20 $R_1=R_2=R_3=R_4=H$



21

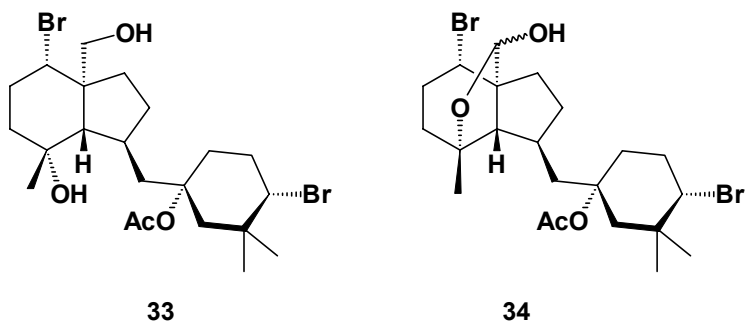
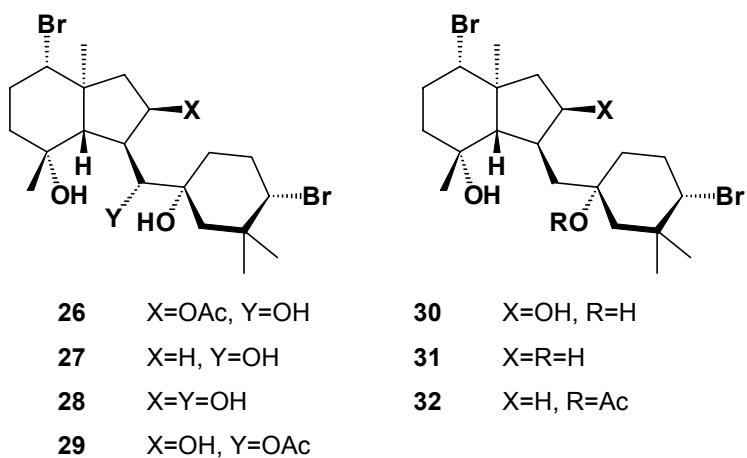
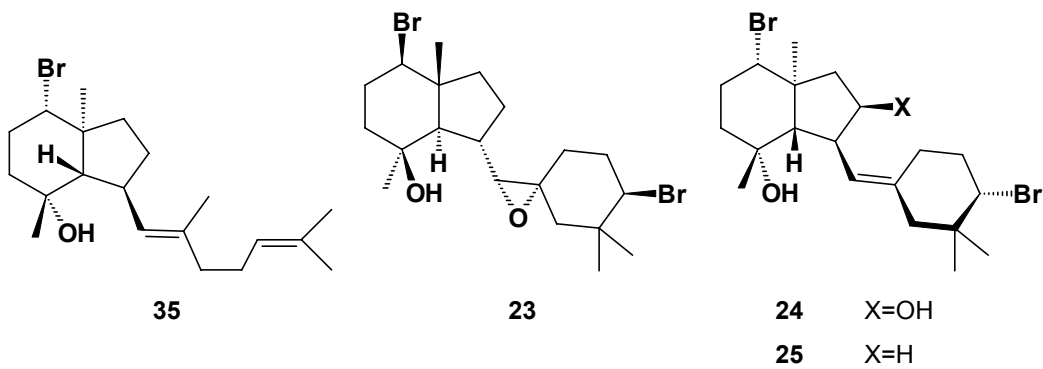


22

B. IREANOS Y PINNATERPENOS

El ireol A **23** y el iriedioli **24** fueron aislados de especies no identificadas de *Laurencia*.¹⁴ Ambas estructuras fueron elucidadas por análisis de rayos X y se observó que poseían el mismo sistema de anillos pero la configuración absoluta era opuesta. Junto con estos, fueron aislados de *L. irieii*, siete diterpenos bromados.^{5b} Las estructuras del irieol **25**, irieol D **26**, irieol E **27**, irieol F **28** e irieol G **29** fueron determinadas por interconversiones químicas, mientras que los del irieol B **30** e irieol C **31**, lo fueron en base a datos espectroscópicos. De *L. pinnata* se obtuvieron tres metabolitos que poseen el mismo esqueleto carbonado que los irieoles, el pinnaterpeno A **32** que es el 11-monoacetato de Irieol C, el pinnaterpeno B **33** y el pinnaterpeno C **34** que son el éter cíclico y el correspondiente hemiacetal resultante de la oxidación del grupo metilo en el puente.^{5c} Junto a estos en la misma alga se aisló el prepinnaterpeno **35**, que se ha propuesto como precursor biosintético del irieol y de los pinnaterpenos con los que aparece.

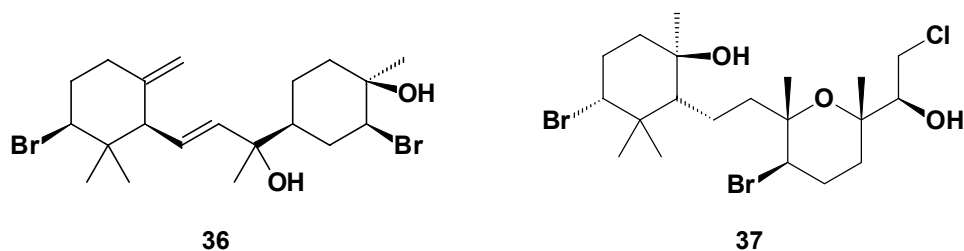
14. W. Fenical, B.M. Howard, K.B. Gifkins, J. Clardy, *Tetrahedron Lett.*, **1975**, 3983.



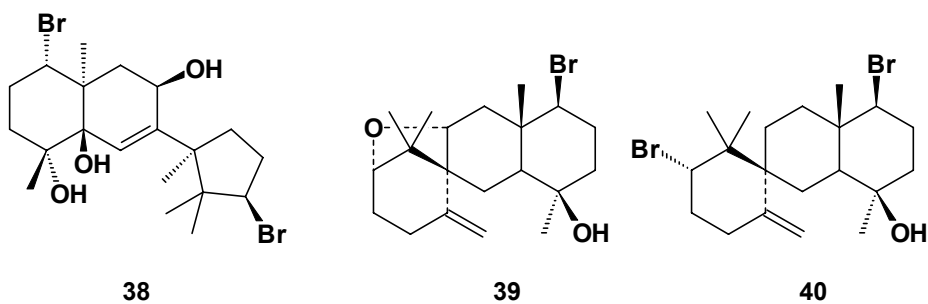
C. OBTUSANOS, CICLOFITANOS, NEOIREONES Y PUHUKUENOS

De *Laurencia obtusa* han sido aislados otros dos diterpenos halogenados, cada uno de los cuales pertenece a una clase estructural diferente: obtusano y 10,15-ciclofitano. La estructura del obtusadiol **36** fue deducida en base a datos espectroscópicos y degradaciones

químicas.³ La estructura del laurencianol **37**, un diterpeno que posee como sustituyentes halogenados cloro y bromo, fue determinado por análisis de rayos X.¹⁵



Uno de los metabolitos de *L. iriei*, neoireone **38**, ha sido determinado en base a su estudio de difracción de rayos X, perteneciendo también a una única clase estructural.

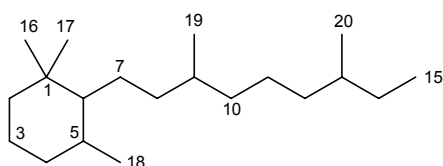


Por último, fueron aislados dos inusuales diterpenos bromados de especímenes Hawaianos de *L. majuscula*,¹⁶ los puhukuenos A y B **39-40**, que fueron identificados por métodos espectroscópicos.

15. S. Caccamese, R.M. Toscano, S. Cerrini, E. Gavuzzo, *Tetrahedron Lett.*, **1982**, 23, 3415.

16. M.R. Brennan, I.K. Kim, R.L. Erickson, *J. Nat. Prod.*, **1993**, 56, 76.

En esta memoria, damos cuenta del aislamiento y elucidación estructural de dos nuevos diterpenos con un esqueleto carbonado de la clase 10,15-ciclofitano, los viridiales A **41** y B **42**, aislados de *Laurencia viridis*,¹⁷ una nueva especie descrita para especímenes recogidos en las costas de las Islas Canarias.¹⁸ Estos diterpenos excepcionalmente no contienen los esperados sustituyentes halogenados característicos de los metabolitos de esta especie. Los ejemplos publicados con este tipo de agrupamiento son muy escasos, existiendo un único ejemplo de este tipo de diterpenos aislado de *Laurencia* (*L. obtusa*), el laurencianol **37**, que es un metabolito polihalogenado como vimos anteriormente.



10,15-ciclofitano

Los viridiales A y B **41-42**, fueron aislados de las fracciones correspondientes a una polaridad n-Hexano:AcOEt 3:2 de la cromatografía general del extracto del alga *L. viridis*, recolectada en Callao Salvaje (Adeje), entre los meses de Abril a Mayo.

Su aislamiento se llevó a cabo mediante cromatografía de filtración en gel con Sephadex LH-20 utilizando como eluyente la mezcla n-Hexano:CHCl₃:MeOH (2:1:1), seguido de cromatografía de media presión en n-Hexano:AcOEt (7:3) y de una columna pre-empaquetada de fase reversa Lobar[®] LiChroprep RP-8 en MeOH:H₂O (9:1). Para la purificación final fue necesario realizar un HPLC utilizando una columna semipreparativa de fase reversa μ -Bondapak RP-18 con CH₃CN:H₂O (9:1). Las fracciones seleccionadas fueron sometidas a una nueva cromatografía en HPLC con una columna semipreparativa μ -Porasil utilizando n-Hexano:AcOEt (3:2) como eluyente.

17. M. Norte, M.L. Souto, J.J. Fernández, *Natural Product Lett.*, **1996**, *8*, 263-269.

18. M.C. Gil-Rodríguez, R. Haaroun, *Botanica Marina*, **1992**, *35*, 227-237.

1.2. ESTUDIO DEL VIRIDIOL A 41 Y DEL VIRIDIOL B 42

El viridiol A **41** fue aislado como un aceite incoloro, $[\alpha]_D^{25} = +0.2^\circ$ (c 0.64, CHCl_3) y su fórmula molecular fue establecida como $\text{C}_{20}\text{H}_{38}\text{O}_2$ en base a su espectro de masas de alta resolución (HRMS, obs. 312.3071; calc. 312.3028 [M+2]), que establece dos grados de insaturación en la molécula. En su espectro de IR se pudieron observar absorciones características de grupos hidroxilos (3691 y 3608 cm^{-1}), así como la ausencia de absorciones correspondientes a grupos carbonilos.

El espectro de RMN ^{13}C de acuerdo con el experimento DEPT, estableció la presencia en el esqueleto carbonado de: cuatro metilos (δ 19.68, 19.74, 22.61, 22.71), diez metilenos (δ 24.46, 24.78, 25.50, 32.99, 36.81, 37.28, 37.45, 39.37, 65.63, 110.54), cuatro metinos (δ 27.97, 32.70, 32.79, 74.98) y dos carbonos cuaternarios (δ 36.83, 148.71) (**Tabla 1**).

El espectro de RMN ^1H mostró la existencia de un sistema ABX para protones geminales a grupos funcionales hidroxilos: un metileno centrado a δ 3.71 (dd, $J = 3.3$ y 11.2 Hz)/3.54 (dd, $J = 7.2$ y 11.2 Hz) y un metino a δ 4.20 (dd, $J = 3.3$ y 7.2 Hz), señales de protón que fueron correlacionadas a través del experimento de HMQC (**Figura 1a**) con las señales de RMN ^{13}C a δ 65.63 y 74.98, respectivamente. Los desplazamientos químicos observados en el espectro de RMN para el metino en α a uno de los grupos hidroxilos (δ 74.98), sugieren que su naturaleza es alílica, lo que fue confirmado por correlaciones a larga distancia con las señales de protón centradas a δ 5.12 y 4.97, atribuibles a un metileno olefínico. Por otra parte, en el experimento HMBC (**Figura 1b y 2**) fueron observadas conectividades entre el carbono cuaternario olefínico centrado a δ 148.71 y las señales de los protones vinílicos a δ 5.12/4.97, así como con el metileno alílico situado a δ 2.04/1.97, los cuales junto con el α -hidroximetino a δ 4.20, fueron a su vez correlacionados con el metileno a δ 110.54. Además, los experimentos de COSY-DQF mostraron que el grupo metilénico alílico pertenece a una cadena que posee tres grupos metilénicos, al observarse acoplamiento de éste con la señal del metileno centrado a δ 1.46, el cual posee correlación con los protones metilénicos a δ 1.10/1.04, lo que establece la presencia de un fragmento $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{CH}_2)-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{OH}$ al final de la molécula (**Figura 2**).

Tabla 1. RMN ¹H (400 MHz) y ¹³C (100 MHz) para el viridiol A **41** y el viridiol B **42**.

n ^o C	Viridiol A				Viridiol B			
	δ ¹³ C	δ ¹ H	J (Hz)	Multiplicidad	δ ¹³ C	δ ¹ H	J (Hz)	Multiplicidad
1	36.83				37.38			
2	39.37	1.13			39.37	1.13		
3	24.78	1.28			24.79	1.29		
4	37.28	1.27			37.42	1.27		
5	27.97	1.53			27.97	1.52		
6	32.79	1.36			32.79	1.42		
7	24.46	1.21			24.47	1.20		
8	37.45	1.31			37.54	1.31		
9	32.70	1.42			32.76	1.35		
10	36.81	1.10			37.28	1.08		
		1.04				1.03		
11	25.50	1.46			21.44	1.30		
12	32.99	2.04			43.12	1.51		
		1.97				1.48		
13	148.71				74.03			
14	74.98	4.20	3.3; 7.2	dd	41.58	1.79	4.6; 7.5; 14.6	ddd
15	65.63	3.71	3.3; 11.2	dd	59.97	1.67	4.3; 6.4; 14.6	ddd
		3.54	7.2; 11.2	dd		3.90	4.3; 7.5; 11.5	ddd
16	22.71	0.87		s	22.71	3.86	4.6; 6.4; 11.5	ddd
17	22.61	0.86		s		0.87		s
18	19.74	0.86	6.4	d	22.62	0.86		s
19	19.68	0.84	6.4	d	19.74	0.86	6.1	d
		5.12		bs	19.68	0.84	6.3	d
20	110.54	4.97		bs	26.83	1.24		s

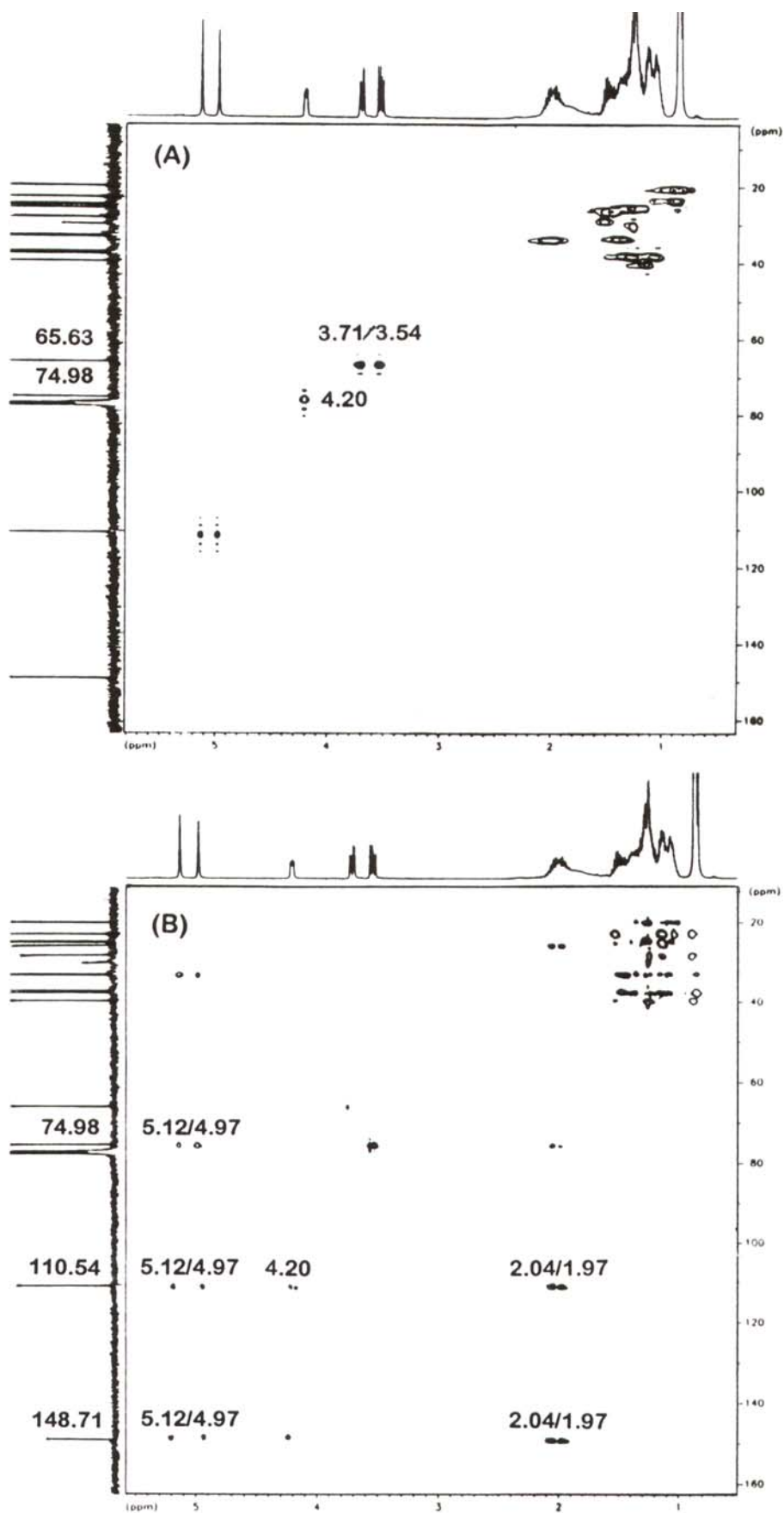


Figura 1. Espectros 2D-RMN HMQC (A) y 2D-RMN HMBC (B) del viridiol A 41.

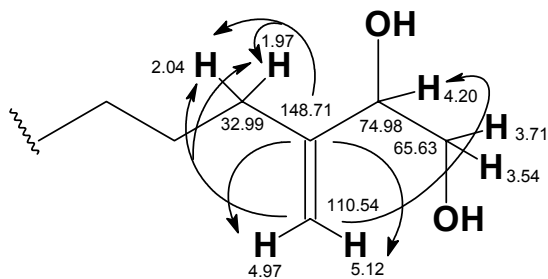


Figura 2

El espectro de RMN ^1H de **41** confirmó la presencia de los cuatro grupos metilos, dos de ellos secundarios centrados a δ 0.84 y 0.86, y dos metilos geminales a δ 0.86/0.87, los cuales fueron correlacionados en el experimento de HMQC con las señales de carbono situadas a δ 19.68, 19.74, 22.61 y 22.71, respectivamente. Estos datos indicaron la naturaleza diterpénica de **41**, y la ausencia de otros protones o carbonos olefinicos establecieron que el segundo grado de insaturación que requiere la fórmula molecular debe ser debido a la presencia de un anillo en la estructura.

Un hecho importante a destacar es que como consecuencia de la ausencia de grupos funcionales en el resto de la molécula, las señales de RMN ^1H están extremadamente solapadas y para llevar a cabo la asignación de los desplazamientos químicos se tuvo que acudir a combinaciones de experimentos de 2D-RMN, siendo especialmente valiosa la información suministrada por las asignaciones a través del experimento de HMQC y las correlaciones a larga distancia observadas en el experimento de HMBC (**Figura 3**), que nos permitieron establecer de manera inequívoca el resto del esqueleto carbonado del viridiol A **41**. De esta forma, el grupo metílico secundario a δ 19.68 (Me-19) mostró correlaciones a larga distancia con los grupos metilénicos a δ 1.31 (H₂-8) y 1.10/1.04 (H₂-10), este último, extremo del fragmento establecido con anterioridad. Por otro lado, el metilo secundario a δ 19.74 (Me-18) fue correlacionado con un metino centrado a δ 1.36 (H-6) y con un metileno a δ 1.27 (H₂-4), señales de protón que fueron asignadas por el experimento HMQC con las señales de carbonos a δ 32.79 y 37.28, respectivamente. A su vez, el carbono de este metileno C-4 presentó correlación además de con el metino H-6, con un metileno centrado a δ 1.13 (H₂-2) que es el metileno en α al carbono portador del gem-dimetilo como se deduce de la correlación a larga distancia de su carbono C-2 (δ 39.37) con los protones de dichos metilos a δ 22.71/22.61 (Me-16/Me-17), lo que nos

indicó que el anillo era de ciclohexano. Finalmente, se observó que la unión del anillo al resto de la cadena alifática tiene lugar entre el carbono del metino C-6 y el carbono del metileno C-8, a través del metileno C-7, como nos lo confirman las correlaciones ^{13}C - ^1H a dos enlaces de estos carbonos con los protones metilénicos que están situados a δ 1.21/1.16 (H₂-7).

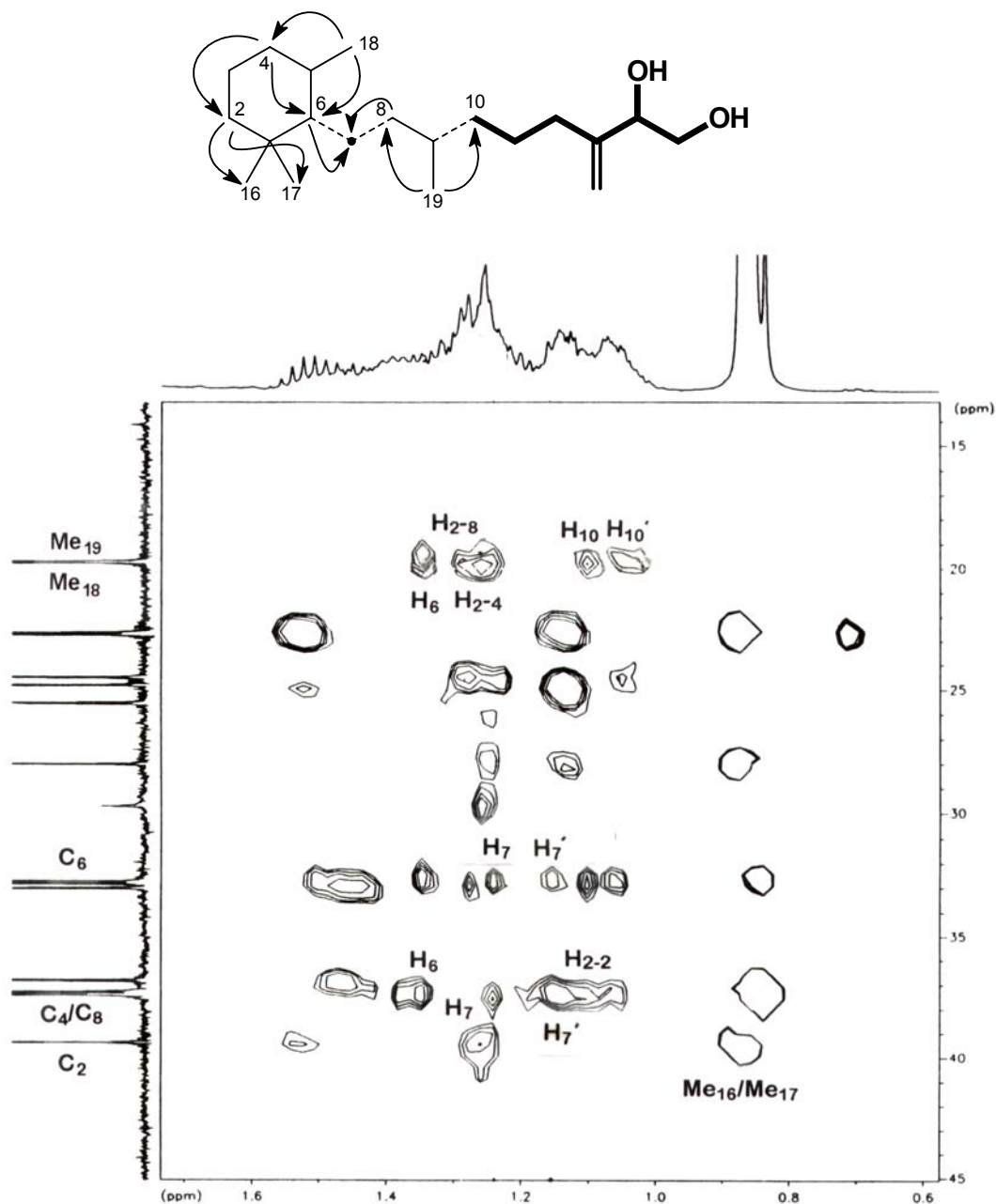
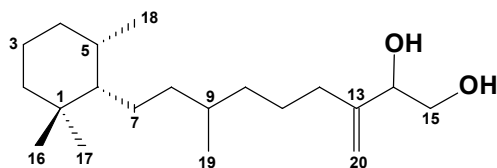


Figura 3

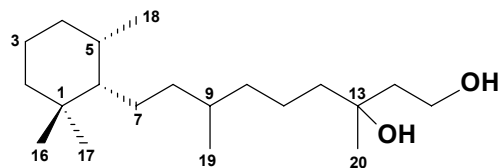
Estos datos fueron el soporte del esqueleto carbonado propuesto para el compuesto **41**, y que se ve reforzado por las otras correlaciones observadas y que se resumen en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Correlaciones tipo HMBC para el viridiol A **41** y el viridiol B **42**.

Carbano N°	Viridiol A δ C		Viridiol B δ C	
1	36.83	Me 16; Me 17	37.38	Me 16; Me 17
2	39.37	H 3s; Me 16; Me 17	39.37	Me 16; Me 17
3	34.78	H 2s; H 5	24.79	H 2s; H 5
4	37.28	H 2s; H 6	37.42	H 2s
5	27.97	H 4s; Me 18	27.97	Me 18
6	32.79	H 7; H 7'	32.79	
7	24.46	H 8s	24.47	H 8s
8	37.45	H 7; H 7'; H 9; H 10; H 10'; Me 19	37.54	H 6; H 7s; H 9; Me 19
9	32.70	H 10; H 10'; Me 19	32.76	H 8s; H 10; H 10'; Me 19
10	36.81	H 11s; H 12; H 12'	37.28	H 9
11	25.50	H 12; H 12'	21.44	H 12; H 12'
12	32.99	H 11s; H 20; H 20'	43.12	H 14; H 14'; Me 20
13	148.71	H 20; H 20'; H 12; H 12'	74.03	H 11s; H 12; H 12'; H 14; H 14'; H 15; H 15'; Me 20
14	74.98	H 12; H 12'; H 15; H 20; H 20'	41.58	H 12; H 12'; H 15; H 15'; Me 20
15	65.63		59.97	H 14; H 14'
16	22.71*	H 2s; Me 17	22.71*	H 2s; Me 17
17	22.61*	H 2s; Me 16	22.62*	H 2s; Me 16
18	19.74	H 6; H 4s	19.74	
19	19.68	H 8s; H 10; H 10'	19.68	H 8s; H 10; H 10'
20	110.54	H 12; H 12'; H 14	26.83	H 12; H 12'; H 14; H 14'



41



42

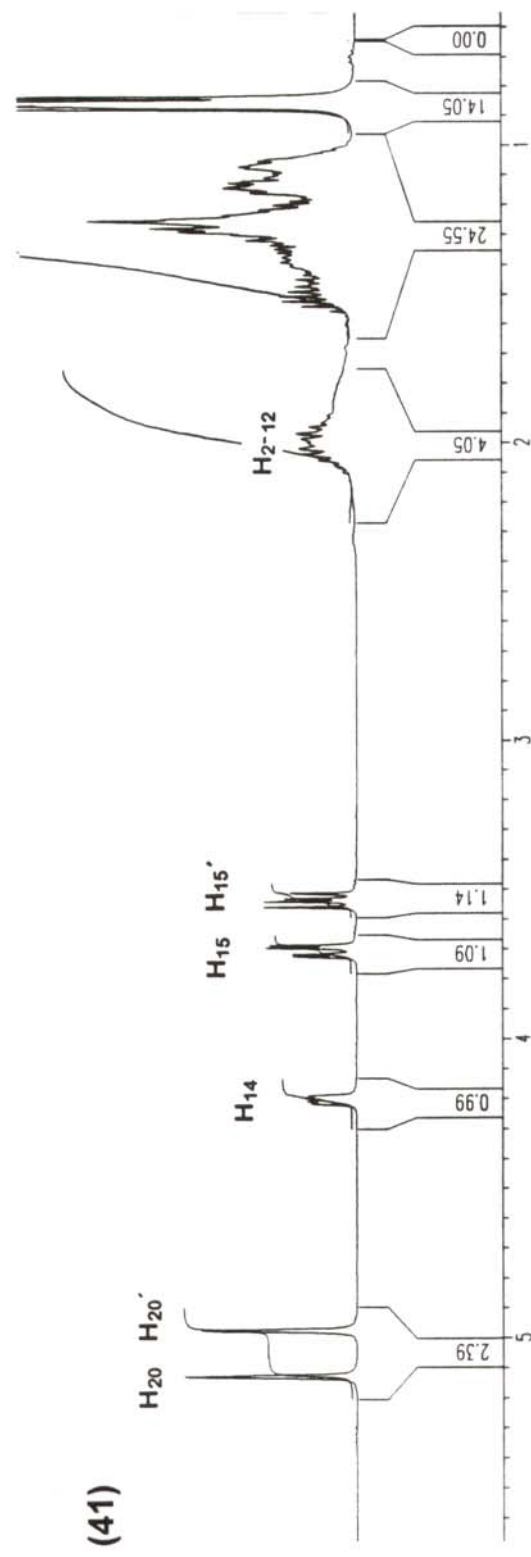
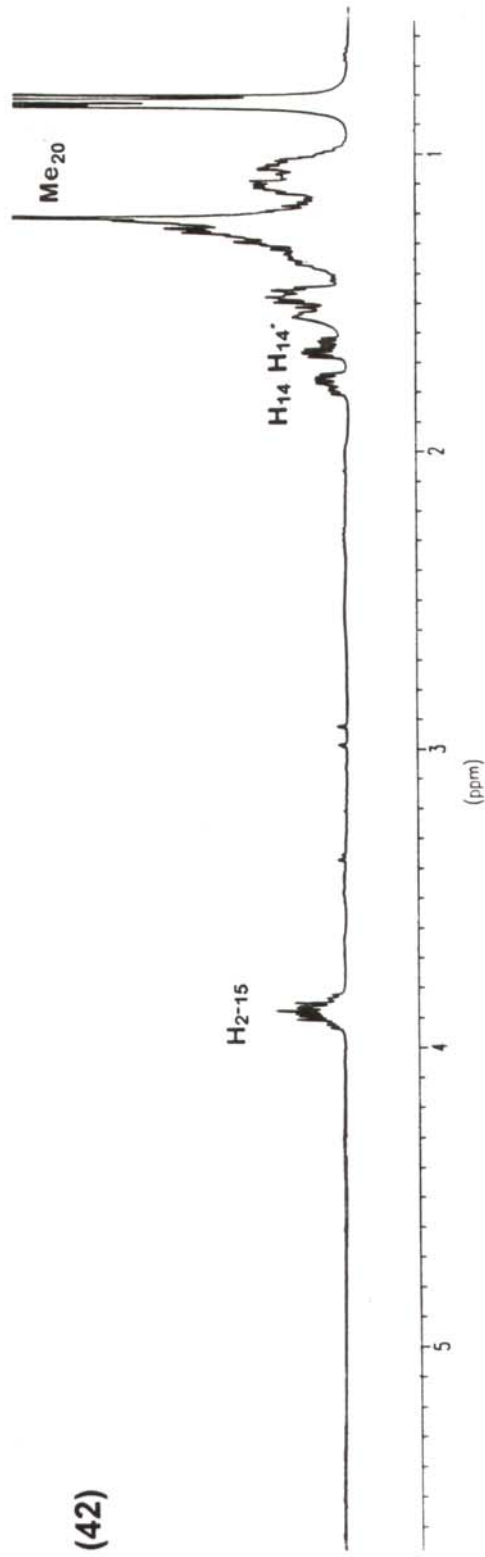


Figura 4. Comparación de los espectros de RMN ¹H del viridanol A 41 y del viridanol B 42.

El segundo diterpeno, el viridiol B **42**, mostró en sus espectros de RMN ^1H y ^{13}C , una relación estructural clara con el viridiol A **41** (Tabla 1). De este modo, se observó que las señales a campo alto en el espectro de RMN ^1H de **41** y **42** (Figura 4) eran idénticas y que su espectro de RMN ^{13}C era muy similar exceptuando las señales C-12, -13, -14, -15 y -20.

Así, en el espectro de RMN ^1H fue observada la ausencia de las señales de los protones olefinicos (H₂-20), así como la debida al metileno alílico (H₂-12) y al metino en α al grupo hidroxilo (H-14). Estas señales fueron sustituidas por un singlete correspondiente a un grupo metilo en α a un grupo hidroxilo centrado a δ 1.24, indicando que este grupo metilo era terciario, y por un grupo metilénico alifático a δ 1.79 y 1.67. Estas señales de protón fueron correlacionadas en el experimento de HMQC con las señales de carbono centradas a δ 26.83 y 41.58, respectivamente. Además, una señal de carbono cuaternario situada a δ 74.03 mostró correlaciones en el experimento de HMBC (Figuras 5 y 6) con los grupos metilénicos centrados a δ 1.30 (H₂-11); 1.51 y 1.48 (H₂-12); 1.79 y 1.67 (H₂-14). También fueron observadas correlaciones entre la señal de carbono situada a δ 41.58 (C-14) y el grupo metilénico en α al grupo hidroxílico centrado a δ 3.90 y 3.86, lo que establece la presencia del fragmento $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)\text{OH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{OH}$.

Por otro lado, su espectro de masas mostró un ion molecular $[\text{M}+2]$ centrado a 314, junto con el pico $[\text{M}+2-\text{CH}_3]$ presente en su espectro de masas de alta definición (HRMS) a m/z 299.2966, lo que nos establece su fórmula molecular como $\text{C}_{20}\text{H}_{40}\text{O}_2$. Además se pudo observar en el espectro de IR, las absorciones a ν_{max} 3693 y 3604 cm^{-1} correspondientes a los grupos hidroxilos. En vista de los datos mencionados fue establecida la estructura del viridiol B como **42**.

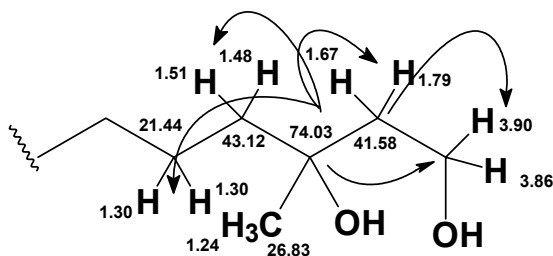


Figura 5

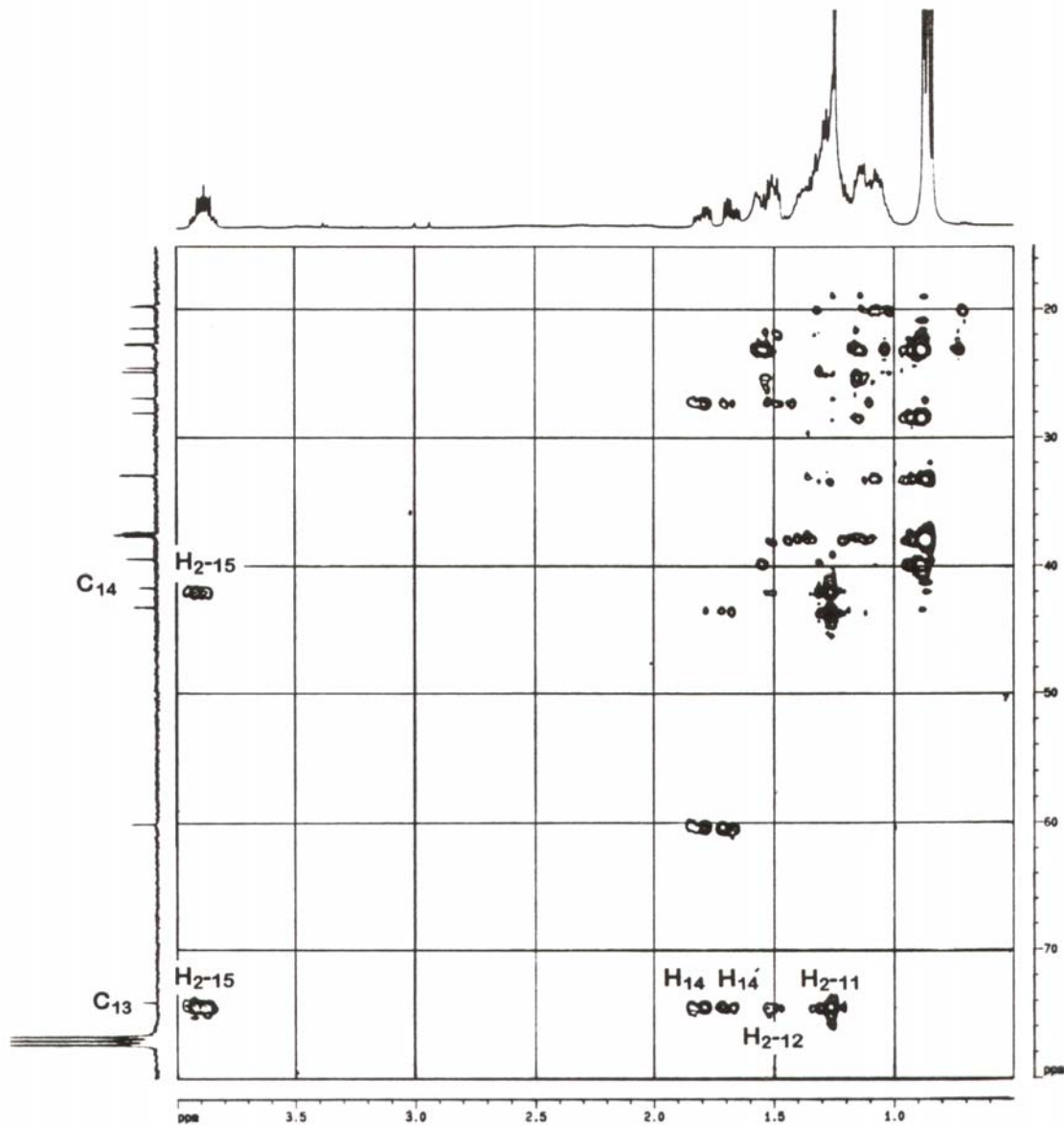


Figura 6

Intentar establecer la estereoquímica relativa de estos compuestos fue muy difícil debido al fuerte solapamiento ya comentado de las señales de protón en el espectro de RMN ^1H . Sin embargo, en base al hecho experimental de que el desacoplamiento del grupo metilo Me-18 a δ 0.86 produce la simplificación de la señal de protón de H-5 en ambos compuestos, mostrándose ésta como un doblete de doblete con tres valores

pequeños de constantes de acoplamiento, se pudo concluir que la configuración de los protones vecinales H-6 y H-5 para el viridiol A **41** y para el viridiol B **42** es de tipo axial-ecuatorial como se muestra en la **Figura 7**.

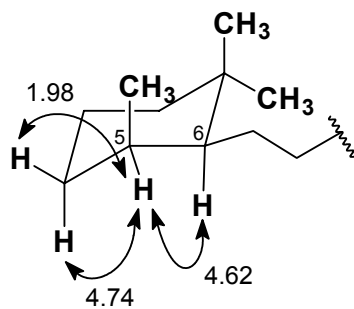
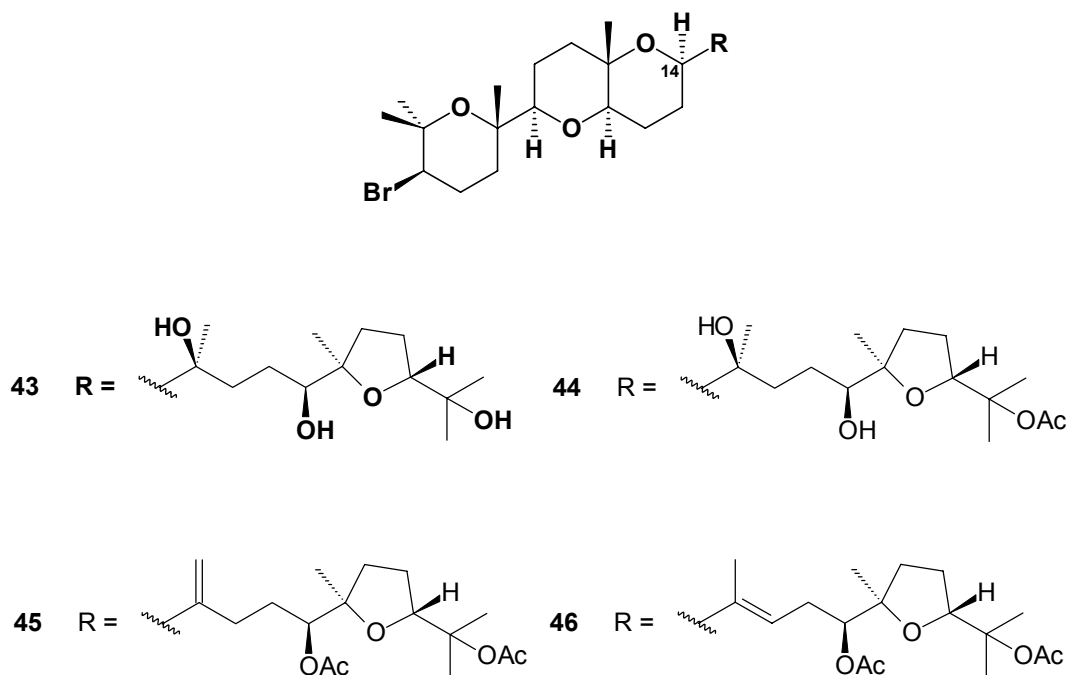


Figura 7

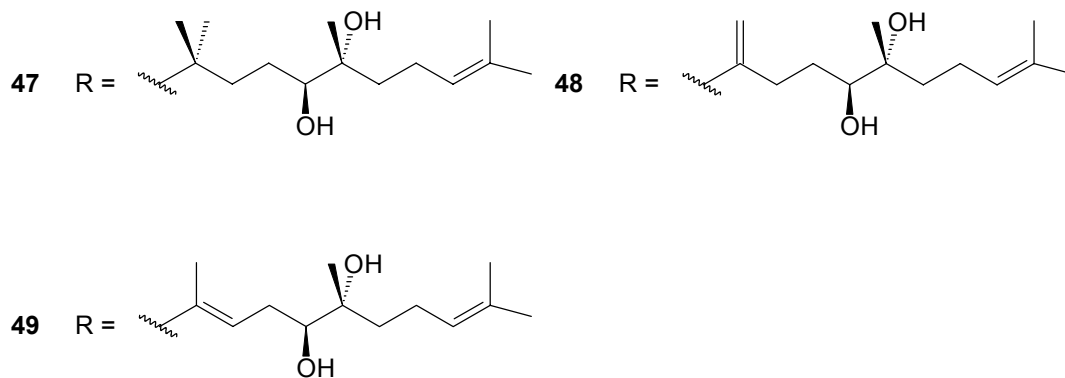
II. POLIETERES DERIVADOS DEL ESCUALENO

II.1. INTRODUCCIÓN

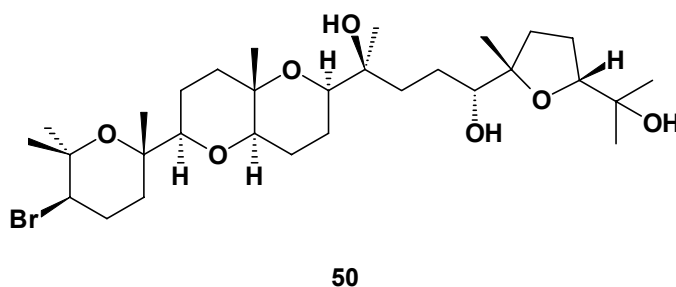
Las algas rojas del género de *Laurencia* son también conocidas por la producción de poliéteres triterpénicos generados por la bromación de epoxiescualenos. Desde el descubrimiento en 1978 del primer representante de este tipo de compuestos, el tirsiferol **43** aislado por Munro y colaboradores de *Laurencia thyrsefera*,¹⁹ estos metabolitos han sido objeto de un alto grado de interés, tanto desde el punto de vista estructural como por aspectos farmacológicos. En efecto, estos compuestos poseen agrupamientos de anillo de oxano y oxolano fusionados y aislados similares a los que presentan algunas de las toxinas DSP y numerosos poliéteres ionóforos terrestres. Además, una serie de derivados del tirsiferol aislados de *Laurencia obtusa*, el 23-acetato de tirsiferol **44**,²⁰ los diacetatos Δ ^{15,16} y Δ ^{15,28} de dehidrotirsiferol **45-46** y los magireoles **47-49**,²¹ han presentado una fuerte actividad citotóxica frente a líneas de células de neoplasma linfocítico de ratón P388. Particularmente, el compuesto **44** mostró valores de IC₅₀ de 0.3×10^{-3} $\mu\text{g/ml}$.



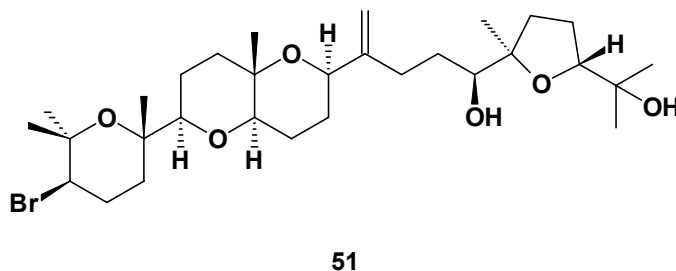
-
19. J.W. Blunt, M.P. Hartshorn, T.J. McLennan, M.H.G. Munro, W.T. Robinson, S.C. Yorke, *Tetrahedron Lett.*, **1978**, 69.
20. T. Suzuki, M. Suzuki, A. Furusaki, T. Matsumoto, A. Kato, Y. Imanaka, E. Kurosawa, *Tetrahedron Lett.*, **1985**, 26, 1329.
21. T. Suzuki, S. Takeda, M. Suzuki, E. Kurosawa, A. Kato, Y. Imanaka, *Chem. Lett.*, **1987**, 361.



De igual forma, el venustatriol **50**, un diastereoisómero del tirsiferol en C-18 y C-19, aislado de *Laurencia venusta* por Higa y colaboradores en 1986²² **50** presentó una notable actividad antiviral frente al virus de la estomatitis vesicular (VSV) y el virus del tipo Herpes simplex (HSV-1).



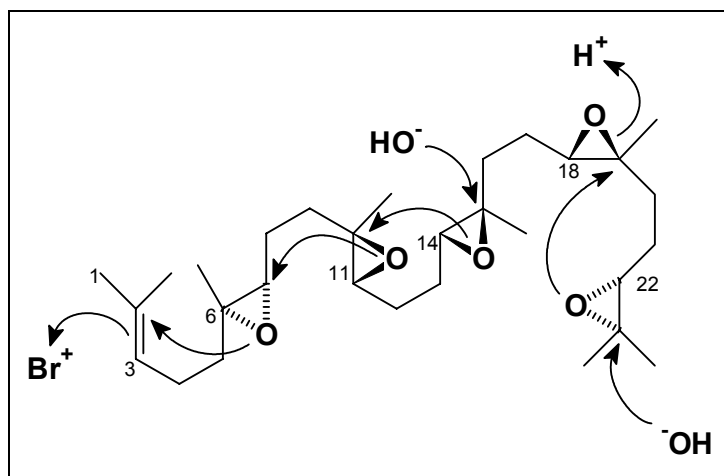
En conexión con nuestros continuos estudios sobre algas rojas del género *Laurencia*, nuestro grupo de trabajo ha aislado e identificado en el año 1983, uno de estos compuestos, el dehidrotirsiferol **51**, de la *Laurencia pinnatifida*.²³



22. S. Sakemi, T. Higa, C.W. Jefford, G. Bernardinelli, *Tetrahedron Lett.*, **1986**, 27, 4287.

23. A.G. González, J.M. Arteaga, J.J. Fernández, J.D. Martín, M. Norte, J.Z. Ruano, *Tetrahedron*, **1984**, 40, 2751.

Todos estos ejemplos de poliéteres aislados poseen un esqueleto común derivado del escualeno perteneciente, o bien a la serie del tirsiferol **43** o a la del venustatriol **50**, estableciéndose las diferencias a nivel de la configuración opuesta de los átomos C-18 y C-19. Esto ha llevado a algunos autores a proponer que la biogénesis de estos compuestos ocurre por la ciclación en dos pasos de un tetraepoxiesqualeno. Primero, a través de una ciclación concertada de los tres epóxidos C-6/C-7, C-10/C-11 y C-14/C-15 por un ion bromonio sobre el doble enlace terminal en C-2/C-3, y segundo, por la formación del anillo furánico entre los carbonos C-19/C-22 (**Esquema 4**).²⁴ Este último proceso establecería las diferencias entre las dos series y su ausencia la formación de los magireoles **47-49**. Sin embargo hasta el momento, este escualeno tetraepoxidado que actuaría como precursor común de estos metabolitos, no ha sido todavía aislado.



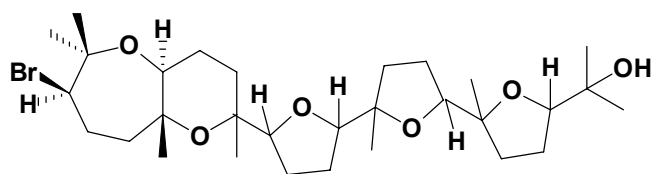
Esquema 4

Por otro lado, recientemente han sido obtenidos también de algas del género de *Laurencia*, dos nuevos triterpenos derivados del escualeno pertenecientes a una nueva clase de bromotriterpenos pentacíclicos, el enshuol **54** y el callicladol **55**. Estos metabolitos fueron aislados de *L. omaezakiana*²⁵ y *L. calliclada*,²⁶ respectivamente.

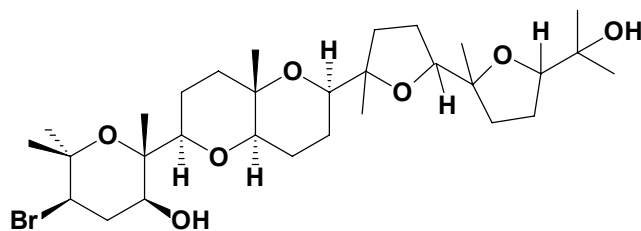
24. M. Hashimoto, T. Kan, K. Nozaki, M. Yanagiya, H. Shirahama, T. Matsumoto, *J. Org. Chem.*, **1990**, 55, 5088-5107.

25. Y. Matsuo, M. Suzuki, M. Masuda, *Chem. Lett.*, **1995**, 1043-1044.

26. M. Suzuki, Y. Matsuo, Y. Takahashi, M. Masuda, *Chem. Lett.*, **1995**, 1045-1046.

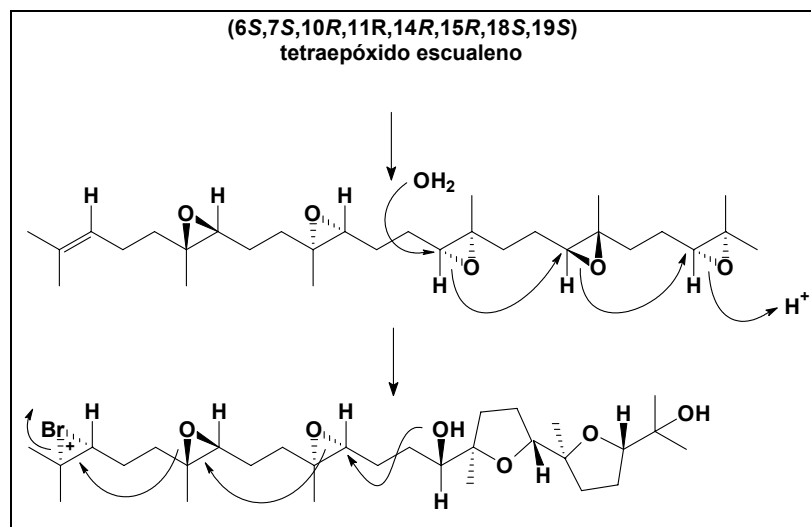


54



55

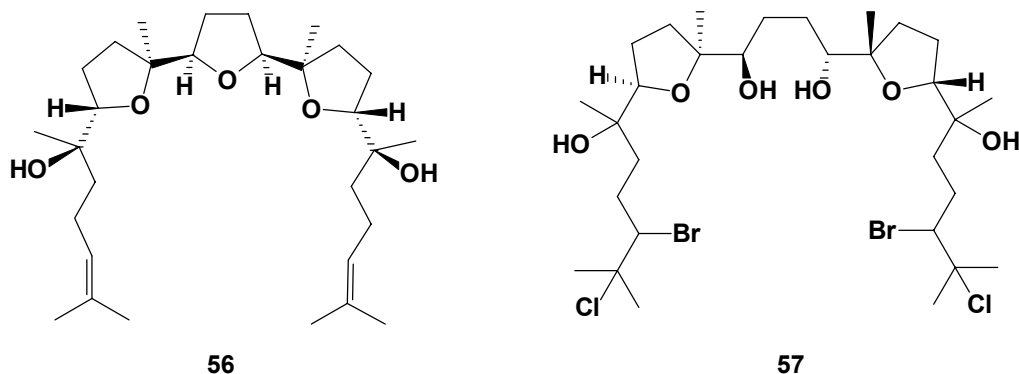
Dada las similitudes estructurales con los compuestos anteriores, se propuso una hipótesis biogénica derivada del mismo precursor tetraepoxiesqualénico. Esta supondría la formación de un pentaepóxido derivado del anterior y luego una ciclación secuenciada equivalente a partir del ataque de un ion bromonio, **esquema 5**.



Esquema 5

Finalmente, han sido aislados otros dos ejemplos de triterpenos de *Laurencia* con esqueletos derivados del escualeno pero cuyas estructuras se caracterizan por poseer un plano o un eje de simetría en la molécula. Estos son el compuesto meso teurileno **56**

aislado de *L. obtusa*²⁰ y el intricatetrol **57** de *L. intricata*.²⁷



II.2. NUEVOS POLIETERES TRITERPENICOS AISLADOS DE *L. VIRIDIS*

Del estudio cromatográfico de las fracciones de n-Hexano:AcOEt 3:2 del extracto del alga *Laurencia viridis*, fueron aislados, junto con el dehidrotirsiferol **51**, una serie de derivados del escualeno obtenidos en muy pequeñas cantidades.

A continuación damos cuenta del aislamiento e identificación a través de métodos espectroscópicos de nueve ejemplos de poliéteres triterpénicos nuevos, derivados del escualeno. Para simplificar su estudio los hemos agrupado en derivados del tirsiferol **43**: isodehidrotirsiferol **56**,²⁸ 16-hidroxidehidrotirsiferol **57**, tirsenol A **58**, tirsenol B **59**,²⁹ 10-epidehidrotirsiferol **60** y 10-epi-15,16-dehidrotirsiferol **61**; y en derivados del venustatriol **50**: dehidrovenustatriol **62**, 15,16-dehidrovenustatriol **63** y acetato de predehidrovenustatriol **64**. Estos nuevos metabolitos fueron sometidos a un amplio estudio farmacológico *in vitro*, presentando importantes actividades citotóxicas, recogidas en el siguiente capítulo de la presente memoria.

A. AISLAMIENTO

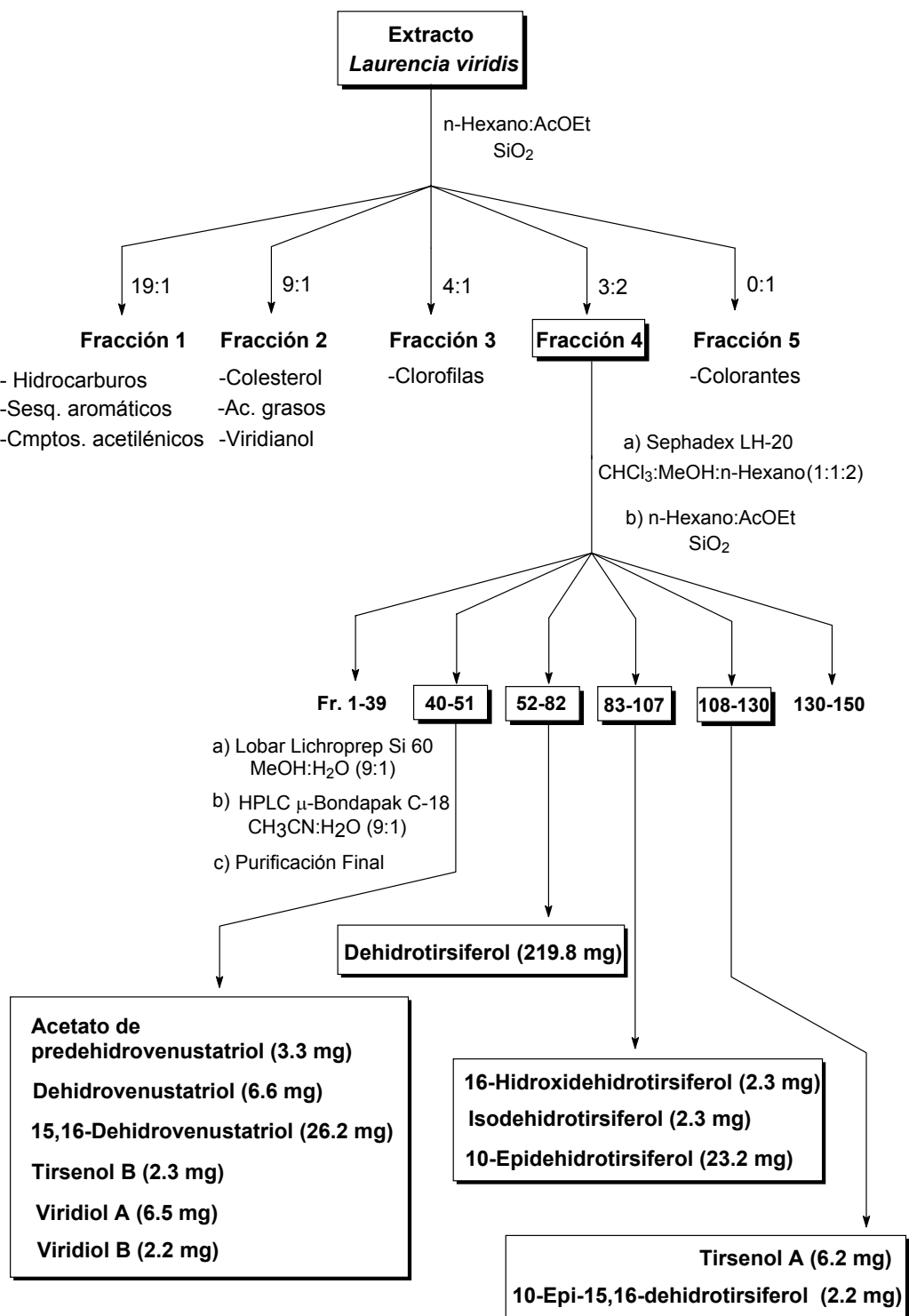
El alga *Laurencia viridis*, fue recolectada en Callao Salvaje (Adeje), entre los meses de Abril a Mayo. Se recogió a mano durante la bajamar y se dejó secar al aire, siendo posteriormente triturada. La extracción se realizó mediante Soxhlet en CH₂Cl₂

27. M. Suzuki, Y. Matsuo, S. Takeda, T. Suzuki, *Phytochemistry*, **1993**, 33, 651.

28. M. Norte, J.J. Fernández, M.L. Souto, M.D. García-Grávalos, *Tetrahedron Lett.*, **1996**, 37, 2671.

29. M. Norte, J.J. Fernández, M.L. Souto, J.A. Gavín, M.D. García-Grávalos, *Tetrahedron*, **1996**, en prensa.

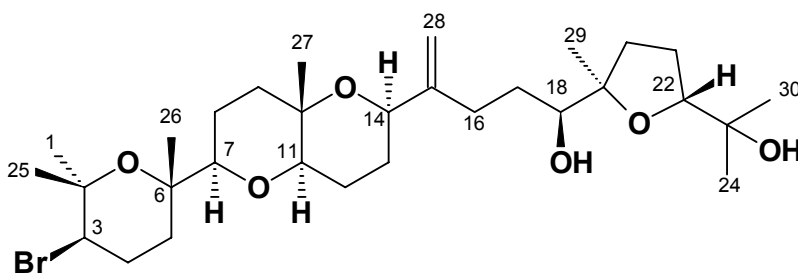
durante 24 horas y seguidamente fue macerada con $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (1:1) a temperatura ambiente hasta agotamiento. A la reunión de los extractos se le realizó cromatografía de acuerdo con la marcha expuesta en el siguiente **esquema 6**.



Esquema 6

B. ESTUDIO DE ELUCIDACION ESTRUCTURAL

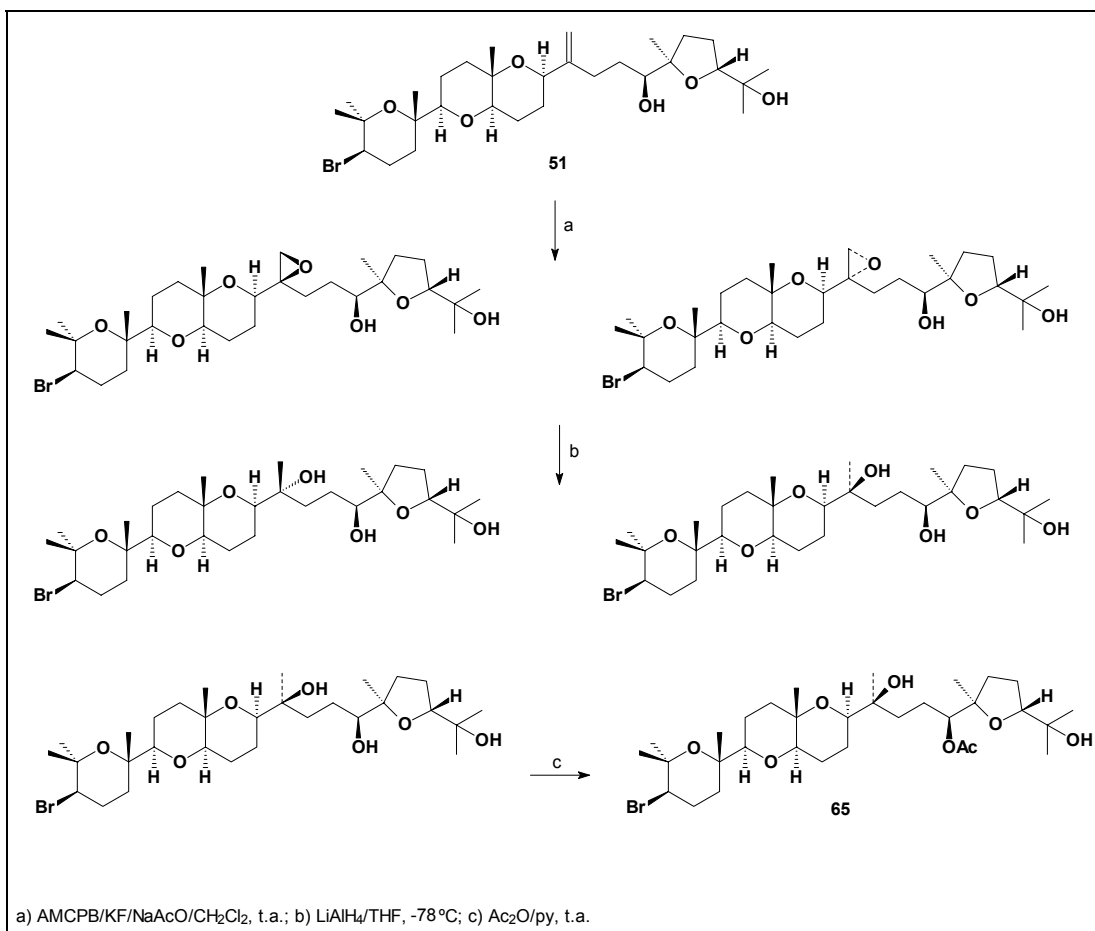
Tal y como puede observarse en el apartado anterior, las cantidades aisladas de la mayor parte de los nuevos compuestos eran pequeñas, a lo que había que añadir en algunos casos una cierta inestabilidad de los mismos. Asimismo, puede constatarse que el producto mayoritario en el alga es el dehidrotirsiferol **51**, compuesto aislado e identificado por nosotros con anterioridad. Por tanto es razonable pensar que fuese necesario disponer de una descripción detallada de sus datos espectroscópicos con fines comparativos.



Dehidrotirsiferol **51**

En efecto, con los recursos espectroscópicos del año 1983, se habían asignado los principales desplazamientos de protón y carbono de este compuesto en base a los datos de RMN mono y bidimensional, tanto homo- como heteronuclear. Como es lógico, estas asignaciones, con las técnicas actuales, hubieron de ser ligeramente modificadas, pero sobre todo, en este nuevo estudio del dehidrotirsiferol, nuestro objetivo principal se orientó al establecimiento de todas las relaciones ROE posibles, a través de experimentos ROESY, con un doble motivo. Por un lado, debido a que no disponíamos de ningún dato de este tipo, ya que cuando el producto se identificó, la configuración relativa se aseguró a través de la correlación química con el 18-acetato de tirsiferol **65**, tal y como se muestra en el **esquema 7**.

Por otro lado, algunos de los productos que se describen en esta memoria a la vista de sus espectros de protón, puede comprobarse que la diferencias son exclusivamente a nivel de configuración. Por todo ello fue importante disponer de este estudio para su determinación, más aún, si tenemos en cuenta que se trata, como hemos dicho, de metabolitos muy minoritarios, lo que acrecienta el tiempo de adquisición de los experimentos y dificulta su análisis.



Esquema 7

Se procedió, pues, a un estudio exhaustivo de los experimentos de RMN con la aplicación de las nuevas técnicas espectroscópicas y el resultado obtenido en la asignación completa de los desplazamientos químicos de protón y de carbono se da en la **tabla 3**.

Un énfasis especial pusimos en el estudio de las relaciones ROE presentes en el experimento de ROESY, puesto que la comparación de los resultados de este estudio con los de los nuevos compuestos, nos va a permitir establecer sus configuraciones relativas y como hemos comentado, jugará un papel fundamental en su identificación.

Estudio configuracional del dehidrotirsiferol 51

En el espectro ROESY en cloroformo deuterado del dehidrotirsiferol **51**, se observó que el metino H-3 (δ 3.89), en la cara α de la molécula, posee una correlación ROE intensa

con las señales a δ 1.52 del protón metilénico H-5 α y a δ 1.27 correspondiente al metilo Me-1 del gem-dimetilo sobre C-2. Similares correlaciones tipo ROE existen entre el otro metilo geminal, Me-25 (δ 1.39) y los protones del Me-26 (δ 1.20), como corresponde a su orientación en la cara contraria del plano (**Figura 8**).

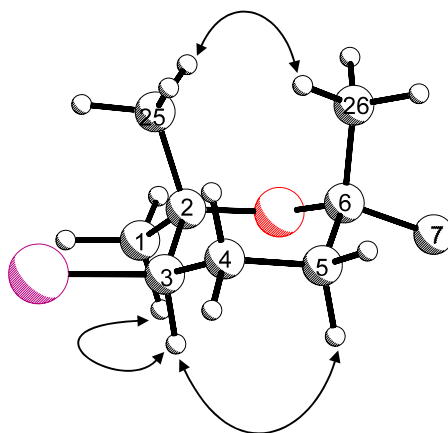


Figura 8

Un sistema de correlaciones ROE clave en la determinación de la configuración relativa de los centros quirales en los anillos B y C en estos compuestos, lo constituyen las correlaciones observadas entre el metino H-11 (δ 3.43) con los metinos H-14 (δ 4.28) y H-7 (δ 3.08), todos ellos situados en la cara α como confirma la correlación de H-7 con H-5 α . La correlación tipo ROE entre estos protones, H-11 y H-14, establece que la conformación en disolución del anillo C es flexible al igual que la encontrada para el 18-acetato de tirsiferol **65** en estado sólido.³⁰ Para completar el conjunto de correlaciones mostradas por los sustituyentes en los tres anillos tetrahidropiránicos, la correlación observada entre el Me-27 (δ 1.23) y la señal del protón metilénico H-9 centrada a δ 1.77 establece la orientación β de éste, en tanto que la orientación α de la señal de H-9 centrada a δ 1.44, fue confirmada por su correlación con H-7 y H-11 (**Figura 9**).

30. J.W. Blunt, J.D. McCombs, M.H.G. Munro, F.N. Thomas, *Magnetic Resonance in Chemistry*, **1989**, 27, 792-795.

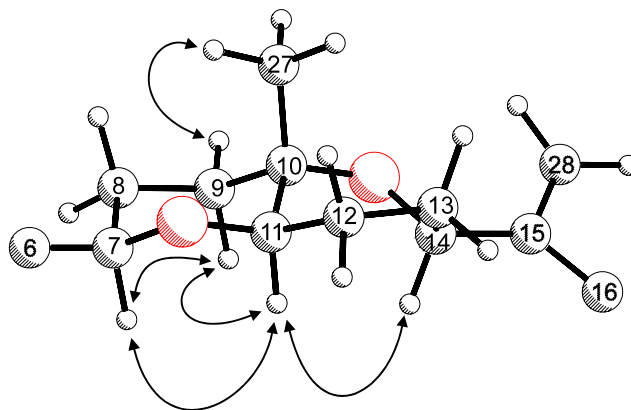


Figura 9

Finalmente, nos queda comentar las correlaciones de los sustituyentes en C-18 y el anillo tetrahidrofuránico, para lo cual es conveniente partir de H-18 (δ 3.52) que se orienta hacia la cara α de la molécula como lo confirma su correlación tipo ROE con la señal de protón centrada a δ 2.11, señal identificada como H-13 α por su correlación con H-14. Asimismo, resaltan las correlaciones de H-18 con Me-29 (δ 1.14) y la de éste con el protón del metileno H-20 orientado hacia la cara α y centrado a δ 1.60, resultado que se confirma por la correlación entre el otro protón diasterotópico H-20 β (δ 2.12) y el metino H-22 (δ 3.76) (**Figura 10**).

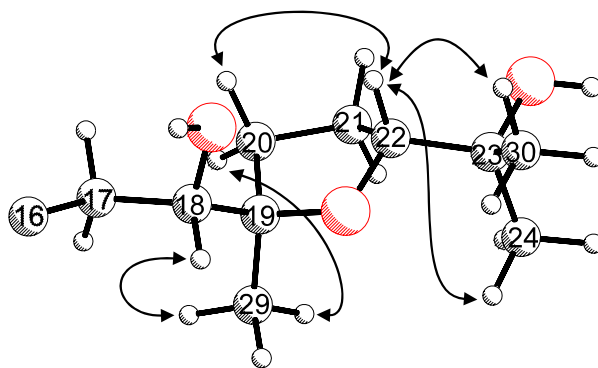


Figura 10

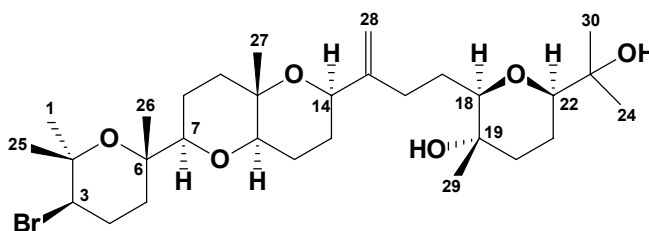
Tabla 3. RMN ¹H y ¹³C para el dehidrotirsiferol 51

n° C	δ ¹³ C	δ ¹ H	J (Hz)	n° C	δ ¹³ C	δ ¹ H	J (Hz)
1	30.99	1.27	s	16	29.92	2.43	
2	74.92			17	30.27	2.12	
3	58.99	3.89	dd	18	76.18	1.63	
4	28.22	2.26	4.1; 12.6	19	86.04	1.45	
		2.13		20	31.65	3.52	dd
5	37.05	β1.80					1.7; 10.4
		α1.52				β2.12	
6	74.36			21	26.25	α1.60	
7	86.65	3.08	dd	22	87.57	1.84	
8	22.92	1.76	2.5; 11.0	23	70.46	3.76	dd
		1.49		24	23.95	1.12	s
9	38.67	β1.77		25	23.62	1.39	s
		α1.44		26	20.05	1.20	s
10	72.86			27	19.43	1.23	s
11	78.92	3.43	dd	28	109.81	5.05	bs
12	21.78	1.81	5.7; 11.3			4.88	bs
		1.60		29	23.72	1.14	s
13	26.57	α2.11		30	27.66	1.21	s
		β1.86					
14	72.45	4.28	dd				
15	151.31		4.0; 8.1				

Una vez que hemos finalizado el estudio espectroscópico completo del dehidrotirsiferol **51**, estuvimos en condiciones de abordar la determinación estructural de cada uno de los nuevos triterpenos aislados de esta alga, tal y como veremos a continuación.

B.1. Isodehidrotirsiferol **56**

Aun cuando el isodehidrotirsiferol **56** no mostró su ion molecular en su espectro de masas, su fórmula molecular fue establecida como $C_{30}H_{51}O_6Br$ en base a las fragmentaciones observadas en su espectro de masas de alta definición (HRMS). Así, aparecen dos picos isotópicos a m/z 572.25524/570.25401 (calc. 572.25355/570.25560) que corresponden a la pérdida de un grupo metilo, y otro a 506.36127 (calc. 506.36074) debida a la pérdida de ácido bromhídrico. Estos resultados establecen que este compuesto es un isómero del dehidrotirsiferol **51**.



56

La comparación de sus datos espectroscópicos con los del dehidrotirsiferol, nos permitió localizar la zona de la molécula donde radican las principales diferencias entre ambos metabolitos. Así en el espectro de RMN 1H del compuesto **56**, las señales de los protones H-7, H-18 y H-22 aparecen solapadas y centradas a δ 3.08, 3.13 y 3.15 mientras que en el compuesto **51**, estas señales se encuentran a δ 3.08 (dd, $J= 2.5, 11.0$ Hz), 3.52 (dd, $J= 1.7, 10.4$ Hz) y 3.76 (dd, $J= 6.0, 9.9$ Hz), respectivamente. Además, en el experimento de RMN ^{13}C se observa un cambio significativo en los desplazamientos químicos de los carbonos portadores de átomos de oxígeno C-18 y C-19. Estas señales de carbono están situadas en el compuesto **51** a δ 76.18 para el carbono terciario (C-18) y a δ 86.04 para el cuaternario (C-19), mientras que en el compuesto **56** se sustituyen por dos señales centradas a δ 84.10 y 70.15, respectivamente (**Figura 11**).

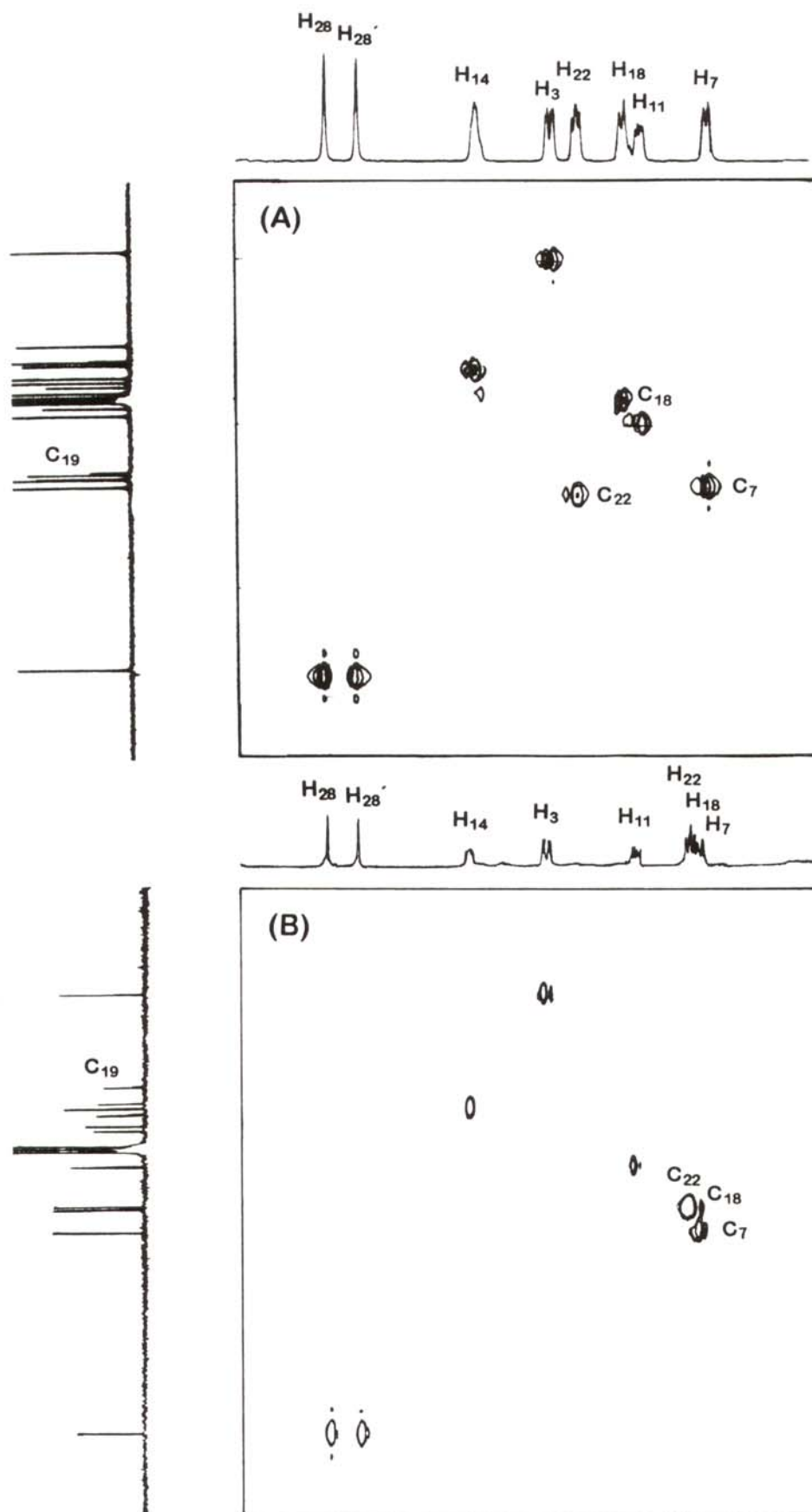


Figura 11. Comparación de los espectros 2D-RMN HMQC del dehidrotirsiferol 51 (A) y del isodehidrotirsiferol 56 (B).

El resto de los desplazamientos químicos tanto de RMN ^1H como de ^{13}C son equivalentes. Estos datos sugieren que las diferencias entre ellos deben localizarse entre los carbonos C-18 y C-22 (**Tablas 3 y 4**).

En el experimento de HMQC (**Figura 11b**), las señales de protón asignadas como H-18 (δ 3.13) y H-22 (δ 3.15) se correlacionan con los desplazamientos de carbono centrados a δ 84.10 (C-18) y 84.42 (C-22) y, además, en el experimento de HMBC se observa la correlación entre C-22 y H-18. Este resultado establece que la unión éter se establece entre los carbonos C-18 y C-22, por lo que podemos concluir que el anillo heterocíclico D en este compuesto es un sistema tetrahidropiránico en vez del sistema tetrahidrofuránico presente en el compuesto **51** (**Figura 12**).

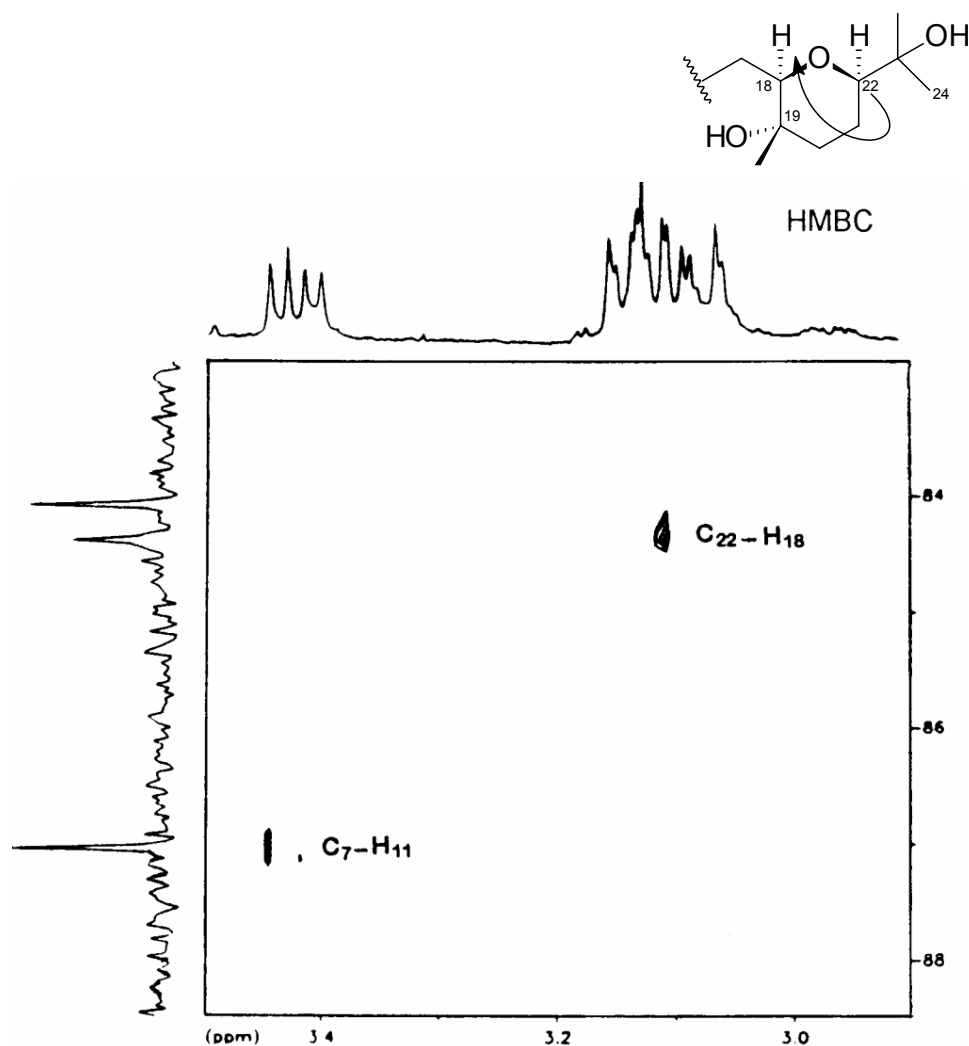


Figura 12

La conformación de este anillo tetrahidropiránico así como la configuración de los centros quirales sobre los carbonos C-18, C-19 y C-22, fue establecida en base a los valores de las constantes de acoplamiento de H-18 y H-22, y a través de la realización de experimentos de NOEDIFF. Para ello fue necesario buscar un disolvente deuterado distinto del cloroformo puesto que, tal y como ya hemos comentado, las señales correspondientes a H-18 y H-22 salen solapadas, siendo la piridina- d_5 la que nos permitió medir los valores de las constantes de acoplamiento. En efecto, los valores encontrados para el protón H-18 centrado a δ 3.51 (dd, $J= 1.2$ y 10.4 Hz) y para el H-22 a δ 3.38 (dd, $J= 1.2$ y 11.2 Hz), nos indican la orientación axial de los metinos y que, por tanto, las cadenas laterales quedan orientadas ecuatorialmente. Esto fue confirmado con el experimento NOEDIFF, donde la irradiación de la señal de protón H-22 muestra relación con las señales de protón de los grupos metilos Me-24/Me-30 y del metino H-18, mientras que la irradiación de H-18 sólo muestra relación NOE con H-22 (**Figura 13**). Además, estos resultados nos permitieron establecer que la orientación relativa del grupo metilo Me-29 debe ser axial y en la cara contraria a los metinos H-18 y H-22.

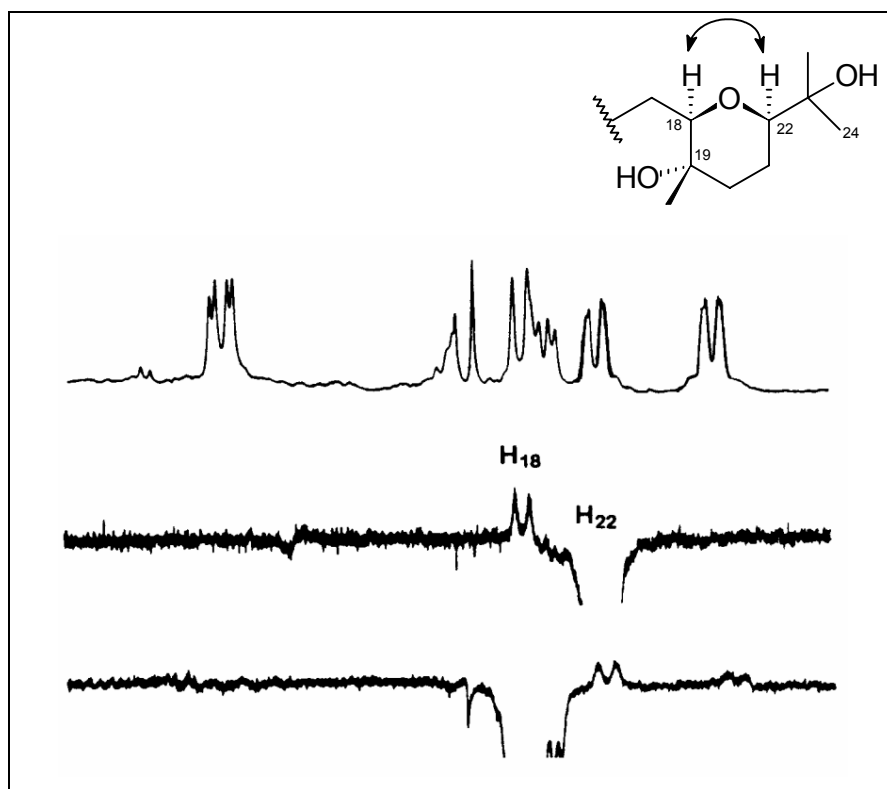
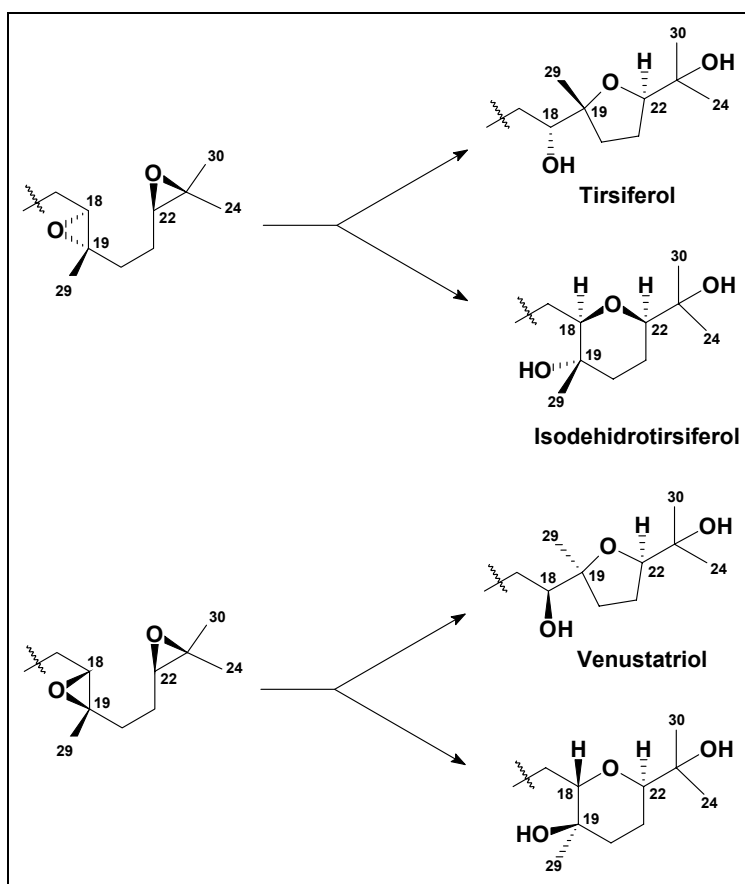


Figura 13

Esto concuerda con las dos posibilidades de formación del anillo D a partir del precursor tetraepoxidado, según la propuesta biogénica realizada para este tipo de derivados y que fue recogida en la introducción. De acuerdo con esta propuesta y según la estereoquímica del epóxido precursor entre los átomos C-18 y C-19, puede explicarse la formación de las dos series, la del tirsiferol **43** y la del venustatriol **50**, caracterizadas por la presencia del sistema tetrahidrofuránico terminal, tal y como se muestra en el **esquema 4**. Siguiendo la misma hipótesis, pero llevando a cabo la ciclación sobre el carbono C-18 en lugar de sobre el C-19, obtendríamos dos sistemas de tetrahidropirano de los cuales sólo el correspondiente a la serie del tirsiferol, tendría como resultado que los dos protones del cierre del anillo se encuentren en la misma cara y el metilo en la opuesta (**Esquema 7**).



Esquema 7

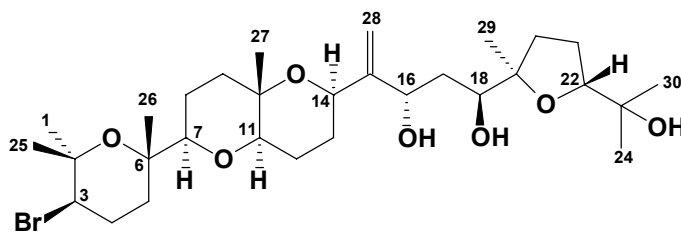
Tabla 4. RMN ¹H y ¹³C para el isodehidrotirsiferol 56

n° C	δ ¹³ C	δ ¹ H	J (Hz)	n° C	δ ¹³ C	δ ¹ H	J (Hz)
1	31.42	1.27	s	16	29.96	2.42	
2	75.35					2.13	
3	59.47	3.90	dd	17	27.28	1.88	
4	28.66	2.25				1.50	
		2.12		18	84.10	3.13	dd
5	37.50	1.82		19	70.15		
		1.55		20	40.22	1.88	
6	74.79					1.55	
7	87.08	3.08	dd	21	24.99	2.09	
8	23.34	1.78		22	84.42	3.15	dd
		1.49		23	72.13		
9	39.10	1.81		24	24.41	1.15	s
		1.51		25	24.01	1.40	s
10	73.31			26	20.48	1.20	s
11	79.37	3.43	dd	27	19.83	1.22	s
12	22.23	1.80		28	110.40	5.04	s
		1.60				4.88	s
13	26.72	2.06		29	20.64	1.17	s
		1.85		30	26.77	1.20	s
14	72.66	4.30	dd				
15	151.68						

B.2. 16-Hidroxidehidrotirsiferol **57**

El siguiente compuesto, el 16-hidroxidehidrotirsiferol **57** fue aislado como un sólido blanco amorfo cuya fórmula molecular $C_{30}H_{51}O_7Br$ fue establecida en base a su espectro de masas de alta resolución, en donde los iones moleculares isotópicos M^+ salen a m/z 604.27987/602.28189 (calc. 604.27976/602.28128) y la fragmentación característica por pérdida de ácido bromhídrico a 522.35563 (calc. 522.35565).

La comparación de sus datos espectroscópicos de RMN con los del dehidrotirsiferol **51**, junto con la absorción observada a 3514 cm^{-1} en su espectro de IR, puso de manifiesto la existencia en la molécula de un grupo hidroxilo alílico. En efecto, en el espectro de ^1H -RMN aparece la señal de un nuevo metino centrada a δ 4.86 y que se correlaciona en el experimento de HMQC con la señal a δ 82.96 del espectro de carbono. Asimismo, la comparación de los experimentos DEPT de **51** y **57**, pone de manifiesto la sustitución de un metileno alílico centrado δ 29.92 en el primero, por el nuevo metino en **57**. (Tabla 5).



57

La localización de este hidroxilo sobre el carbono C-16 se confirmó en base a los datos de los experimentos de 2D-RMN. Así, en el experimento COSY pudimos establecer la presencia de un sistema aislado a través de las correlaciones de la señal de metino centrada a δ 3.82, con las del metileno a δ 1.88 y 1.69, y éstas a su vez con la del protón de metino centrado a δ 4.86, no observándose ulteriores acoplamientos (Figura 14).

La ubicación de este sistema entre los carbonos C-15 y C-19, se realizó en base a las correlaciones ^{13}C - ^1H observadas en el experimento de HMBC entre el metino a δ 4.86 con el carbono cuaternario C-15 (δ 149.29) y la del metino a δ 3.82 con el carbono

cuaternario C-19 (δ 85.54). Además se observaron las correlaciones de C-16 (δ 82.96) con los protones H₂-28 (δ 5.30 y 5.25) y de C-18 (δ 72.83) con los protones del metilo Me-29 (δ 1.14) (Figura 15).

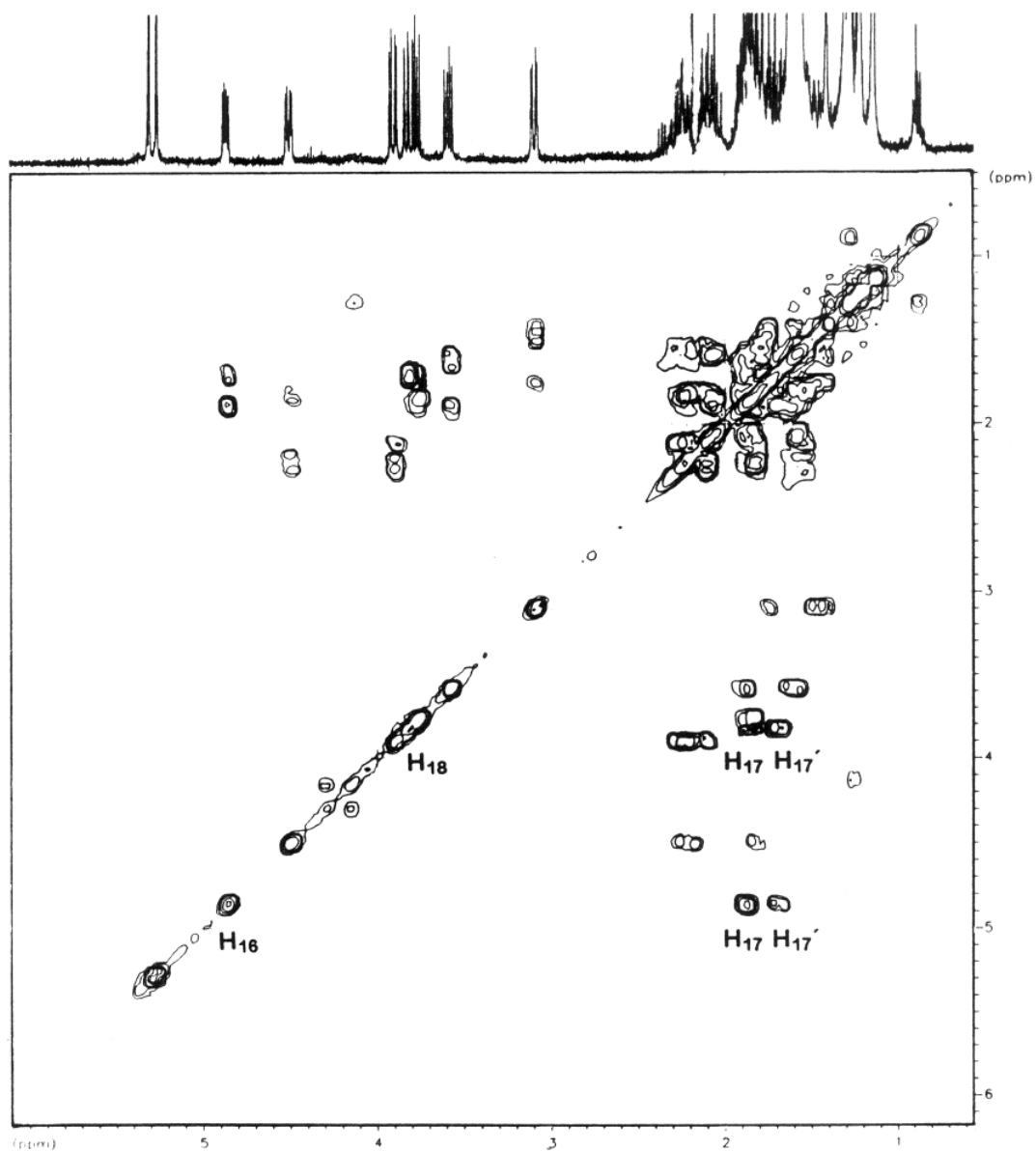


Figura 14

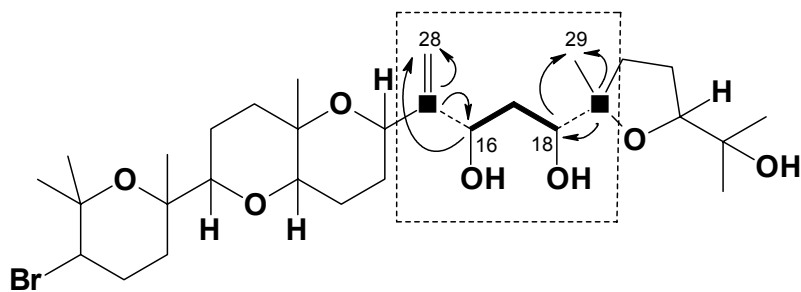


Figura 15

La configuración relativa de este compuesto fue establecida a través del estudio del experimento ROESY. En el mismo, por un lado se observó las correlaciones entre el protón H-11 (δ 3.58) con H-7 (δ 3.09) y H-14 (δ 4.50), y este último, con el protón metilénico H-28 (δ 5.30). Por otro, el protón H-16 (δ 4.86) se correlaciona con los protones H-13 α (δ 1.85), H-17 β (δ 1.69) y H-18 (δ 3.82). Finalmente, H-18 presenta correlación tipo ROE con H-17 α (δ 1.88). Esta secuencia sólo puede ser explicada si la configuración relativa de C-16 es S*. En la **figura 16** son representadas las correlaciones ROESY más importantes para el compuesto **57**.

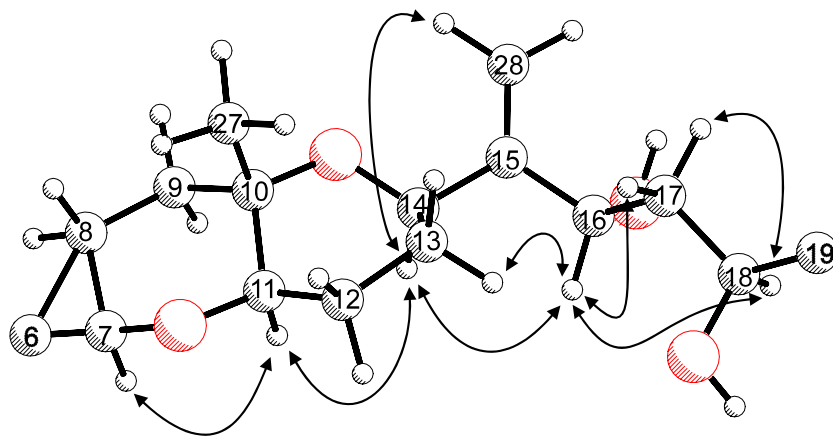


Figura 16

Tabla 5. RMN ¹H y ¹³C para el 16-hidroxiidehidrotirsiferol 57

n° C	δ ¹³ C	δ ¹ H	J (Hz)	n° C	δ ¹³ C	δ ¹ H	J (Hz)
1	31.00	1.28	s	16	82.96	4.86	dd
2	75.00			17	34.96	α1.88	
3	58.94	3.90	dd			β1.69	
4	28.21	2.25	4.2; 12.3	18	72.83	3.82	dd
		2.10		19	85.54		
5	37.08	1.81		20	32.12	2.12	
		1.57		21	26.48	1.84	
6	74.35	3.09	dd	22	87.52	3.77	dd
7	86.66	1.75	2.7; 11.6	23	70.46		
8	23.25	1.47		24	24.00	1.13	s
		1.77		25	23.65	1.41	s
9	38.62	1.55		26	20.05	1.21	s
				27	20.43	1.30	s
10	73.39			28	114.72	5.30	s
11	77.21	3.58	dd	29	22.93	5.25	s
12	21.61	1.87	6.4; 11.1	30	27.67	1.14	s
		1.61				1.22	s
13	25.98	β2.22					
		α1.85					
14	72.09	4.50	dd				
15	149.29		3.4; 10.6				

B.3. Tirsenol A **58** y Tirsenol B **59**

El tirsenol A **58** fue aislado como un sólido amorfo de color blanquecino $[\alpha]_D^{25} = +12.9^\circ$ (c 0.69, CHCl_3). La fórmula molecular fue establecida como $\text{C}_{30}\text{H}_{51}\text{O}_8\text{Br}$ por espectroscopía de masas. Así, el espectro de masas FAB utilizando NBA como matriz más adecuada, muestra un ion a m/z 625/623 debido a un fragmento formado por pérdida de agua $[\text{M}^{++} \text{Na} - \text{H}_2\text{O}]$.

El espectro de RMN ^{13}C confirma la fórmula molecular y muestra la presencia de siete metilos, diez metilenos y seis grupos metinos, junto con siete carbonos cuaternarios en α a oxígenos (**Tabla 6**).

El espectro de RMN ^1H muestra en la región baja cinco señales de metinos a δ 3.92, 3.89, 3.77, 3.31 y 3.08 identificados como H-18, H-3, H-22, H-11 y H-7, respectivamente, por comparación con los datos del espectro de RMN ^1H del dehidrotirsiferol **51**. Junto a éstos, fue observada una señal de un metileno diasterotópico centrado a δ 3.63 y 3.49, un protón olefínico centrado a δ 5.02 y un grupo metilénico alílico a δ 2.13 y 1.82, estas últimas señales de protón constituyen las diferencias más sobresalientes entre los espectros de RMN de ambos metabolitos, y que a través del experimento de COSY fueron localizadas en la zona de los carbonos C-11/C-15(C-28). Así, el análisis del COSY en esta región debe comenzar de forma conveniente desde el metino H-11 (δ 3.31), el cual está acoplado al metileno H₂-12 (δ 2.13 y 1.82), protones que a su vez están conectados con el metino H-13 (δ 5.02). El sistema de protones acoplados en esta región termina con la presencia de dos centros cuaternarios (**Figura 17**).

Esto fue confirmado por combinación de experimentos tipo 2D-HMQC-TOCSY los cuales mostraron la correlación entre la señal de protón H-13 (δ 5.02) y las señales de carbono a δ 94.03 (C-13), 24.63 (C-12) y 77.31 (C-11). Además, este experimento nos permitió asignar de forma inequívoca, los desplazamientos químicos de todos los carbonos de grupos metilo, metileno y metino (**Figura 18**).

Tabla 6. RMN ^1H y ^{13}C (CDCl_3) para los compuestos **58** y **59**.

n° C	Tirsenol A			Tirsenol B		
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	J (Hz)
1	31.39	1.27	s	31.01	1.28	s
2	75.38			74.98		
3	59.35	3.89	dd	58.94	3.90	dd
4	28.59	2.12		28.21	2.11	
		2.24			2.24	
5	37.50	1.50		37.15	1.50	
		1.81			1.83	
6	74.70			74.33		
7	86.70	3.08	dd	86.36	3.09	dd
8	23.25	1.48		22.84	1.47	
		1.83			1.80	
9	36.86	1.59		36.45	1.57	
		1.87			1.84	
10	74.02			73.66		
11	77.31	3.31	dd	77.20	3.29	dd
12	24.63	α 1.82	ddd	24.17	α 1.85	ddd
		β 2.13	ddd		β 2.09	ddd
						8
						2;10.6;14.8
13	94.03	5.02	dd	91.60	4.85	dd
14	152.11			152.44		
15	85.52			85.83		
16	32.04	α 1.81		31.75	α 2.01	
		β 1.93			β 2.12	
17	26.85	β 1.71		27.10	1.88	
		α 1.84			1.89	
18	86.59	3.92	dd	85.67	4.03	dd
19	84.20			84.94		
20	34.93	1.66		34.61	1.68	
		1.98			1.84	
21	26.58	1.85		25.88	1.84	
		1.95			1.94	
22	87.56	3.77	dd	87.83	3.79	dd
23	70.84			70.29		
24	24.50	1.12	s	24.22	1.12	s
25	24.12	1.40	s	23.65	1.41	s
26	20.42	1.21	s	19.99	1.22	s
27	15.50	1.07	s	15.29	1.08	s
28	66.97	β 3.49	d	67.92	3.56	bs
		α 3.63	d			
						11.1
29	24.95	1.23	s	25.15	1.30	s
30	28.10	1.21	s	27.75	1.24	s

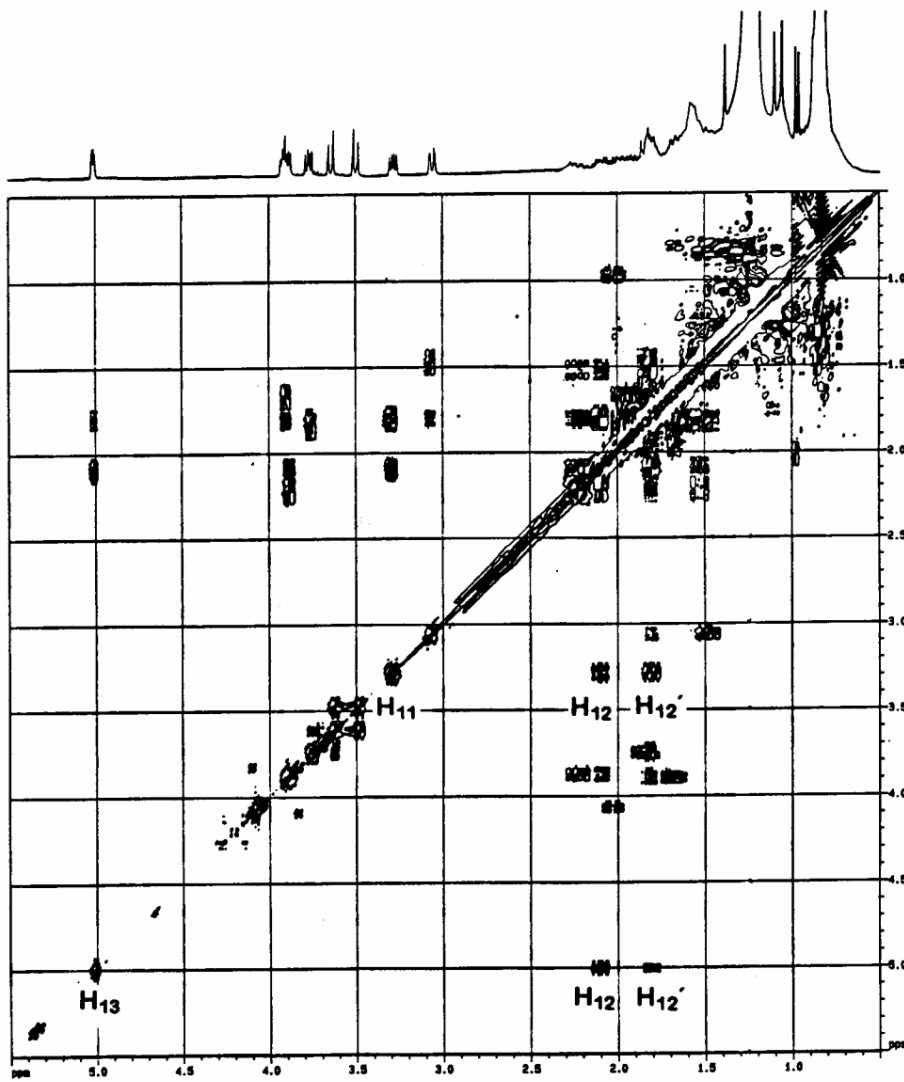


Figura 17

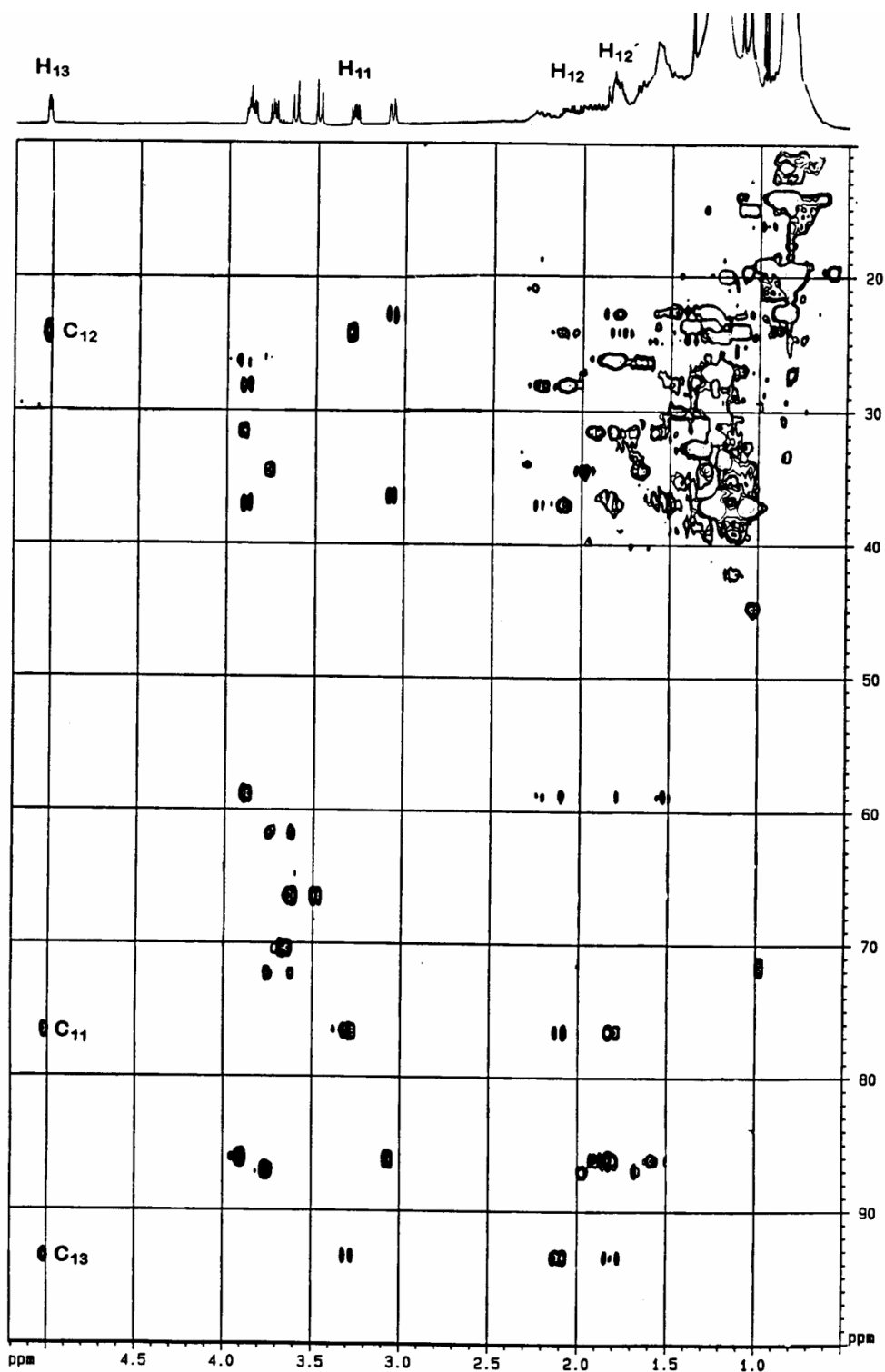


Figura 18

La señal del carbono cuaternario C-14 se sitúa a δ 152.11 a través de correlaciones HMBC con H₂-12 y H-13, mientras que las observadas entre H-11 y H₂-12 con la señal a δ 74.02, identificaron esta última señal de carbono como C-10. Por otra parte, C-14 se correlaciona con el metileno H₂-28, el cual aparece en el espectro de RMN ¹H como un sistema AB aislado centrado a δ 3.63 (d, J= 11.1 Hz) y 3.49 (d, J= 11.1 Hz). Estos protones fueron también correlacionados en el experimento de HMBC con el carbono cuaternario centrado a δ 85.82 (C-15), el cual a su vez fue correlacionado con el protón olefínico H-13 y los protones metilénicos centrados a δ 1.93/1.81 (H₂-16) (**Figura 19**).

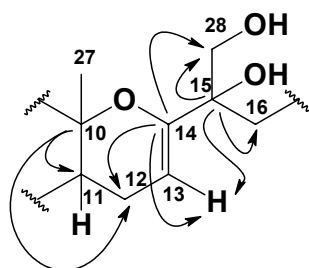


Figura 19

Estas correlaciones establecieron la presencia de un inusual sistema enol-éter en C-13/C-14 junto con un sistema diol en C-15/C-28 en lugar del doble enlace observado en el compuesto **51**. Estos datos junto con todas las correlaciones observadas en los experimentos 2D-RMN sustentan que la estructura plana de este compuesto es la que se muestra en la **figura 20**.

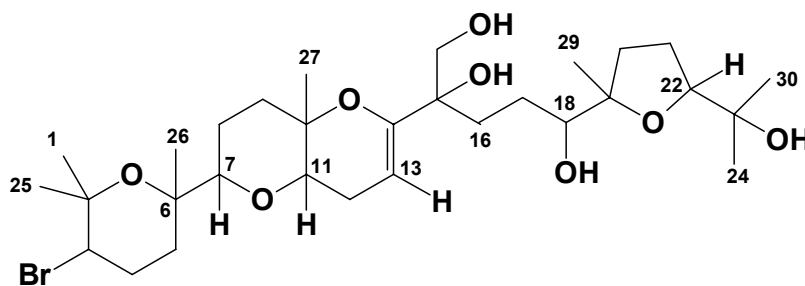


Figura 20

El tirsenol B **59**, $[\alpha]^{25}_D = -1.1^\circ$ (*c* 0.26, CHCl₃) resultó ser un isómero del compuesto **58** en base a su espectro de masas y a sus datos espectroscópicos, que mostraron que su estructura química estaba estrechamente relacionada con la del tirsenol A.

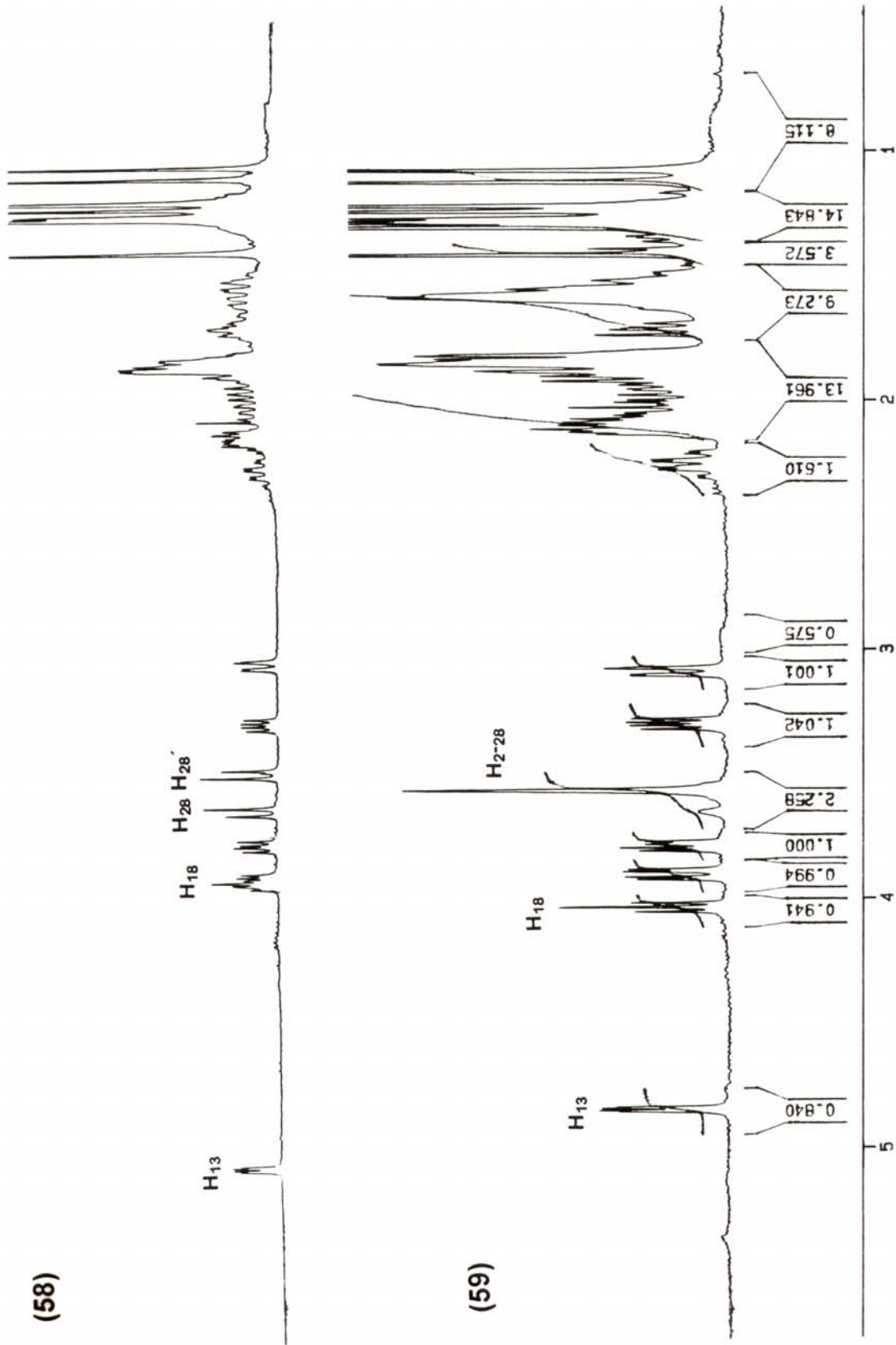
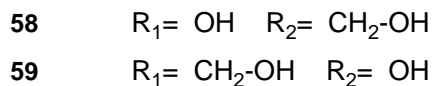
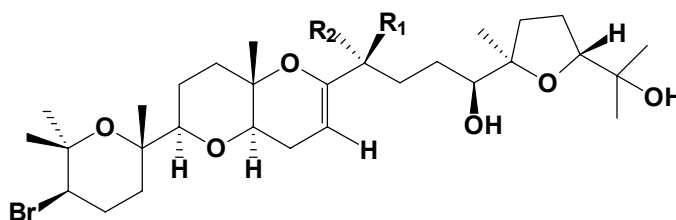


Figura 21. Comparación de los espectros de RMN 1H del tirsenol A 58 y del tirsenol B 59.

Las principales diferencias se observaron en el espectro de RMN ^1H , donde las señales de protón de los metinos H-13 a δ 4.85 (dd, $J= 2.0, 5.4$ Hz) y H-18 a δ 4.03 (dd, $J= 7.0, 7.0$ Hz), junto con las del metileno H₂-28 a δ 3.56 (bs) aparecen ligeramente desplazadas (**Figura 21**).

Una vez que se compararon los experimentos COSY, HMQC, 2D-HMQC-TOCSY y HMBC de los compuestos **59** y **58**, tomando en consideración que los protones del metileno H₂-28 aparecen como un sistema AB aislado en el compuesto **58**, mientras que en el **59** aparece como un singlete ancho, llegamos a la conclusión que estos compuestos se diferencian en la estereoquímica del carbono C-15.



Se estableció en base a los datos observados en los experimentos ROESY que la estereoquímica relativa de los carbonos C-3, C-6, C-7, C-10, C-11, C-18, C-19 y C-22 en ambos compuestos es idéntica a la observada para el dehidrotirsiferol **51**. La configuración relativa del carbono C-15 en los compuestos **58** y **59** fue establecida como sigue. El hecho de que en el compuesto **58** los protones H₂-28 sean diastereotópicos, determina que el alcohol primario debe estar fijo formando un enlace de hidrógeno con el oxígeno del enol-éter, lo cual es confirmado por correlaciones tipo ROE observadas entre H-13 con H-16 β , H-28 β con H-17 β y H-28 α con H-16 α . Así, la estereoquímica relativa en C-15 es establecida como R* para este compuesto (**Figura 23a**). La misma estrategia fue adoptada para el tirsanol B **59**, cuya estereoquímica 15 S*, está de acuerdo con las correlaciones observadas en el experimento de ROESY entre H-13 con H-18 y H-16 α , y entre H₂-28 con H-13 y H-16 β (**Figura 23b**).

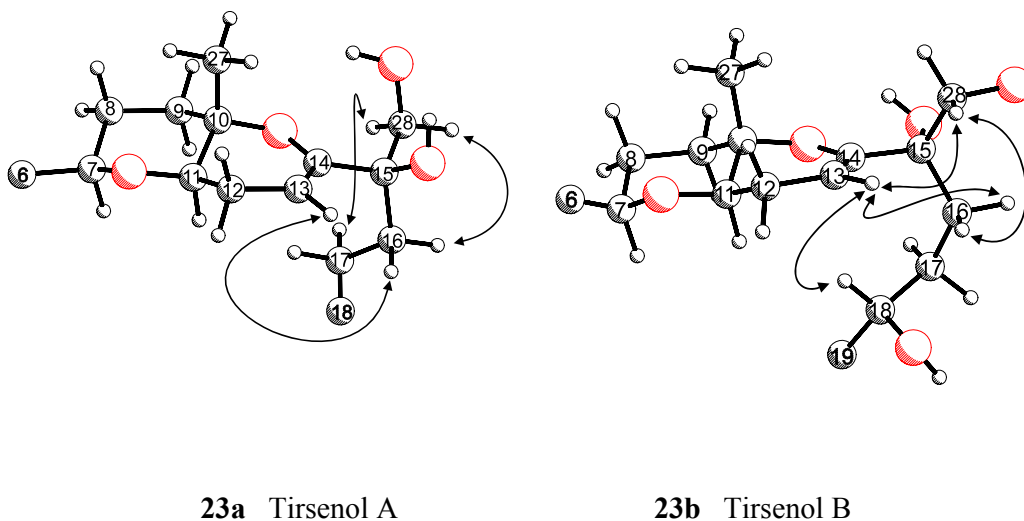


Figura 23

B.4. 10-Epidehidrotirsiferol 60 y 10-Epi-15,16-dehidrotirsiferol 61

El 10-epidehidrotirsiferol **60**, resultó ser un isómero del dehidrotirsiferol **51**, en base al ion molecular observado en el espectro de masas FAB a m/z 587/589 (MH^+), siendo NBA la matriz más adecuada. Sus datos espectroscópicos mostraron que su estructura química estaba estrechamente relacionada con los valores observados para el compuesto **51**, hasta el punto de que las fragmentaciones mostradas en su espectro de masas, así como las absorciones en su espectro de infrarrojo fueron idénticas a las de éste (ver parte experimental).

En el espectro de RMN 1H , los desplazamientos químicos y los valores de las constantes de acoplamiento para los metinos H-3, H-18 y H-22 junto con las de los protones metilénicos vinílicos H₂-28, fueron también equivalentes (**Tablas 3 y 7**). Sin embargo, las señales de protón de los metinos a δ 3.69 (dd, $J= 6.8, 6.8$ Hz, H-7), 3.84 (dd, $J= 7.0, 7.0$ Hz, H-11) y 4.27 (dd, $J= 7.4, 7.4$ Hz, H-14) fueron diferentes tanto en sus desplazamientos como en los valores de las constantes de acoplamiento (**Figura 24**).

Tabla 7. RMN de ^1H y ^{13}C para los compuestos **60** y **61**.

n° C	10-Epidehidrotirsiferol 60			10-Epi-15,16-dehidrotirsiferol 61		
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	J (Hz)
1	30.93	1.29	s	30.95	1.28	s
2	74.78			74.80		
3	59.04	3.90	dd	59.06	3.89	dd
4	28.13	2.25		28.14	2.23	
		2.11			2.12	
5	35.83	1.85		35.77	1.87	
		1.61			1.61	
6	74.89			74.82		
7	88.25	3.69	dd	88.23	3.68	dd
8	26.43	1.92		26.54	1.92	
		1.64			1.64	
9	33.80	1.94		34.00	1.95	
		1.60			1.60	
10	84.64			84.70		
11	84.78	3.84	dd	84.69	3.82	dd
12	27.07	1.90		27.39	1.89	
		1.70			1.71	
13	31.63	2.05		30.18	1.91	
		1.66			1.66	
14	82.21	4.27	dd	84.51	4.23	dd
15	149.63			137.31		
16	28.94	2.39		122.94	5.60	dd
		2.06				
17	30.34	1.67		30.39	2.24	
		1.50			2.14	
18	76.27	3.53	d	76.68	3.58	dd
19	86.08			85.79		
20	31.91	2.08		32.02	2.11	
		1.84			1.86	
21	26.56	1.88		26.43	1.85	
		1.57			1.56	
22	87.60	3.76	dd	87.55	3.76	dd
23	70.46			70.45		
24	23.76	1.13	s	23.99	1.13	s
25	23.70	1.41	s	23.71	1.41	s
26	20.74	1.22	s	27.71	1.22	s
27	23.56	1.17	s	23.45	1.16	s
28	109.17	5.13	s	11.88	1.63	s
		4.83	s			s
29	31.22	1.15	s	20.77	1.17	s
30	27.69	1.22	s	27.71	1.22	s

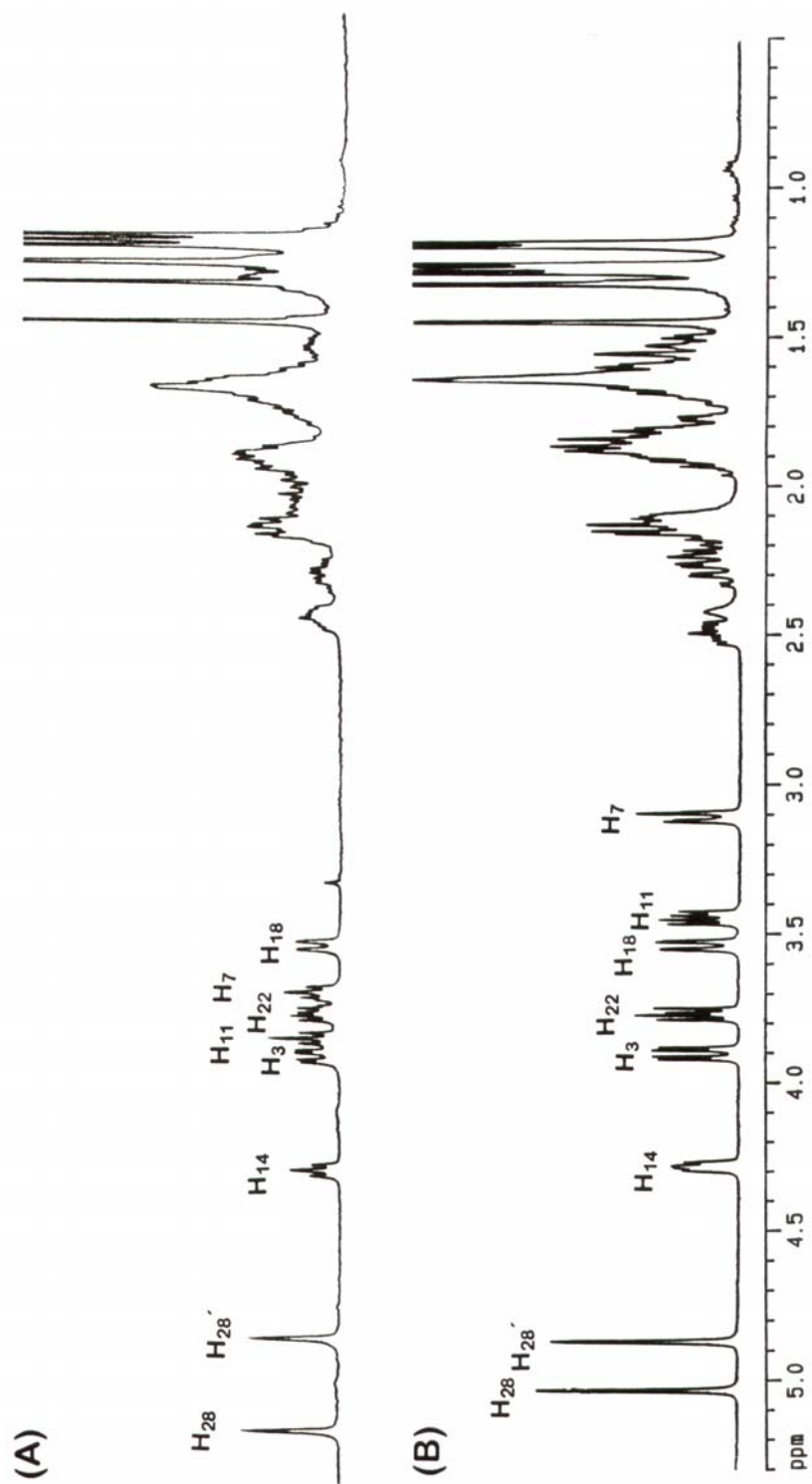


Figura 24. Comparación de los espectros de RMN ^1H del 10-epidehidrotirsiferol **60** (A) y del dehidrotirsiferol **51** (B).

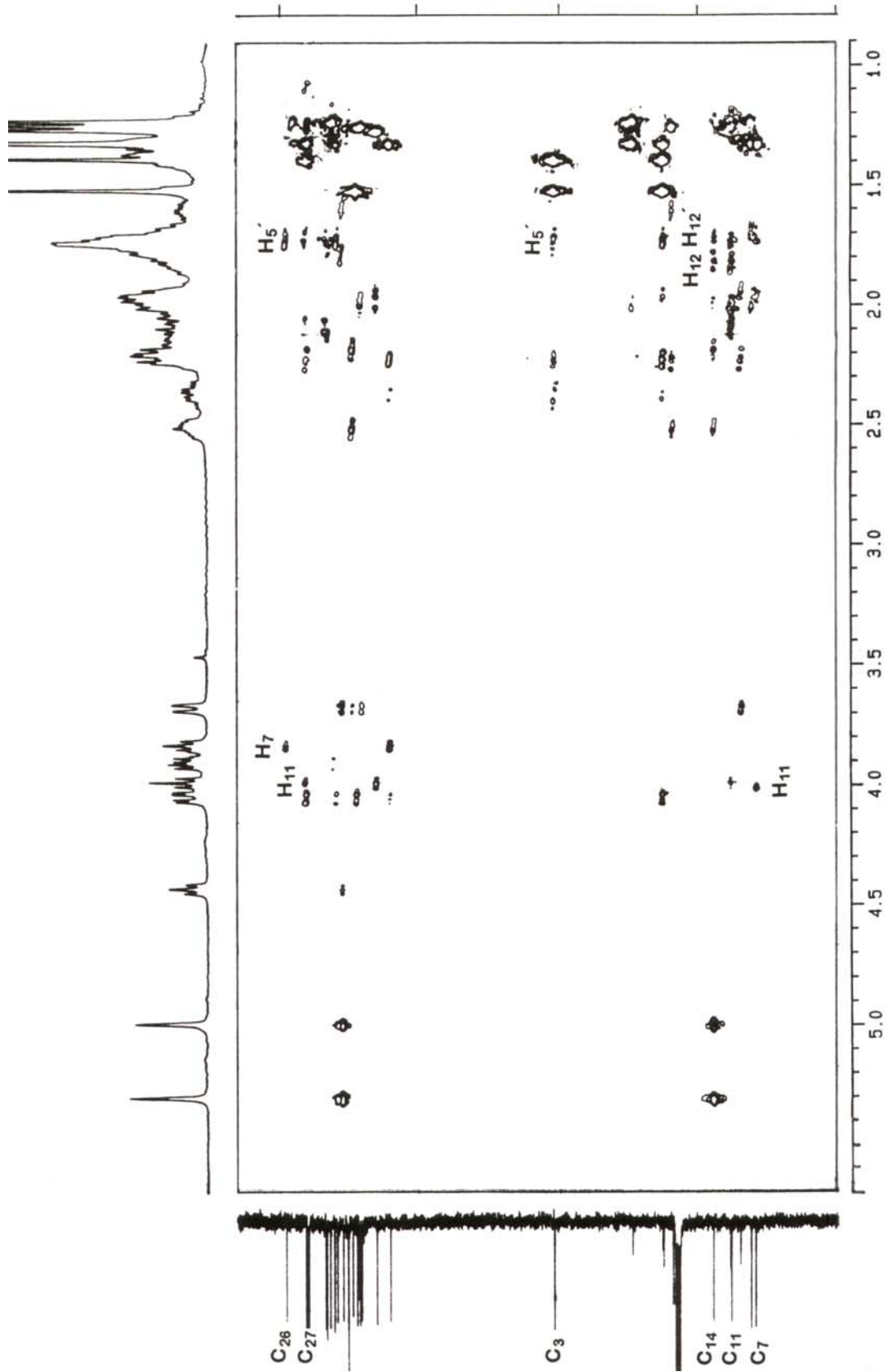


Figure 25

Estos desplazamientos químicos fueron asignados en base a las correlaciones observadas en el experimento de HMBC. Así, el carbono C-3 (δ 59.04), identificado por su correlación HMQC con H-3 (δ 3.90), muestra correlación con el metileno H-5' (δ 1.61), y éste a su vez, con el grupo metilo Me-26 (δ 20.74). La correlación HMBC entre el carbono de este grupo metilo y la señal de protón centrada a δ 3.69 nos permitió identificar H-7. A su vez, el carbono C-7 (δ 88.25) identificado a través del experimento HMQC, presenta una correlación a larga distancia con una señal de protón de grupo metino a δ 3.84 correspondiente a H-11. La correlación entre esta señal de protón y la del carbono metílico situado a δ 23.56, nos permitió identificar la señal de protón del Me-27 a δ 1.17. Finalmente el carbono C-11 (δ 84.78) mostró correlación con el metileno H₂-12 (δ 1.70/1.90) y éste con el carbono C-14 (δ 82.21). La señal de protón de este metino, H-14, se situó a δ 4.27 (**Figura 25**).

A la vista de estos resultados podemos suponer que las notables diferencias que habíamos indicado entre los desplazamientos químicos de estas señales de protón y sus valores de constantes de acoplamiento, con las establecidas para el dehidrotirsiferol **51**, deben estar relacionadas con el cambio en la configuración de uno o varios centros quirales en el sistema formado por los anillos B y C. En efecto, si consideramos que en el compuesto **51** las señales de protón de H-7 y H-11 se resolvieron como un doble doblete con dos valores distintos de constantes de acoplamiento (uno grande y otro pequeño), mientras que en el compuesto **60**, las señales H-7 y H-11 se resuelven como dobles dobletes con dos valores iguales de constante de acoplamiento, podemos concluir que tiene lugar un cambio en la conformación de los anillos fusionados de tetrahidropirano.

Esto fue confirmado en el experimento de ROESY por las correlaciones observadas de H-11 con H-7, H-14 y Me-27. Esta última establece que los dos heterociclos deben estar cis-fusionados y la correlación con H-7, que el anillo B posee una conformación flexible, a diferencia de lo que se observa para el compuesto **51**, donde los anillos B y C forman un sistema trans-fusionado (**Figura 26**).

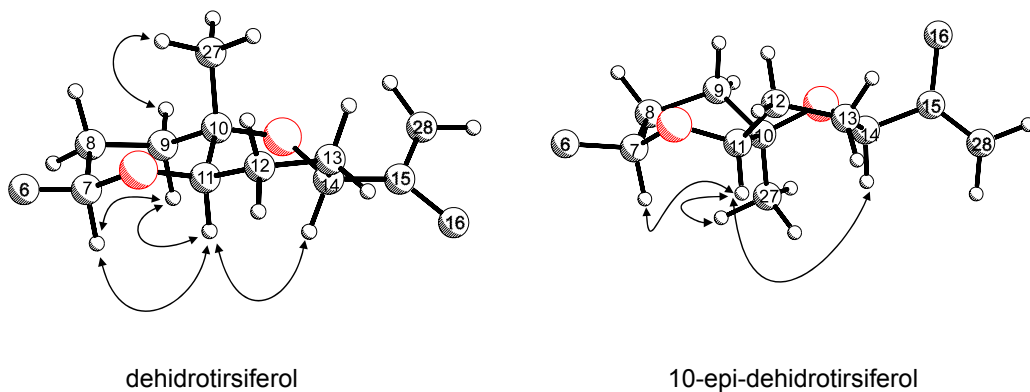
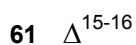
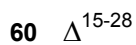
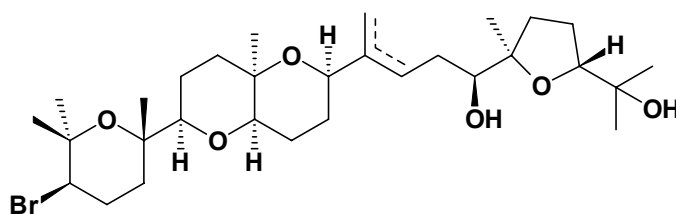


Figura 26

El 10-Epi-15,16-dehidrotirsiferol **61** es un isómero del 10-epidehidrotirsiferol **60**. La interpretación de los datos de los experimentos COSY, HMQC y HMBC, permitió realizar las asignaciones de las señales de RMN ^1H y ^{13}C (**Tabla 7**), las cuales mostraron que realmente la única diferencia entre ambos compuestos, consiste en la posición del doble enlace. En el compuesto **61** se encuentra localizado entre los carbonos C-15/C-16, mientras que en el compuesto **60** está entre los carbonos C-15/C-28.



La determinación de la geometría de este doble enlace se realizó principalmente en base a los datos observados en el experimento ROESY. Así el protón vinílico H-16 mostró correlación tipo ROE con H-14, que junto con el desplazamiento químico observado para el metilo Me-28 a δ 11.88, nos permite establecer que la geometría de el enlace en este compuesto es E. Las restantes correlaciones ROE que se observaron y que son resumidas

en la **figura 27**, fueron idénticas a las del 10-epi-dehidrotirsiferol por lo que establecemos que en todos sus centros poseen la misma estereoquímica relativa.

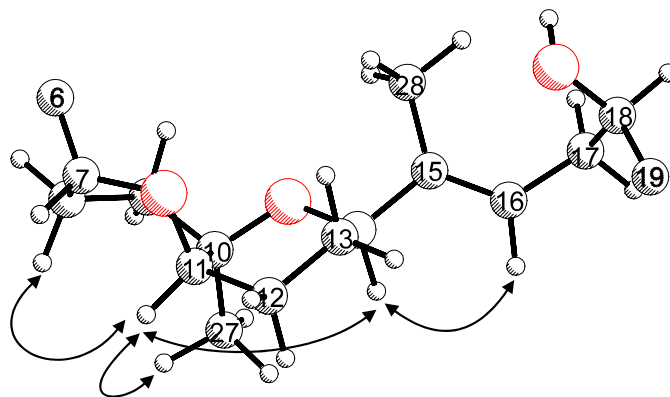


Figura 27

B.5. Dehidrovenustatriol 62 y 15,16-Dehidrovenustatriol 63

El dehidrovenustatriol **62** fue aislado como un sólido blanco amorfo, $[\alpha]_{D}^{25} = +4.6^{\circ}$ (*c* 0.26, CHCl_3), estableciéndose su fórmula molecular como $\text{C}_{30}\text{H}_{51}\text{O}_6\text{Br}$ en base al ion molecular de su espectro de masas de alta resolución (HRMS, obs. 588.28693/586.28496; calc. 588.28485/586.28690).

Los datos espectroscópicos de este compuesto pusieron de manifiesto que están estrechamente relacionados con los del dehidrotirsiferol **51**, hasta el punto de que podemos establecer que los dos metabolitos poseen la misma estructura plana (**Tabla 8**). Las diferencias más significativas entre ellos se aprecian en el espectro de RMN ^1H , en el que las señales de H-18 (δ 3.59), H-22 (δ 3.83) y Me-30 (δ 1.26) del compuesto **62**, se desplazan hacia campos más bajos en comparación a lo observado en el espectro del dehidrotirsiferol en el que se sitúan a δ 3.52, 3.76 y 1.21, respectivamente. Además, la señal del metino H-22 muestra variación en los valores de acoplamiento, de modo que en el compuesto **51** se resuelve como un doble doblete con valores distintos de constantes de acoplamiento ($J = 6.0, 9.9$ Hz), mientras que en el **62** aparecen como doble doblete con los dos valores iguales ($J = 7.3, 7.3$ Hz) (**Figura 28**).

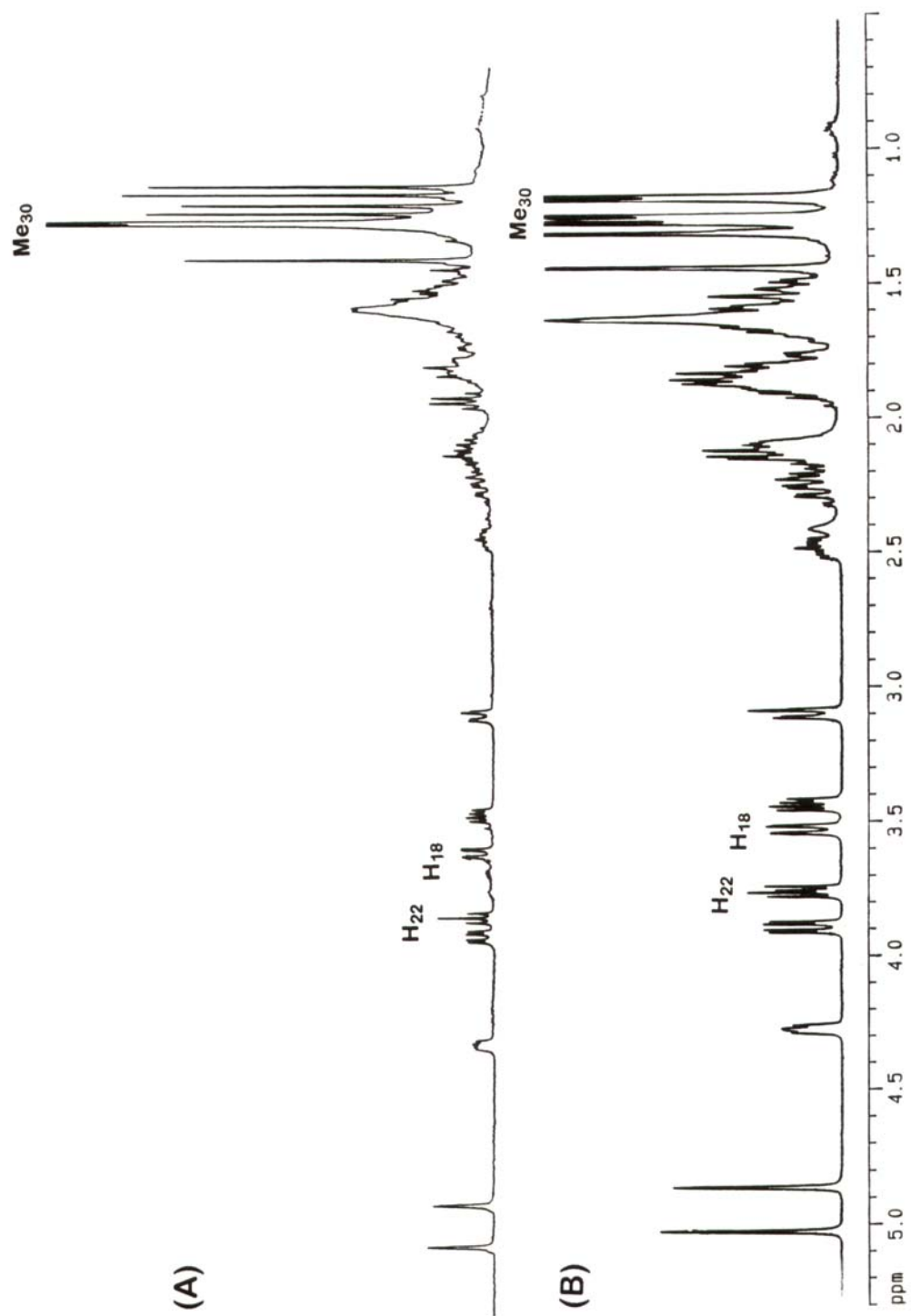


Figura 28. Comparación de los espectros de RMN ^1H del dehidrovenustatriol **62** (A) y del dehidrotirsiferol **51** (B).

La comparación de estos valores con los datos espectroscópicos del venustatriol **50** puso de manifiesto que el desplazamiento químico y los valores de las constantes de acoplamiento del metino H-22 en el compuesto **62**, coinciden plenamente con los de éste.²² A la luz de estos datos, podemos establecer que las diferencias con el dehidrotirsiferol **51** a las que hacíamos antes mención, deben localizarse a nivel de su estereoquímica en los carbonos C-18 y C-19, la cual fue determinada por experimentos ROESY.

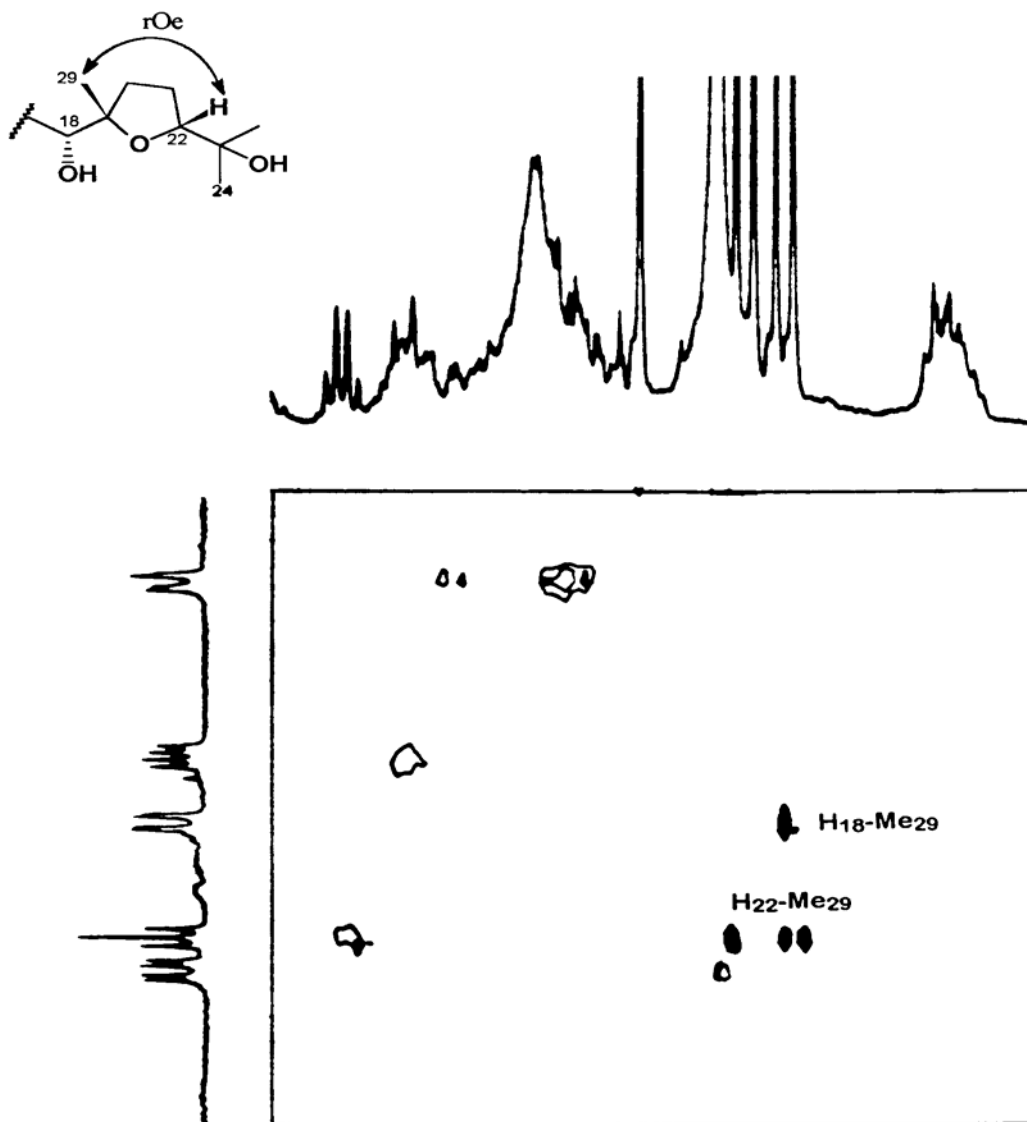
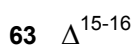
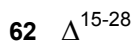
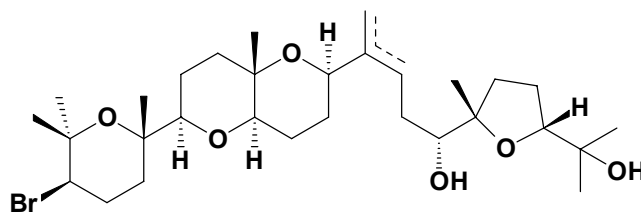


Figura 29

En efecto, para el compuesto **62** se observó que además de varias correlaciones tipo ROE completamente equivalentes a las del dehidrotirsiferol **51**, tales como las observadas entre la señal de protón H-3 (δ 3.90) y la del grupo metilo Me-1 (δ 1.27), y por otro lado, la del protón H-11 (δ 3.45) con los protones H-7 (δ 3.08)/H-14 (δ 4.30), este compuesto también presenta una correlación tipo ROE entre el protón del metino H-22 situado a δ 3.83 y el grupo metilo Me-29 (δ 1.16) (**Figura 29**). Esta correlación que no se observa en el compuesto **51**, confirma que la estereoquímica en los carbonos C-18 y C-19 deriva, tal y como ya comentamos a la vista de los valores de la constante de acoplamiento del metino H-22, del venustatriol **50**.



El compuesto **63**, el 15,16-dehidrovenustatriol, resultó ser un isómero del compuesto **62** en base a su espectro de masas de alta resolución, HRMS. Su estructura fue establecida como sigue: los espectros de RMN ^1H y ^{13}C mostraron que sus datos espectroscópicos muy similares a los del compuesto **62**, excepto por la ausencia de las señales de los protones H-28 y H-16 así como de los carbonos correspondientes a C-15 (δ 151.47), C-16 (δ 29.71) y C-28 (δ 110.64) (**Tabla 8**). En su lugar se observó que en este compuesto el doble enlace es trisustituido y se encuentra localizado entre los C-15/C-16, de acuerdo a los desplazamientos químicos observados en el espectro de RMN ^1H para H-16 (δ 5.42) y Me-28 (δ 1.73) y en el espectro de RMN ^{13}C para C-15 (δ 137.83), C-16 (δ 126.23) y C-28 (δ 18.73).

En cuanto a su configuración relativa, las correlaciones tipo ROE a las que hicimos alusión en la discusión del compuesto **62**, se repitieron en el espectro de este compuesto, por lo que concluimos que este caso se trata también de un derivado del venustatriol **50**.

Tabla 8. RMN ^1H y ^{13}C (CDCl_3) para los compuestos **62** y **63**.

n° C	Dehidrovenustatriol			15,16-Dehidrovenustatriol		
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	J (Hz)
1	31.41	1.27	s	31.02	1.27	s
2	75.36			74.96		
3	59.45	3.90	dd	59.01	3.89	dd
4	28.65	2.25		28.24	2.24	
		2.11			2.11	
5	37.47	1.73		37.05	1.81	
					1.54	
6	74.79			74.38		
7	87.07	3.08	dd	86.52	3.09	dd
8	23.35	1.75		22.68	1.76	
		1.48			1.44	
9	39.04	1.82		38.64	1.79	
		1.51			1.56	
10	73.36			72.22		
11	79.03	3.45	dd	76.44	3.66	dd
12	22.14	1.80		21.53	1.95	
		1.63			1.56	
13	26.51	2.06		24.17	2.08	
		1.83			1.60	
14	72.91	4.30	dd	67.35	4.77	dd
15	151.47			137.83		
16	29.71	2.43		126.23	5.42	dd
		2.20				
17	31.20	1.66		30.13	α 2.27	
		1.45			β 2.18	
18	76.90	3.59	dd	76.35	3.40	dd
19	86.69			85.31		
20	31.87	2.17		34.32	2.12	
		1.60			2.05	
21	27.26	1.92		26.49	1.85	
22	84.93	3.83	dd	86.89	3.76	dd
23	72.37			70.56		
24	25.73	1.13	s	23.64	1.14	s
25	24.06	1.40	s	22.98	1.41	s
26	20.02	1.20	s	20.06	1.21	s
27	20.49	1.23	s	21.26	1.23	s
28	110.64	5.04	s	18.73	1.73	s
		4.89	s			
29	24.06	1.16	s	22.28	1.18	s
30	27.97	1.26	s	27.63	1.22	s

Queda por determinar la geometría del doble enlace que en este caso se establece como Z. En efecto, la observación de la correlaciones tipo ROE del Me-28, con el protón vinílico H-16, junto con el valor del desplazamiento químico del metilo Me-28 (δ 18.73) en el espectro de carbono, apoyan esta geometría. En la **figura 30** se resumen las principales correlaciones tipo ROE para esta región, resaltándose, además de la mencionada con anterioridad, las correlaciones del metino H-14 con los protones H-11 y H-17 β , de H-16 con H-17 α y H-18, y por último de H-18 con H-16, H-17 α y Me-29.

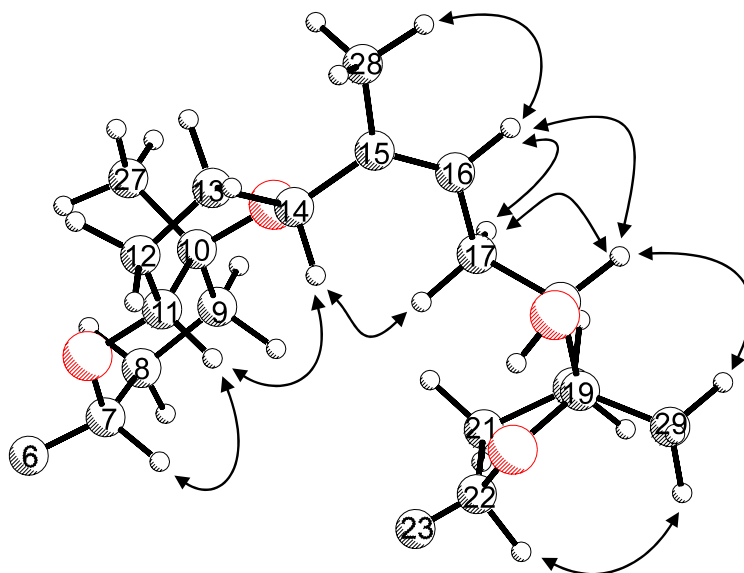


Figura 30

B.6. Acetato del Predehidrovenustatriol 64

Indudablemente, el metabolito aislado más interesante desde el punto de vista biogénico es el acetato del predehidrovenustatriol **64**. Fue aislado como un aceite incoloro, $[\alpha]_D^{25} = +20.6^\circ$ (c 0.33, CHCl_3), y su fórmula molecular fue establecida como $\text{C}_{32}\text{H}_{54}\text{O}_7$ por espectroscopía de masas de alta resolución (HRMS, obs. 548.37054; calc. 548.37130 $[\text{M}^+ - 2\text{H}]$). Las absorciones a 3691, 3456 y 1727 cm^{-1} en su espectro de IR indican la presencia de dos grupos hidroxilos y un grupo éster, respectivamente.

El espectro de RMN ^1H (**Figura 31**) revela la presencia de cinco grupos metilos en posición α a oxígenos situados a δ 1.25, 1.24, 1.19, 1.15 y 1.09, dos grupos metilos olefinicos a δ 1.67 y 1.61, y un grupo metilo de acetato a δ 2.07; cinco metinos oxigenados a δ 4.95 (dd, $J= 2.3, 10.0$ Hz), 4.15 (dd, $J= 5.5, 9.1$ Hz), 3.97 (dd, $J= 5.9, 9.0$ Hz), 3.81 (dd, $J= 6.9, 7.0$ Hz) y 3.45 (dd, $J= 2.0, 11.6$ Hz); y tres protones olefinicos a δ 5.10 (1H, t, $J= 7.0$ Hz) y 4.73 (2H, bs).

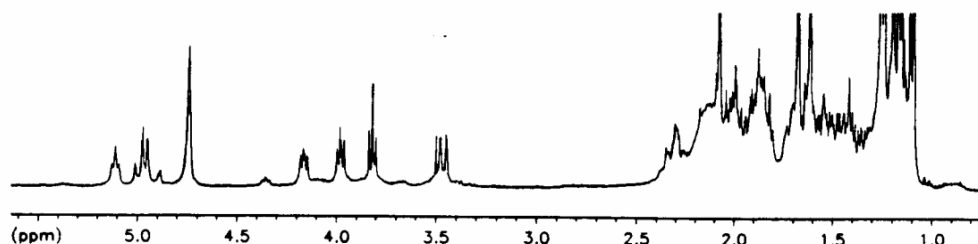


Figura 31

El espectro de RMN ^{13}C confirmó la presencia del grupo carboxilo tipo éster a δ 170.84, y también la de los ocho metilos, siete metilenos (uno de ellos olefinico), seis metinos y seis carbonos totalmente sustituidos (**Tabla 9**).

Otro dato importante a enfatizar, fue la ausencia del átomo de bromo en la posición C-3, característico de este tipo de metabolitos.

Los experimentos de RMN de dos dimensiones fueron cuidadosamente analizados, de forma que en el experimento de HMBC fue posible observar que los carbonos C-1 (δ 25.68) y C-25 (δ 17.65) presentan correlaciones con el protón olefinico H-3 (δ 5.10), indicando la ausencia del anillo de tetrahidropirano A presente en todos los metabolitos de esta serie aislados hasta la fecha. La posición del grupo acetato se fija sobre el carbono C-18 (δ 77.75) por correlación del protón H-18 (δ 4.95) con el carbono carboxílico (δ 170.84) y con el carbono del metilo C-29 (δ 22.17).

Estos datos fueron el soporte para el esqueleto carbonado propuesto para el compuesto **64**, y que se ve reforzado por las otras correlaciones observadas y que se resumen en la **figura 32**.

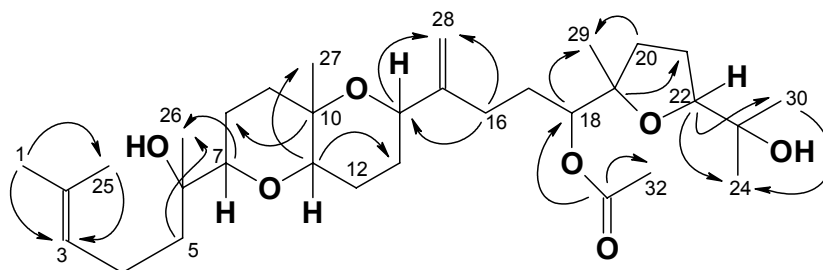
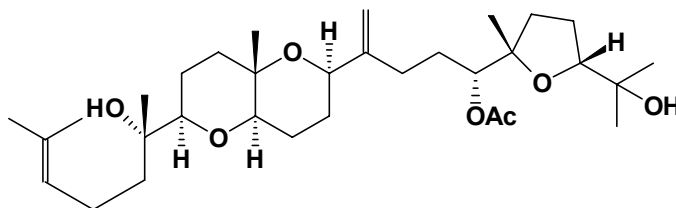


Figura 32

La estereoquímica relativa fue determinada principalmente a través de las correlaciones mostradas en los experimentos ROESY. Así, el protón H-11 (δ 3.97) pudo ser correlacionado con los protones H-7 (δ 3.45) y H-14 (δ 4.15), y por otro lado, el protón H-22 (δ 3.81) con el protón del metilo Me-29 (δ 1.19). En vista de los datos anteriores, fue propuesta para el compuesto **64**, una configuración relativa coincidente con la presente en el venustatriol **50**. En referencia a la estereoquímica del carbono C-6, al estar situado en una cadena y sujeto a libre rotación, nos fue imposible determinar su configuración relativa a través de experimentos de RMN por lo que a una muestra del dehidrovenustatriol **62**, se aciló de la manera habitual para dar el 18-monoacetato, que por posterior reacción con Zn en polvo en presencia de ácido acético dio un compuesto tricíclico idéntico en todos los aspectos al acetato del predehidrovenustatriol, por lo que proponemos que la estructura de este compuesto coincide con la dada como **64**.



64

Tabla 9. RMN ¹H y ¹³C para el acetato de predehidrovenustatriol **64**

n° C	δ ¹³ C	δ ¹ H	J (Hz)	n° C	δ ¹³ C	δ ¹ H	J (Hz)
1	25.68	1.67	s	17		1.91	
2	131.33					1.51	
3	124.79	5.10	dd	18	77.75	4.95	dd
4	27.96	2.11		19	84.01		2.3; 10.0
		1.71		20	34.81	1.87	
5	36.75	1.53				1.58	
		1.35		21	27.49	1.98	
6	73.33					1.63	
7	75.13	3.45	dd	22	85.39	3.81	dd
8		1.80		23	71.34		6.9; 7.0
		1.54		24	24.92	1.09	s
9				25	17.65	1.61	s
10	73.35			26	23.22	1.15	s
11	84.60	3.97	dd	27	24.31	1.25	s
12		1.89		28	109.42	4.73	bs
		1.67		29	22.17	1.19	s
13		1.93		30	27.89	1.24	s
		1.47		31	170.84		
14	79.16	4.15	dd	32	21.19	2.07	s
15	146.03						
16	28.32	2.32					
		2.16					

C. ORIGEN BIOGENÉTICO

Una vez que los nuevos derivados del escualeno han sido aislados y caracterizados, nos encontramos en disposición de pasar a considerar si éstos se ajustan o no a la propuesta biogenética establecida para este tipo de compuestos y que fue resumida en la introducción de este capítulo.

En esta hipótesis se propone que el origen de estos poliéteres pasa por la ciclación secuenciada de un intermedio común, un epoxiesqualeno (**Esquema 4**). Esta ciclación transcurre en dos pasos, una ciclación concertada de los tres epóxidos C-6/C-7, C-10/C-11 y C-14/C-15 inducida por la formación de un ión bromonio entre los carbonos C-2/C-3 y la que da lugar a la formación del anillo tetrahidrofuránico. Esto último permite explicar las dos series de compuestos, la del tirsiferol **43** y la del venustatriol **50**, así como la formación de los magireoles **47-49**.

En nuestro caso tenemos que todos los metabolitos aislados de *L. viridis*, pueden agruparse en estas dos series e incluso, la ruta biogenética general puede explicar la formación del anillo D tetrahidropiránico del isodehidrotirsiferol **56**, tal y como vimos en el **esquema 7**. Sin embargo, a la luz de la identificación del acetato de predehidrovenustatriol **64** como un derivado que presenta el anillo A abierto y con un doble enlace terminal en C-2/C-3; de la estereoquímica mostrada en el carbono C-10 en los isómeros del 10-epi-dehidrotirsiferol **60** y del 10-epi-15,16-dehidrotirsiferol **61**; y de la presencia en los tirsenoles A y B **58-59** de un agrupamiento enol-éter entre las posiciones C-13/C-14, consideramos que la propuesta biogenética clásica elaborada para la formación de estos poliéteres triterpénicos, debe ser puesta en cuestión. En efecto, el aislamiento del compuesto **64** parece indicar que no es necesaria la inducción del ión bromonio para que se produzca la ciclación. Asimismo, los cambios de estereoquímica observados en los sistemas ciclados de **60** y **61**, apoyan la posibilidad de que la ciclación no se produzca a través de un proceso concertado.

III. ESTUDIO FARMACOLÓGICO

III.1. INTRODUCCIÓN

Desde que a principios de este siglo, Paul Erlich pusiera las bases de la medicación con sustancias químicas, el auge de esta especialidad, hoy llamada quimioterapia, ha sido prodigioso. Se ha convertido en una de las técnicas más utilizadas por la medicina moderna para luchar contra las enfermedades. Durante estos cincuenta últimos años han sido descubiertos un gran número de medicamentos nuevos. Sin embargo, a pesar del incuestionable éxito de la quimioterapia se calcula que aproximadamente dos tercios de las enfermedades esperan todavía un tratamiento satisfactorio. Así ocurre en especial, con las numerosas formas de cáncer, las infecciones víricas o las enfermedades cardiovasculares. Además, si después del descubrimiento de los antibióticos modernos se pudo creer que el peligro de las infecciones bacterianas quedaba definitivamente eliminado, el desarrollo de cepas resistentes como consecuencia de una utilización abusiva de los mismos, modera fuertemente el entusiasmo inicial. La necesidad de medicamentos nuevos más específicos y mejor adaptados es sentida de forma imperiosa.

Las dos fuentes de moléculas nuevas, y por tanto de potenciales nuevos medicamentos, son la química orgánica y los organismos vivos. Hasta principios de este siglo los medicamentos eran extraídos únicamente de la naturaleza. Sin embargo, el desarrollo de la química orgánica hizo posible que las sustancias de síntesis proliferaran rápidamente y que el porcentaje relativo de los medicamentos de origen natural decreciera. Pero la estructura, a menudo inesperada, de la molécula natural sirve de punto de partida para la concepción y construcción de esqueletos moleculares originales que a menudo conducen a sustancias más activas y específicas.

El medio marino constituye una enorme fuente potencial de moléculas naturales nuevas. El interés que prestamos a los recursos bioquímicos de los océanos anuncia el nacimiento de un nuevo campo de investigación: la farmacología marina. La razón fundamental de tan tardía aparición podemos encontrarla en la dificultad que ha sido resuelta recientemente gracias tanto a los progresos realizados en las técnicas de prospección como en las técnicas espectroscópicas, que permiten analizar y determinar las estructuras de nuevos compuestos con muy poca cantidad de la muestra.

En base a todo ello, es evidente que una vez aislados los productos en nuestro estudio del alga, uno de los objetivos inmediatos fue la evaluación de su actividad farmacológica. Dentro de ésta, dado que el interés prioritario en los últimos años se orienta

hacia la obtención de sustancias con actividad antitumoral y antiviral, los ensayos farmacológicos realizados sobre todos los nuevos metabolitos aislados, se pueden clasificar en tres grandes grupos:

- a) evaluación de la actividad citotóxica
- b) determinación de la actividad inhibitoria enzimática *in vitro*
- c) medición de la actividad antiviral

Estos ensayos se llevaron a cabo en los laboratorios de la empresa Pharma Mar S.A. con la que mantenemos una importante colaboración.

III.2. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA

Los ensayos de actividad citotóxica se realizaron, utilizando una adaptación del método descrito por Bergeron y colaboradores,³¹ sobre cultivos *in vitro* de células tumorales de los siguientes tipos:

- Suspensión de células P-388 (ATCC CCL-46) de neoplasma linfoide de ratón DBA/2.
- Líneas de células A-549 (ATCC CCL-185) de carcinoma de pulmón humano.
- Líneas de células HT-29 (ATCC HTB-38) de carcinoma de colon humano.
- Líneas de células MEL-28 (ATCC HTB-72) de melanoma humano.

Estas células se mantuvieron en fase de crecimiento logarítmico, en un medio EMEM/nea, suplementado con un 5% de FCS (Fetal Calf Serum), bicarbonato sódico 10^{-2} M y en presencia de los antibióticos penicilina G (0.1 g/l) y sulfato de estreptomina (0.1 g/l). Los metabolitos a ensayar, se añadieron a los medios de cultivo disueltos en una

31. R.J. Bergeron, P.F. Cavanaugh, S.J. Kline, R.G. Hughes Jr., G.T. Elliott, C.W. Porter, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **1984**, 121(3), 848-854.

proporción de 1 mg/ml en una mezcla de metanol:acetona (1:1). Las células fueron sembradas en pocillos de 16 mm de diámetro a una concentración de 1×10^4 (P-388) y 2×10^4 (A-549, HT-29 y MEL-28) por pocillo, en alícuotas de 1 ml de medio EMEM 5%FCS, conteniendo los productos a evaluar a diferentes concentraciones. En cada caso y de forma separada, se realizó un cultivo sin adicionar ningún tipo de droga para poder utilizarlo como control, realizándose todas las determinaciones por duplicado. Después de tres días de incubación a 37° C, en una atmósfera con un 98 % de humedad y 10 % de CO₂, las líneas celulares fueron contadas con un Coulter Counter ZM. Todos los recuentos de células por pocillo, fueron promediados, para poder compararlos con los cultivos control. Los resultados de éstos fueron usados para generar la curvas de dosis-repuesta con las que determinar de forma precisa los valores IC₅₀ (concentración de muestra a la que se produce la inhibición del 50 % de crecimiento celular).

Los resultados de estos ensayos de citotoxicidad quedan resumidos en las **tablas 10** y **11**. En la tabla 10 se recogen los valores de IC₅₀ para los derivados del escualeno, observándose que presentan potentes actividades.³² En la tabla 11, se resumen de igual manera los valores de IC₅₀ de los derivados con esqueleto de ciclofitano, que aunque son notablemente más bajos que en el caso de los compuestos anteriores, reflejan una actividad considerable.

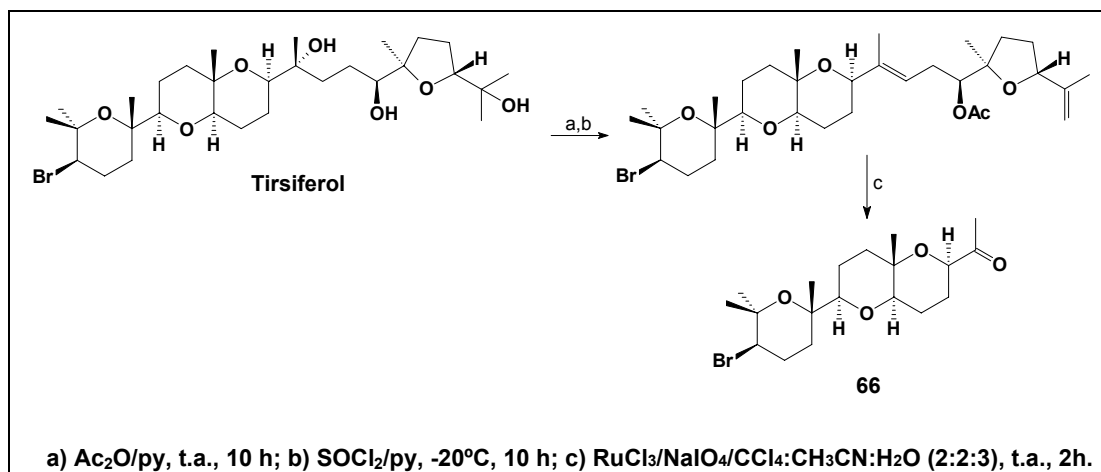
A. ANÁLISIS DE POSIBLES RELACIONES ESTRUCTURA-ACTIVIDAD

A la vista de los resultados farmacológicos expuestos en la tabla 10, dos hechos principales llaman en gran medida nuestra atención. En primer lugar, destaca la potente y altamente selectiva citotoxicidad mostrada por los metabolitos: dehidrotirsiferol **51**, isodehidrotirsiferol **56**, dehidrovenustatriol **62** y tirsenol B **59** frente a células P-388 de leucemia linfocítica de ratón. Y en segundo lugar, observamos que los pares de compuestos, el tirsenol A **58** y tirsenol B **59**, o el dehidrotirsiferol **51** y 10-epidehidrotirsiferol **60**, cuyas diferencias estructurales consisten solamente en el cambio en la configuración de un carbono, presentan unos valores de IC₅₀ muy diferentes.

32. M. Norte, J.J. Fernández, M.L. Souto, Pharma Mar S.A., "New Antitumoral Macrolides from *Laurencia viridis*". British Patent Application No. 9518326.5, September 1995.

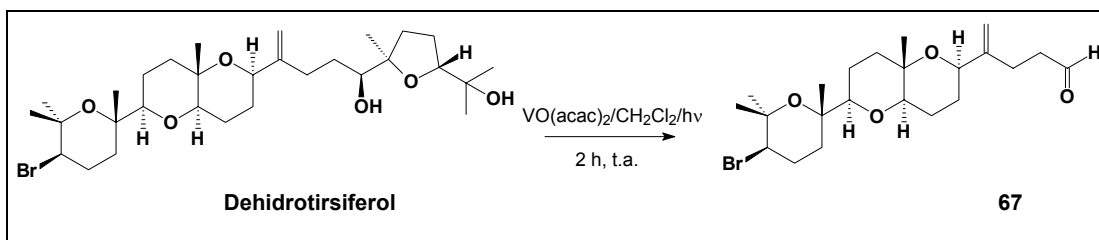
Estos resultados, nos indujeron a considerar que era interesante establecer posibles relaciones estructura-actividad de este grupo de moléculas. Para ello, por un lado comparamos las estructuras de los distintos compuestos aislados de fuente natural, y por otro, a fin de clarificar mejor esta dependencia estructural, realizamos también unas “simplificaciones moleculares” consistentes, en un primer caso, en la ruptura oxidativa del enlace C15-C16, y en un segundo caso, del enlace C18-C19.

La secuencia de reacciones para el caso primero se resume en el **esquema 8**, utilizándose como producto de partida el tirsiferol **43**. Este fue tratado con anhídrido acético en piridina a temperatura ambiente durante 10 horas, para obtener el correspondiente acetato en C-18. El paso siguiente consistió en el tratamiento con cloruro de tionilo y piridina a -20°C , que nos condujo mayoritariamente al compuesto doblemente deshidratado. El paso final fue la oxidación de éste con RuCl_3 y NaIO_4 , utilizando como disolvente la mezcla $\text{CCl}_4:\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ en las proporciones 2:2:3, obteniéndose la cetona **66**.



Esquema 8

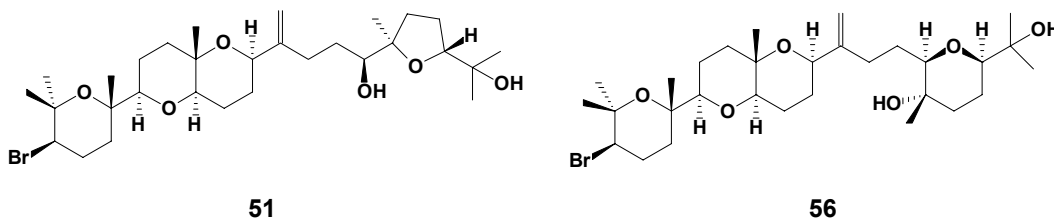
Para la segunda fragmentación, entre los enlaces C18-C19 (**Esquema 9**), partimos del dehidrotirsiferol **51**, el cual se sometió a una reacción de foto-oxigenación en presencia de cantidades catalíticas de $\text{VO}(\text{acac})_2$, obteniendo de forma mayoritaria el aldehído **67**. Estos compuestos fueron evaluados de igual forma que los metabolitos de origen natural y los resultados se resumen en la **tabla 12**.



Esquema 9

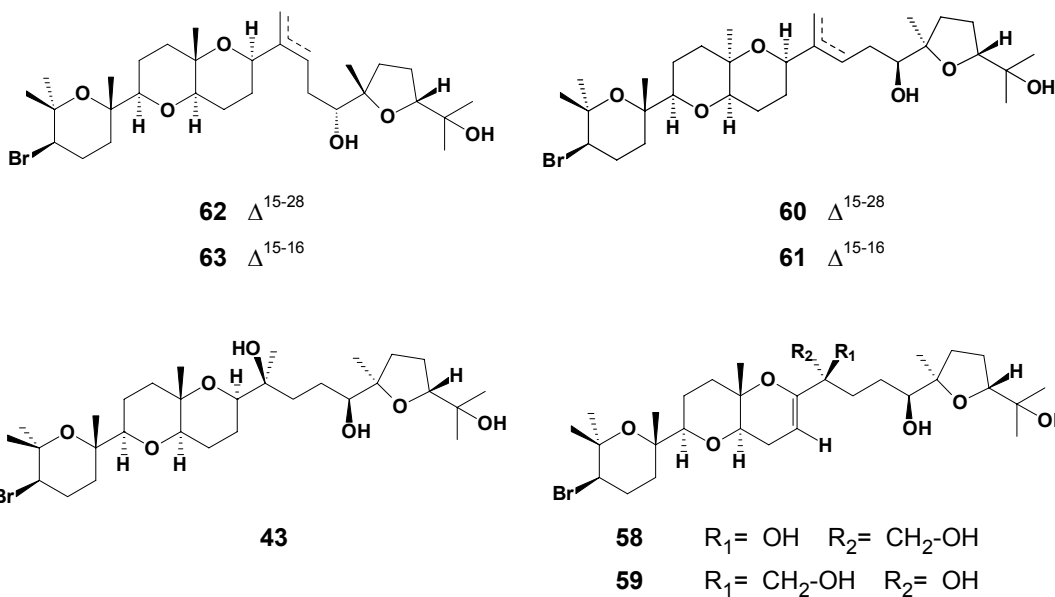
Un simple análisis de la relación entre las estructuras químicas de estos compuestos y sus actividades, nos llevan a constatar los siguientes hechos:

a) El cambio de un anillo de tetrahydrofurano por uno de tetrahydropirano entre el par de compuestos dehidrotirsiferol **51** e isodehidrotirsiferol **56**, no afecta a sus actividades como antileucémicos.

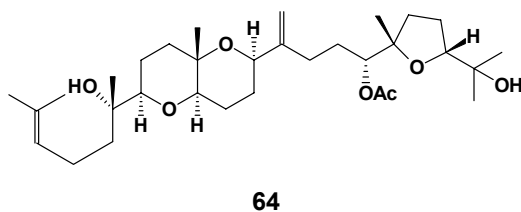


b) Al comparar el dehidrotirsiferol **51** con el dehidrovenustatriol **62**, observamos que ambos poseen la misma actividad aunque presenten diferencia en la estereoquímica de los centros C-18 y C-19.

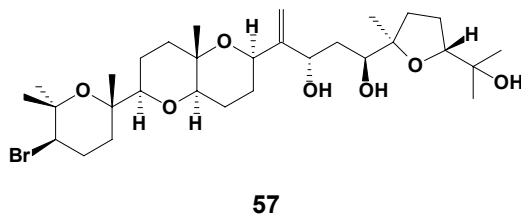
c) La isomerización del doble enlace presente en los compuestos dehidrovenustatriol **62** y 15,16-dehidrovenustatriol **63**, hace que el primer compuesto sea veinticinco veces más activo que el segundo. Sin embargo, una isomerización del mismo tipo pero con diferente geometría en el doble enlace trisustituido, provoca efectos totalmente opuestos en el par de compuestos 10-epidehidrotirsiferol **60** y 10-epi-15,16-dehidrotirsiferol **61**, siendo el primero la mitad de activo que el segundo. La hidratación de la insaturación entre C-15 y C-28 por un grupo hidroxilo, tal y como sucede al comparar el par de compuestos dehidrotirsiferol **51** y tirsiferol **43**, o su oxidación a un sistema de diol en el tirsenol B **59**, no afecta para nada sus actividades, mostrándose los tres igual de potentes.



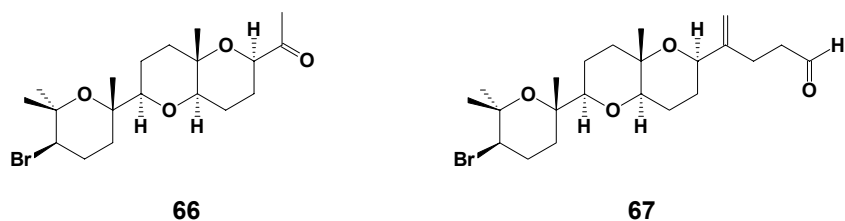
d) El acetato de predehidrovenustatriol **64**, en el que desaparece el sistema de bromodihidropirano del anillo A, presenta una citotoxicidad bastante menor que el resto de los compuestos de la serie.



e) La introducción de un grupo hidroxilo en la posición C-16, como sucede en el 16-hidroxidehidrotirsiferol **57** lo convierte en un derivado 50 veces menos potente en comparación con el dehidrotirsiferol **51**.



f) Por último, el compuesto obtenido como consecuencia de la fragmentación oxidativa de la cadena en el enlace entre los carbonos C-15 y C-16, la cetona **66**, o en el enlace C18-C19, el aldehído **67**, son mucho menos potentes. Además, ambos muestran una importante disminución con respecto al grado de selectividad que presentaban sus compuestos de partida frente a células de leucemia P-388.



B. ESTUDIO CONFORMACIONAL

Este conjunto de apreciaciones, donde pequeños cambios químicos dentro de la estructura de la molécula condicionan tremendamente la potencia citotóxica, nos sugirió que una gran parte de la explicación a estos hechos podría estar relacionada con las distintas conformaciones de los análogos, situación que frecuentemente ha sido asociada a fuertes cambios de actividades.

Así, como disponíamos en todos los casos de detallados datos espectroscópicos, nos decidimos a abordar un estudio conformacional que nos permitiera encontrar una explicación lógica a estas grandes variaciones observadas en la actividad. Este estudio se llevó a cabo haciendo uso de cálculos de mecánica molecular a través del programa Macromodel versión 4.0 utilizando un campo de fuerza MM2*.³³ Se realizó una búsqueda conformacional de 1000 estructuras con un rango de energía de 50 KJ/mol, por el método Monte Carlo y el algoritmo de Newton-Raphson, aplicándose las restricciones observadas en los experimentos de RMN. Para correlaciones tipo ROE y NOE intensas se impuso una restricción de 2-4 Å. Así, las correlaciones observadas entre los hidrógenos H-7 y H-11, H-11 y H-14, como también la observada en algunos casos entre H-11 y Me-27, nos permiten fijar las conformaciones de los anillos B y C en todos los metabolitos de la serie. Otras restricciones importantes son las ofrecidas por las correlaciones observadas para los

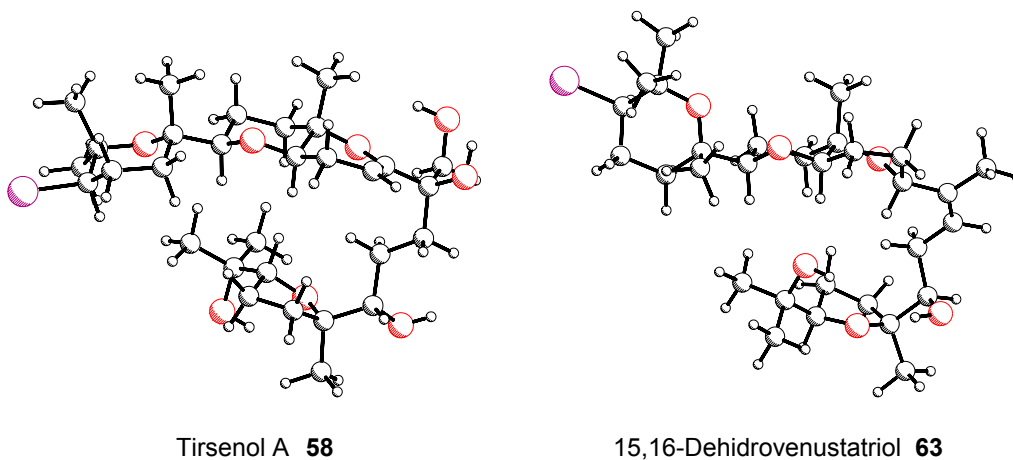
33. D.K. Chalmers, G.R. Marshall, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117*, 5927-5937.

hidrógenos H-16 y H-17 en algunos metabolitos, pero sin lugar a dudas, las más importantes son las derivadas de las correlaciones observadas para H-13, H-18 y H-28, que fijan, en la mayoría de los casos, la disposición espacial que adoptará la cadena carbonada entre los carbonos C-14 y C-19.

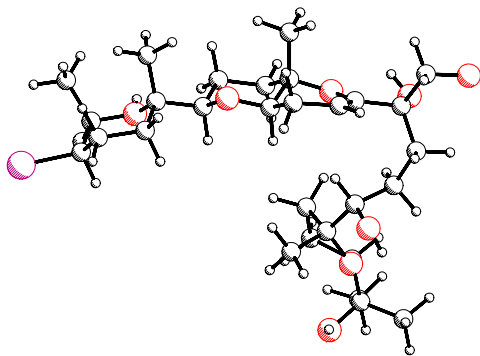
Como resultado de este estudio, obtuvimos una serie de mínimos conformacionales en los cuales podemos apreciar que sus átomos adoptan una variada disposición espacial, destacando en sobremanera, los cambios de orientación dependiendo del metabolito que presenta la cadena flexible entre los carbonos C-14 y C-19.

Llegados a este punto, nuestro primer objetivo fue, con estos datos, el intentar buscar una explicación a los hechos que fueron enumerados anteriormente. Tomamos entonces la decisión de agrupar los metabolitos siguiendo como criterio principal, la disposición en el espacio que adopte la cadena carbonada flexible, asociándola a los valores de IC_{50} que muestre cada uno. Así obtuvimos, los diferentes grupos que a continuación exponemos.

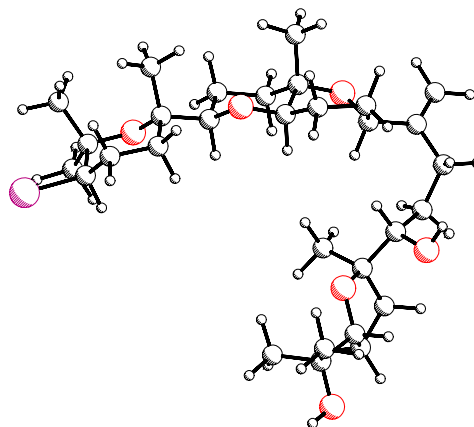
Primer grupo, formado por el tirsenol A **58** y el 15,16-dehidrovenustatriol **63**, que presenta un plegamiento de la cadena muy fuerte en la cara α de la molécula, y muestra un $IC_{50} = 0.25 \mu\text{g/ml}$.



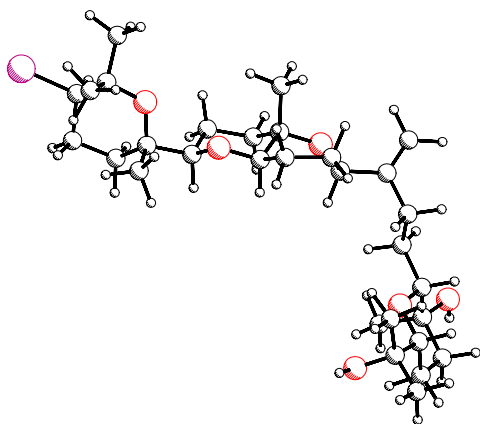
Segundo, otro grupo compuesto por tirsenol B **59**, dehidrotirsiferol **51**, isodehidrotirsiferol **56** y dehidrovenustatriol **62**, cuyos metabolitos adoptan un plegamiento también por la cara α tremendamente parecido, y todos ellos presentan un $IC_{50} = 0.01 \mu\text{g/ml}$.



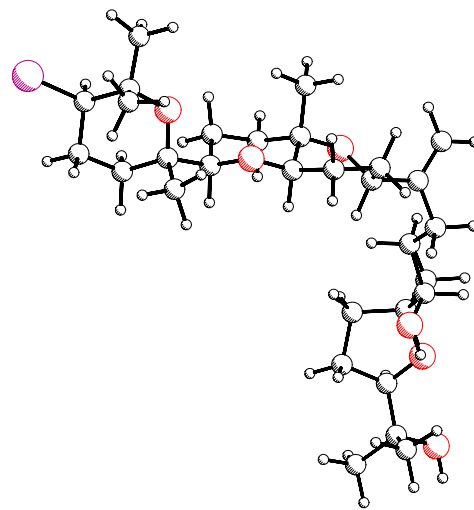
Tirsenol B **59**



Dehidrotirsiferol **51**

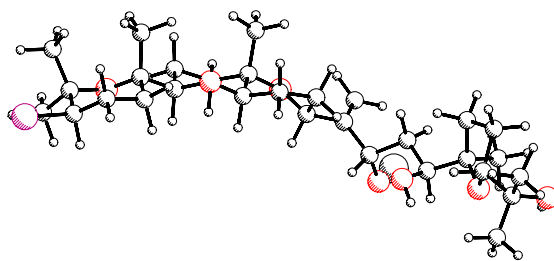


Isodehidrotirsiferol **56**

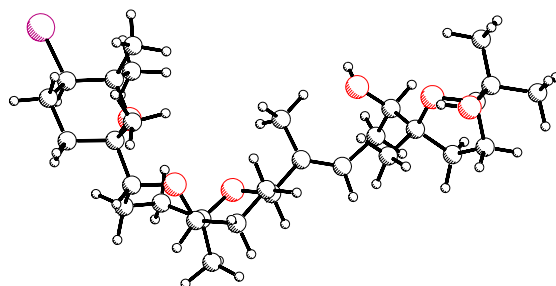


Dehidrovenustatriol **62**

El tercer grupo está formado por el 16-hidroxidehidrotirsiferol **57** y el 10-epi-15,16-dehidrotirsiferol **61**, que muestra una posición extendida de la cadena y presentan un $IC_{50} = 0.50 \mu\text{g/ml}$.

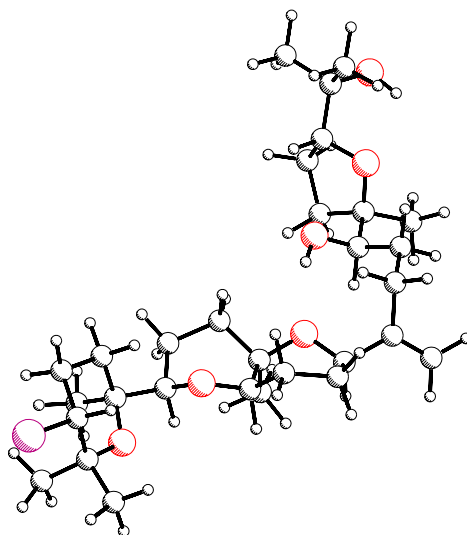


16-Hidroxidehidrotirsiferol **57**



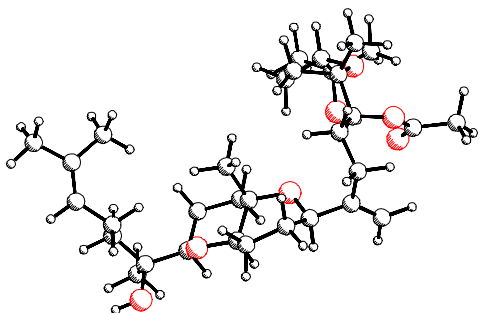
10-Epi-15,16-dehidrotirsiferol **61**

Un cuarto grupo formado por el 10-epidehidrotirsiferol **60**, en el que el plegamiento es en el mismo grado que en el grupo del dehidrotirsiferol, pero por la cara β de la molécula, y que le corresponde un $IC_{50} = 1 \mu\text{g/ml}$.

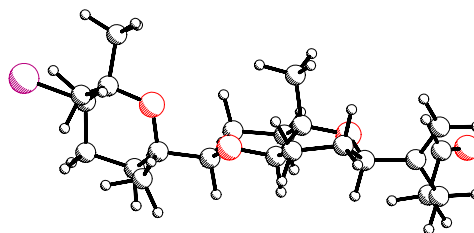


10-Epidehidrotirsiferol **60**

Por último, un grupo compuesto por el acetato de predehidrovenustatriol **64** y el aldehído **67**, donde como se puede observar, el plegamiento es muy diferente del resto y presentan $IC_{50} = 1.2 \mu\text{g/ml}$ y $1.0 \mu\text{g/ml}$, respectivamente.



Acetato de predehidrovenustatriol **64**



Aldehído **67**

En función de estos resultados, llegamos a establecer que el plegamiento y la orientación de la cadena carbonada entre los carbonos C-14 y C-19 es uno de los factores que condicionan la potencia de la actividad de estos metabolitos, pudiendo llegar a explicar de forma razonada, con los datos del análisis conformacional, cada una de las apreciaciones que hacíamos en un principio. Así, observamos que los compuestos que varían en un centro quiral y tienen valores de IC_{50} diferentes, adoptan conformaciones espaciales también muy diferentes. Los metabolitos que no alteran su potencia relativa ya sea al variar la quiralidad de los carbonos C-18 y C-22, o bien, al sustituir un anillo de tetrahidropirano por uno de tetrahidrofurano, podemos comprobar que el plegamiento de sus cadenas es idéntico. Si analizamos los cambios que produce en el plegamiento, la isomerización del doble enlace entre los carbonos C-15/C-28 y C-15/C-16, hallamos una justificación razonable a las diferencias y efectos contrapuestos encontrados en un principio. Cuando ésta induce a un plegamiento hacia la configuración que consideramos la más activa, mostrada en el grupo donde se encuadra el dehidrotirsiferol **51**, aumenta la potencia, mientras que cuando se aleja de esta posición la potencia va disminuyendo. En el 10-epi-15,16-dehidrotirsiferol **61** y en el 10-epidehidrotirsiferol **60**, la presencia de un cierre cis en los anillos B y C implica que la conformación de ambos sea de bote, lo que condiciona una posición extendida de la cadena en el compuesto **61**, mientras que en el **60**, un plegamiento en el sentido de la cara β de la molécula, es decir, en el sentido contrario a los metabolitos que presentan mayor actividad. Para finalizar tanto el acetato de predehidrovenustatriol **64** como el aldehído **67** dan unas conformaciones muy diferentes a las anteriores y que permiten explicar la baja potencia, y pérdida de selectividad respectivamente.

Como conclusión podemos reafirmar que el plegamiento y orientación que adopta la cadena carbonada entre los carbonos C-14/C-19 condiciona en gran medida la potencia de la actividad citotóxica frente a células de leucemia de ratón P-388, de estos metabolitos aislados de *Laurencia viridis*. Asimismo, que los metabolitos más potentes con un valor de $IC_{50}=0.01 \mu\text{g/ml}$, como son el dehidrotirsiferol **51**, isodehidrotirsiferol **56**, dehidrovenustatriol **62** y tirsenol B **59** presentan un plegamiento de la cadena muy similar, pudiéndola considerar en nuestro caso como la “conformación más activa”. A medida que la orientación de la cadena se desvía, en ambos sentidos, la potencia citotóxica va disminuyendo progresivamente hasta llegar al 10-epidehidrotirsiferol **60**, el metabolito menos activo de la serie cuyo plegamiento es en sentido contrario al de los compuestos como el dehidrotirsiferol, que son 100 veces más potentes.

III.3. ACTIVIDAD INHIBITORIA ENZIMÁTICA *IN VITRO*

Las células cancerosas que se dividen aceleradamente requieren un aporte continuado de desoxirribonucleótidos para llevar a cabo la biosíntesis de DNA. Por ello son altamente susceptibles a los agentes que inhiben la formación de desoxirribonucleótidos así como a los que afectan a la replicación de la información genética en la biosíntesis de DNA, RNA y formación de proteínas.

Por otro lado, el genoma vírico utiliza la maquinaria enzimática celular para la síntesis de nuevas partículas. Por lo tanto, todas aquellas sustancias que posean actividad inhibitoria sobre enzimas que se utilizan en la replicación del DNA, como DNA polimerasas, tienen también un uso potencial como medicamento antiviral.

En base a todo esto, con los metabolitos de *L. viridis* se realizaron una serie de ensayos encaminados a evaluar su capacidad citotóxica y antiviral midiendo la actividad inhibitoria *in vitro* de la síntesis de proteínas, DNA y RNA en cultivos de células P-388 de leucemia linfocítica de ratón³⁴ así como con las siguientes enzimas:

- Timidilato sintetasa (TS)³⁵
- Dihidrofolato reductasa (DHFR)³⁶
- DNA Topoisomerasa I

34. F. Tomita, K. Takahashi, T. Tamaoki, *J. Antibiotics*, **1984**, *37(10)*, 1268-1272.

35. R.B. Dunlap, N.G.L. Harding, F.M. Huennekens, *Biochemistry*, **1971**, *10(1)*, 88-97.

36. D.P. Baccanari, S. Daluge, R.W. King, *Biochemistry*, **1982**, *21*, 5068-5075.

- DNA Topoisomerasa II³⁷
- DNA polimerasas
- RNA polimerasas³⁸

De forma simultánea, al haber firmado la empresa Pharma Mar S.A., un proyecto de trabajo con la fundación ONCE, también fueron evaluadas sus actividades inhibitorias frente a:

- Acetilcolinesterasa (ACHE)
- Aldosa reductasa (AR)³⁹

Estas son enzimas que cuyo control podría ser interesante para al tratamiento del glaucoma y de la retinopatía diabética, respectivamente.

En estos ensayos se observó que los derivados del escualeno presentaban nula actividad inhibitoria (**Tablas 13-14**), mientras que en el caso de los viridiales (**Tablas 15-16**), destacó la actividad que el viridiol A **41** mostró frente a la síntesis de RNA, a concentraciones de 3 µg/ml, con cultivos de células P-388 de leucemia linfocítica de ratón.

III.4. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL

Los primeros ensayos de evaluación de la actividad antiviral de estos compuestos, se realizaron infectando células CV-1 de riñón de ratón con virus HVS (Herpes simplex tipo 1) y células BHK de riñón de cría de hámster con virus VSV (virus de la estomatitis vesicular). En ellos, los únicos metabolitos testados fueron el dehidrotirsiferol **51** y la cetona **66**, siendo la actividad descrita en ambos casos prácticamente nula.

Con posterioridad, se realizaron ensayos en células CEM infectadas con el virus HIV (virus que produce inmunodeficiencia humana). Los resultados de este análisis, recogidos en las **tablas 17 y 18**, tampoco fueron significativos por lo que podemos concluir que ninguno de estos metabolitos presenta una manifiesta actividad antiviral.

37. Y-H. Hsiang, R. Hertzberg, S. Hecht, L.F. Liu, *J. Biol. Chem.*, **1985**, 260(27), 14873-14878.

38. S. Spadari, G. Pedrali-Noy, F. Foher, A. Montecucco, T. Bordoni, C. Geroni, F.C. Giuliani, G. Ventrella, F. Arcamone, G. Ciarrocchi, *Anticancer Research*, **1986**, 6, 935-940.

39. a) Ch. Nishimura, T. Yamaoka, M. Mizutani, K. Yamashita, T. Akera, T. Tanimoto, *Biochim. Biophys. Acta*, **1991**, 1078, 171-178; b) H. Rink, C. Baumstark-Khan, "Manual of Oculotoxicity". Eds. O. Hockwin, K. Green, L.F. Rubin, *Gustav Fisher Verlag, Stuttgart, Germana*, **1992**, pp. 389-401.

n°	Compuestos	IC ₅₀							
		P388		A549		HT29		MEL28	
		µg/ml	µM	µg/ml	µM	µg/ml	µM	µg/ml	µM
43	Tirsiferol	0.01	0.016	10.0	16.53	10.0	16.53		
51	Dehidrotirsiferol	0.01	0.017	2.5	4.26	2.5	4.26	5	8.52
56	Isodehidrotirsiferol	0.01	0.017	2.5	4.26	2.5	4.26	2.5	4.26
57	16-Hidroxidehidrotirsiferol	0.50	0.83	1.2	1.99	1.2	1.99	1.2	1.99
58	Tirsinol A	0.25	0.40	>1.0	>1.62	>1.0	>1.62	>1.0	>1.62
59	Tirsinol B	0.01	0.016	>1.0	>1.62	>1.0	>1.62	>1.0	>1.62
60	10-Epidehidrotirsiferol	1.0	1.70	5.0	8.52	5.0	8.52	5.0	8.52
61	10-Epi-15,16-dehidrotirsiferol	0.5	0.85	2.5	4.26	1.2	2.04	2.5	4.26
62	Dehidrovenustatriol	0.01	0.017	2.5	4.26	2.5	4.26	2.5	4.26
63	15,16-Dehidrovenustatriol	0.25	0.43	2.5	4.26	2.5	4.26	2.5	4.26
64	Acetato Predehidrovenustatriol	1.2	2.18	2.5	4.54	5.0	9.09	2.5	4.54

Tabla 10. Valores de IC₅₀ correspondientes a los triterpenos aislados de *Laurencia viridis*.

Compuestos	IC ₅₀							
	P388		A549		HT29		MEL28	
	μg/ml	μM	μg/ml	μM	μg/ml	μM	μg/ml	μM
41 Viridiol A	1	3.22	2.5	8.06	2.5	8.06	2.5	8.06
42 Viridiol B	1	3.20	2.5	8.01	2.5	8.01	2.5	8.01

Tabla 11. Valores de IC₅₀ correspondientes a los diterpenos aislados de *Laurencia viridis*.

Compuestos	IC ₅₀							
	P388		A549		HT29		MEL28	
	μg/ml	μM	μg/ml	μM	μg/ml	μM	μg/ml	μM
66 cetona	2.0	4.96	2.0	4.96	2.0	4.96	1.0	2.26
67 aldehído	1.0	2.26	1.0	2.26	1.0	2.26	1.0	2.26

Tabla 12. Valores de IC₅₀ correspondientes a las simplificaciones moleculares.

n°	Compuestos	Proyecto ONCE					IC ₅₀ P388	
		AR	ACHE	Prot µg/ml	RNA µg/ml	DNA µg/ml		
51	Dehidrotirsiferol	-	-	-	-	>10		
56	Isodehidrotirsiferol	-	-	-	-	>10		
57	16-Hidroxidehidrotirsiferol	-	-	-	>10	8		
58	Tirsenol A	-	-	>10	>10			
59	Tirsenol B	-	-	>10	>10			
60	10-Epidehidrotirsiferol	-	-	-	-			
61	10-Epi-15,16-dehidrotirsiferol	-	-	-	-	>10		
62	Dehidrovenustatriol	-	-	7	10	>10		
63	15,16-Dehidrovenustatriol	-	-	>10	>10	>10		
64	Acetato Predehidrovenustatriol	-	-	-	-	-		
67	aldehído	-	-	-	-	-		

Tabla 13. Resultados de los ensayos de Inhibición enzimática de los triterpenos aislados de *Laurencia viridis*.

n°	Compuestos						
		DHFR	TS	DNA pol.	RNA pol.	TOPO I	TOPO II
51	Dehidrotirsiferol	-	-	-	-	-	-
56	Isodehidrotirsiferol	-	-	-	-	-	-
57	16-Hidroxidehidrotirsiferol	-	-	-	-	-	-
58	Tirsenol A	-	-	-	-	-	-
59	Tirsenol B	-	-	-	-	-	-
60	10-Epidehidrotirsiferol	-	-	-	-	-	-
61	10-Epi-15,16-dehidrotirsiferol	-	-	-	-	-	-
62	Dehidrovenustatriol	-	-	-	-	-	-
63	15,16-Dehidrovenustatriol	-	-	-	-	-	-
64	Acetato Predehidrovenustatriol	-	-	-	-	-	-
67	aldehído	-	-	-	-	-	-

Tabla 14. Resultados de los ensayos de Inhibición enzimática de los triterpenos aislados de *Laurencia viridis*.

Compuestos	Proyecto ONCE			IC ₅₀ P388		
	AR	ACHE	Prot μg/ml	DNA μg/ml	RNA μg/ml	
41 Viridiol A	-		10	10	3	
42 Viridiol B	-		>10	10	8	

Tabla 15. Resultados de los ensayos de Inhibición enzimática de los diterpenos aislados de *Laurencia viridis*.

Compuestos	DHFR	TS	DNA pol.	RNA pol.	TOPO	
					I	II
41 Viridiol A					-	-
42 Viridiol B					-	-

Tabla 16. Resultados de los ensayos de Inhibición enzimática de los diterpenos aislados de *Laurencia viridis*

Compuestos		Actividad antiviral frente a HIV			
n°	Concentración µg/ml	Celulas CEM % Citotoxicidad	Antiviral % Inhibición		
56	Isodehidrotirsiferol	5	100	0	
		0.5	0	0	
		0.05	0	0	
		0.005	4	1	
57	16-Hidroxidehidrotirsiferol	3	100	3	
		0.3	0	2	
		0.03	0	0	
		0.003	4	0	
61	10-Epi-15,16-dehidrotirsiferol	3	0	0	
		0.3	0	0	
		0.03	0	4	
		0.003	0	0	
64	Acetato Predehidrovenustatriol	3	13	0	
		0.	0	0	
		0.03	0	0	
		0.003	4	7	
67	aldehído	3	100	0	
		0.3	0	0	
		0.03	0	0	
		0.003	1	0	

Tabla 17. Resultados de los ensayos de actividad antiviral frente a HIV de algunos triterpenos seleccionados de *Laurencia viridis*

Actividad antiviral frente a HIV				
Compuestos		Concentración	Celulas CEM	Antiviral
n°		µg/ml	% Citotoxicidad	% Inhibición
41	Viridiol A	3	0	0
		0.3	2	4
		0.03	2	0
		0.003	3	0
42	Viridiol B	3	0	1
		0.3	1	1
		0.03	0	2
		0.003	0	2

Tabla 18. Resultados de los ensayos de actividad antiviral frente a HIV de los diterpenos aislados de *Laurencia viridis*

IV. PARTE EXPERIMENTAL

IV.1. TÉCNICAS EXPERIMENTALES

Resonancia Magnética Nuclear

Para la realización de los experimentos de RMN, los productos fueron disueltos en CDCl_3 o Piridina deuterada, usando TMS como referencia interna. Dichos espectros, tanto de ^1H como de ^{13}C , fueron realizados en espectrómetros BRUKER[®] AC 200 o AMX 400 MHz, según las necesidades. Se utilizaron los programas COSY, COSY DQF, NOESY, ROESY, DEPT, HMBC, HMQC y HMQC-TOCSY los cuales fueron suministrados por la casa BRUKER[®]. Los datos de adquisición obtenidos en el espectrómetro BRUKER[®] AMX 400 fueron procesados en un PC utilizando el programa WIN-NMR de BRUKER[®] versión 931115, empleando funciones de tipo exponencial y gaussiana de ventana.

Mecánica Molecular

Para la realización de los cálculos de mecánica molecular utilizando un campo de fuerza MM2*, se empleó el programa MACROMODEL versión 4.0 en un ordenador IBM RISC SYSTEM/6000 modelo 360. Se realizó una búsqueda conformacional de 1000 estructuras con un rango de energía de 50 KJ/mol, por el método Monte Carlo y el algoritmo de Newton-Raphson.

Infrarrojo

Los espectros de IR fueron realizados usando el producto en disolución de cloroformo seco, en células de NaCl de 0.1 mm. Se utilizó un espectrofotómetro BRUKER[®], modelo IFS 55 (F.T.I.R.).

Masas

Los espectros de masas de baja y alta resolución fueron realizados en un espectrómetro VG MICROMASS[®] modelo ZAB-2F.

F.A.B. (Bombardeo con Átomos Acelerados): Se utilizó un espectrómetro de masas KRATOS[®], modelo MS 80 RFA. Las muestras se introdujeron mediante sonda de sólidos calentada de 30 a 280° C. La temperatura de la fuente de ionización se fijó entre 150-250° C según la experiencia realizada. Como gas se usó el Xenón. Como matriz se usó *m*-nitrobenzol que se salinizó con NaI.

Rotación óptica

La determinación de las actividades ópticas se realizaron en un polarímetro PEKIN-ELMER[®], modelo 241, a 25° C, usando la línea D del sodio y en disolución de cloroformo seco con células de 1 dm.

Puntos de fusión

Los puntos de fusión fueron determinados en un aparato BUCHI[®], modelo 535, y están sin corregir.

Cromatografía en columnas

Las cromatografías de los productos en columna fueron realizadas sobre gel de sílice 60 tipos G y H, de diferentes tamizados, de la casa MERCK[®]. La preparación de las columnas se realizó por dos procedimientos:

a) Aplicando vacío por el extremo inferior de la columna, se vierte la gel en su interior al tiempo que se somete a vibración. Luego se añade la mezcla de elución hasta que humedezca totalmente el lecho. Cuando se ha eliminado todo el aire de la sílice, se adiciona la mezcla a separar, ya sea disuelta en el mismo eluyente o bien impregnada en gel de sílice de tamizado superior al utilizado para formar el lecho. La relación de peso del producto/ peso de gel de sílice, fue siempre como mínimo, de 1/100.

b) Se forma una papilla con la gel de sílice y el eluyente a utilizar. Una vez formada una mezcla homogénea, se vierte en la columna y se deja depositar por gravedad. A continuación se aplica presión con bomba de émbolo, de la casa FLUID METERING[®], modelo RP-SY. En este procedimiento, la relación peso de mezcla de productos/ peso de gel de sílice, fue siempre, como mínimo de 1/200.

En los últimos estadios del aislamiento la cromatografía se realizó en columnas pre-empaquetadas LOBAR[®] GRÖBE B (310-25)- LICHROPREP RP 18 (40-63 μ m) de la casa MERCK[®], y bombas de media presión.

Cromatografía HPLC

En este tipo de cromatografía se utilizó un sistema de HPLC compuesto por una bomba HPLC LKB[®], modelo 2248, columnas μ -Bondapak C-18 (D.I. 1.9 cm; longitud 15 cm) para la cromatografía en fase reversa, μ -Porasil (D.I. 1.9 cm; longitud 15 cm) y

Spherisorb (D.I. 0.65 cm; longitud 30 cm) y un detector de fotodiodo 2MD RAPID SPECTRAL, LKB®.

Cromatografía de gel-filtración

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

IV.2. RECOLECCIÓN Y EXTRACCION DEL ALGA *LAURENCIA VIRIDIS*

El alga fue recolectada en Callao Salvaje (Adeje), al Sur de la isla de Tenerife, entre los meses de Abril y Mayo, época en la que alcanza su máximo crecimiento y tras la cual desaparece. La recolección se realizó a mano durante la bajamar, se dejó secar al aire y después de triturada pesó 4.0 Kg.

La extracción se realizó mediante Soxhlet con CH₂Cl₂ durante 24 horas y seguidamente fue macerada con CHCl₃:MeOH (1:1) a temperatura ambiente hasta agotamiento. La reunión de los extractos fue evaporada al vacío obteniéndose un extracto de aspecto aceitoso y color marrón verdoso (52.0 g, 1.3 % peso seco).

IV.3. MARCHA CROMATOGRÁFICA DEL EXTRACTO

El extracto fue cromatografiado en tres porciones en una columna de gel de sílice usando como eluyente mezclas de n-Hexano y AcOEt de polaridad creciente. Se recogieron fracciones de 250 ml, correspondiendo los metabolitos recogidos en esta memoria, a la reunión de fracciones seleccionadas de una polaridad 3:2.

Después de la evaporación del disolvente, este residuo fue sucesivamente cromatografiado con una columna de Sephadex LH-20 (D.I. 7 cm, longitud 60 cm) usando como eluyente la mezcla n-Hexano:CHCl₃:MeOH (2:1:1) y las fracciones seleccionadas se sometieron a una segunda cromatografía de media presión recogiendo fracciones de 25 ml según el siguiente esquema de elución: n-Hexano: AcOEt (7:3), fracciones 1-70; n-Hexano: AcOEt (1:1), fracciones 71-100; AcOEt, fracciones 101-150. Aquellas que mostraron un comportamiento similar en cromatografía de capa fina fueron reunidas dando como resultado seis fracciones, según se esquematiza a continuación (**Esquema 10**). Cada una de éstas fueron inicialmente recromatografiadas empleando el mismo sistema de

columnas. En primer lugar con una columna pre-empaquetada de fase reversa Lobar[®] LiChroprep RP-8 (D.I. 2.5 cm, longitud 31 cm) en MeOH:H₂O (9:1) y en segundo lugar, a través de un HPLC en fase reversa utilizando una columna semipreparativa μ -Bondapak C-18 (D.I. 1.9 cm, longitud 15 cm) con una mezcla de Acetonitrilo:H₂O (9:1) como eluyente.

Estudio de las fracciones de 40-51 (816 mg)

Como resultado de las cromatografías anteriores se obtuvo acetato de predehidrovenustatriol **64** puro (3.3 mg), viridiol B **42** impuro y una mezcla de cuatro compuestos.

Para la purificación del viridiol B **42**, se empleó una columna pre-empaquetada μ -Porasil (D.I. 1.9 cm, longitud 15 cm) eluyendo con n-Hexano:AcOEt (3:2). Como resultado se aislaron 2.2 mg de sustancia pura.

En el caso de la mezcla de compuestos, la separación se llevó a cabo a través de HPLC empleando la misma columna cromatográfica que en el caso anterior pero usando n-Hexano:AcOEt (7:3) como eluyente. Se obtuvieron los siguientes metabolitos puros: dehidrovenustatriol **62** (6.5 mg), 15,16-dehidrovenustatriol **63** (26.2 mg) y el tirsenol B **59** (2.3 mg), junto con el diterpeno viridiol A **41** (6.5 mg).

Estudio de las fracciones 52-82 (750.7 mg)

De estas fracciones se obtuvo dehidrotirsiferol **51** puro (219.8 mg), que es el metabolito mayoritario aislado en este estudio de *L. viridis*.

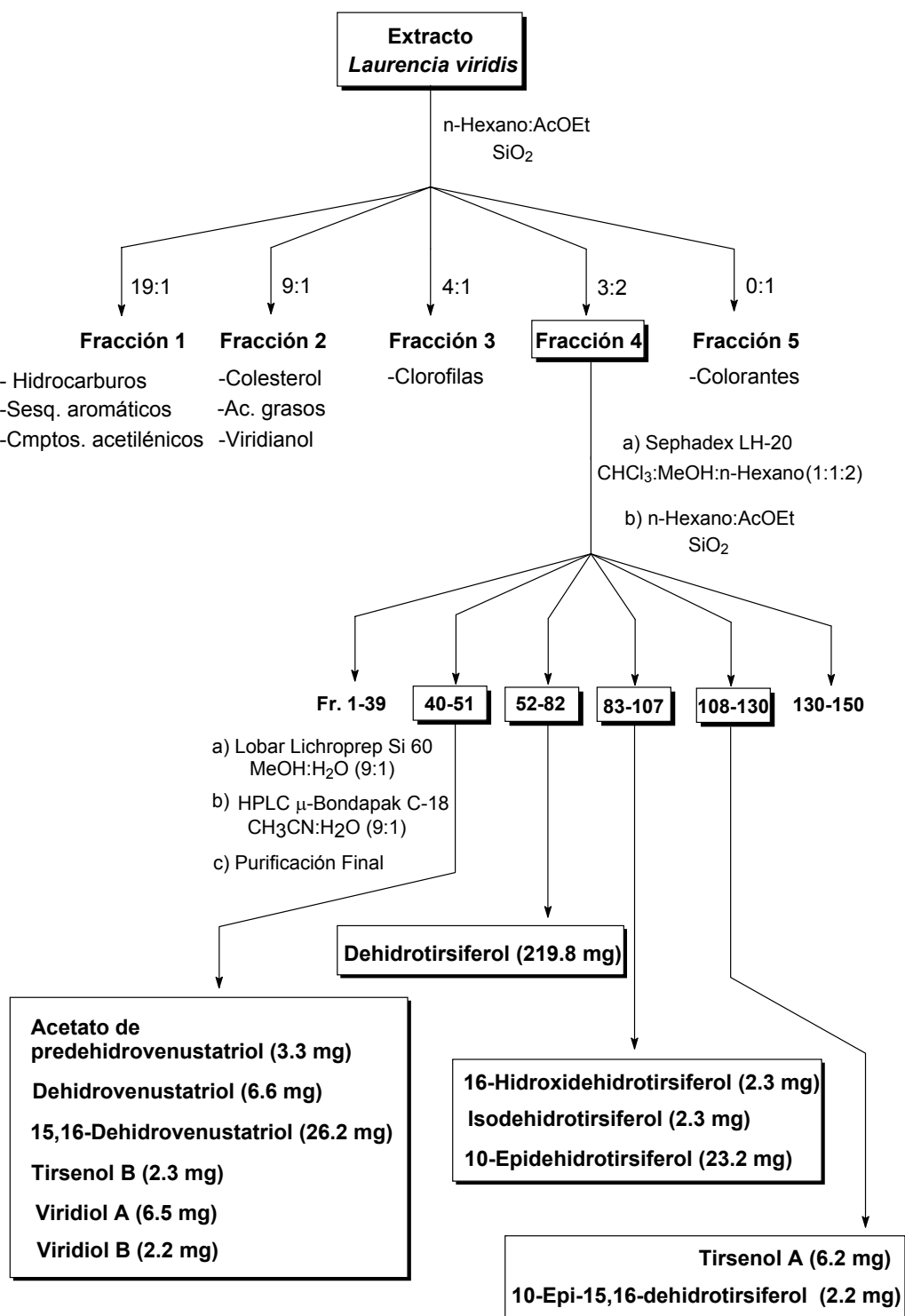
Estudio de las fracciones 83-107 (344 mg)

Este estudio rindió 16-hidroxidehidrotirsiferol **57** puro (2.3 mg) y los compuestos impuros isodehidrotirsiferol **56** y 10-epidehidrotirsiferol **60**, los cuales fueron recromatografiados usando HPLC, con una columna de μ -Porasil y n-Hexano:AcOEt (3:2) como eluyente, obteniéndose 2.3 mg y 23.2 mg, respectivamente.

Estudio de las fracciones 108-130 (1.235 g)

Esta reunión de fracciones contenía la mezcla de los productos 10-epi-15,16-dehidrotirsiferol **61** y tirsenol A **58**, la cual después de ser sometida a purificación final también por HPLC utilizando una columna pre-empaquetada Spherisorb Silica 5 μ (D.I.

0.65 cm, longitud 30 cm) eluyendo con n-Hexano:AcOEt (1:1), dio como resultado el aislamiento de los compuestos **61** (2.2 mg) y **58** (6.2 mg) en estado puro.



Esquema 10

DATOS FISICOS DEL VIRIDIOL A 41

Aceite

$[\alpha]_D^{25} = +0.2^\circ$ (c 0.64, CHCl_3)

IR ν_{max} (CHCl_3): 3691, 3608, 3021, 2928, 2869, 1711, 1602, 1463 y 1377 cm^{-1}

RMN ^1H (CDCl_3) δ : 0.84 (d, $J = 6.4 \text{ Hz}$, 3H); 0.86 (d, $J = 6.4 \text{ Hz}$, 3H); 0.86 (s, 3H); 0.87 (s, 3H); 1.04 (m, 1H); 1.10 (m, 1H); 1.13 (m, 2H); 1.16 (m, 1H); 1.21 (m, 1H); 1.27 (m, 2H); 1.28 (m, 2H); 1.31 (m, 2H); 1.36 (m, 1H); 1.42 (m, 1H); 1.46 (m, 2H); 1.53 (m, 1H); 1.97 (m, 1H); 2.04 (m, 1H); 3.54 (dd, $J = 11.2$ y 7.2 Hz , 1H); 3.71 (dd, $J = 11.2$ y 3.3 Hz , 1H); 4.20 (dd, $J = 7.2$ y 3.3 Hz , 1H); 4.97 (bs, 1H); 5.12 (bs, 1H).

RMN ^{13}C (CDCl_3) δ : 19.68 (q); 19.74 (q); 22.61 (q); 22.71 (q); 24.46 (t); 24.78 (t); 25.50 (t); 27.97 (d); 32.70 (d); 32.79 (d); 32.99 (t); 36.81 (t); 36.83 (s); 37.28 (t); 37.45 (t); 39.37 (t); 65.63 (t); 74.98 (d); 110.54 (t); 148.71 (s).

MS: m/z : 312, 294, 281, 263, 249, 236, 222, 199, 179, 137, 123, 109.

HRMS: $\text{C}_{20}\text{H}_{38}\text{O}_2$, obs. 312.3071, calc. 312.3028 $[\text{M}^{+2}]$

DATOS FISICOS DEL VIRIDIOL B 42

Aceite

$[\alpha]_D^{25} = +3.2^\circ$ (c 0.22, CHCl_3)

IR ν_{max} (CHCl_3): 3693, 3604, 3020, 2929, 2869, 1725, 1602, 1463 y 1379 cm^{-1}

RMN ^1H (CDCl_3) δ : 0.84 (d, $J = 6.3 \text{ Hz}$, 3H); 0.86 (d, $J = 6.1 \text{ Hz}$, 3H); 0.86 (s, 3H); 0.87 (s, 3H); 1.03 (m, 1H); 1.08 (m, 1H); 1.13 (m, 2H); 1.20 (m, 2H); 1.24 (s, 3H); 1.27 (m, 2H); 1.29 (m, 2H); 1.30 (m, 2H); 1.31 (m, 2H); 1.35 (m, 1H); 1.42 (m, 1H); 1.48 (m, 1H); 1.51 (m, 1H); 1.52 (m, 1H); 1.67 (ddd, $J = 14.6, 6.4 \text{ y } 4.3 \text{ Hz}$, 1H); 1.79 (ddd, $J = 14.6, 7.5 \text{ y } 4.6 \text{ Hz}$, 1H); 3.86 (ddd, $J = 11.5, 6.4 \text{ y } 4.6 \text{ Hz}$, 1H); 3.90 (ddd, $J = 11.5, 7.5 \text{ y } 4.3 \text{ Hz}$, 1H).

RMN ^{13}C (CDCl_3) δ : 19.68 (q); 19.74 (q); 21.44 (t); 22.62 (q); 22.71 (q); 24.47 (t); 24.79 (t); 26.83 (q); 27.97 (d); 32.76 (d); 32.79 (d); 37.28 (t); 37.38 (s); 37.42 (t); 37.54 (t); 39.37 (t); 41.58 (t); 43.12 (t); 59.97 (t); 74.03 (s).

MS: m/z : 314, 308, 299, 281, 269, 250, 236, 210, 196, 185, 123

HRMS: M^+ no observado

$\text{C}_{19}\text{H}_{39}\text{O}_2$, obs. 299.2966, calc. 299.2950 $[\text{M}^{+2}-\text{CH}_3]$

DATOS FISICOS DEL DEHIDROTIRSIFEROL 51

Agujas blancas

p.f.= 103° C

$[\alpha]_D^{25} = -203^\circ$ (c 0.64, CHCl₃)

IR ν_{\max} (CHCl₃): 3450, 3100, 1640, 1450, 1370 y 1320 cm⁻¹

RMN ¹H (CDCl₃) δ : 1.12 (s, 3H); 1.14 (s, 3H); 1.20 (s, 3H); 1.21 (s, 3H); 1.23 (s, 3H); 1.27 (s, 3H); 1.39 (s, 3H); 1.44 (m, 1H); 1.45 (m, 1H); 1.49 (m, 1H); 1.52 (m, 1H); 1.60 (m, 2H); 1.63 (m, 1H); 1.76 (m, 1H); 1.77 (m, 1H); 1.80 (m, 1H); 1.81 (m, 1H); 1.84 (m, 1H); 1.86 (m, 1H); 2.11 (m, 1H); 2.12 (m, 2H); 2.13 (m, 1H); 2.26 (m, 1H); 2.43 (m, 1H); 3.08 (dd, J= 11.0 y 2.5 Hz, 1H); 3.43 (dd, J= 11.3 y 5.7 Hz, 1H); 3.52 (dd, J= 10.4 y 1.7 Hz, 1H); 3.76 (dd, J= 9.9 y 6.0, Hz, 1H); 3.89 (dd, J= 12.6 y 4.1 Hz, 1H); 4.28 (dd, J= 8.1 y 4.0 Hz, 1H); 4.88 (bs, 1H); 5.05 (bs, 1H)

RMN ¹³C (CDCl₃) δ : 19.43 (q); 20.05 (q); 21.78 (t); 22.92 (t); 23.62 (q); 23.72 (q); 23.95 (q); 26.25 (t); 26.57 (t); 27.66 (q); 28.22 (t); 29.92 (t); 30.27 (t); 30.99 (q); 31.65 (t); 37.05 (t); 38.67 (t); 58.99 (d); 70.46 (s); 72.45 (d); 72.86 (s); 74.36 (s); 74.92 (s); 76.18 (d); 78.92 (d); 86.04 (s); 86.65 (d); 87.57 (d); 109.81 (t); 151.31 (s)

MS: m/z: 529, 527, 506, 445, 443, 401, 363, 319, 207, 205, 143

HRMS: M⁺ no observado

C₃₀H₅₀O₆, obs. 506.36060, calc. 506.36074 [M⁺-HBr]

DATOS FISICOS DEL ISODEHIDROTIRSIFEROL 56

Aceite

$[\alpha]_D^{25} = +6.5^\circ$ (c 0.23, CHCl_3)

IR ν_{max} (CHCl_3): 3490, 2956, 2857, 1725, 1462 y 1381 cm^{-1}

RMN ^1H (CDCl_3) δ : 1.15 (s, 3H); 1.17 (s, 3H); 1.20 (s, 3H); 1.20 (s, 3H); 1.22 (s, 3H); 1.27 (s, 3H); 1.40 (s, 3H); 1.49 (m, 1H); 1.50 (m, 1H); 1.51 (m, 1H); 1.55 (m, 2H); 1.60 (m, 1H); 1.78 (m, 1H); 1.80 (m, 1H); 1.81 (m, 1H); 1.82 (m, 1H); 1.85 (m, 1H); 1.88 (m, 2H); 2.06 (m, 1H); 2.09 (m, 2H); 2.12 (m, 1H); 2.13 (m, 1H); 2.25 (m, 1H), 2.42 (m, 1H); 3.08 (dd, $J = 11.2$ y 2.6 Hz, 1H); 3.13 (dd, $J = 10.6$ y 1.7 Hz, 1H); 3.15 (dd, $J = 10.7$ y 1.7 Hz, 1H); 3.43 (dd, $J = 11.5$ y 5.9 Hz, 1H); 3.90 (dd, $J = 12.3$ y 4.2 Hz, 1H), 4.30 (dd, $J = 7.0$ y 4.3 Hz, 1H); 4.88 (s, 1H), 5.04 (s, 1H)

RMN ^{13}C (CDCl_3) δ : 19.83 (q); 20.48 (q); 20.64 (q); 22.23 (t); 23.34 (t); 24.01 (q); 24.41 (q); 24.99 (t); 26.72 (t); 26.77 (q); 27.28 (t); 28.66 (t); 29.96 (t); 31.42 (q); 37.50 (t); 39.10 (t); 40.22 (t); 59.47 (d); 70.15 (s); 72.13 (s); 72.66 (d); 73.31 (s); 74.79 (s); 75.35 (s); 79.37 (d); 84.10 (d); 84.42 (d); 87.08 (d); 110.40 (t); 151.68 (s)

MS: m/z : 572, 570, 506, 473, 445, 443, 403, 363, 332, 265, 205, 143

HRMS: M^+ no observado

$\text{C}_{29}\text{H}_{47}\text{O}_6$ ^{81}Br , obs. 572.25524,	calc. 572.25355	$[\text{M}^+ - \text{CH}_3]$
$\text{C}_{29}\text{H}_{47}\text{O}_6$ ^{79}Br , obs. 570.25401,	calc. 570.25560	$[\text{M}^+ - \text{CH}_3]$
$\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_6$, obs. 506.36127,	calc. 506.36074	$[\text{M}^+ - \text{HBr}]$
$\text{C}_{29}\text{H}_{45}\text{O}_5$, obs. 473.32621,	calc. 473.32670	$[\text{M}^+ - \text{HBr} - \text{CH}_3 - \text{H}_2\text{O}]$
$\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{O}_4$ ^{81}Br , obs. 445.17358,	calc. 445.17765	$[\text{M}^+ - \text{C}_8\text{H}_{15}\text{O}_2]$
$\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{O}_4$ ^{79}Br , obs. 443.17453,	calc. 443.17970	$[\text{M}^+ - \text{C}_8\text{H}_{15}\text{O}_2]$
$\text{C}_{22}\text{H}_{35}\text{O}_4$, obs. 363.25452,	calc. 363.25353	

DATOS FISICOS DEL 16-HIDROXIDEHIDROTIRSIFEROL 57

Sólido amorfo de color blanquecino

$[\alpha]_D^{25} = -2.2^\circ$ (c 0.23, CHCl_3)

IR ν_{\max} (CHCl_3): 3789, 3694, 3514, 3020, 2929, 2856, 1726, 1602, 1461, 1381 y 1221 cm^{-1}

RMN ^1H (CDCl_3) δ : 1.13 (s, 3H); 1.14 (s, 3H), 1.21 (s, 3H); 1.22 (s, 3H); 1.28 (s, 3H); 1.30 (s, 3H); 1.41 (s, 3H); 1.47 (m, 1H); 1.55 (m, 1H); 1.57 (m, 1H); 1.61 (m, 1H); 1.69 (m, 1H); 1.75 (m, 1H); 1.77 (m, 1H); 1.81 (m, 1H); 1.84 (m, 2H); 1.85 (m, 1H); 1.87 (m, 1H); 1.88 (m, 1H); 2.10 (m, 1H); 2.12 (m, 2H); 2.22 (m, 1H); 2.25 (m, 1H); 3.09 (dd, $J = 11.6, 2.7$ Hz, 1H); 3.58 (dd, $J = 11.1, 6.4$ Hz, 1H); 3.77 (dd, $J = 10.1, 6.2$ Hz, 1H); 3.82 (dd, $J = 10.1, 1.5$ Hz, 1H); 3.90 (dd, $J = 12.3, 4.2$ Hz, 1H); 4.50 (dd, $J = 10.6, 3.4$ Hz, 1H); 4.86 (dd, $J = 7.6, 4.1$ Hz, 1H); 5.25 (s, 1H); 5.30 (s, 1H)

RMN ^{13}C (CDCl_3) δ : 20.05 (q); 20.43 (q); 21.61 (t); 22.93 (q); 23.25 (t); 23.65 (q); 24.00 (q); 25.98 (t); 26.48 (t); 27.67 (q); 28.21 (t); 31.00 (q); 32.12 (t); 34.96 (t); 37.08 (t); 38.62 (t); 58.94 (d); 70.46 (s); 72.09 (d); 72.83 (d); 73.39 (s); 74.35 (s); 75.00 (s); 77.21 (d); 82.96 (d); 85.54 (s); 86.66 (d); 87.52 (d); 114.72 (t); 149.29 (s)

FAB (NBA+NaI)

MS: m/z : 627, 625, 609, 593, 577, 561, 545, 357, 301

HRMS: $\text{C}_{30}\text{H}_{51}\text{O}_7^{81}\text{Br}$,	obs. 604.27987,	calc. 604.27976	$[\text{M}^+]$
$\text{C}_{30}\text{H}_{51}\text{O}_7^{79}\text{Br}$,	obs. 602.28189,	calc. 602.28181	$[\text{M}^+]$
$\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_7$,	obs. 522.35563,	calc. 522.35565	$[\text{M}^+ - \text{HBr}]$

DATOS FISICOS DEL TIRSENOL A 58

Sólido amorfo de color blanquecino

$[\alpha]_D^{25} = +12.9^\circ$ (c 0.69, CHCl_3)

IR ν_{max} (CHCl_3): 3855, 3688, 3442, 3020, 2956, 2928, 2857, 1718, 1671, 1603, 1460 y 1376 cm^{-1}

RMN ^1H (CDCl_3) δ : 1.07 (s, 3H); 1.12 (s, 3H); 1.21 (s, 6H); 1.23 (s, 3H); 1.27 (s, 3H); 1.40 (s, 3H); 1.48 (m, 1H); 1.50 (m, 1H); 1.59 (m, 1H); 1.66 (m, 1H); 1.71 (m, 1H); 1.81 (m, 2H); 1.82 (ddd, $J = 14.8, 6.0$ y 5.5 Hz, 1H); 1.83 (m, 1H); 1.84 (m, 1H); 1.85 (m, 1H); 1.87 (m, 1H); 1.93 (m, 1H); 1.95 (m, 1H); 1.98 (m, 1H); 2.12 (m, 1H); 2.13 (ddd, $J = 14.8, 10.6$ y 2.0 Hz, 1H); 2.24 (m, 1H); 3.08 (dd, $J = 11.2$ y 2.3 Hz, 1H); 3.31 (dd, $J = 10.6$ y 6.0 Hz, 1H); 3.49 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H); 3.63 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H); 3.77 (dd, $J = 9.5$ y 6.0 Hz, 1H); 3.89 (dd, $J = 12.4$ y 4.0 Hz, 1H); 3.92 (dd, $J = 7.0$ y 7.0 Hz, 1H); 5.02 (dd, $J = 5.5$ y 2.0 Hz, 1H)

RMN ^{13}C (CDCl_3) δ : 15.50 (q); 20.42 (q); 23.25 (t); 24.12 (q); 24.50 (q); 24.63 (t); 24.95 (q); 26.58 (t); 26.85 (t); 28.10 (q); 28.59 (t); 31.39 (q); 32.04 (t); 34.93 (t); 36.86 (t); 37.50 (t); 59.35 (d); 66.97 (t); 70.84 (s); 74.02 (s); 74.70 (s); 75.38 (s); 77.31 (d); 84.20 (s); 85.52 (s); 86.59 (d); 86.70 (d); 87.56 (d); 94.03 (d); 152.11 (s)

FAB (NBA+NaI)

MS: m/z:	625/623	$[\text{M}^+ + \text{Na} - \text{H}_2\text{O}]$,	603/601	$[\text{MH}^+ - \text{H}_2\text{O}]$,
	585/583	$[\text{MH}^+ + \text{Na} - \text{C}_3\text{H}_7\text{O}]$,	571/569	$[\text{M}^+ - \text{CH}_2\text{OH} - \text{H}_2\text{O}]$,
	543/541	$[\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O} - \text{C}_3\text{H}_7\text{O}]$		

DATOS FISICOS DEL TIRSENOL B 59

Sólido amorfo de color blanquecino

$[\alpha]_D^{25} = -1.1^\circ$ (c 0.26, CHCl_3)

IR ν_{max} (CHCl_3): 3855, 3689, 3568, 3442, 3021, 2957, 2928, 2856, 1717, 1671, 1602, 1459 y 1377 cm^{-1}

RMN ^1H (CDCl_3) δ : 1.08 (s, 3H); 1.12 (s, 3H); 1.22 (s, 3H); 1.24 (s, 3H); 1.28 (s, 3H); 1.30 (s, 3H); 1.41 (s, 3H); 1.47 (m, 1H); 1.50 (m, 1H); 1.57 (m, 1H); 1.68 (m, 1H); 1.80 (m, 1H); 1.83 (m, 1H); 1.84 (m, 3H); 1.85 (ddd, $J = 14.8, 5.9$ y 5.4 Hz, 1H); 1.88 (m, 1H); 1.89 (m, 1H); 1.94 (m, 1H); 2.01 (m, 1H); 2.09 (ddd, $J = 14.8, 10.6$ y 2.0 Hz, 1H); 2.11 (m, 1H); 2.12 (m, 1H); 2.24 (m, 1H); 3.09 (dd, $J = 11.3$ y 2.3 Hz, 1H); 3.29 (dd, $J = 10.6$ y 5.9 Hz, 1H); 3.56 (bs, 2H); 3.79 (dd, $J = 10.3$ y 4.9 Hz, 1H); 3.90 (dd, $J = 12.3$ y 4.4 Hz, 1H); 4.03 (dd, $J = 7.0$ y 7.0 Hz, 1H); 4.85 (dd, $J = 5.4$ y 2.0 Hz, 1H)

RMN ^{13}C (CDCl_3) δ : 15.29 (q); 19.99 (q); 22.84 (t); 23.65 (q); 24.17 (t); 24.22 (q); 25.15 (q); 25.88 (t); 27.10 (t); 27.75 (q); 28.21 (t); 31.01 (q); 31.75 (t); 34.61 (t); 36.45 (t); 37.15 (t); 58.94 (d); 67.92 (t); 70.29 (s); 73.66 (s); 74.33 (s); 74.98 (s); 77.20 (d); 84.94 (s); 85.67 (d); 85.83 (s); 86.36 (d); 87.83 (d); 91.60 (d); 152.44 (s)

FAB (NBA+NaI)

MS: m/z:	625/623	$[\text{M}^+ + \text{Na} - \text{H}_2\text{O}]$,	603/601	$[\text{MH}^+ - \text{H}_2\text{O}]$,
	585/583	$[\text{MH}^+ + \text{Na} - \text{C}_3\text{H}_7\text{O}]$,	571/569	$[\text{M}^+ - \text{CH}_2\text{OH} - \text{H}_2\text{O}]$,
	543/541	$[\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O} - \text{C}_3\text{H}_7\text{O}]$		

DATOS FISICOS DEL 10-EPIDEHIDROTIRSIFEROL 60

Aceite

 $[\alpha]_D^{25} = +20.7^\circ$ (c 0.76, CHCl₃)IR ν_{\max} (CHCl₃): 3438, 2978, 1644, 1455 y 1374 cm⁻¹RMN ¹H (CDCl₃) δ : 1.13 (s, 3H); 1.15 (s, 3H); 1.17 (s, 3H); 1.22 (s, 3H); 1.22 (s, 3H); 1.29 (s, 3H); 1.41 (s, 3H); 1.50 (m, 1H); 1.57 (m, 1H); 1.60 (m, 1H); 1.61 (m, 1H); 1.64 (m, 1H); 1.66 (m, 1H); 1.67 (m, 1H); 1.70 (m, 1H); 1.84 (m, 1H); 1.85 (m, 1H), 1.88 (m, 1H); 1.90 (m, 1H); 1.92 (m, 1H); 1.94 (m, 1H); 2.05 (m, 1H); 2.08 (m, 1H); 2.06 (m, 1H); 2.11 (m, 1H); 2.25 (m, 1H); 2.39 (m, 1H); 3.53 (d, J= 10.3 Hz, 1H); 3.69 (dd, J= 6.8 y 6.8 Hz, 1H); 3.76 (dd, J= 9.7 y 6.0 Hz, 1H); 3.84 (dd, J= 7.0 y 7.0 Hz, 1H); 3.90 (dd, J= 12.3 y 3.6 Hz, 1H), 4.27 (dd, J= 7.4 y 7.4 Hz, 1H); 4.83 (s, 1H); 5.13 (s, 1H)RMN ¹³C (CDCl₃) δ : 20.74 (q); 23.56 (q); 23.70 (q); 23.76 (q); 26.43 (t); 26.56 (t); 27.07 (t); 27.69 (q); 28.13 (t); 28.94 (t); 30.34 (t); 30.93 (q); 31.22 (q); 31.63 (t); 31.91 (t); 33.80 (t); 35.83 (t); 59.04 (d); 70.46 (s); 74.78 (s); 74.89 (s); 76.27 (d); 82.21 (d); 84.64 (s); 84.78 (d); 86.08 (s); 87.60 (d); 88.25 (d); 109.17 (t); 149.63 (s)

MS: m/z: 529, 527, 506, 445, 363, 291, 209, 143

FAB MS:m/z: 587/589 [MH⁺]

HRMS: C ₂₇ H ₄₄ O ₅ ⁸¹ Br,	obs. 529.23585,	calc. 529.23516	[M ⁺ -C ₃ H ₇ O]
C ₂₇ H ₄₄ O ₅ ⁷⁹ Br,	obs. 527.23762,	calc. 527.23721	[M ⁺ -C ₃ H ₇ O]
C ₃₀ H ₅₀ O ₆ ,	obs. 506.36318,	calc. 506.36074	[M ⁺ -HBr]
C ₂₂ H ₃₇ O ₄ ⁸¹ Br,	obs. 446.18054,	calc. 446.18547	[M ⁺ -C ₈ H ₁₄ O ₂]
C ₂₂ H ₃₇ O ₄ ⁷⁹ Br,	obs. 444.18748,	calc. 444.18752	[M ⁺ -C ₈ H ₁₄ O ₂]
C ₂₂ H ₃₅ O ₄ ,	obs. 363.25223,	calc. 363.25353	

DATOS FISICOS DEL 10-EPI-15,16-DEHIDROTIRSIFEROL 61

Aceite

$[\alpha]_D^{25} = + 8.0^\circ$ (c 0.20, CHCl_3)

IR ν_{max} (CHCl_3): 3789, 3694, 3572, 3022, 2928, 2857, 1726, 1666 y 1602 cm^{-1}

RMN ^1H (CDCl_3) δ : 1.13 (s, 3H); 1.16 (s, 3H); 1.17 (s, 3H); 1.22 (s, 3H); 1.22 (s, 3H); 1.28 (s, 3H); 1.41 (s, 3H); 1.56 (m, 1H); 1.60 (m, 1H); 1.61 (m, 1H); 1.63 (s, 3H); 1.64 (m, 1H); 1.66 (m, 1H); 1.71 (m, 1H); 1.85 (m, 1H); 1.86 (m, 1H); 1.87 (m, 1H); 1.89 (m, 1H); 1.91 (m, 1H); 1.92 (m, 1H); 1.95 (m, 1H); 2.11 (m, 1H); 2.12 (m, 1H); 2.14 (m, 1H); 2.23 (m, 1H); 2.24 (m, 1H); 3.58 (dd, $J = 9.7, 2.8$ Hz, 1H); 3.68 (dd, $J = 7.1, 7.1$ Hz, 1H); 3.76 (dd, $J = 10.0, 6.0$ Hz, 1H); 3.82 (dd, $J = 6.7, 6.7$ Hz, 1H); 3.89 (dd, $J = 12.2, 4.0$ Hz, 1H); 4.23 (dd, $J = 7.6, 7.6$ Hz, 1H); 5.60 (dd, $J = 6.7, 6.7$ Hz, 1H)

RMN ^{13}C (CDCl_3) δ : 11.88 (q); 20.77 (q); 23.45 (q); 23.71 (q); 23.99 (q); 26.43 (t); 26.54 (t); 27.39 (t); 27.71 (q); 27.71 (q); 28.14 (t); 30.18 (t); 30.39 (t); 30.95 (q); 32.02 (t); 34.00 (t); 35.77 (t); 59.06 (d); 70.45 (s); 74.80 (s); 74.82 (s); 76.68 (d); 84.51 (d); 84.69 (d); 84.70 (s); 85.79 (s); 87.55 (d); 88.23 (d); 122.94 (d); 137.31 (s)

FAB MS: m/z : 611, 609, 593, 591, 545

HRMS: M^+ no observado

$\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_6$, obs. 506.36410, calc. 506.36074 $[\text{M}^+ - \text{HBr}]$

DATOS FISICOS DEL DEHIDROVENUSTATRIOL 62

Sólido amorfo de color blanquecino

$[\alpha]_D^{25} = +4.6^\circ$ (c 0.26, CHCl_3)

IR ν_{max} (CHCl_3): 3689, 3649, 3020, 2928, 2854, 2359, 2341, 1734, 1601 y 1466 cm^{-1}

RMN ^1H (CDCl_3) δ : 1.13 (s, 3H); 1.16 (s, 3H); 1.20 (s, 3H); 1.23 (s, 3H); 1.26 (s, 3H); 1.27 (s, 3H); 1.40 (s, 3H); 1.45 (m, 1H); 1.48 (m, 1H); 1.51 (m, 1H); 1.60 (m, 1H); 1.63 (m, 1H); 1.66 (m, 1H); 1.73 (m, 2H); 1.75 (m, 1H); 1.80 (m, 1H); 1.82 (m, 1H); 1.83 (m, 1H); 1.92 (m, 2H); 2.06 (m, 1H); 2.11 (m, 1H); 2.17 (m, 1H); 2.20 (m, 1H); 2.25 (m, 1H); 2.43 (m, 1H); 3.08 (dd, $J = 11.4$ y 2.6 Hz, 1H); 3.45 (dd, $J = 11.3$ y 5.6 Hz, 1H); 3.59 (dd, $J = 10.5$ y 1.9 Hz, 1H); 3.83 (dd, $J = 7.3$ y 7.3 Hz, 1H); 3.90 (dd, $J = 12.3$ y 4.2 Hz, 1H); 4.30 (dd, $J = 8.0$ y 4.0 Hz, 1H); 4.89 (s, 1H); 5.04 (s, 1H)

RMN ^{13}C (CDCl_3) δ : 20.02 (q); 20.49 (q); 22.14 (t); 23.35 (t); 24.06 (q); 24.06 (q); 25.73 (q); 26.51 (t); 27.26 (t); 27.97 (q); 28.65 (t); 29.71 (t); 31.20 (t); 31.41 (q); 31.87 (t); 37.47 (t); 39.04 (t); 59.45 (d); 72.37 (s); 72.91 (d); 73.36 (s); 74.79 (s); 75.36 (s); 76.90 (d); 79.03 (d); 84.93 (d); 86.69 (s); 87.07 (d); 110.64 (t); 151.47 (s)

FAB (NBA+NaI)

MS: m/z: 611, 609, 529, 329, 279, 207, 176, 143

HRMS: $\text{C}_{30}\text{H}_{51}\text{O}_6$ ^{81}Br ,	obs. 588.28693,	calc. 588.28485	$[\text{M}^+]$
$\text{C}_{30}\text{H}_{51}\text{O}_6$ ^{79}Br ,	obs. 586.28496,	calc. 586.28690	$[\text{M}^+]$
$\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_6$,	obs. 506.36071,	calc. 506.36074	$[\text{M}^+ - \text{HBr}]$

DATOS FISICOS DEL 15,16-DEHIDROVENUSTATRIOL 63

Sólido amorfo de color blanquecino

 $[\alpha]_D^{25} = -5.4^\circ$ (c 0.26, CHCl₃)IR ν_{\max} (CHCl₃): 3571, 2981, 2866, 1732, 1602, 1460, 1378 y 1321 cm⁻¹RMN ¹H (CDCl₃) δ : 1.14 (s, 3H); 1.18 (s, 3H); 1.21 (s, 3H); 1.22 (s, 3H); 1.23 (s, 3H); 1.27 (s, 3H); 1.41 (s, 3H); 1.44 (m, 1H); 1.54 (m, 1H); 1.56 (m, 2H); 1.60 (m, 1H); 1.73 (s, 3H); 1.76 (m, 1H); 1.79 (m, 1H); 1.81 (m, 1H); 1.85 (m, 2H); 1.95 (m, 1H); 2.05 (m, 1H); 2.08 (m, 1H); 2.11 (m, 1H); 2.12 (m, 1H); 2.18 (m, 1H); 2.24 (m, 1H); 2.27 (m, 1H); 3.09 (dd, J= 11.4 y 2.2 Hz, 1H); 3.40 (dd, J= 9.9 y 2.2 Hz, 1H); 3.66 (dd, J= 11.0 y 7.4 Hz, 1H); 3.76 (dd, J= 8.7 y 6.9 Hz, 1H); 3.89 (dd, J= 12.2 y 4.1 Hz, 1H); 4.77 (dd, J= 12.3 y 2.7 Hz, 1H); 5.42 (dd, J= 7.7 y 7.6 Hz, 1H)RMN ¹³C (CDCl₃) δ : 18.73 (q); 20.06 (q); 21.26 (q); 21.53 (t); 22.28 (q); 22.68 (t); 22.98 (q); 23.64 (q); 24.17 (t); 26.49 (t); 27.63 (q); 28.24 (t); 30.13 (t); 31.02 (q); 34.32 (t); 37.05 (t); 38.64 (t); 59.01 (d); 67.35 (d); 70.56 (s); 72.22 (s); 74.38 (s); 74.96 (s); 76.35 (d); 76.44 (d); 85.31 (s); 86.52 (d); 86.89 (d); 126.23 (d); 137.83 (s)

MS: m/z: 570, 506, 473, 445, 443, 403, 399, 363, 334, 291, 209, 207, 143

HRMS: M⁺ no observado

C ₃₀ H ₄₉ O ₅ ⁸¹ Br,	obs. 570.27450,	calc. 570.27429	[M ⁺ -H ₂ O]
C ₃₀ H ₅₀ O ₆ ,	obs. 506.35715,	calc. 506.36074	[M ⁺ -HBr]
C ₂₂ H ₃₆ O ₄ ⁸¹ Br,	obs. 445.17512,	calc. 445.17765	[M ⁺ -C ₈ H ₁₅ O ₂]
C ₂₂ H ₃₆ O ₄ ⁷⁹ Br,	obs. 443.17607,	calc. 443.17970	[M ⁺ -C ₈ H ₁₅ O ₂]
C ₂₀ H ₃₂ O ₃ ⁷⁹ Br,	obs. 399.15331,	calc. 399.15348	[M ⁺ -C ₁₀ H ₁₉ O ₃]

DATOS FISICOS DEL ACETATO DE PREDEHIDROVENUSTATRIOL 64

Sólido amorfo de color blanquecino

$[\alpha]_D^{25} = +20.6^\circ$ (c 0.33, CHCl₃)

IR ν_{\max} (CHCl₃): 3691, 3580, 3456, 2978, 2931, 2872, 2359, 1727, 1456 y 1249 cm⁻¹

RMN ¹H (CDCl₃) δ : 1.09 (s, 3H); 1.15 (s, 3H); 1.19 (s, 3H); 1.24 (s, 3H); 1.25 (s, 3H); 1.35 (m, 1H); 1.47 (m, 1H); 1.51 (m, 1H); 1.53 (m, 1H); 1.54 (m, 1H); 1.58 (m, 1H); 1.61 (s, 3H); 1.63 (m, 1H); 1.67 (m, 1H); 1.67 (s, 3H); 1.71 (m, 1H); 1.80 (m, 1H); 1.87 (m, 1H); 1.89 (m, 1H); 1.91 (m, 1H); 1.93 (m, 1H); 1.98 (m, 1H); 2.07 (s, 3H); 2.11 (m, 1H); 2.16 (m, 1H); 2.32 (m, 1H); 3.45 (dd, J= 11.6, 2.0 Hz, 1H); 3.81 (dd, J= 7.0, 6.9 Hz, 1H); 3.97 (dd, J= 9.0, 5.9 Hz, 1H); 4.15 (dd, J= 9.1, 5.5 Hz, 1H); 4.73 (bs, 2H); 4.95 (dd, J= 10.0, 2.3 Hz, 1H); 5.10 (dd, J= 7.1, 7.0 Hz, 1H)

RMN ¹³C (CDCl₃) δ : 17.65 (q); 21.19 (q); 22.07 (t); 22.17 (q); 23.22 (q); 24.31 (q); 24.92 (q); 25.68 (q); 26.33 (t); 26.47 (t); 27.08 (t); 27.49 (t); 27.89 (q); 27.96 (t); 28.32 (t); 32.63 (t); 34.81 (t); 36.75 (t); 71.34 (s); 73.33 (s); 73.35 (s); 75.13 (d); 77.75 (d); 79.16 (d); 84.01 (s); 84.60 (d); 85.39 (d); 109.42 (t); 124.79 (d); 131.33 (s); 146.03 (s); 170.84 (s)

FAB (NBA+NaI)

MS: m/z: 548, 532, 522, 473, 405, 345, 321, 282, 261, 227, 183

HRMS: M⁺ no observado

C ₃₂ H ₅₂ O ₇ ,	obs. 548.37054,	calc. 548.37130	[M ⁺ -2H]
C ₃₂ H ₅₂ O ₆ ,	obs. 532.37182,	calc. 532.37639	[M ⁺ -H ₂ O]
C ₂₉ H ₄₅ O ₅ ,	obs. 473.32361,	calc. 473.32670	[M ⁺ -C ₃ H ₇ O-H ₂ O]

Obtención de la cetona **66**

El tirsiferol **43** (20 mg, 0.034 mmol) se disolvió en piridina (1 ml) y se le añadió anhídrido acético (1 ml). Al cabo de 5 horas a temperatura ambiente se adicionó hielo para destruir el exceso de anhídrido acético y se extrajo con éter etílico (3 x 10 ml). El lavado de la fase etérea se realizó con disoluciones de HCl 5% (2 x 10 ml) y NaHCO₃ 5 % (2 x 10 ml). Se secó posteriormente sobre sulfato sódico anhidro y una vez evaporado el disolvente se obtuvo el 18-acetato de tirsiferol. Este fue tratado con cloruro de tionilo (1 ml) en piridina (1 ml) a -20° C durante 15 horas dando como producto mayoritario de deshidratación en las dos posiciones C₁₅-C₁₆ y C₂₃-C₂₄. Este producto fue disuelto en la mezcla siguiente: 2 ml de tetracloruro de carbono, 2 ml de acetonitrilo y 3 ml de agua. Se le añadió metaperiodato sódico (4.1 eq) y tricloruro de rutenio (2.2 mol %) sometiéndolo a agitación vigorosa durante 2 horas a temperatura ambiente. Seguidamente se adicionó 5 ml de CH₂Cl₂. Después de la extracción y la separación cromatográfica en columna de gel de sílice con n-Hexano:AcOEt (7:3) se obtuvo la cetona **66** como un aceite incoloro.

DATOS FISICOS

Aceite

IR ν_{\max} (CHCl₃): 2970, 2870, 1725, 1465, 1385, 1100, 900 y 745 cm⁻¹

RMN ¹H (CDCl₃) δ : 1.06 (s, 3H); 1.19 (s, 3H); 1.27 (s, 3H); 1.39 (s, 3H); 2.10 (dd, J= 13.2, 3.9 Hz, 1H); 2.23 (dd, J= 13.2, 3.4 Hz, 1H); 2.28 (s, 3H); 2.44 (dd, J= 13.5, 2.5 Hz, 1H); 3.10 (dd, J= 11.2, 2.4 Hz, 1H); 3.16 (dd, J= 11.3, 4.4 Hz, 1H); 3.88 (dd, J= 12.2, 3.9 Hz, 1H); 3.98 (dd, J= 6.8, 2.0 Hz, 1H)

MS: m/z: 405, 404, 403, 402, 361, 359, 207, 205

HRMS: C₁₉H₃₂O₄⁷⁹Br, obs. 403.1464, calc. 403.1484 [M⁺+H]

Obtención del aldehído **67**

El dehidrotirsiferol **51** (25 mg, 0.044 mmol) disuelto en CH₂Cl₂ (5 ml) se sometió a una reacción de foto-oxigenación. Se hizo burbujear una suave corriente de oxígeno gas seco, mientras era sometido a una irradiación externa con una lámpara de sodio a 15° C en presencia de cantidades catalíticas de VO(acac)₂. Transcurridas 2 horas se evaporó el disolvente a vacío y el residuo fue cromatografiado en una columna de sílica gel eluyendo con éter etílico. Se obtuvieron 3.6 mg de aldehído **67**.

DATOS FISICOS

Sólido amorfo de color blanquecino

$[\alpha]_D^{25} = + 5.3^\circ$ (c 0.36, CHCl₃)

IR ν_{\max} (CHCl₃): 3567, 2955, 2929, 2856, 2360, 2341, 1717, 1558, 1508, 1457 y 1230 cm⁻¹

RMN ¹H (CDCl₃) δ : 1.20 (s, 3H); 1.21 (s, 3H); 1.27 (s, 3H); 1.40 (s, 3H); 1.50 (m, 1H); 1.53 (m, 1H); 1.55 (m, 1H); 1.60 (m, 1H); 1.75 (m, 1H); 1.76 (m, 1H); 1.80 (m, 1H); 1.81 (m, 1H); 1.82 (m, 1H); 2.08 (m, 1H); 2.13 (m, 1H); 2.26 (m, 1H); 2.48 (m, 2H); 2.61 (m, 2H); 3.08 (dd, J= 11.0, 2.5 Hz, 1H); 3.42 (dd, J= 11.3, 5.7 Hz, 1H); 3.89 (dd, J= 12.3, 4.1 Hz, 1H); 4.28 (dd, J= 6.7, 5.0 Hz, 1H); 4.83 (bs, 1H); 5.06 (bs, 1H); 9.78 (dd, J= 1.4, 1.4 Hz, 1H)

RMN ¹³C (CDCl₃) δ : 19.36 (q); 20.06 (q); 21.71 (t); 22.93 (t); 23.63 (q); 24.72 (t); 26.17 (t); 28.23 (t); 31.01 (q); 37.08 (t); 38.66 (t); 42.16 (t); 58.99 (d); 72.60 (d); 72.97 (s); 74.37 (s); 74.96 (s); 78.90 (d); 86.69 (d); 110.26 (t); 149.84 (s); 202.20 (d)

MS: m/z: 424, 363, 291, 289, 278, 277, 274, 205, 125

HRMS: M⁺ no observado

C ₂₂ H ₃₅ O ₄ ,	obs. 363.25354,	calc. 363.25353	[M ⁺ -Br]
C ₁₃ H ₂₂ O ₂ ⁸¹ Br,	obs. 291.07991,	calc. 291.07827	[M ⁺ -C ₉ H ₁₃ O ₂]
C ₁₃ H ₂₂ O ₂ ⁷⁹ Br,	obs. 289.07969,	calc. 289.08032	[M ⁺ -C ₉ H ₁₃ O ₂]
C ₁₇ H ₂₆ O ₃ ,	obs. 278.18634,	calc. 278.18819	[M ⁺ -C ₅ H ₉ O ⁸¹ Br]
C ₁₃ H ₂₃ O ⁷⁹ Br,	obs. 274,09261,	calc. 274.09323	[M ⁺ -C ₉ H ₁₂ O ₃]

Obtención del acetato de predehidrovenustatriol 64

A una disolución del compuesto **62** (3 mg, 5.7 μmol) en piridina seca (250 μl) le fue adicionado anhídrido acético (250 μl) y la mezcla resultante sometida a agitación durante 5 horas a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno. Después de realizada la extracción habitual, el residuo aceitoso obtenido fue disuelto en 1 ml de etanol a 0° C y se le añadió 5 mg de Zn en polvo y 50 μl de AcOH. La mezcla se agitó durante 3 horas, fue filtrada y el disolvente evaporado para dar un residuo que después de ser cromatografiado se comprobó que era 1.9 mg del compuesto **64** puro.

IV.4. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA

A. CULTIVOS DE CÉLULAS

Los ensayos de actividad citotóxica se realizaron sobre cultivos *in vitro* de células tumorales de los siguientes tipos:

- Suspensión de células P-388 (ATCC CCL-46) de neoplasma linfoide de ratón DBA/2.
- Líneas de células A-549 (ATCC CCL-185) de carcinoma de pulmón humano.
- Líneas de células HT-29 (ATCC HTB-38) de carcinoma de colon humano.
- Líneas de células MEL-28 (ATCC HTB-72) de melanoma humano.

Estas células se mantuvieron en fase de crecimiento logarítmico, en un medio EMEM/nea (Eagle's Minimun Essential Medium, Earle's Balanced Salt, con L-

Glutamina 2.0 mM, con aminoácidos no esenciales y preparado sin bicarbonato sódico). Este medio es entonces suplementado con un 5% de FCS (Fetal Calf Serum), bicarbonato sódico 10^{-2} M y con la presencia de los antibióticos penicilina G (0.1 g/l) y sulfato de estreptomicina (0.1 g/l).

B. ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD

Los metabolitos a ensayar, se añadieron a los medios de cultivo disueltos en una proporción de 1 mg/ml en una mezcla de metanol:acetona (1:1). Las células fueron sembradas en pocillos de 16 mm de diámetro a una concentración de 1×10^4 (P-388) y 2×10^4 (A-549, HT-29 y MEL-28) por pocillo, en alícuotas de 1 ml de medio EMEM 5%FCS, conteniendo los productos a evaluar a diferentes concentraciones. En cada caso y de forma separada, se realizó un cultivo sin adicionar ningún tipo de droga para poder utilizarlo como control, realizándose todas las determinaciones por duplicado. Después de tres días de incubación a 37° C, en una atmósfera con un 98 % de humedad y 10 % de CO₂, las líneas celulares fueron contadas con un Coulter[®] Counter ZM. Todos los recuentos de células por pocillo, fueron promediados, para poder compararlos con los cultivos control. Los resultados de éstos fueron usados para generar la curvas de dosis-repuesta con las que determinar de forma precisa los valores IC₅₀ (concentración de muestra a la que se produce la inhibición del 50 % de crecimiento celular). Los valores de IC₅₀ son usados como parámetro de citotoxicidad.

TOXINAS POLIETEREAS DE ORIGEN MARINO

I. Introducción

II. Estudios de Complejación del Acido Okadaico

III. Estudios Biosintéticos de las Toxinas del *P.lima*

IV. Parte Experimental

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCION

A lo largo de los últimos años, el interés por los fenómenos tóxicos asociados con las proliferaciones de microalgas del fitoplancton marino, conocidos como mareas rojas, ha ido en aumento en función de la creciente necesidad social de controlar de forma efectiva los efectos producidos por los mismos y del enorme interés que tienen las sustancias tóxicas involucradas, tanto desde un punto de vista químico como desde un punto de vista farmacológico.

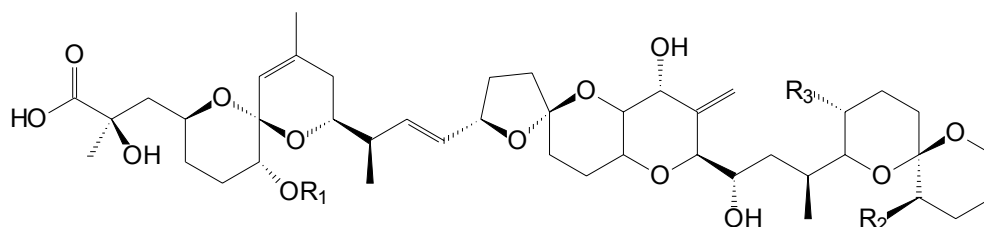
Una de estas toxinas, el ácido okadaico (AO) **1**, es responsable junto con otros derivados polietéricos del síndrome diarreico conocido como DSP (diarrhetic shellfish poisoning) que, aunque no es mortal, causa un gran impacto en la salud pública y en la industria marisquera cuando los períodos de infestación son prolongados. Este síndrome, cuyos principales síntomas son las diarreas, vómitos y cefaleas de cierta intensidad, se produce como consecuencia de la ingestión de moluscos contaminados, fundamentalmente mejillones, los cuales filtran el agua de mar reteniendo en su hepatopáncreas los organismos planctónicos y sus toxinas.

El grupo de las toxinas DSP ha sido el último en estudiarse tanto desde el punto de vista estructural como farmacológico. Ello ha sido debido fundamentalmente a que el efecto que produce su ingestión, una gastroenteritis, durante muchos años estuvo relacionada con la contaminación del marisco por parte de otros organismos patógenos presentes en el mar. De hecho la toxina “cabeza de serie” del grupo, el ácido okadaico, fue aislado como metabolito de la esponja *Halichondria okadai*, y sólo dos años más tarde fue relacionada con el fenómeno tóxico y su origen establecido a partir de dinoflagelados del fitoplancton.¹

El *Prorocentrum lima* es uno de los dinoflagelados responsables junto con otros pertenecientes al género *Dinophysis*, de la producción de las toxinas características de las mareas rojas tipo DSP. Las toxinas responsables de este fenómeno natural, constituyen un grupo de toxinas lípido-solubles caracterizadas por un esqueleto con anillos de oxolano y

1. a) F.J. Schmitz, R.S. Prasad, Y. Gopichand, M.B. Hossain, D. Van der Helm, P. Schmitz, *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**, *103*, 2467; b) K. Tachibana, P.J. Scheuer, H. Kiruchi, Y. Tsukitani, D. Van Engen, J. Clardy, Y. Gopichand, F.J. Schmitz, *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**, *103*, 2469; c) T. Yasumoto, M. Murata, Y. Oshima, M. Sano, G.K. Matsumoto, J. Clardy, *Tetrahedron*, **1985**, *41*, 1019.

oxano agrupados en forma de espiro o trans-fusionados. Las diferencias estructurales entre ellas se establecen fundamentalmente en la presencia de metilos secundarios sobre los carbonos C-31 y C-35. De esta forma, el ácido okadaico **1** posee un metilo secundario en el carbono C-31, mientras que la dinofisistoxina-2 (DTX-2) **4** (toxina de la que todavía no se ha establecido el dinoflagelado que la produce, puesto que sólo ha sido aislada de mejillones contaminados), es su isómero con el metilo en C-35. Por otro lado, la dinofisistoxina-1 (DTX-1) **2** posee ambos metilos en tanto que la dinofisistoxina-3 (DTX-3) **3** es el 7-O-acil derivado de la DTX-1.



OA 1	R ₁ = H, R ₂ = H, R ₃ = Me
DTX-1 2	R ₁ = H, R ₂ = Me, R ₃ = Me
DTX-3 3	R ₁ = acilo, R ₂ = Me, R ₃ = Me
DTX-2 4	R ₁ = H, R ₂ = Me, R ₃ = H

Durante los últimos años, nuestro grupo de investigación ha venido poniendo en marcha una nueva línea de trabajo hacia el estudio químico-estructural y biosintético de este tipo de metabolitos, para lo cual como primer objetivo, se realizaron cultivos artificiales a gran escala de distintas cepas de *P. lima* ya que del género *Dinophysis*, a pesar de los esfuerzos llevados a cabo, no se ha logrado cultivar artificialmente hasta la fecha. Este primer paso, el disponer de cultivos artificiales de las especies planctónicas responsables de estos fenómenos era fundamental a la hora de abordar un estudio serio, además de que la posibilidad de disponer de mayor cantidad de extracto permite el aislamiento e identificación de las toxinas minoritarias e inestables. En el caso de que las toxinas fuesen obtenidas únicamente de fuente natural, la disponibilidad de la sustancia necesaria para la realización de su estudio quedaría exclusivamente restringida a la aparición del fenómeno tóxico. Esto supondría que se diesen de manera conjugada varios factores, tanto naturales como generados por el hombre, que influyen directamente en las

condiciones de salinidad, temperatura y concentración de nutriente idóneas. Todo ello conduce a la multiplicación de dinoflagelados en zonas relativamente cerradas, como ciertas bahías de poca profundidad, dando lugar al fenómeno conocido como “mareas rojas”.

En función de lo expuesto anteriormente y dentro de la continua colaboración que mantenemos con grupos del Instituto Español de Oceanografía de Vigo, nos fueron cedidas células de *P. lima*. Las distintas cepas fueron localizadas en diversos lugares de las Rías Gallegas, en los fondos de las mismas, depositadas sobre algas o fijadas sobre las cuerdas de las bateas dado su carácter bentónico. Una vez que fueron aisladas, identificadas y cultivadas artificialmente a pequeña escala en las cámaras del IEO de Vigo, se trasladaron a nuestro laboratorio, donde se procedió a su cultivo a gran escala.

A la hora de obtener un cultivo de estas características, partiendo de unas pocas células de dinoflagelado, fue necesario ir optimizando sucesivamente una serie de factores de crecimiento, llegando al establecimiento de las siguientes **condiciones idóneas para el cultivo a gran escala del *Prorocentrum lima***:

a) Medio de cultivo

El medio de cultivo empleado ha sido el *medio K* descrito por Guillard,² puesto que resultó el medio más específico y mejor caracterizado para el dinoflagelado. La naturaleza y concentraciones molares de las soluciones nutrientes se dan en la **tabla 1**:

MEDIO K

<u>Compuestos</u>	<u>Concentración (M)</u>	<u>g/l agua destilada</u>
1.- NO ₃ Na	8.83 x 10 ⁻⁴	75.05
2.- NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	1 x 10 ⁻⁵	1.38
3.- ClNH ₄	5 x 10 ⁻⁵	2.68
4.- Tris	1 x 10 ⁻³	121.14

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

5.- Na ₂ EDTA.2H ₂ O	1 x 10 ⁻⁴	37.22
6.- FeEDTA	1.7 x 10 ⁻⁵	5.00
7.- Metales trazas		
MnCl ₂ .4H ₂ O	9 x 10 ⁻⁷	0.18
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8 x 10 ⁻⁸	0.02
CoCl ₂ .6H ₂ O	5 x 10 ⁻⁸	0.01
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	3 x 10 ⁻⁸	0.007
CuSO ₄ .5H ₂ O	1 x 10 ⁻⁸	2.4968 x 10 ⁻³
H ₂ SeO ₃	1 x 10 ⁻⁸	1.2898 x 10 ⁻³
8.- Vitaminas		
Tiamina ClH	3 x 10 ⁻⁷	0.1
Biotina	2.1 x 10 ⁻⁹	5.1305 x 10 ⁻⁴
Vitamina B ₁₂	3.7 x 10 ⁻¹⁰	5.0149 x 10 ⁻⁴

Tabla 1

Las soluciones stocks de nutrientes se preparan de tal forma, que tomando 1 ml de solución de nutrientes por litro de medio de cultivo, resulte la concentración deseada. Se emplea para ello agua destilada y son autoclavadas y almacenadas a temperatura ambiente. Como soporte para el medio de cultivo se utiliza agua de mar con un 5% de agua destilada, que es esterilizado pasándolo a través de un sistema de filtros (1µm, 0.45µm y 0.22 µm) con una bomba peristáltica.

b) Temperatura óptima de crecimiento

En relación con la temperatura de los cultivos, se estableció en 23° C. Las razones fueron las siguientes: se observó que por debajo de 17° C el cultivo era notoriamente más lento en su primera fase y que por encima de 25° C las células morían. Además se observó que el crecimiento del cultivo es ligeramente más rápido en una primera fase a 23° C, aunque cuando se alarga el mismo se iguala la cantidad de células. Esto es lógico porque cuantas más células hay, más se favorece la reproducción sexual del dinoflagelado, independientemente de la reproducción vegetativa por escisión, que es la más frecuente.

c) Aireación

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

d) Duración del fotoperíodo

Se comprobó que el fotoperíodo no era necesario para la supervivencia del cultivo, por lo que se mantiene bajo iluminación constante.

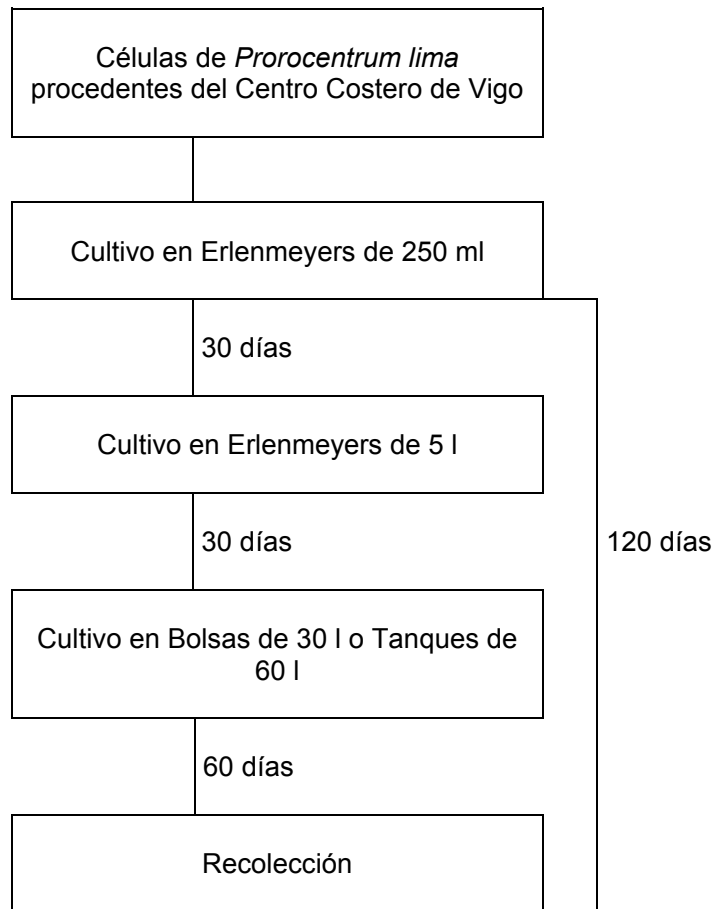
e) Intensidad lumínica

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

e) Ciclo de cultivo

El estadio inicial del cultivo a gran escala así como el cultivo de mantenimiento, se conserva en erlenmeyers de 250 ml con 150 ml de medio. Transcurridos 30 días, tiempo en el que el cultivo estabiliza su crecimiento, estos son trasvasados a recipientes de 5 l que contienen 3 l de medio. Una vez concluida esta etapa, que dura también cuatro semanas, comienza el último estadio del cultivo de sesenta días de duración, en bolsas de plástico de 20 l de capacidad conteniendo 15 l de medio o en tanques de vidrio de 60 l conteniendo 40 l. El paso de uno a otro se hace añadiendo dos erlenmeyers de un nivel inferior a un recipiente de volumen superior conteniendo 2/3 del volumen final de medio de cultivo.

A la vista de los datos anteriores, se establece el tiempo aproximado de un ciclo de cultivo completo en 4 meses (**Esquema 1**).



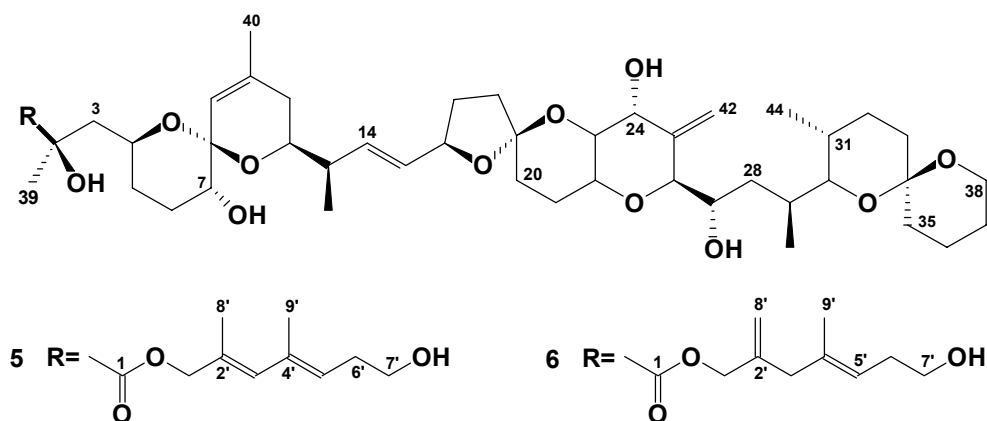
Esquema 1

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

Una vez completado el ciclo de crecimiento en las condiciones idóneas, se llevó a cabo la **recolección de las células**. Para ésta, dado el carácter bentónico del dinoflagelado (éste se adosa al fondo del recipiente que lo contiene), se procede a suspender las células en el medio. Ello se lleva a cabo manualmente utilizando una varilla de teflón. A continuación, las células en suspensión se recolectan por centrifugación continua a 7000 r.p.m. y a 0° C, y se maceran durante una hora en una solución de acetona al tiempo que se

someten a ultrasonido. Esta operación es necesaria para producir la ruptura de la pared celular del dinoflagelado. Las células se extraen hasta agotamiento y el disolvente se evapora obteniéndose un extracto de color verde oscuro que a continuación es sometido a diferentes procesos cromatográficos.

El siguiente paso, dado que las marchas cromatográficas utilizadas hasta el momento con las muestras de ácido okadaico eran largas y tediosas aumentando la posibilidad de pérdida de producto, nos propusimos conseguir una cromatografía rápida y eficaz, sobre todo cara a los experimentos biosintéticos. Como resultado de este estudio, se estableció el siguiente **método de separación y purificación** eficaz para las toxinas aisladas y posteriormente identificadas en nuestro laboratorio como ácido okadaico **1**³ (aislada en todas las cepas ensayadas), dinofisistoxina-1 **2**⁴ (cepa PL-4 y trazas en la PL-2) y de dos nuevos ésteres del AO, el 7'-hidroxi-2',4'-dimetil-hepta-2'(E),4'(E)-dienil-okadaato **5** y el 7'-hidroxi-4'-metil-2'-metilen-hepta-4'-enil-okadaato **6**⁵ (uno aislado de la cepa PL-3 y otro de la cepa PL-2, respectivamente).



El aislamiento se lleva a cabo mediante cromatografía de filtración en gel con Sephadex LH-20 utilizando como eluyente la mezcla: n-Hexano:CHCl₃:MeOH (2:1:1). La fracción tóxica así obtenida se cromatografía a media presión a través de una columna de fase reversa Lobar® Lichroprep RP-18 que es eluida con la mezcla MeOH:H₂O (85:15). Esta cromatografía nos permite separar los ésteres del ácido okadaico de la mezcla

3. M. Norte, R. González, J.J. Fernández, M. Rico, *Tetrahedron*, **1991**, 47, 7437-7446.
4. M. Norte, A. Padilla, J.J. Fernández, *Tetrahedron Letters*, **1994**, 35, 1441-1444.
5. M. Norte, A. Padilla, J.J. Fernández, M.L. Souto, *Tetrahedron*, **1994**, 50, 9175-9180.

AO/DTX-1, eluyendo en primer lugar la mezcla de las dos toxinas y en segundo lugar los ésteres. Hay que tener en cuenta que ninguna cepa de las estudiadas hasta la fecha tiene presentes los dos ésteres conjuntamente.

La purificación final de los ésteres se llevó a cabo a través de HPLC en una columna semipreparativa μ -Bondapak C-18 eluyendo con MeOH:H₂O (85:15) y con un flujo de 3 ml/min. Los tiempos de elución de los dos ésteres son muy similares y están alrededor de los 22 min.

La separación y purificación final del AO y DTX-1 se realiza también en HPLC con la misma columna μ -Bondapak C-18, pero se utiliza un gradiente lineal binario de una hora de duración, con un flujo de 2.5 ml/min, cuya elución comienza con la mezcla CH₃CN:H₂O:AcOH (50:50:0.1) y finaliza con CH₃CN:AcOH (100:0.1) durante 30 minutos más. En estas condiciones de trabajo, el AO suele tener un tiempo de retención de 27/28 min después de la inyección de la muestra y la DTX-1 de unos 38/40 min.

El seguimiento de todas las cromatografías se hace por capa fina, eluyendo las placas con la mezcla Benceno:Acetona:Metanol:Acido Acético 6N (150:80:19:1) en la que el AO y DTX-1 presentan un R_f de 0.7 y los ésteres un R_f de 0.8.

Seguidamente se realizó la **determinación de todos los desplazamientos químicos de RMN de protón y carbono de las toxinas aisladas** (AO, DTX-1, ésteres **5** y **6**) a través de la utilización preferente de los experimentos bidimensionales de COSY, HOHAHA, HMQC, HMBC y ROESY. En este estudio se comenzó con el AO debido a que su estructura había sido determinada por difracción de RX de su derivado el éster o-bromobencilo y era necesario el poder disponer de estos datos para poder abordar los estudios biosintéticos de estas toxinas.

En cuanto a los **aspectos biosintéticos**, fueron realizados varios experimentos de adición de marcadores a cultivos artificiales de cepas PL-2 y -4,^{4,5} dos de las cuatro cepas cultivadas en nuestro laboratorio. El esquema general de los experimentos fue como sigue:

- Se inocularon con 250 ml de cultivo de *P. lima* 10 erlenmeyers de 5 l de capacidad conteniendo cada uno de ellos 2.5 l de medio de cultivo Guillard K.

- Un día antes de la adición de los precursores, se añadieron a los cultivos 40 UI/ml de penicilina G y 200 UI/ml de sulfato de estreptomycin. Los precursores que se

añadieron fueron [1-¹³C₁], [2-¹³C₁], [1,2-¹³C₂] acetato sódico en una concentración 0.67 mM en todos los casos.

- Al cabo de 10 días se procedió a la recolección de las células, extracción y aislamiento de las toxinas. La cantidad media de toxina aislada fue de 1 mg.

- El análisis de los resultados se llevó a cabo a través de RMN ¹³C.

Estos experimentos pusieron de manifiesto la incorporación selectiva de los precursores y los resultados alcanzados se resumen a continuación:

-Para el esqueleto carbonado del AO **1**, de la DTX-1 **2**, y de los ésteres **5** y **6**, se observó el enriquecimiento diferenciado de todos los carbonos de la molécula excepto dos, C-37 y C-38 en el esqueleto base junto con C-1' y C-2' en las cadenas laterales de los ésteres. Estos resultados se resumen en la **figura 1**, en la que los carbonos identificados como **c** y **m** significa, respectivamente, la procedencia biosintética del carboxilo C-1 o del metilo C-2 del acetato.

-En el esqueleto principal se observa que 16 carbonos proceden del carboxilo del acetato, mientras que 26 para el AO y 27 para la DTX-1, proceden del metilo del acetato. Del análisis de los valores de las constantes de acoplamiento C-C, se establece la presencia de 16 unidades intactas de acetato. En lo que respecta a las cadenas laterales de los ésteres la situación es similar, 5 carbonos procedentes del metilo y sólo dos del carboxilo, con dos unidades intactas de acetato.

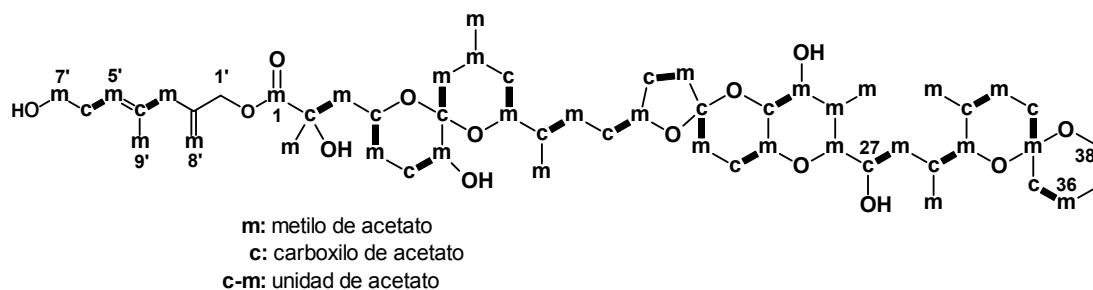


Figura 1

De acuerdo con lo anterior, podemos afirmar que estas moléculas no son policétidos clásicos, lo que es reforzado por la presencia de fragmentos de carbonos contiguos enriquecidos por el metilo del acetato. Por lo tanto, se propone una hipótesis biogenética en que estos metabolitos se biosintetizan por condensación de cinco fragmentos A-E de tres tipos diferentes en función de su origen biosintético (**Figura 2**).

Tres de ellos A, C y E tienen claramente su origen en la condensación directa de unidades de acetato, mientras que en el caso de los otros dos fragmentos B y D, el acetato es introducido en otras rutas metabólicas previamente a su incorporación en la molécula.

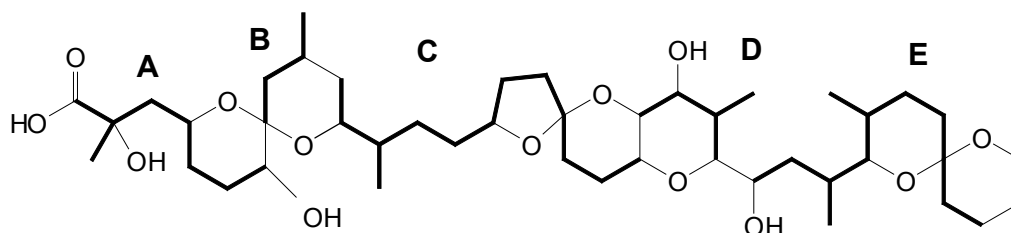
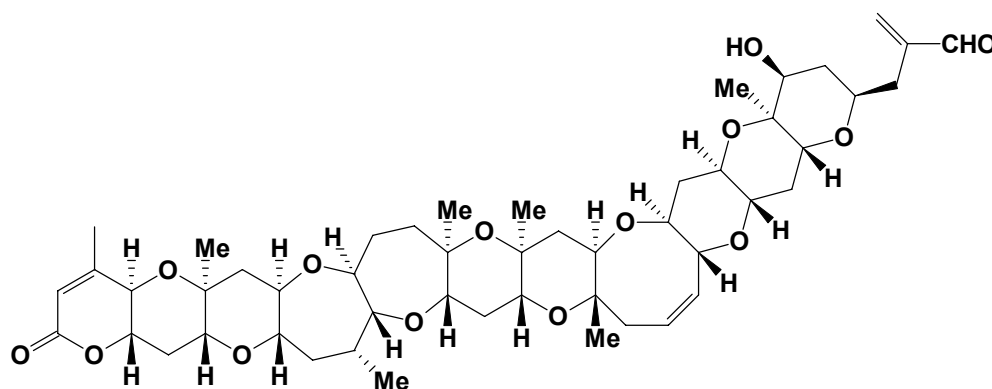


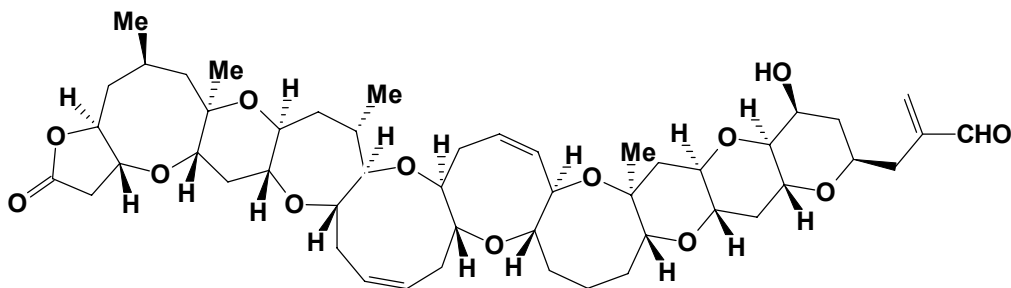
Figura 2

Estos resultados preliminares establecen diferencias notables en el modo a través del cual son biosintetizadas estas toxinas si se comparan con otras toxinas pertenecientes al mismo grupo de toxinas polietéreas de origen marino como son las brevetoxinas (BTXs) 7-8, aisladas del dinoflagelado *Ptychodiscus brevis*.⁶ Así, la importancia capital que tienen los ácidos dicarboxílicos provenientes del ciclo del ácido cítrico en la construcción de estas últimas, está muy minimizada en el caso del grupo del AO, en el que el papel fundamental en la construcción del esqueleto carbonado lo juega el acetato, quedando sólo dos pequeños fragmentos que nos parece que pueden derivar del ácido succínico y de la intervención de rutas de aminoácidos, respectivamente.



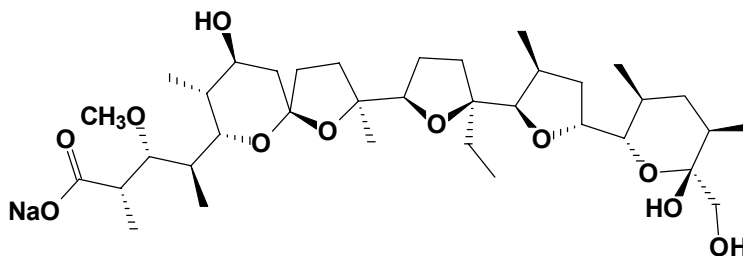
7 Brevetoxina B

6. M.S. Lee, G.-W. Qin, K. Nakanishi, M.G. Zagorski, *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111*, 6234-6241



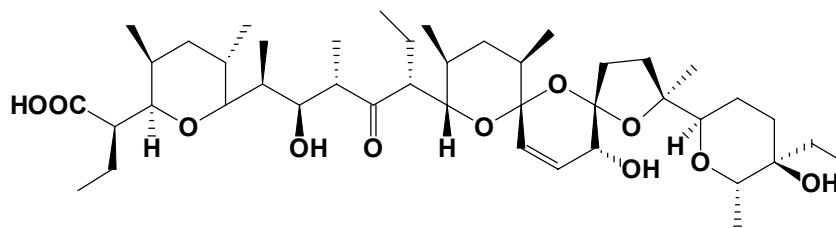
8 Brevetoxina A

Por otro lado, estos resultados acercan el origen biosintético del grupo del AO al de otro grupo de poliéteres de enorme interés, cuales son los antibióticos ionóforos terrestres tales como la monensina **9**, la nanansina **10**, el lasalócido **11**, etc., elaborados por hongos del género *Streptomyces*.⁷ Ello está en contraposición con la teoría elaborada por el grupo de Nakanishi (Columbia) que proponía que el elevado grado de implicación del ciclo del ácido cítrico en la biosíntesis de las BTXs, sería una diferencia general entre el origen biosintético de los poliéteres de origen terrestre y de origen marino. Hay que resaltar que, desde un punto de vista estructural hay diferencias claras entre el AO y las BTXs en lo referente tanto al tamaño de los anillos heterocíclicos como a la forma de unión entre ellos. Así, los anillos de tamaño medio trans-fusionados de las BTXs se contraponen a los anillos de oxolano y oxano en forma de espiro del grupo del okadaico, similares a las estructuras de los poliéteres de origen terrestre. En cualquier caso, llama poderosamente la atención la capacidad de los dinoflagelados para biosintetizar derivados de ácidos grasos de gran tamaño, en contraposición con los organismos terrestres.

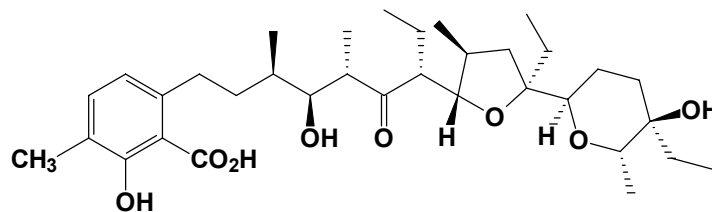


9

7. a) J.W. Westley, "Polyether Antibiotics: Carboxylic Ionophores", M. Dekker; Ed. New York, Vol. II, 1982; b) J.W. Westley, *J. Nat. Prod.*, 1986, 49, 35.



10



11

Otro de los aspectos relacionados con este grupo de toxinas que ha despertado en los últimos años un enorme interés entre la comunidad científica, es el estudio de sus aplicaciones desde el punto de vista farmacológico.

En efecto, la fosforilación reversible de proteínas sobre residuos de serina, treonina y/o tirosina es el principal mecanismo implicado en la regulación de los procesos de transducción de señales celulares. El estado de fosforilación de una determinada proteína, depende directamente de las actividades relativas de las enzimas denominadas proteína quinasa y proteína fosfatasa. Mientras que la familia de las proteína quinasa ha estado sujeta a una intensiva investigación durante las pasadas décadas, el papel concreto de las proteína fosfatasa en la fisiología celular es menos conocido. La reciente disponibilidad de potentes y selectivos inhibidores de proteína fosfatasa del tipo 1 (PP1) y tipo 2 (PP2A),⁸ dos de las más importantes fosfatasa específicas de serina/treonina presentes en las células eucarióticas, ha atraído la atención de los investigadores hacia el papel fisiológico jugado por estas enzimas en la regulación de las funciones celulares.

Los inhibidores de proteína fosfatasa, particularmente el ácido okadaico, inducen efectos complejos sobre la musculatura lisa, sugiriendo que las proteína fosfatasa del tipo -1 y -2A juegan un importante papel en la regulación de la contracción y de la

8. a) A.C. Takai, C. Bialojan, M. Troschka, J.C. Rüegg, *FEBS Lett.*, **1987**, 217, 81; b) P. Cohen, S. Klumpp, D.L. Schelling, *FEBS Lett.*, **1989**, 250, 596-600; c) P. Cohen, F.B. Holmes, Y. Tsukitani, *TIBS*, **1990**, 15, 98.

relajación del músculo liso. En la mayoría de los tejidos en los que sus efectos han sido estudiados, el ácido okadaico exhibe una doble acción, estimulante e inhibitoria, sobre la actividad mecánica,⁹ si bien, en algunas preparaciones de músculos lisos como las de vaso deferente de rata¹⁰ o en arteria basilar canina,¹¹ sólo han sido observados efectos inhibitorios.

Los efectos contráctiles del AO sobre músculo liso se correlacionan con un incremento en el estado de fosforilación de la cadena ligera de 20 KDa de miosina y que parece estar relacionada con la inhibición de la fosfatasa PP1 de la cadena ligera de miosina.¹² Con respecto a los efectos inhibitorios, aunque no se conocen bien los mecanismos a través de los cuales este compuesto ejerce su acción, en un principio fueron atribuidos a una acción indirecta de proteína quinasas dependientes de AMPc y/o GMPc, o a una posible interacción con los elementos contráctiles. También se ha considerado la hipótesis de que implique inhibición de la entrada de calcio.¹³

En miometrio de rata, se ha observado que el ácido okadaico induce contracción a concentraciones superiores a 3 μ M, mientras que a concentraciones más bajas inhibe la contracción inducida por una solución elevada de iones K⁺.¹⁴ Estos experimentos han sido realizados en nuestro laboratorio por el grupo que dirige la Dra. Luz Candenás de Luján, que desarrolla su investigación en este campo y que actualmente tiene como principal objetivo el estudio sobre los posibles mecanismos implicados en los efectos inhibitorios provocados por el ácido okadaico en útero de rata en fase estrógena. Los resultados obtenidos hasta el momento se pueden resumir en los siguientes puntos:

-
9. a) N. Ashizawa, F. Kobayashi, Y. Tanaka, K. Nakayama, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1989**, 162, 971; b) H. Karaki, M. Mitsui, H. Nagase, H. Ozaki, S. Shibata, D. Uemura, *Br. J. Pharmacol.*, **1989**, 98, 590; c) E. Naline, M.L. Candenás, C. Palette, J. Moreau, M. Norte, J.D. Martín, M. Pays, C. Advenier, *Br. J. Pharmacol.*, **1994**, 256, 301.
 10. S. Shibata, N. Satake, M. Morikawa, S.C. Kown, H. Karaki, K. Kurahashi, T. Sawada, I. Kodama, *Eur. J. Pharmacol.*, **1991**, 193,1.
 11. M. Kimura, Y. Suzuki, S.I. Satoh, M. Takayasu, M. Shibuya, K. Sugita, *Brain Res. Bull.*, **1993**, 30, 701.
 12. a) C. Biolojan, J.C. Rüeg, A. Takai, *J. Physiol.*, **1988**, 398, 81-95; b) M.C. Gong, P. Cohen, T. Kitazawa, M. Ikebe, M. Masuo, A.P. Somlyo, A.V. Somlyo, *J. Biol. Chem.*, **1992**, 267, 14662.
 13. a) S.M. Ward, F. Vogalis, D.P. Blondfield, H. Ozaki, N. Fusetani, D. Vemura, *Am. J. Physiol.*, **1991**, 261, C64; b) N. Yanagihara, Y. Toyohira, Y. Kode, A. Wade, F. Izumi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1991**, 174, 77; c) K. Obara, H. Yabu, *Am. J. Physiol.*, **1993**, 264, C296.
 14. M.L. Candenás, M. Norte, R. González, E. Arteché, J.J. Fernández, R. Borges, J. Boada, C. Advenier, J.D. Martín, *Eur. J. Pharmacol.*, **1992**, 219, 473-476.

- en músculo liso uterino de rata, los efectos inhibitorios del AO no están, al menos totalmente, mediados por la activación de los pasos dependientes de AMPc y/o GMPc.

- la respuesta a AO es altamente resistente a la ausencia de calcio,¹⁵ aunque se ha observado que la contracción inducida por AO en el músculo uterino liso de rata es parcialmente efectuada por movimientos de calcio a través de la membrana, pudiendo ser inhibido por teofilina o cafeína en un medio libre de Ca^{2+} con una disolución 10^{-3} M de EGTA. Esta contracción también envuelve una movilización de Ca^{2+} de un depósito intracelular que es también sensible a xantinas. El último efecto parece ser importante en la inducción de contracción. Sin embargo, este estudio no excluye la posibilidad de que otros mecanismos estén envueltos en la contracción inducida por AO.¹⁶

-el AO y el activador de la proteína quinasa C, forbol 12,13-dibutirato inducen efectos similares en músculo uterino liso de rata y sugiere que las proteína fosfatasa de tipo PP1 y PP2A deben jugar parte importante en la regulación de los mecanismos de la respuesta mecánica evocada por la activación de la proteína quinasa C en miometrio de rata.

En base a todo lo anterior, vemos que aún no se ha llegado a resultados concluyentes, por lo que ulteriores estudios se hacen necesarios para clarificar los mecanismos envueltos en la interacción.

El enorme interés que el ácido okadaico suscita desde el punto de vista fisiológico y farmacológico, es lógico ya que mediante su uso puede permitírnos diferenciar un gran número de procesos celulares que están mediados a través de mecanismos de fosforilación reversible de proteínas,¹⁷ así como profundizar en el conocimiento del modo de acción de fármacos cuyo mecanismo intrínseco no ha sido aún establecido, a pesar de los intensos estudios realizados hasta el momento.

Además, vinculado a su actividad como potente inhibidor de las proteína fosfatasa, el AO ha resultado ser un potente inductor tumoral,¹⁸ definiendo un nuevo grupo conocido

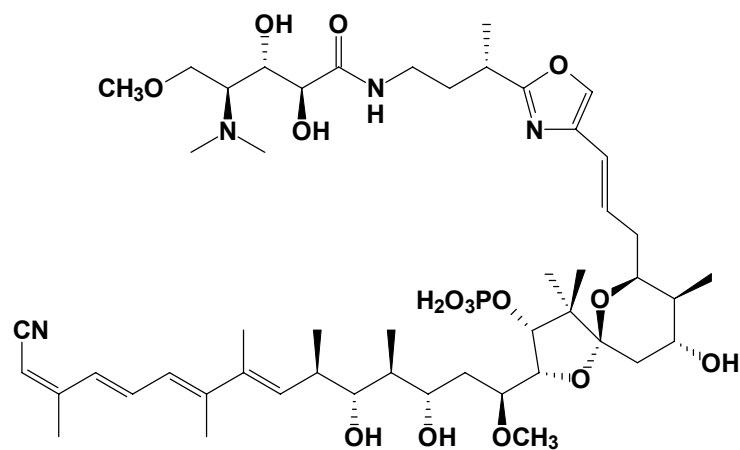
15. E. Arteché, M.P. Ausina, J.D. Martín, M. Norte, C. Advenier, M.L. Candenás, *Planta Medica*, **1995**, *61*, 13-17.

16. M.L. Candenás, E. Arteché, M. Norte, C. Advenier, J.D. Martín, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol*, **1994**, *350*, 315-321.

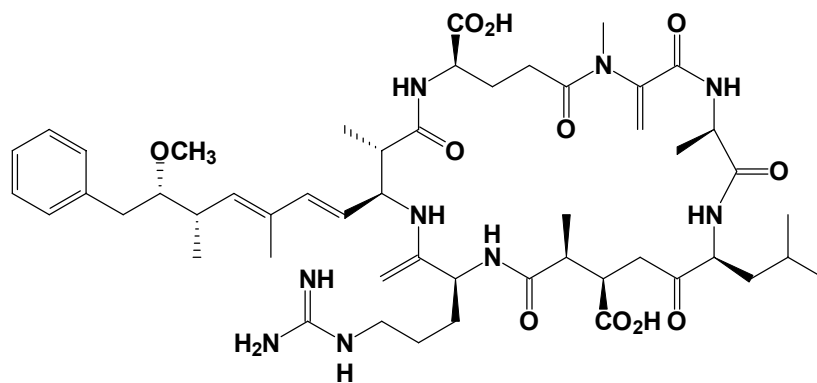
17. T.A.J. Haystead, A.T.R. Sim, D. Carling, R.C. Honnor, Y. Tsukitaki, P. Cohen, D.G. Hardie, *Nature*, **1989**, *337*, 78-81.

18. H. Fujiki, M. Suganuma, S. Nishiwaki, S. Yoshizawa, B. Winyar, T. Sugimura, F.J. Schmitz, *The Biology and Medicine of signal transduction*, ed. Y. Nishizuka Raven Press, New York, **1990**, 340-343.

como el grupo de ácido okadaico, y que incluyen además de él mismo, la dinofisistoxina-1 **2**, la caliculina A **12** y la microcistina LR **13**.¹⁹ Estos inductores tumorales actúan por un mismo mecanismo, la inhibición de proteína fosfatasa, demostrando el importante papel que estas enzimas pueden jugar como protectores celulares frente al desarrollo de tumores.



12



13

19. R.J. Quinn, C. Taylor, M. Suganuma, H. Fujiki, *BioMed. Chem. Lett.*, **1993**, 3(6), 1029-1034.

II. ESTUDIO DE COMPLEJACIÓN DEL ÁCIDO OKADAICO

Cuando aislamos en nuestro laboratorio ácido okadaico **1** de cultivos del dinoflagelado marino *Prorocentrum lima*, éste aparece generalmente complejo con un catión metálico.³ Las muestras de este complejo no pueden ser diferenciadas de las muestras libres durante la cromatografía, debido a que los comportamientos cromatográficos de ambas en las condiciones habituales son idénticas, pero sí son detectadas por espectroscopía de RMN (**Figura 3**), en donde puede observarse que los espectros del complejo metálico muestran peor resolución y ligeras diferencias en los desplazamientos químicos con respecto a la muestra libre.

La presencia del catión metálico, fue confirmada por el hecho de que el tratamiento de las muestras con EDTA disódico permitió obtener ácido okadaico libre. Bastó con añadir una disolución de EDTA 80 mg/10 ml, agitar, separar la fase orgánica, lavar y secar con MgSO₄, para obtener una muestra pura del mismo. Este proceso puede incluso simplificarse a añadir unas gotas de la disolución de EDTA en el mismo tubo de resonancia, pudiendo realizar a continuación un espectro de RMN de la muestra totalmente descomplejada.

Estos hechos nos llevaron a plantearnos el realizar un estudio sobre la capacidad de complejación del ácido okadaico con varios cationes metálicos a fin de determinar la naturaleza del catión que nos aparece en nuestras muestras de ácido okadaico aislado de *P. lima*. Este catión podría tener influencia en la potente actividad farmacológica que presenta el AO comentada con anterioridad, por lo que consideramos interesante explorar la posible conexión entre la posible capacidad ionófora de este compuesto y su actividad. Además, como hemos indicado, la presencia o ausencia de complejación del AO es detectada fácilmente por experimentos de RMN, por lo que es viable el seguimiento de la quelación.

A la hora de escoger los cationes metálicos para los ensayos, por un lado se consideró el tamaño de la cavidad adoptada por el AO, y por otro, que se tratase de iones de reconocida influencia en los procesos celulares. Así, en primer lugar se estableció cual sería la conformación más estable del ácido okadaico en disolución, concluyendo que ésta coincide con la encontrada para la molécula en estado sólido a través de estudios de difracción de rayos X. En efecto, por combinación de los datos del análisis de rayos X

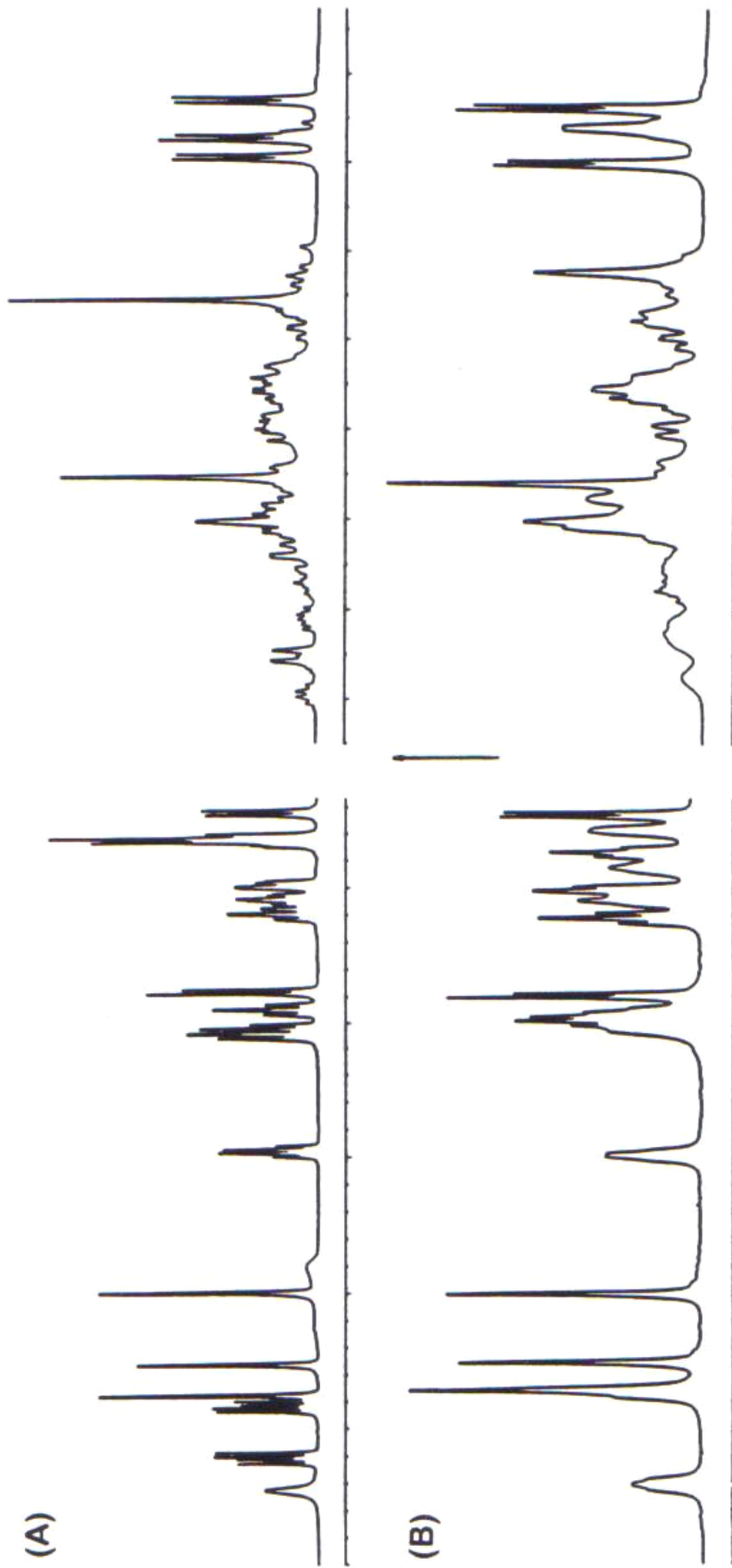


Figura 3. Comparación de los espectros de RMN ^1H del ácido okadaico libre (A) y del complejo (B).

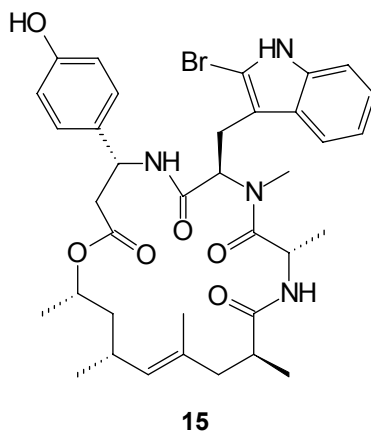
de su derivado éster o-bromobencilo,^{1a,1b} con los de los estudios de modelización molecular¹⁹ y con los datos de RMN que habíamos obtenido en nuestros estudios³ se deduce que a la molécula en disolución se le confiere una geometría en forma de bastón que configura una cavidad cuyo diámetro está en torno a valores de 5-7 Å a través de un puente de hidrógeno entre el grupo carboxilo y el grupo hidroxilo sobre el carbono C-24 del anillo E. De esta manera, de los 13 oxígenos que forman parte de la molécula, 10 se disponen alrededor de la cavidad y, a su vez, 7 de ellos se encuentran a una distancia de aproximadamente 4 Å respecto del centro de la misma. El resto de la molécula, entre los carbonos C-25 y C-38 se orienta como una cadena alquílica extendida y dos anillos de tetrahidropirano (**Figura 4**).

La suposición de la presencia del catión en la zona reseñada de la molécula, concuerda con el hecho experimental de que en todos los casos en que existe esterificación en el grupo carbonilo, como ocurre con los diol ésteres aislados de la cepas de *Prorocentrum lima* cultivadas por nosotros, nunca se presentan muestras complejadas al ser aislados de fuente natural. Además, cuando se comparan los desplazamientos químicos de los espectros de RMN del ácido libre y del complejo (**Tablas 2-3**), se observa que las diferencias más notables son las correspondientes a las señales del doble enlace C-14/C-15, las de los metinos H-12 y H-23 y la del metilo secundario Me-13, lo que refuerza esta hipótesis.

En base a esto, decidimos ensayar muestras de ácido okadaico libre con sales de metales alcalinos y alcalinotérreos, concretamente de los cationes metálicos: Li⁺, Na⁺, K⁺, Ca²⁺ y Mg²⁺, iones que combinan ambos requerimientos.

A la hora de plantearnos el protocolo a seguir en la experimentación para la formación de los complejos, inicialmente se decidió invertir el proceso que realizábamos en la descomplejación por adición de EDTA disódico, para lo cual lo más evidente sería añadir a muestras de ácido okadaico libre, disoluciones de los cationes metálicos y someterlas a agitación. Se consideró que éste era un planteamiento factible a pesar de su simplicidad, ya que el proceso de descomplejación con EDTA era prácticamente inmediato

y además se había empleado un protocolo similar para el estudio de complejación del jasplakinolido **15**, un macrociclo de origen marino.²⁰



La forma de proceder fue la que se describe a continuación y en todos los casos las muestras resultantes fueron comparadas con una muestra patrón de ácido okadaico sometida a una manipulación idéntica, excepto la adición del catión metálico.

En primer lugar, se añadió una disolución acuosa 200 mM del catión correspondiente (LiCl, NaCl, KCl, CaCl₂·2H₂O y MgCl₂), a una disolución de ácido okadaico en CDCl₃ (5.58 × 10⁻³ mM). La mezcla resultante se sometió a agitación vigorosa y centrifugación, pasando seguidamente a monitorizar la fase orgánica por espectroscopía de RMN ¹H. El resultado de estas primeras experiencias fue la ausencia de cambios significativos en las señales de los desplazamientos químicos, aun cuando se repitió el proceso utilizando disoluciones que duplicaban o triplicaban la concentración de los cationes.

Esta ausencia de variación, nos hizo pensar que podía tratarse de un problema de miscibilidad. En consecuencia, decidimos cambiar las condiciones y realizar los experimentos empleando para las disoluciones, disolventes miscibles. Así, en las mismas concentraciones que en el experimento anterior, se disolvieron las muestras de ácido okadaico en Metanol-*d*₄ y los cationes se adicionaron disueltos en D₂O, en el mismo tubo de resonancia. La mezcla fue sometida a agitación y el curso del proceso se siguió llevando

20. W. Inman, P. Crews, R. McDowell, *J. Org. Chem.*, **1989**, *54*, 2523-2526.

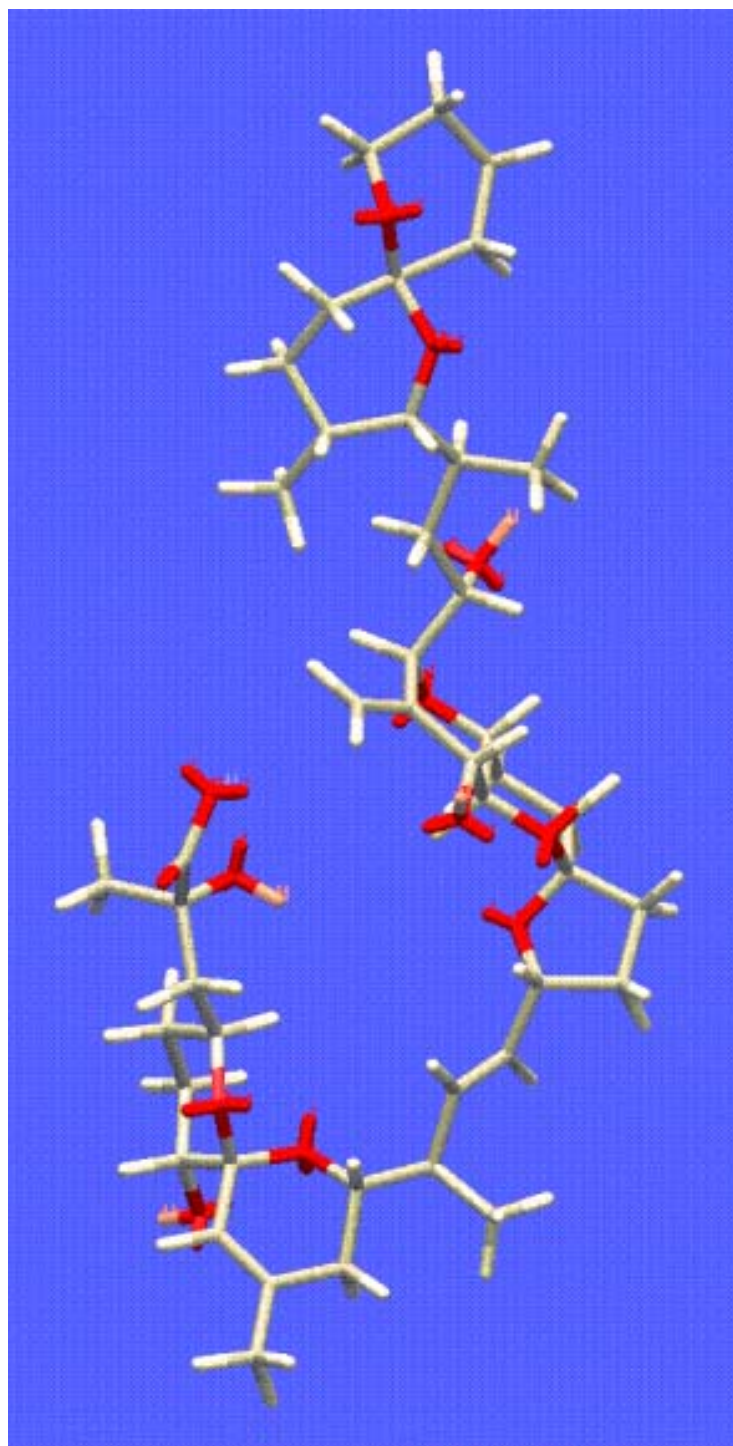


Figura 4

a cabo espectros de protón cada cierto tiempo y comparándolos con el de la muestra patrón en el mismo sistema de disolventes. Como resultado, sólo se observó una pequeña variación en el espectro de RMN ^1H en el caso del K^+ , variación que desapareció cuando se repitió el espectro 5 minutos más tarde y en los controles posteriores, dando un espectro totalmente superponible con el de la muestra patrón.

Decidimos repetir el mismo procedimiento pero adicionando doble volumen de cada una de las disoluciones de las distintas sales, lo que nos permitió volver a observar por RMN una variación equivalente en la muestra tratada con la sal de potasio, pero que a diferencia del experimento anterior, ésta se mantuvo en el tiempo. Con el objeto de poder estudiar mejor las variaciones introducidas en los espectros, cada una de las disoluciones obtenidas en estas experiencias, fueron llevadas a sequedad, disueltas en CDCl_3 y analizadas por RMN, ya que disponíamos de datos de un estudio completo del complejo natural en este disolvente.³ Se pudo comprobar que los resultados se repetían, de forma que únicamente en el caso de la muestra tratada con la sal de potasio se observaban pequeños cambios en los desplazamientos químicos y en la resolución de las señales, aún cuando no resultaba superponible con el espectro del complejo obtenido de la muestra natural (**Figura 5a**). En los demás casos los espectros realizados fueron totalmente idénticos a los del AO libre.

Un hecho que habíamos observado de forma frecuente en nuestros estudios cromatográficos, es que las muestras de toxina libre, al volver a someterlas a purificación por cromatografía en columna de fase reversa en $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (85:15), se nos volvían a complejar. En base a esto, decidimos emular las condiciones que tenían lugar en este proceso, pensando que para la complejación total de la muestra quizá era necesario un soporte físico. Así, muestras de ácido okadaico ($2,23 \times 10^{-3}$ mmol) y sales (20 mmol) disueltas en 5 ml de $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (85:15) se pasaron por un sep-pak C-18 lavando a continuación con 5 ml MeOH . Seguidamente, las fracciones se llevaron a sequedad y se redisolvieron en CDCl_3 . Por espectroscopía de RMN ^1H , se observaron ligeras variaciones en los espectros correspondientes a las muestras tratadas con sales de Li^+ y Na^+ , mientras que no fue observado ningún cambio con el Ca^{2+} y el Mg^{2+} . En el caso del espectro de protón de la muestra tratada con sales de potasio, resultó ser idéntico al del complejo obtenido de fuente natural (**Figura 5b**). Este proceso, fue reproducido con el tratamiento

de más cantidad de muestra a fin de realizar un espectro de RMN ^{13}C , que también fue totalmente equivalente al del complejo natural.

Estos datos apuntan a que el catión metálico que compleja las muestras de ácido okadaico que obtenemos después del proceso cromatográfico, es el potasio. Por este motivo, decidimos ensayar muestras de complejo de AO obtenido de fuente natural con los éteres corona 18/6 (1,4,7,10,13,16-hexaoxaciclooctadecano) y 15/5 (1,4,7,10,13-pentaoxaciclopentadecano). Estos éteres complejan metales alcalinos, con preferencia hacia el potasio y el sodio, respectivamente. Así, se prepararon dos tubos de resonancia conteniendo muestras del complejo natural disueltas en cloroformo deuterado, añadiéndosele a una de ellas unas gotas de una disolución en CDCl_3 de éter corona 18/6 y a la otra, éter corona 15/5. El resultado fue la total e inmediata descomplejación con el éter 18/6 y sólo parcialmente con el éter 15/5 (**Figura 5c**).

Una vez que habíamos determinado mediante métodos químicos la presencia de iones potasio unidos a las muestras de ácido okadaico obtenidas de los cultivos, es evidente que el siguiente paso era estudiar la influencia de este catión en la actividad farmacológica del ácido okadaico. Para ello en un primer experimento, muestras del complejo del AO obtenido de fuente natural fueron ensayadas frente a músculo liso de útero de rata, en las mismas condiciones en las que se llevaban a cabo los ensayos con AO (ver parte experimental). Se observó que presenta un efecto contráctil idéntico al del ácido okadaico libre.

A la vista de este resultado, se decidió estudiar la dependencia que, frente a la actividad farmacológica, tenían tanto el ácido okadaico libre como la muestra complejada cuando los ensayos se llevaban a cabo en ausencia de los cationes Ca^{2+} , K^+ y Na^+ en el medio extracelular. Los resultados alcanzados se muestran a continuación:

a) En el caso de que se secuestre del medio extracelular todo el Ca^{2+} o todo el Na^+ , la actividad del ácido libre y del complejo siguen siendo virtualmente idénticas no observándose diferencias apreciables tanto entre ellos o en comparación con los resultados obtenidos en los experimentos con presencia de estos cationes.

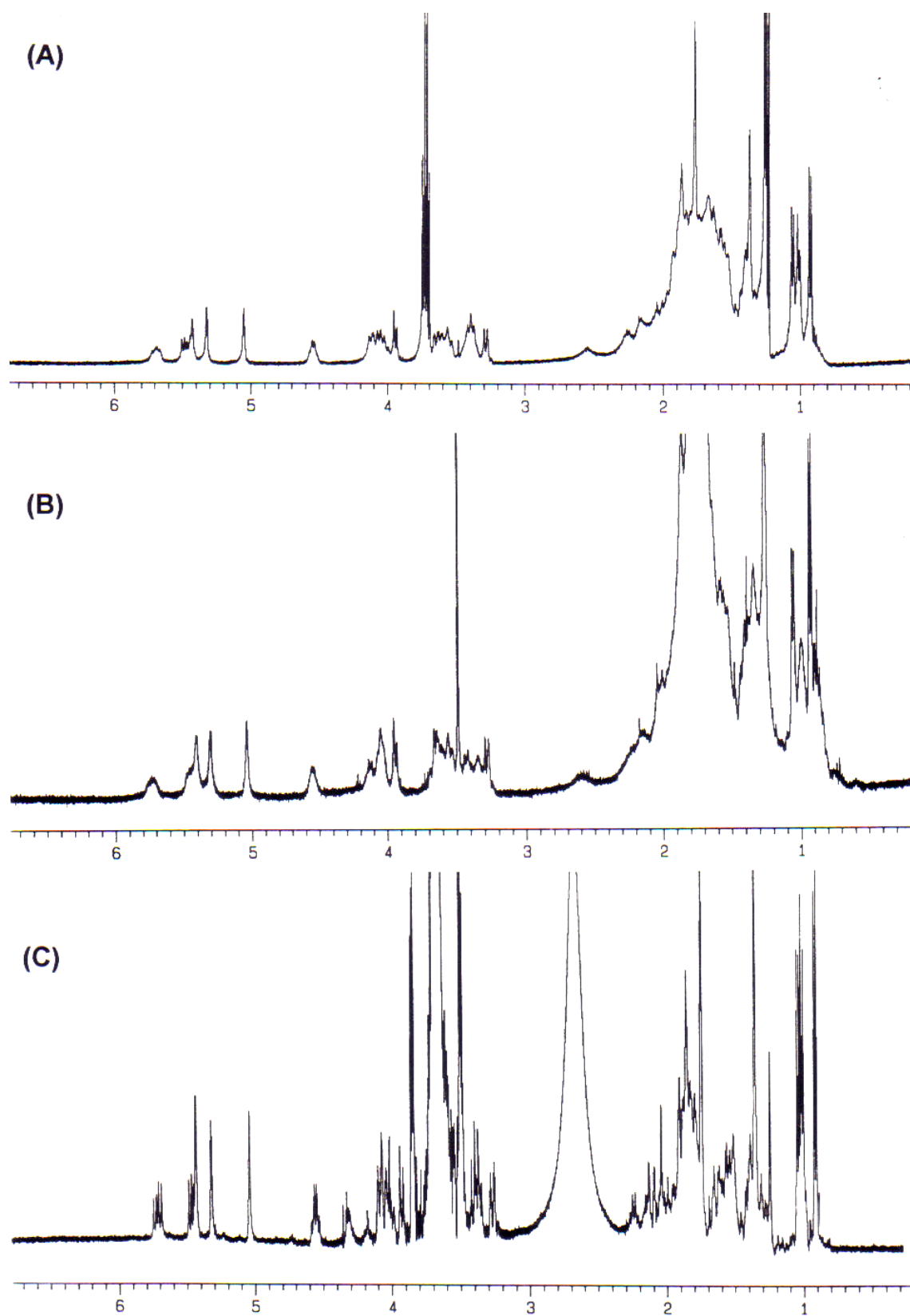


Figura 5. RMN ^1H de AO libre tratado con (A) 40 mmol de KCl, (B) 20 mmol de KCl pasando a través de un sep-pak C-18, y (C) complejo de AO tratado con éter corona 18/6.

b) Ahora bien, si se secuestra el ion potasio del medio extracelular, se observa una inhibición de la actividad del ácido okadaico libre, mientras que en el caso del complejo, la respuesta contráctil se mantiene.

En conclusión, el análisis de estos resultados tanto de los estudios de complejación como de los farmacológicos, parecen confirmar que el complejo de ácido okadaico que obtenemos de nuestros cultivos de *Prorocentrum lima*, es un complejo formado por ácido okadaico y un catión de potasio. Asimismo, reflejan que la presencia de éste catión juega un importante papel en la actividad de este políéter.

Aunque todavía se desconoce el mecanismo a través del que actúa este catión, todo parece indicar que, tal y como se ha demostrado con otras sustancias ionóforas, el posible papel de este catión sea el de unirse específicamente al ácido okadaico para que se produzca el transporte a través de la membrana celular. Esto está en consonancia con la naturaleza química de esta toxina, ya que su estructura posee una parte externa hidrofóbica, lo que permite su paso a través de la membrana celular, y un centro hidrofílico localizado en la cavidad generada por el plegamiento molecular del que ya hemos hablado, capaz de acoger a un único ion K^+ (**Figura 6**).

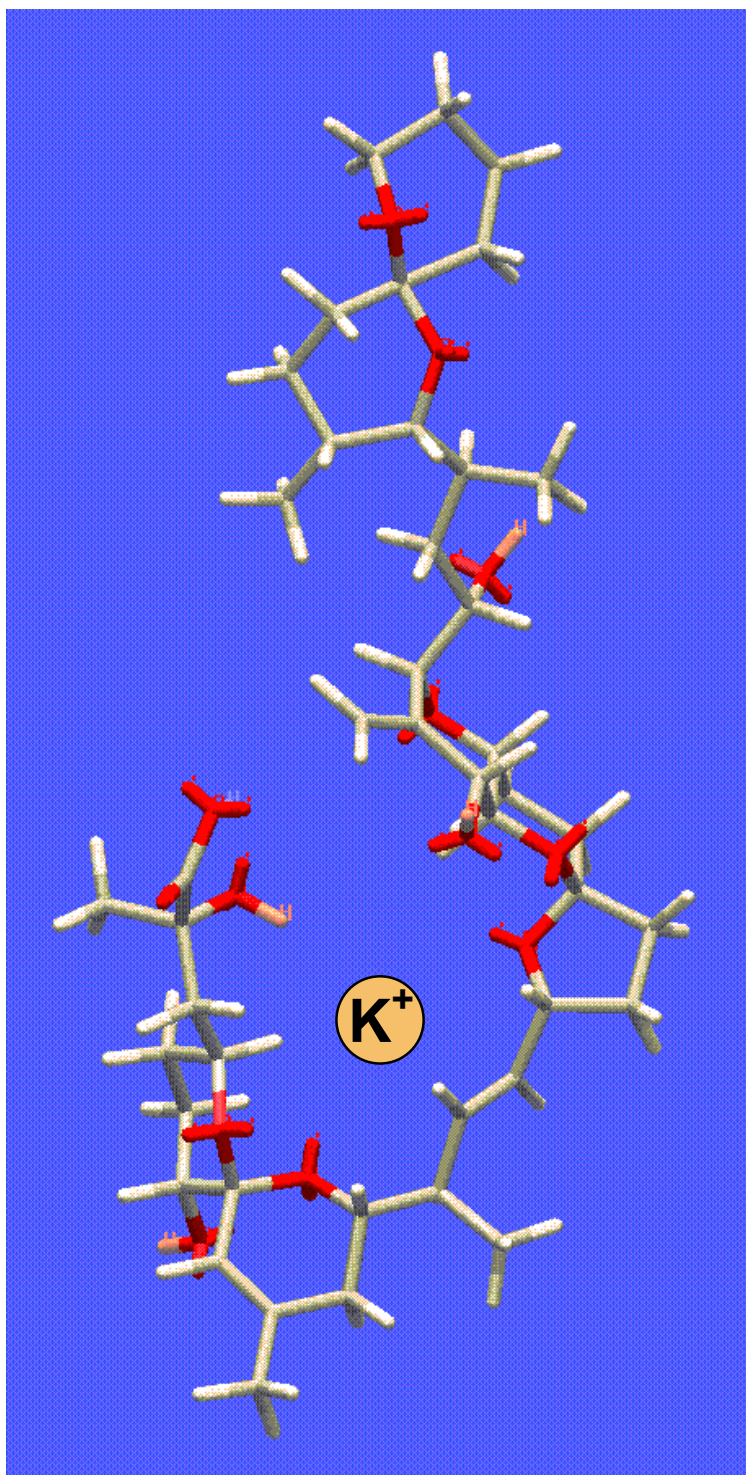


Figura 6

Tabla 2. RMN ¹H (400 MHz) δ: (a) Acido Okadaico libre. (b) Acido Okadaico complejoado.

Protón	a		Protón		a		b	
	a	b	Protón	Protón	a	b	a	b
3	2.12	2.08	18	18	1.80	1.85	33	1.52
3'	1.62	1.56	18'	18'	2.04	2.05	33'	1.34
4	3.96	3.98	20	20	1.32	1.36	35	1.31
5	1.72	1.72	20'	20'	1.47	1.49	35'	1.48
5'	1.31	1.27	21	21	1.81	1.83	36	1.39
6	1.79	1.78	21'	21'	1.72	1.76	36'	1.61
6'	1.83	1.82	22	22	3.57	3.58	37	1.84
7	3.34	3.32	23	23	3.35	3.40	37'	1.51
9	5.29	5.28	24	24	4.07	4.07	38	3.62
11	1.87	1.80	26	26	3.90	3.91	38'	3.53
11'	1.91	1.95	27	27	4.04	4.01	39	1.36
12	3.35	3.47	28	28	0.95	0.93	40	1.73
13	2.21	2.17	28'	28'	1.28	1.34	41	0.97
14	5.63	5.74	29	29	1.91	1.91	42	5.39
15	5.42	5.38	30	30	3.25	3.28	42'	5.02
16	4.51	4.52	31	31	1.75	1.79	43	1.01
17	2.14	2.06	32	32	1.96	1.98	44	0.88
17'	1.54	1.54	32'	32'	1.86	1.83		

Tabla 3. RMN ¹³C (100 MHz) δ: (a) Acido Okadaico. (b) Acido Okadaico complejojado.

n°C	a	b	n°C	a	b	n°C	a	b
1	177.05	176.7	16	79.60	80.2	31	27.83	28.1
2	77.02	77.2	17	31.05	31.3	32	26.77	27.0
3	42.84	44.5	18	37.73	38.0	33	30.78	31.0
4	69.75	69.9	19	106.09	106.5	34	96.02	96.3
5	31.98	32.5	20	33.22	27.0	35	36.32	26.1
6	27.53	34.0	21	27.02	28.1	36	19.18	36.6
7	71.96	72.5	22	70.16	70.6	37	25.86	19.4
8	96.96	96.9	23	76.86	76.6	38	60.77	61.0
9	121.85	122.8	24	71.55	71.8	39	27.69	29.0
10	139.85	139.4	25	145.22	145.7	40	23.54	23.9
11	33.64	33.7	26	85.29	85.3	41	16.32	16.7
12	71.96	71.6	27	64.98	65.7	42	112.97	113.2
13	42.63	43.3	28	35.65	36.0	43	16.61	16.9
14	136.85	138.7	29	31.50	31.7	44	11.12	11.3
15	131.76	131.0	30	75.46	75.8			

III. ESTUDIOS BIOSINTÉTICOS DE LAS TOXINAS DE P. LIMA

En la introducción se recogieron los antecedentes del estudio biosintético de estas toxinas a través de experimentos de adición de $[1-^{13}\text{C}_1]$, $[2-^{13}\text{C}_1]$ y $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ acetato sódico, realizados en nuestro laboratorio y cuyos resultados se resumen en la **figura 7a**. Estos datos nos permitieron establecer una propuesta para el origen de su esqueleto carbonado. Esta establece que estos poliéteres se biosintetizan por condensación de cinco fragmentos **A-E** (**Figura 7b**) de tres tipos diferentes en función de su origen biosintético. Tres de ellos **A**, **C** y **E** tienen claramente su origen como policétidos clásicos por la condensación directa de cuatro, seis y cinco unidades de acetato, respectivamente, mientras que en el caso de los otros dos fragmentos **B** y **D**, el acetato es introducido en otras rutas metabólicas previamente a su incorporación en la molécula. En este estudio nos proponemos verificar la propuesta biogenética que generaría la secuencia de marcaje observada en los experimentos con acetato enriquecido en carbono 13, para estos dos fragmentos.

Fig 7a

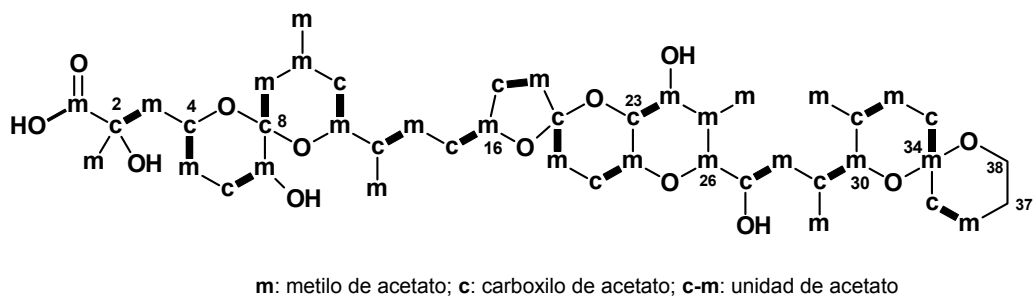


Fig 7b

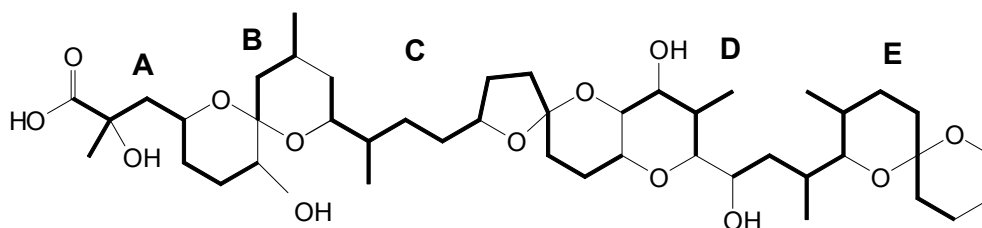
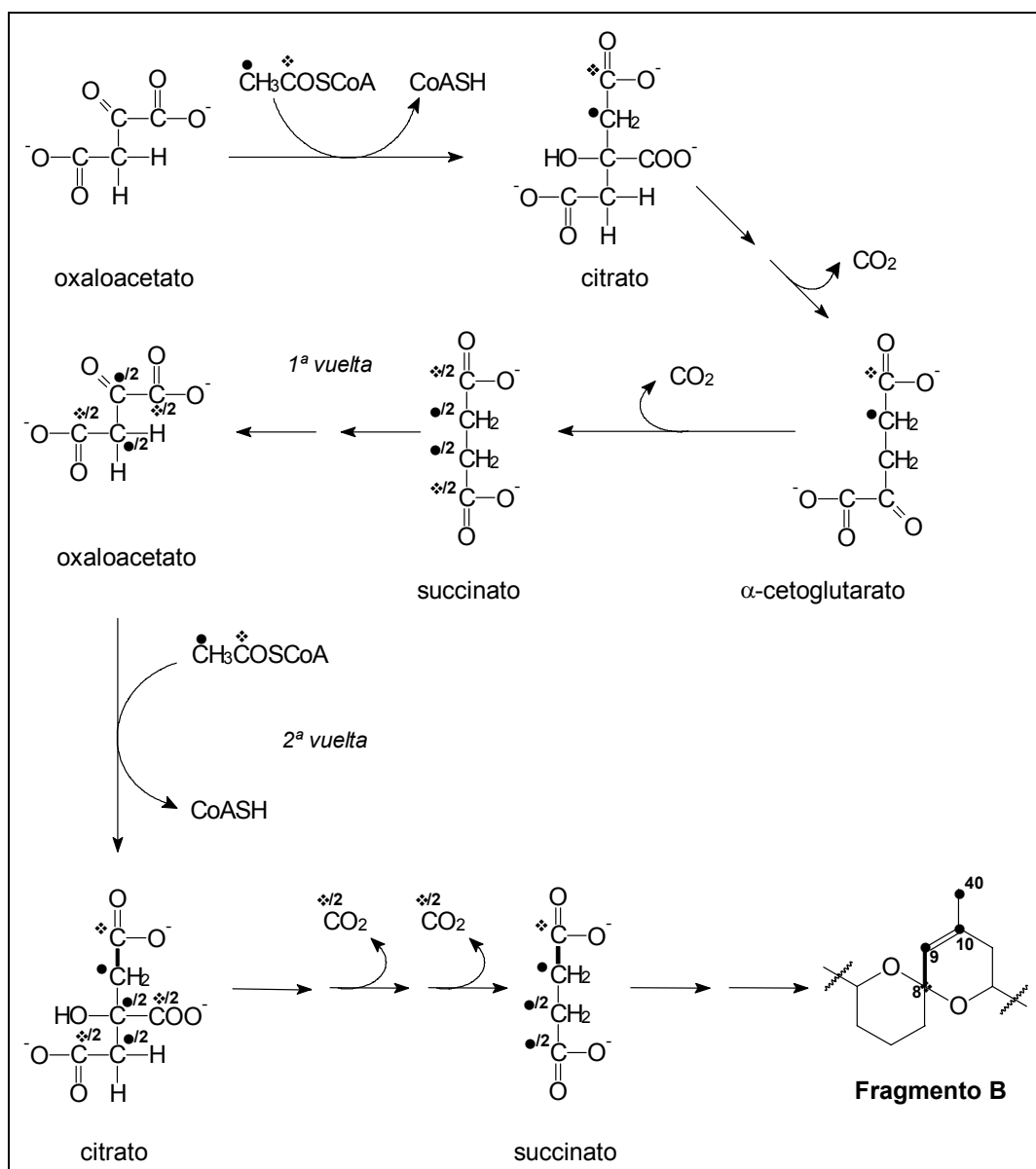


Figura 7

Origen biosintético del fragmento B

El fragmento B corresponde a los carbonos C-8/C-9/C-10/C-40 y se trata de un policétido no-clásico puesto que sus carbonos derivan de acetato según la secuencia "c-m-m". El origen de este tipo de fragmentos, también observado en la biosíntesis de la brevetoxinas, debe proceder directa o indirectamente del ciclo del ácido cítrico y más concretamente del succinato tal y como se propone en el **esquema 2**.



Esquema 2

En efecto, el acetato doblemente marcado, se introduce en el ciclo del ácido cítrico a través de su condensación con oxaloacetato para dar citrato. Durante la transformación de éste en succinato, la unidad de acetato incorporada en la molécula se mantiene intacta, puesto que los dos grupos carboxilos que se pierden en la transformación provienen del oxaloacetato original. El succinato es una molécula simétrica y en el siguiente paso, su transformación en fumarato, la enzima involucrada no es capaz de distinguir entre un extremo y otro de tal manera que el fumarato resultante se encuentra totalmente marcado de acuerdo con la secuencia indicada en el esquema anterior, con un contenido en ^{13}C de los carbonos que es la mitad del original. Al cerrarse el primer ciclo el oxalacetato se encuentra en las mismas condiciones. El segundo paso por el ciclo del ácido cítrico se inicia nuevamente con la adición de una segunda molécula de acetato enriquecido para generar citrato totalmente marcado. Durante su transformación en succinato, las dos moléculas de dióxido de carbono que se pierden corresponden a carbonos enriquecidos por el carboxilo del acetato, obteniéndose un succinato con una secuencia de marcaje “c-m-m” idéntica a la observada en el fragmento B. Además, si tenemos en cuenta que la unidad intacta de acetato que aparece en el succinato se incorpora en el segundo ciclo, es lógico que el grado de enriquecimiento de esos carbonos sea mayor que el de los otros, tal y como se pudo observar en los espectros de RMN ^{13}C de los marcajes con acetato.

Origen biosintético del fragmento D

El fragmento C-23/C-24/C-25[C-42]/C-26, presenta como ya hemos visto, una secuencia de marcaje "c-m-m[m]-m", que es bastante inusual en los experimentos biosintéticos sobre poliéteres. De acuerdo con la estructura del fragmento D el precursor metabólico que mejor se adaptaría sería el 3-hidroxi-3-metil-glutárico, que se incorporaría a la cadena carbonada a través del grupo carboxilo C-23 y vía descarboxilación por C-26. Esto nos plantea un problema, y es que para que este precursor genere la secuencia de marcaje observada, sería necesaria una ruta metabólica en la que el acetoacetato precursor apareciese con todos los carbonos como metilo de acetato, lo que descarta la ruta de formación del HMGA observada en la biosíntesis de terpenoides que pasa necesariamente por una unidad de acetoacetato con dos unidades intactas de acetato. Por ello se hizo necesario la elaboración de una ruta alternativa para explicar el origen biosintético del

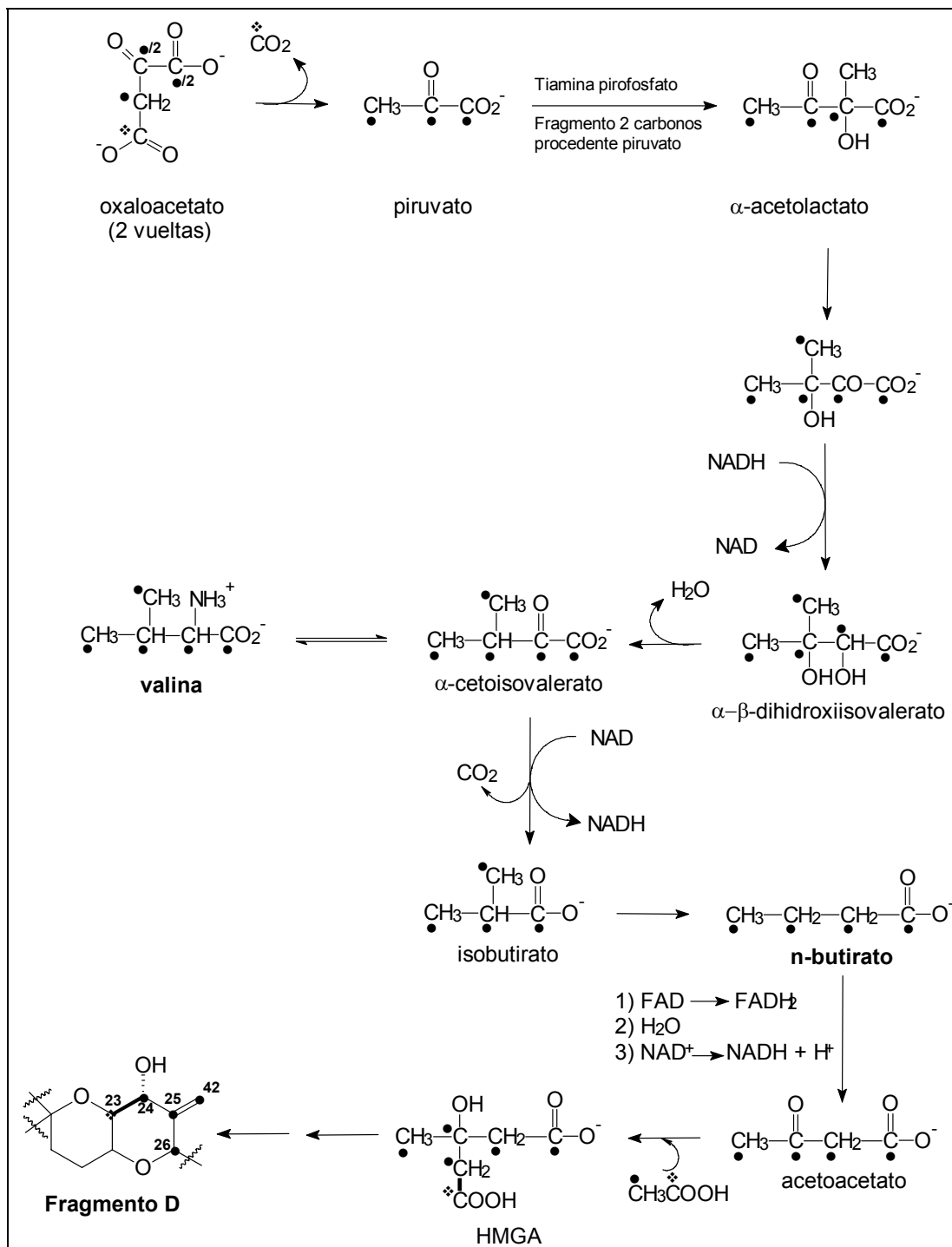
acetoacetato con la secuencia de marcaje observada.

De cara a la construcción de ésta alternativa, se constata que en los últimos años se ha puesto de manifiesto que los dinoflagelados involucran a los aminoácidos en la biosíntesis de sus toxinas. En efecto, Shimizu observó un aumento en el rendimiento de toxina que producían los cultivos de *Ptychodiscus brevis* cuando estos eran suplementados con aminoácidos.²¹ Al llevar a cabo la adición de [3-¹³C₁] y [2,3-¹³C₂] aspártico encontró que se producía un enriquecimiento no distintivo, es decir al azar, de los carbonos de la toxina. Sin embargo en otro experimento con [3,4-¹³C₂] leucina observó que el enriquecimiento recordaba al obtenido en los experimentos con acetato. En cualquier caso, estos resultados son indicativos de la capacidad de los dinoflagelados para utilizar los aminoácidos como fuente de los metabolitos necesarios para la biosíntesis de los ácidos carboxílicos precursores de este tipo de toxinas. Además, este fenómeno no es exclusivo de los poliéteres elaborados por dinoflagelados. Recientemente y durante los estudios biosintéticos de la monensina A, ha podido demostrarse la implicación de la L-valina en la biosíntesis de la misma por parte del hongo *Streptomyces cinnamonensis*.²² De esta forma, se pudo comprobar que la unidad de n-butilato necesaria procedía del metabolismo de este aminoácido, lo que implicaba la necesidad de que existiese un reagrupamiento desde el iso-butilato, metabolito conocido del catabolismo de la L-valina, a n-butilato, hecho que se comprobó experimentalmente. Estos precedentes junto con el tipo de marcaje observado en el fragmento D, nos llevaron a proponer que la formación de este fragmento podría tener lugar por la ruta que se muestra en el **esquema 3**. En ella, se parte del oxaloacetato obtenido después de dos pasos del acetato doblemente marcado a través del ciclo del ácido cítrico. La descarboxilación supone la pérdida del único carbono enriquecido por el carboxilo del acetato, generando una unidad de piruvato totalmente enriquecida por el metilo del acetato. Está bien establecido, que todos los carbonos de la L-valina proceden del piruvato, por lo que durante el catabolismo de ésta obtendríamos una unidad de iso-butilato enriquecido de la misma manera. El reagrupamiento de éste a n-butilato observado en el *S. cinnamonensis* junto con la β-oxidación de este último nos generaría el

21. Y. Shimizu, G. Wrensford, "Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea", T.J. Smayda, Y. Shimizu, Eds.; Elsevier Amsterdam, **1993**, 907-912.

22. K.A. Reynolds, D. O'Hagan, D. Gani, J.A. Robinson, *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1*, **1988**, 3195-3207.

acetoacetato deseado. La incorporación de una unidad de acetato sobre el carbonilo del acetoacetato nos produce la unidad de HMGA necesaria para explicar la secuencia de marcaje observada en el fragmento D.



Esquema 3

Con posterioridad a la publicación de estos datos biosintéticos, Wright y col. publicaron los resultados obtenidos en su laboratorio, resultados que confirman los obtenidos por nosotros y que aportaron el origen biosintético de los carbonos C-37 y C-38 como derivados de la glicina al observar el enriquecimiento selectivo en aquellos dos carbonos en experimentos de adición de $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ y $[2-^{13}\text{C}_1, ^{18}\text{O}]$ glicolato.²³ Asimismo llevaron a cabo la adición de $[2-^{13}\text{CD}_3]$ y $[1-^{13}\text{C}_1, ^{18}\text{O}]$ acetato sódico a cultivos de *Prorocentrum lima*, obteniendo los resultados que se resumen en la **figura 8**.²⁴

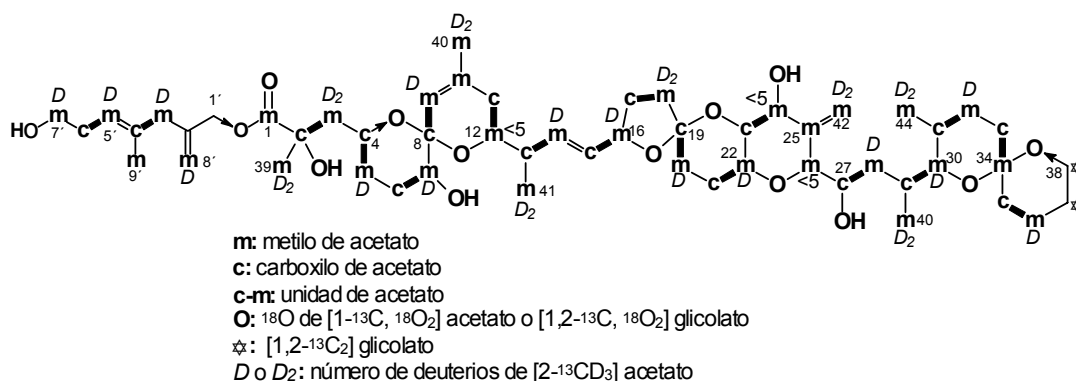


Figura 8

En efecto, en los experimentos con, $[2-^{13}\text{CD}_3]$ acetato sódico, la mayoría de los carbonos derivados del metilo de las unidades intactas de acetato incorporado, retienen un único átomo de deuterio, dato extensible a la cadena de los ésteres. Entre las excepciones más significativas están C-3 y C-18 que retienen dos deuterios, indicando que en el proceso biosintético no ha tenido lugar deshidratación en las posiciones (C-4, C-19). Por el contrario, se considera que en los carbonos C-12, C-24 y C-26, se pierden todos los átomos de deuterio, presumiblemente durante la formación oxidativa de los sistemas de anillos. En cuanto a los grupos metilos y el grupo exo-metileno se observa que retienen dos átomos de deuterio.

-
23. J. Needham, J.L. McLachlan, J.A. Walter, J.L.C. Wright, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1994**, 2599-2600.
24. J.L.C. Wright, T. Hu, J.L. McLachlan, J. Needham, J.A. Walter, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 8757-8758.

En el experimento [1-¹³C, ¹⁸O] acetato sódico existe retención de ¹⁸O únicamente en C-4 y C-27, por lo que sostiene que en general el ¹⁸O es reemplazado durante la formación del hemiacetal.

III.1. EXPERIMENTOS DE ADICION DE [1,4-¹³C₂] SUCCINATO SÓDICO Y [2-¹³C₁] BUTIRATO SÓDICO

En base a los datos anteriores, se diseñaron en nuestro laboratorio nuevos experimentos de marcaje por adición de precursores avanzados a los cultivos de *Prorocentrum lima*.

Previamente, y aprovechando las muestras de ácido okadaico obtenido de un cultivo al que se le había adicionado [1,2-¹³C₂] acetato sódico, se llevó a cabo un experimento de INADEQUATE, a través del cual se comprobó la incorporación de las 16 unidades intactas de acetato que se habían establecido a partir de los valores de las constantes de acoplamiento carbono-carbono en los experimentos con acetato (**Figura 9**). Sin embargo, y dada la similitud de estos valores, este estudio puso de manifiesto que la asignación previa de los desplazamientos químicos de los carbonos C-6 y C-21 era errónea, estando las señales intercambiadas por lo que hubo que reasignarlos. En cualquier caso, hay que significar que este hecho no afecta a las conclusiones obtenidas de los marcajes, puesto que ambos carbonos derivan del carboxilo del acetato.

Como ya hemos comentado anteriormente y con el fin de confirmar nuestra propuesta biogenética para los fragmentos B y D, se realizaron en nuestro laboratorio los experimentos de marcaje por adición de los precursores hipotéticos [1,4-¹³C₂] succinato sódico y [2-¹³C₁] butirato sódico a los cultivos de *Prorocentrum lima*. Para el primer caso la razón es obvia puesto que su origen lo proponíamos en el metabolismo del succinato. Para el segundo, su origen lo establecíamos en el catabolismo de la valina a hidroximetilglutarato, lo que implica que para la formación del acetoacetato precursor de éste tenga que producirse un reagrupamiento isobutirato-butirato. La incorporación selectiva del [2-¹³C₁] butirato sódico en el carbono C-26 de la toxina sería un dato irrevocable de apoyo a la hipótesis propuesta. La razón por la que escogimos un intermedio avanzado del catabolismo de la valina en lugar del aminoácido, es porque de esta forma se

asegura un mayor grado de incorporación en el producto final, facilitando el análisis por RMN ^{13}C .

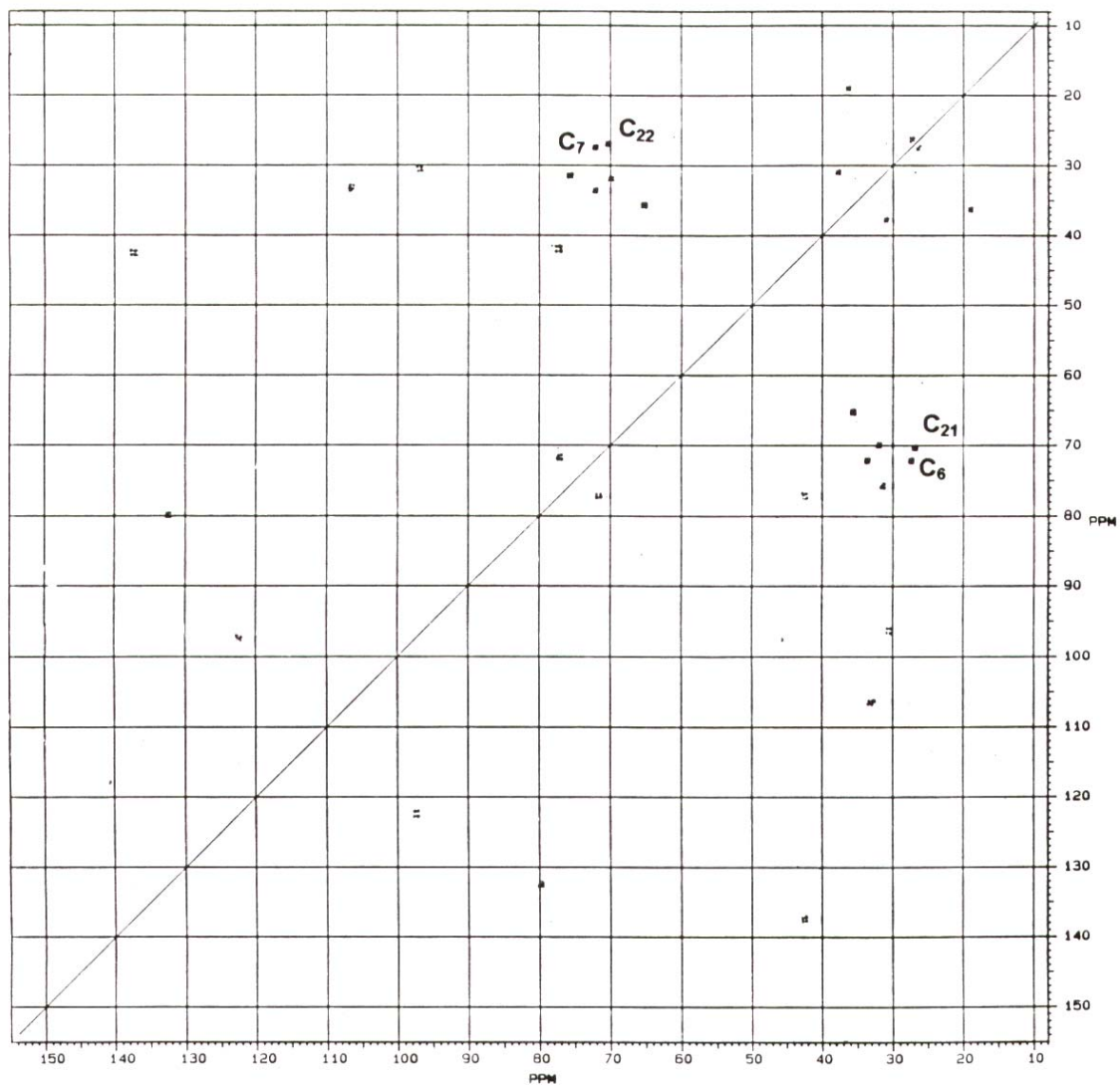


Figura 9

Tabla 4 . RMN ¹³C (100 MHz) δ: (a) Acido Okadaico 1. (b) Ester 6.

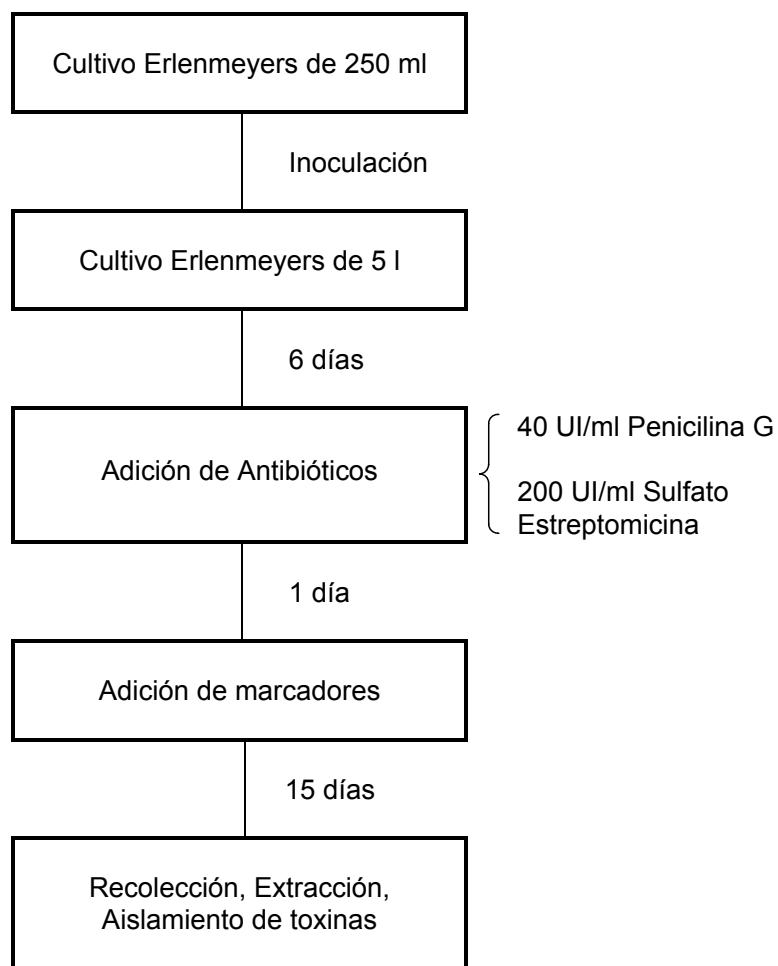
n°C	a	b	n°C	a	b	n°C	a	b
1	177.05	176.5	19	106.09	106.23	37	25.86	25.88
2	77.02	75.79	20	33.22	33.28	38	60.77	60.75
3	42.84	44.53	21	27.02	27.84	39	27.69	27.65
4	69.75	69.03	22	70.16	70.00	40	23.54	23.46
5	31.98	32.23	23	76.86	77.62	41	16.32	16.23
6	27.53	26.89	24	71.55	71.28	42	112.97	112.89
7	71.96	72.03	25	145.22	144.21	43	16.61	16.62
8	96.96	96.57	26	85.29	85.31	44	11.12	11.11
9	121.85	122.15	27	64.98	65.06			
10	139.85	139.21	28	35.65	35.70	1'		66.92
11	33.64	33.28	29	31.50	31.51	2'		141.64
12	71.96	71.28	30	75.46	75.49	3'		44.79
13	42.63	42.26	31	27.83	27.84	4'		134.98
14	136.85	136.08	32	26.77	26.79	5'		124.10
15	131.76	131.43	33	30.78	30.77	6'		31.99
16	79.60	79.52	34	96.02	96.02	7'		62.73
17	31.05	31.11	35	36.32	36.33	8'		144.76
18	37.73	37.61	36	19.18	19.19	9'		16.17

A. DESCRIPCIÓN GENERAL DEL EXPERIMENTO BIOSINTÉTICO

La cepa del dinoflagelado elegida para llevar a cabo estos estudios fue la PL-2, debido a que es la que presenta una mayor proporción de ácido okadaico **1** en relación a la cantidad de extracto obtenido y que además produce el 7' hidroxí-4'-metil-2'-metilenohepta-4'-enil-okadaato **6**, igualmente útil para nuestros intereses. Dadas las similitudes estructurales de estas dos toxinas con las otras toxinas del grupo, los resultados que se obtengan sobre el ácido okadaico y su posterior discusión pueden ser perfectamente extrapolados al resto, como se ha comprobado en los estudios biosintéticos anteriormente realizados sobre la DTX-1.

Los datos de los desplazamientos químicos de los espectros de RMN ^{13}C , tanto del AO como del éster **6**, necesarios para la evaluación de los resultados de los experimentos biosintéticos se recogen en la **tabla 4**.

Cada experimento biosintético comenzaba con la inoculación de 3 l de medio Guillard K en ocho erlenmeyer de 5 l con 250 ml de cultivo de *P. lima* cada uno. Se dejaba entonces crecer el cultivo durante un período de seis días y en el séptimo se procedía a la adición de penicilina G y sulfato de estreptomicina. Los antibióticos fueron elegidos en función de que entre ambos cubren un amplio espectro bacteriano y las concentraciones usadas fueron las mismas que en los experimentos biosintéticos con acetato, es decir 40 UI de penicilina G y 200 UI de sulfato de estreptomicina por ml de cultivo, que se adicionan disueltas en agua bidestilada y esterilizada. Al día siguiente de añadir los antibióticos, se procedió a la adición al medio de cultivo de los marcadores correspondientes. Las concentraciones de marcadores utilizadas fueron de 0.33 mM de [2- $^{13}\text{C}_1$] butirato sódico; 0.33 mM y 0.15 mM de [1,4- $^{13}\text{C}_2$] succinato sódico. El cultivo se dejó crecer durante 15 días y se procedió a la recolección de las células, a la extracción de las mismas y al aislamiento cromatográfico de las toxinas. (**Esquema 4**).



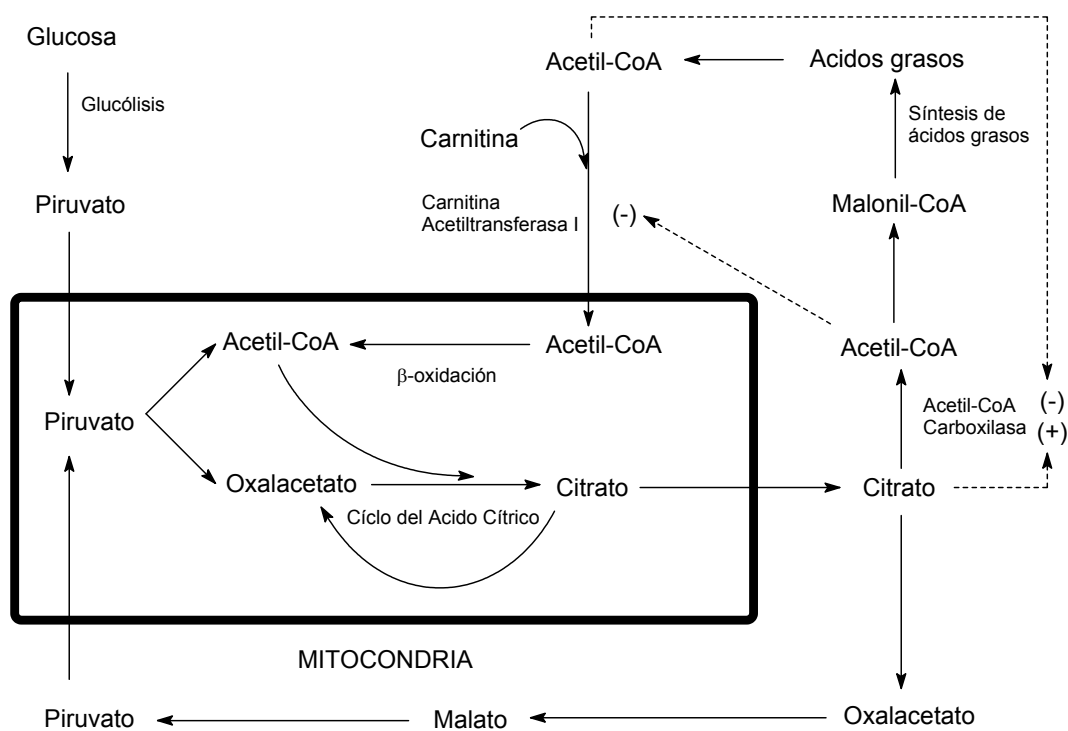
Esquema 4

B. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS DE ADICIÓN DE [1,4-¹³C₂] SUCCINATO SÓDICO

En este experimento biosintético, añadimos inicialmente el precursor en una concentración de 0.33 mM, que supuso la mitad de la utilizada en los experimentos de acetato. A esta concentración se produjo la muerte generalizada del cultivo a los cuatro días de haberse producido la adición de marcador por lo que decidimos repetir el experimento disminuyendo las cantidades de succinato. Así, en la siguiente experiencia se añadió sólo una concentración 0.15 mM, consiguiéndose que las células se mantuviesen

con vitalidad durante los 15 días necesarios para el proceso. Ahora bien, durante este tiempo no se observó un crecimiento significativo de la biomasa celular.

Como resultado del proceso de aislamiento apareció únicamente el 7' hidroxí-4'-metil-2'-metilén-hepta-4'-enil-okadaato **6** y a muy bajas concentraciones, no observándose la presencia de ácido okadaico, toxina mayoritaria en esta cepa. La presencia de esta pequeña cantidad de toxina podría ser debido a que como es sabido, concentraciones altas de succinato sódico producen una inhibición del ciclo del ácido cítrico, dando lugar a una disminución de los niveles de citrato.²⁵ Este hecho lleva consigo la ralentización de la formación de ácidos dicarboxílicos y, por tanto, de la formación de toxinas polietéreas. La razón por la cual no se forma ácido okadaico libre resulta para nosotros inexplicable. (Esquema 5).



Esquema 5

25. J.D. Rawn, "Bioquímica", Ed. Interamericana-McGraw-Hill, 1989, 446-450.

En cuanto al estudio de los espectros de carbono obtenidos del éster, el grado de enriquecimiento comparado con el observado con los experimentos con los acetatos es bajo. Además, no se ha producido enriquecimientos distintivos en el contenido de carbono ^{13}C de los carbonos de la molécula, sino que preferentemente éstos han sido al azar, probablemente como consecuencia de una metabolización previa a la incorporación del precursor a la correspondiente ruta metabólica.

Un estudio detallado sólo nos permite observar un pequeño incremento en la intensidad del pico correspondiente a C-8, con respecto al espectro de producto sin enriquecer, lo que parece confirmar la hipótesis anteriormente propuesta (**Figura 10**). Situaciones similares se observaron en la brevetoxina donde la incorporación de succinato sódico fue tan baja que fue imposible de detectar por RMN ^{13}C , teniendo que recurrirse a la utilización de isótopos radiactivos.⁶

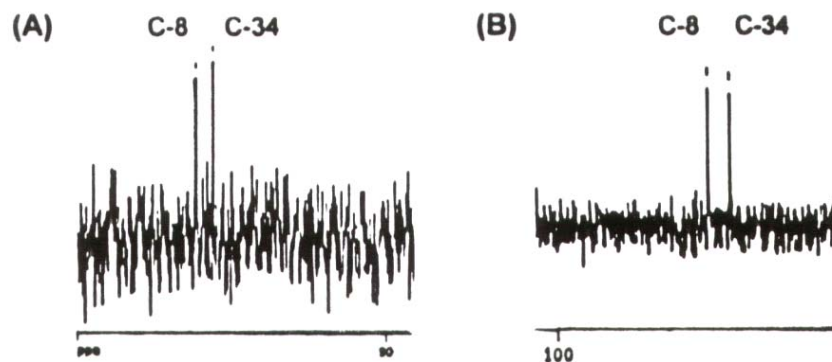


Figura 10. Fragmentos de los espectros de RMN- ^{13}C , correspondientes a las zonas de las señales de los carbonos C-8 y C-34. (A) Muestra procedente de un cultivo sin adición de marcador. (B) Enriquecida con $[1,4-^{13}\text{C}_2]$ succinato sódico.

En situaciones similares o simplemente como estrategia para la incorporación de precursores avanzados, se han utilizado derivados de éstos en forma de tioésteres de N-acetil-cisteamina, que actúa como agente de transporte.²⁶ En nuestro caso, llevamos a cabo experimentos sin marcaje añadiendo al cultivo concentraciones similares a las utilizadas en los experimentos biosintéticos, tanto de N-acetilcisteamina como del derivado con el acetato. El resultado fue que el cultivo lo ha tolerado mal, paralizándose en su crecimiento, cambiando de color y produciéndose la muerte generalizada de las células.

26. S. Ley y col., *Tetrahedron Lett.*, **1994**, 35, 307-326.

C. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS DE ADICIÓN DE [2-¹³C₁] BUTIRATO SÓDICO

En base a la propuesta establecida para el fragmento D, se realizó el experimento biosintético de adición del precursor [2-¹³C₁] butirato sódico a concentraciones de 0.33 mM. Las toxinas obtenidas en este caso, fueron tanto ácido okadaico **1** como 7' hidroxí-4'-metil-2'-metilén-hepta-4'-enil-okadaato **6**.

C.1. Resultados con el Acido Okadaico.

El AO resultante del experimento biosintético con [2-¹³C₁] butirato sódico, mostró enriquecimientos distintivos en las señales del espectro de RMN ¹³C correspondientes a veintiséis carbonos: C-1, C-3, C-5, C-7, C-9, C-10, C-12, C-14, C-16, C-18, C-20, C-22, C-24, C-25, C-26, C-28, C-30, C-32, C-34, C-36, C-39, C-40, C-41, C-42, C-43 y C-44, y dos carbonos, C-37 y C-38, que aún cuando aparecen enriquecidos lo hacen en mucha menor proporción que el resto. Esta situación es totalmente equivalente a la observada durante los experimentos biosintéticos por adición de [2-¹³C₁] acetato sódico (**Figura 11**).

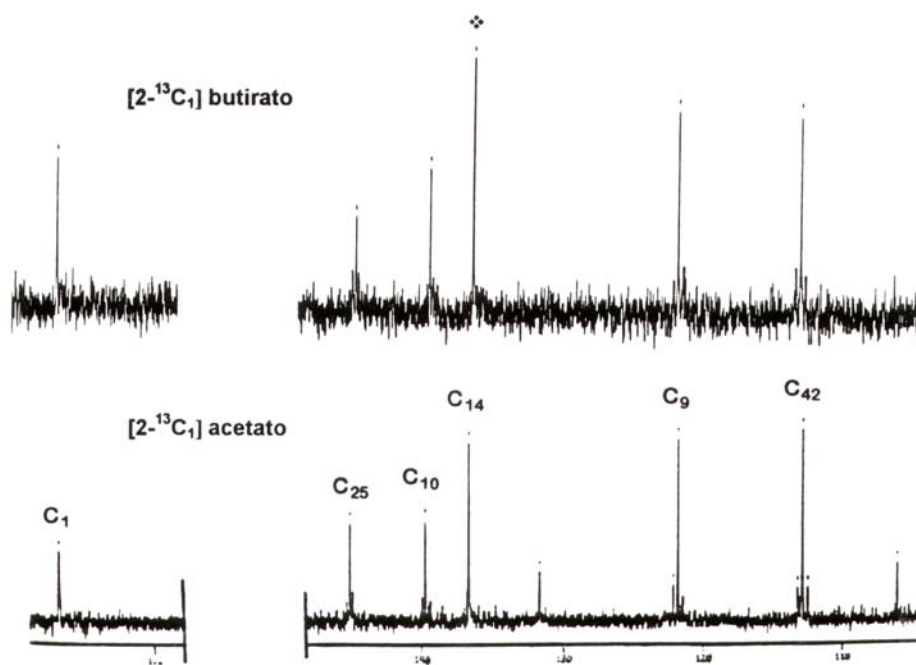


Figura 11

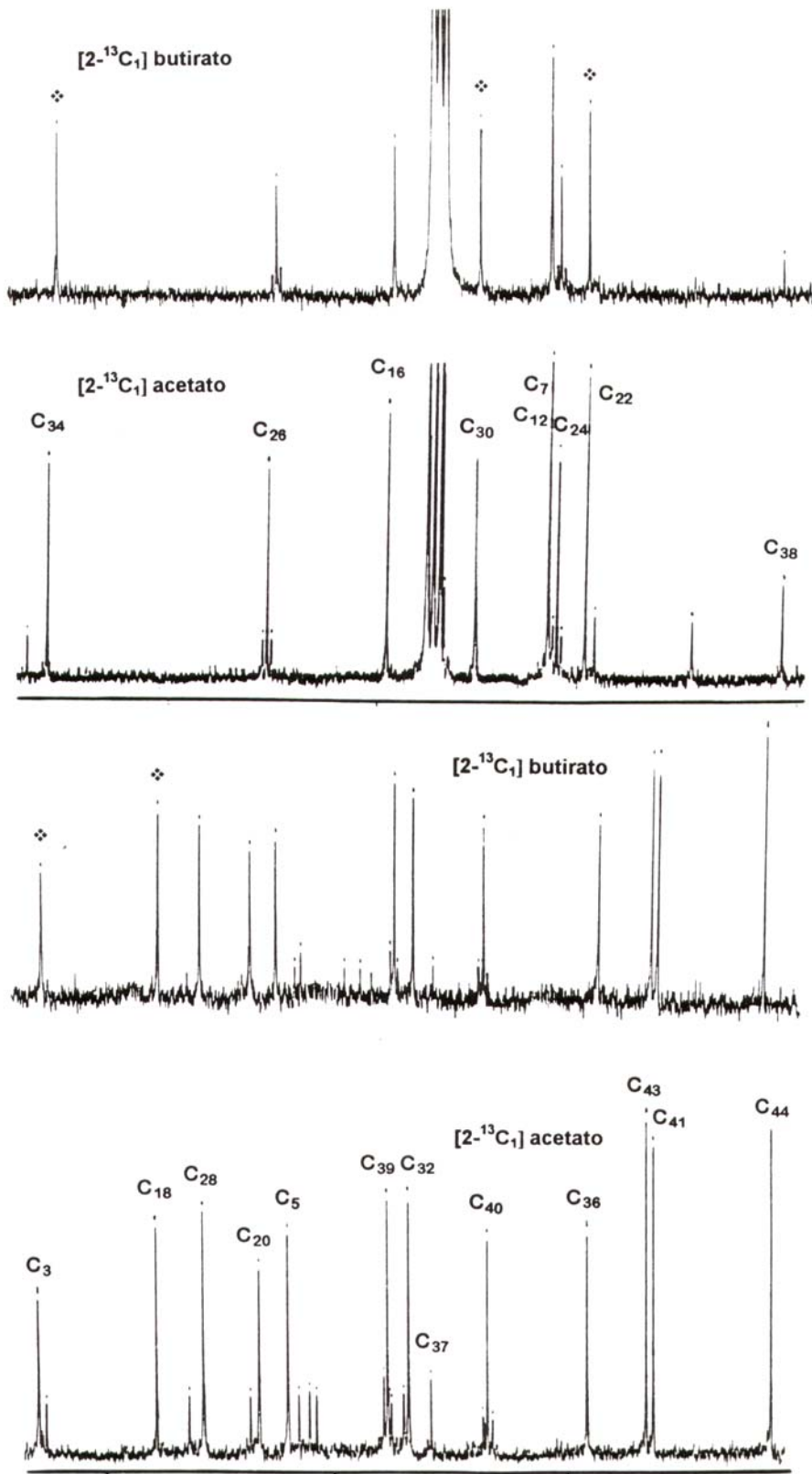


Figura 11'

Las señales correspondientes a los carbonos C-9, C-10 y C-40, presentan alrededor del pico de cada una de ellos, señales satélites de baja intensidad debidas a acoplamientos carbono-carbono. En efecto, en la **figura 12**, se dan las señales seleccionadas correspondientes a estos carbonos, pudiendo observarse que las de C-9 y C-40 aparecen flanqueadas por un doblete con una constante de acoplamiento 56.0 Hz y 43.1 Hz, respectivamente, en tanto que la de C-10 está flanqueada por dos dobletes de constantes idénticas a las anteriores. Este hecho refleja la presencia simultánea en la molécula de carbonos vecinales enriquecidos por el precursor, lo que obviamente implica que la incorporación de éste no puede ser directa, sino que debe metabolizarse previamente. Por otro lado, esta secuencia también fue observada durante el marcaje con [2- $^{13}\text{C}_1$] acetato.

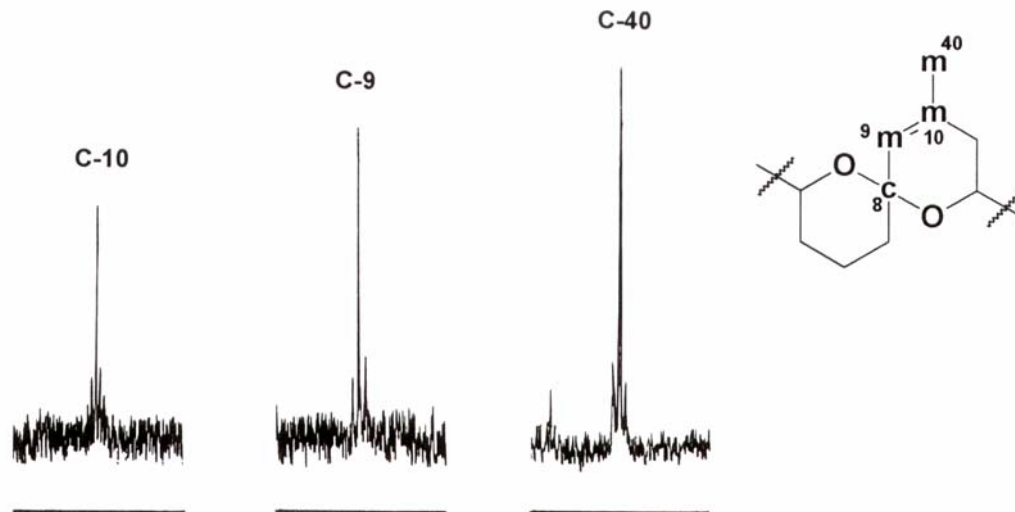


Figura 12

Para el fragmento C-24/C-26, se vuelve a observar la presencia de carbonos vecinales enriquecidos y que además aparecen acoplados. Así, las señales correspondientes a los carbonos C-24, C-26 y C-42 aparecen flanqueadas por dobletes con constantes de acoplamientos de 41.6, 42.6 y 74.0, respectivamente. La señal correspondiente al carbono C-25 aparece flanqueada por un doblete con constantes de acoplamiento idénticas a las anteriores. El hecho de que el doblete de menor constante de acoplamiento presente una mayor intensidad es indicativo del doble acoplamiento con C-24 y C-26. De nuevo, la situación es similar a la observada en el experimento con [2- $^{13}\text{C}_1$] acetato (**Figura 13**).

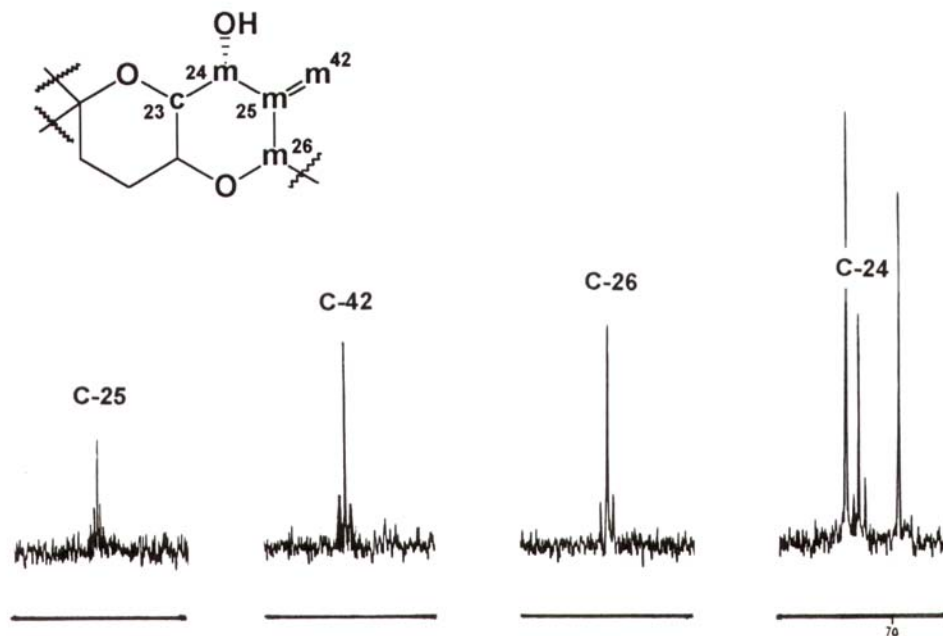


Figura 13

Finalmente, no se observa enriquecimiento en ninguna de las señales de carbono restantes del ácido okadaico.

Este análisis cualitativo de los resultados obtenidos nos lleva a una conclusión inmediata, cual es que hemos obtenido exactamente el mismo marcaje que en el experimento con $[2-^{13}\text{C}_1]$ acetato. La diferencia estriba, fundamentalmente, en que el patrón de marcaje ha sido más limpio, puesto que en el experimento con el acetato, también se observaban pequeños enriquecimientos en los carbonos que, posteriormente se comprobó, procedían del carboxilo del acetato. Sin embargo, una comparación minuciosa de los dos resultados, los marcajes con $[2-^{13}\text{C}_1]$ acetato sódico y $[2-^{13}\text{C}_1]$ butirato sódico, nos permitió establecer diferencias cuantitativas. En efecto, pudimos constatar que los carbonos C-3, C-14, C-18, C-22, C-30 y C-34 muestran en el experimento con $[2-^{13}\text{C}_1]$ butirato sódico, un incremento en la intensidad de las señales con respecto al observado cuando se suministra al medio de cultivo $[2-^{13}\text{C}_1]$ acetato sódico. Este incremento lo interpretamos como consecuencia de un aumento del grado de enriquecimiento, que alcanza un máximo en C-34 y C-20 paulatinamente hasta el valor mínimo en el C-3. En la

tabla 5 se señalan los incrementos de enriquecimiento cuando se comparan las señales observadas en los espectros de $[2-^{13}\text{C}_1]$ acetato sódico con los de $[2-^{13}\text{C}_1]$ butirato sódico.

Carbonos n°	% de Δ
C-3	4
C-14	9
C-18	11
C-22	20
C-30	10
C-34	20

Tabla 5. Incrementos de enriquecimiento en el experimento con $[2-^{13}\text{C}_1]$ butirato sódico, con respecto al marcaje con $[2-^{13}\text{C}_1]$ acetato sódico.

C.2. Resultados con el 7' hidroxí-4'-metil-2'-metilén-hepta-4'-enil-okadaato

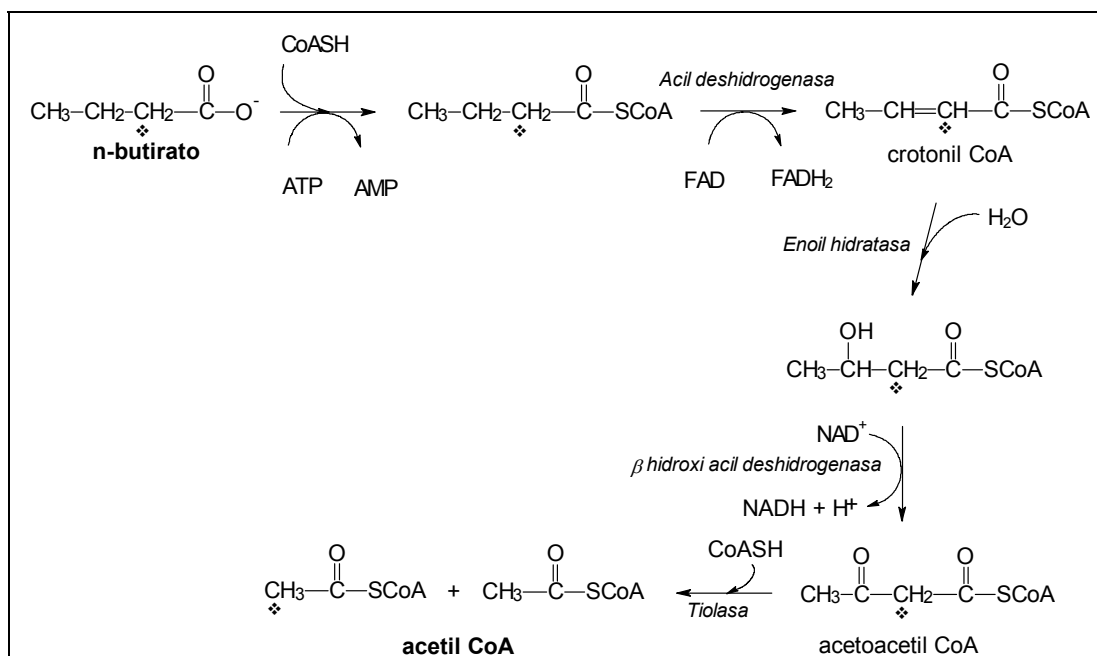
El resultado sobre esta molécula en lo que respecta al esqueleto de okadaico es igual al anterior. Así, se aprecia enriquecimiento en los mismos carbonos que con los experimentos de $[2-^{13}\text{C}_1]$ acetato sódico y también un incremento, en este caso algo menos acusado, en los carbonos C-3, C-14, C-18, C-22, C-30 y C-34. En este punto, hay que señalar que la cantidad aislada fue muy pequeña, lo que redundó en la calidad de la espectroscopía.

En lo que respecta a la cadena lateral, las señales correspondientes a C-3', C-5', C-7', C-8' y C-9' aparecen enriquecidas con el experimento de $[2-^{13}\text{C}_1]$ butirato sódico, no observándose incorporación en ninguna otra señal. Destaca entre éstas últimas que los carbonos C-1' y C-2' repiten la situación observada en todos los experimentos anteriormente realizados en nuestro laboratorio, por lo que seguimos careciendo de evidencias que nos aclaren el posible origen de sus carbonos.

D. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Resulta evidente que para la discusión de los resultados, o lo que es lo mismo, tratar de proponer una posible ruta biogénica de este grupo de toxinas elaboradas por dinoflagelados marinos, tendremos que tener en cuenta todos los resultados experimentales obtenidos, tanto por nuestro grupo de trabajo como los aportados por el grupo de Wright en Canadá. En la discusión que sigue nos referiremos de forma exclusiva al ácido okadaico, bien entendido que las conclusiones son aplicables al resto de las toxinas del grupo. Esto se debe a que experimentos particulares llevados a cabo con alguna de ellas, han demostrado que las secuencias de marcaje son idénticas y por lo tanto, también lo será su origen biogénico. En cualquier caso, las situaciones que exijan un comentario particular, serán oportunamente indicadas.

De los experimentos con butirato anteriormente descritos, la observación más directa es que el patrón de marcaje resulta cualitativamente idéntico al obtenido al añadir al cultivo [2-¹³C₁] acetato sódico. La explicación más inmediata resulta obvia, la β-oxidación previa del butirato produce dos unidades de acetato, una de las cuales está enriquecida con ¹³C, por lo que su incorporación será idéntica (**Esquema 6**).



Esquema 6

La conexión entre el butirato y la molécula de acetato marcada parece indiscutible, pero al mismo tiempo llama poderosamente la atención el hecho de que con una concentración de precursor marcado que es la mitad de la utilizada en el experimento con acetato (0.33 mM frente a 0.67 mM), se obtengan unos grados de enriquecimiento similares e, incluso superiores. Asimismo, es de resaltar la limpieza del marcaje, puesto que no se observa enriquecimiento al azar en ninguno de los carbonos procedentes del carboxilo, circunstancia observada durante el marcaje con acetato. Todo ello parece indicar la posibilidad de que el acetato se incorpore a la molécula vía butirato.

Otro dato general en este experimento es que se observa que los grupos metilos aparecen también enriquecidos considerándolos derivados del grupo metilo de las unidades de acetato. Desde el punto de vista biogénico, se repite esta situación inusual, ya que en los policétidos terrestres estos metilos derivan de metionina o propionato. Para los policétidos marinos se ha propuesto que la incorporación de este metilo procede de la condensación de una unidad de acetato (o malonato) sobre un carbonilo en la cadena del policétido, seguida de descarboxilación, un hecho que se da únicamente en algunas bacterias,²⁷ algas verde-azuladas²⁸ y dinoflagelados.²⁹

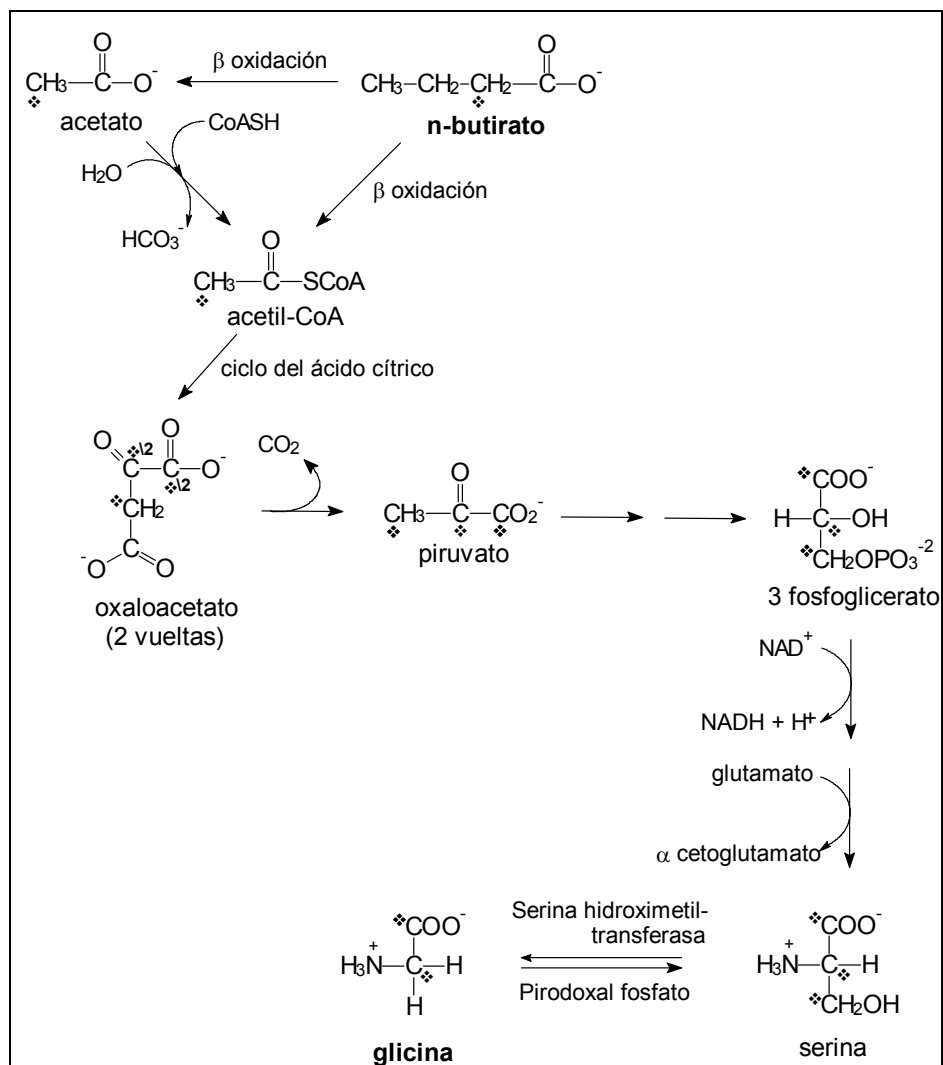
Sin lugar a dudas, el hecho mas importante es el enriquecimiento diferencial que se produce sobre seis carbonos en toda la molécula. Ello implica que, al margen de la ruta general de incorporación de las unidades de acetato procedentes del metabolismo del butirato, éste nos debe conducir a seis precursores mas avanzados capaces de incorporarse a la molécula. Estos precursores deben caracterizarse por mantener el marcaje diferenciado que aparece en el butirato, lo que explicaría el enriquecimiento específico en seis carbonos de los veintiséis que resultan enriquecidos del marcaje con acetato. Esto nos lleva a hipotetizar que la biogénesis de la molécula debe producirse por el ensamblamiento de precursores cetogénicos de origen diverso, circunstancia ya observada en la biogénesis de las brevetoxinas y que las diferenciaba de la de los poliéteres de origen terrestre.⁶

-
27. a) J. Needham, R.J. Andersen, M.T. Kelly, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1993**, 1367-1368; b) N.D. Priestley, S. Gröger, *J. Org. Chem.*, **1995**, *60*, 4951-4953.
28. S.C. Bobzin, R.E. Moore, *Tetrahedron*, **1993**, *49*, 7615-7626.
29. J. Kobayashi, M. Takahashi, M. Ishibashi, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1995**, 1639-1640.

Para un mejor desarrollo de la discusión de los resultados obtenidos por nosotros y la elaboración de una propuesta biogénica que adecue estos resultados y los de los experimentos biosintéticos previos, procederemos al estudio de los diferentes fragmentos comenzando desde el carbono C-38 hasta el extremo contrario de la molécula.

D.1. Origen biosintético del fragmento [C-38/C-27]

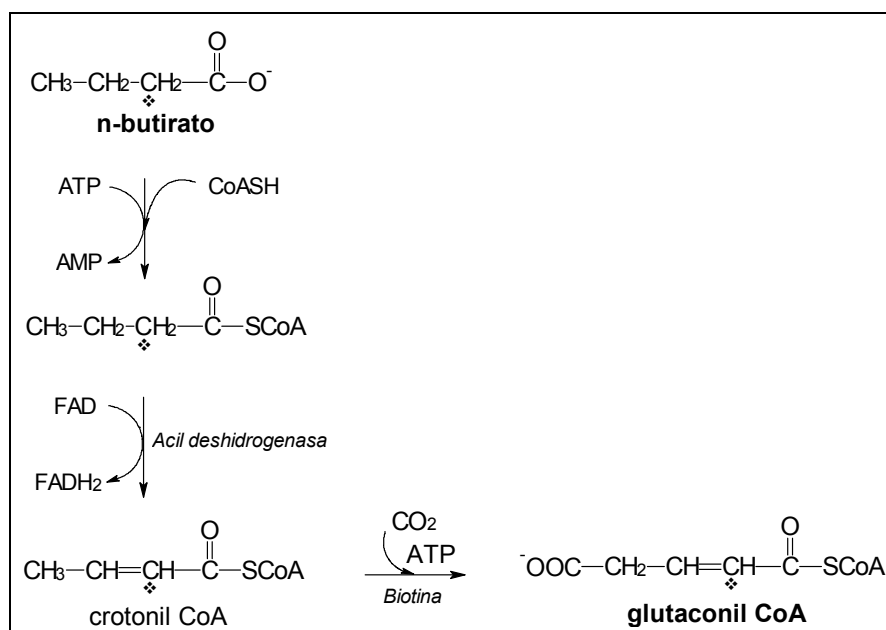
En primer lugar, tal y como se ha mencionado anteriormente, para este fragmento, en el experimento con $[2-^{13}\text{C}_1]$ butirato sódico aparecen ligeramente enriquecidos los carbonos C-38 y C-37, cuyo origen se ha establecido en la glicina a través de experimentos con incorporación selectiva de $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ y $[2-^{13}\text{C}_1, ^{18}\text{O}]$ glicolato.



Esquema 7

Si consideramos que el [2-¹³C₁] butirato sódico sufre unas reacciones de β-oxidación que lo transforma en dos unidades de acetyl-CoA con enriquecimiento en la posición del metilo, podemos justificar esta situación de tenue intensidad de marcaje en C-38. El que también aparezca un pequeño enriquecimiento en C-37 se comprende fácilmente siguiendo la secuencia del **esquema 7**, al considerar que las unidades marcadas en la posición 2 de acetyl-CoA pueden incorporarse varias veces al ciclo del ácido cítrico. Después de dos vueltas se llegaría a oxaloacetato doblemente marcado que generaría la unidad de piruvato totalmente marcada necesaria para dar como resultado la glicina con el marcaje necesario para explicar nuestro patrón de enriquecimiento en esas posiciones.

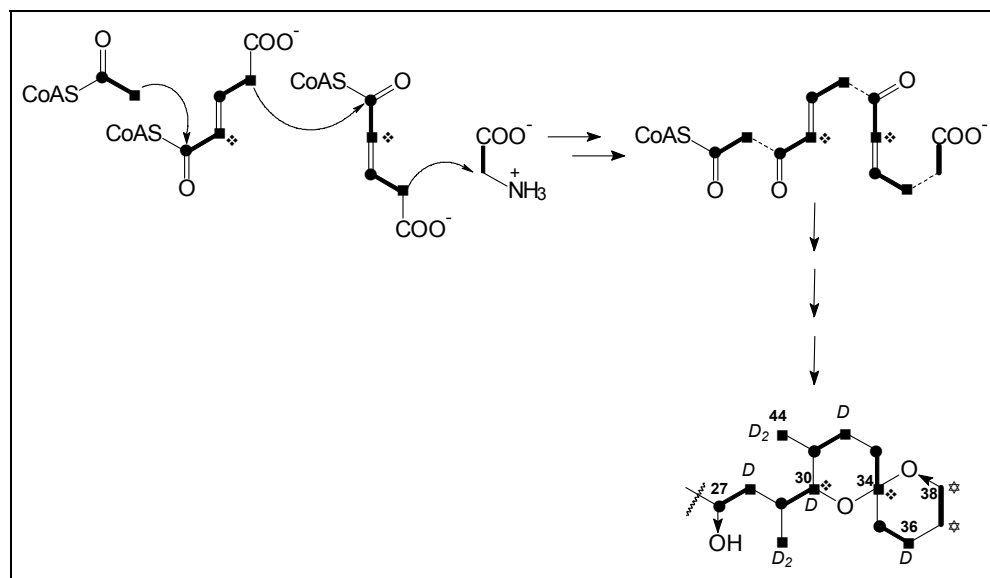
Los otros carbonos que aparecen enriquecidos en este fragmento son los carbonos de la cadena C-36, C-34, C-32, C-30, C-28 y los metilos C-43 y C-44, siendo el enriquecimiento de C-34 y C-30 superior al resto, tal y como se ha indicado previamente. La explicación de la secuencia de marcaje general ya se ha dado previamente, pero necesitamos una explicación para el marcaje diferenciado de C-34 y C-30. Para ello, proponemos que el fragmento C-36/C-29 debe generarse por condensación de dos unidades de glutaconil-CoA. En efecto, tal y como puede observarse en el **esquema 8**, el [2-¹³C₁] butirato sódico puede transformarse en el [2-¹³C₁] glutaconil-CoA vía crotonil-CoA, proceso durante el cual se mantiene el marcaje sobre el carbono 2.



Esquema 8

Finalmente, los carbonos C-28 y C-27 procederían de una unidad intacta de acetato.

De acuerdo con todo ello, el origen biogénico de este fragmento suponemos que comienza con una unidad de glicina que da lugar a los carbonos C-37 y C-38, y la cadena se va elongando por condensación de dos unidades de glutaconil-CoA, que por posterior decarboxilación, dan lugar al fragmento C-36/C-29. Por último, se produce la condensación de una unidad de acetyl-CoA que origina C-27 y C-28. En el **esquema 9** se resume la propuesta biogénica para este fragmento.



Esquema 9

Esta ruta biogénica puede acomodarse a los datos experimentales observados hasta el momento. En efecto, el hecho de que en el fragmento C-36/C-29 aparezca el mismo patrón de marcaje que el obtenido en el experimento con acetato puede explicarse en base a que la molécula de acetato procedente de la β -oxidación del butirato puede incorporarse a la ruta general de biosíntesis de ácidos grasos generando unidades de butirato que aparecerían marcados en los carbonos 2 y 4 y que se incorporarían a la molécula vía glutaconil CoA. El mayor grado de enriquecimiento en los carbonos C-30 y C-34, sería debido a la incorporación directa de unidades de $[2-^{13}\text{C}_1]$ butirato a la ruta de formación del glutaconil-CoA.

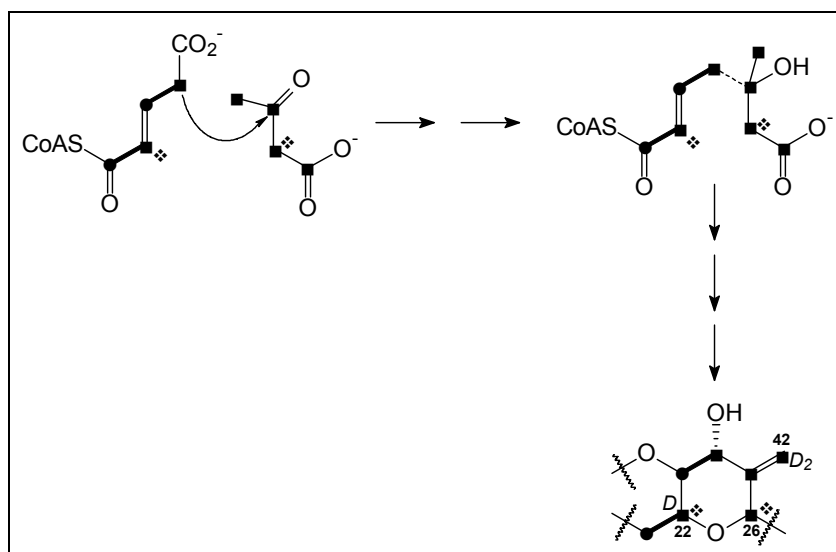
Esta hipótesis, además, no entra en contradicción con los otros resultados experimentales observados. En efecto, siguiendo la ruta propuesta, uno de los deuterios del grupo metileno del glutaconil-CoA, se pierde durante la condensación, lo que explica la retención de un solo átomo de deuterio en los carbonos C-36 y C-32. Una explicación similar, dada la forma de incorporarse de los metilos, justifica la retención de dos átomos de deuterio sobre C-43 y C-44. Finalmente, la retención del ^{18}O en C-38 y C-27 observada durante la adición de los marcadores $[2\text{-}^{13}\text{C}_1, ^{18}\text{O}]$ glicolato sódico y $[1\text{-}^{13}\text{C}_1, ^{18}\text{O}]$ acetato sódico, justifica la incorporación directa de los mismos.

D.2. Origen biogénico del fragmento [C-21/C-26]

En el experimento realizado con $[2\text{-}^{13}\text{C}_1]$ butirato sódico nos aparecen enriquecidos los carbonos C-22, C-24, C-25, C-26 y C-42, presentando en este fragmento un mayor grado de enriquecimiento los carbonos C-22 y C-26. Al compararlo con el que se realiza con $[2\text{-}^{13}\text{C}_1]$ acetato sódico aparece distintivamente enriquecido C-22. Si las medidas de las integrales se hacen en una muestra disuelta en CDCl_3 y desgasificada pasando una corriente de argón, se observan también ligeros incrementos en el carbono C-26. En cuanto a los resultados de los otros experimentos, se aprecian retenciones de un deuterio en el carbono C-22 y de dos en el metilo C-42.

De acuerdo con los resultados obtenidos por nosotros a partir de la adición de $[1\text{-}^{13}\text{C}_1]$, $[2\text{-}^{13}\text{C}_1]$ y $[1,2\text{-}^{13}\text{C}_2]$ acetato sódico, se había propuesto que el fragmento C-23/C-26 procedía de una unidad de hidroximetilglutarato por condensación de acetyl-CoA con una unidad de acetoacetato procedente de butirato del metabolismo de la valina (**Esquema 3**). Con los resultados de este nuevo experimento, esta hipótesis proponemos modificarla en el sentido de que la condensación de esta unidad de acetoacetato sea con una de glutaconil-CoA, que nos permite explicar los incrementos observados. Asimismo, la hipótesis es totalmente compatible con los marcajes con acetato y en lo referente a la incorporación de átomos de deuterio, también puede explicarse teniendo en cuenta la funcionalización del fragmento. El hecho de que en el experimento con $[2\text{-}^{13}\text{C}_1]$ acetato sódico se observe acoplamiento entre los carbonos C-24 y C-25 (**Figura 13**), obliga a que el policétido

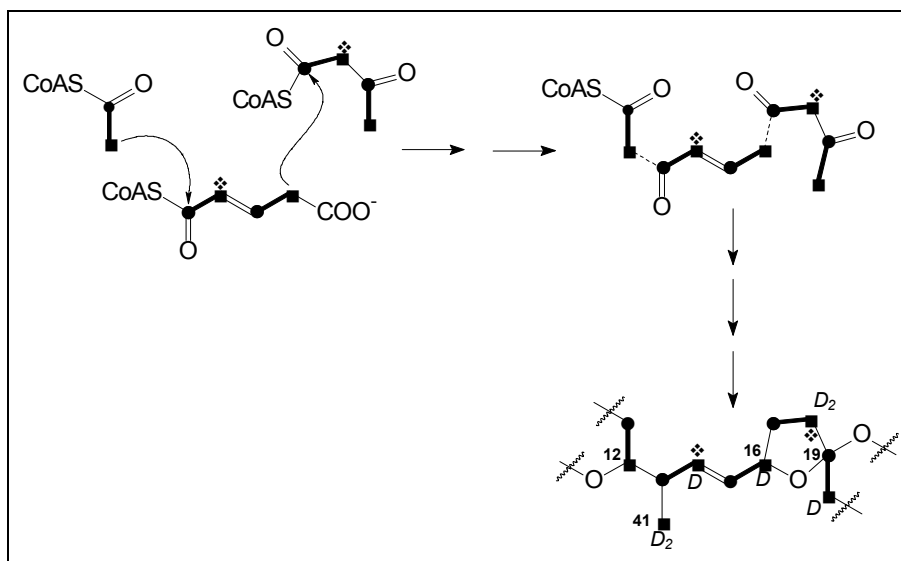
resultante de la condensación de estos dos fragmentos se incorpore de forma intacta a la molécula (**Esquema 10**).



Esquema 10

D.3. Origen biogénico del fragmento [C-11/C-20]

En el experimento biosintético realizado con $[2-^{13}\text{C}_1]$ butirato sódico aparecen enriquecidos los carbonos C-12, C-14, C-16, C-18, C-20 y el metilo C-41. De forma distintiva con respecto al marcaje con $[2-^{13}\text{C}_1]$ acetato sódico, se observan incrementos en los carbonos C-14 y C-18. Este marcaje podría ser explicado a través de la condensación de dos unidades de glutaconil-CoA y una unidad de acetil-CoA. Ahora bien, si tenemos en cuenta la retención de dos átomos de deuterio en el C-18 y con el fin de explicarla, proponemos que una de las unidades C_4 sea acetoacetato en vez de glutaconil CoA. Así para esta zona de la molécula proponemos la condensación de una unidad de acetoacetato procedente de la β -oxidación del $[2-^{13}\text{C}]$ butirato sódico (C-17/C-20), con una unidad de glutaconil-CoA enriquecida en la posición α (C-16/C-13), y finalmente una unidad de acetil-CoA (C-12/C-11). Este proceso se resume en el **esquema 11**. El presente encadenamiento nos conduce al fragmento del policétido enriquecido selectivamente con la funcionalización adecuada donde el metilo C-41 se incorporaría sobre el carbonilo resultante en C-14.



Esquema 11

D.4. Origen biosintético del fragmento [C-8/C10(40)]

El fragmento B comprende los carbonos C-8, C-9, C-10 y C-40. Aparecen enriquecidos en el experimento con $[2-^{13}\text{C}_1]$ butirato sódico, los carbonos C-9, C-10 y C-40. Este tipo de secuencias en metabolitos derivados de acetato ha sido observada durante la biosíntesis de las brevetoxinas y se propone como ya se enunció anteriormente, que su origen biogénético está en una molécula de succinato después de dos pasos a través del ciclo del ácido cítrico (**Esquema 2**).

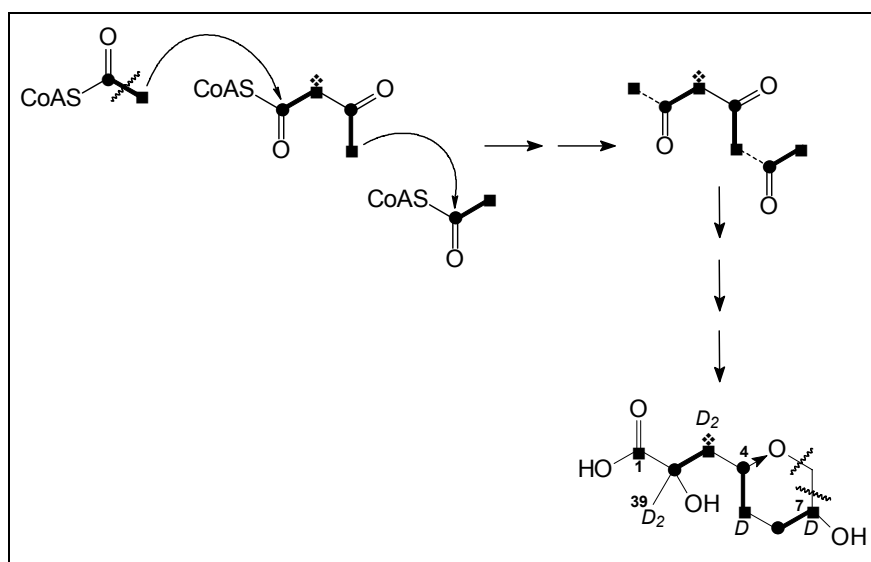
En el experimento con $[1,4-^{13}\text{C}_2]$ succinato sódico, aunque el enriquecimiento de la muestra no fue selectivo, se observaron ligeros incrementos en las señal correspondiente a C-8 lo que unido al hecho de que ninguno de los carbonos de este fragmento presenta incremento adicional en el experimento con $[2-^{13}\text{C}_1]$ butirato, refuerza nuestra hipótesis biogénética que sostiene al succínico como origen del fragmento B. Además, como era de esperar, en el experimento con $[2-^{13}\text{CD}_3]$ acetato sódico, hay retención de un deuterio en C-9 y de dos en C-40.

D.5. Origen biogénético del fragmento [C-1/C-7].

En este último fragmento aparecen enriquecidos los carbonos C-1, C-3, C-5, C-7 y

C-39, en el experimento de $[2-^{13}\text{C}_1]$ butirato sódico, apareciendo de forma distintiva con respecto al de $[2-^{13}\text{C}_1]$ acetato sódico, tan sólo el carbono C-3. Empleando el mismo criterio que en los fragmentos anteriores, este carbono debe proceder del carbono 2 del butirato que hemos empleado como marcador. De nuevo en este fragmento, se retienen dos átomos de deuterio sobre C-3, lo que nos obliga a proponer como precursor de la unidad de cuatro carbonos a una molécula de acetoacetato, probablemente proveniente de la β -oxidación, en lugar de una de glutaconil-CoA. La retención observada de ^{18}O sobre el carbono C-4 en el experimento con $[1-^{13}\text{C}_1, ^{18}\text{O}]$ acetato sódico, podría también explicarse a través de la misma ruta.

En base a todo ello proponemos que el origen de este fragmento está en la condensación de una unidad de acetato, correspondiente a los carbonos C-6/C-7, que se condensa con una unidad de acetoacetato para los carbonos C-2/C-5, la cual a su vez se condensa finalmente con otra unidad de acetato. Esta última unidad sufre una decarboxilación y posterior oxidación que da lugar al grupo carboxilo en C-1, que tiene su origen en un metilo de acetato. Estas condensaciones al igual que en los casos precedentes nos conducen al policétido con un carbonilo en la posición C-2, donde debe producirse la metilación que da lugar al C-39. Este proceso se resume en el **esquema 12**.



Esquema 12

D.6. Origen biosintético de la cadena del éster 7' hidroxí-4'-metil-2'-metilén-hepta-4'-enil-okadaato

En los experimentos realizados con [2-¹³C₁] butirato sódico aparecen enriquecidos los picos correspondientes a los carbonos C-3', C-5', C-7', C-8' y C-9'. Todos ellos aparecen también enriquecidos en el experimento con [2-¹³C₁] acetato sódico, y en nuestro caso no hay ningún enriquecimiento superior, por lo que suponemos que su origen está en la condensación de tres unidades de acetato.

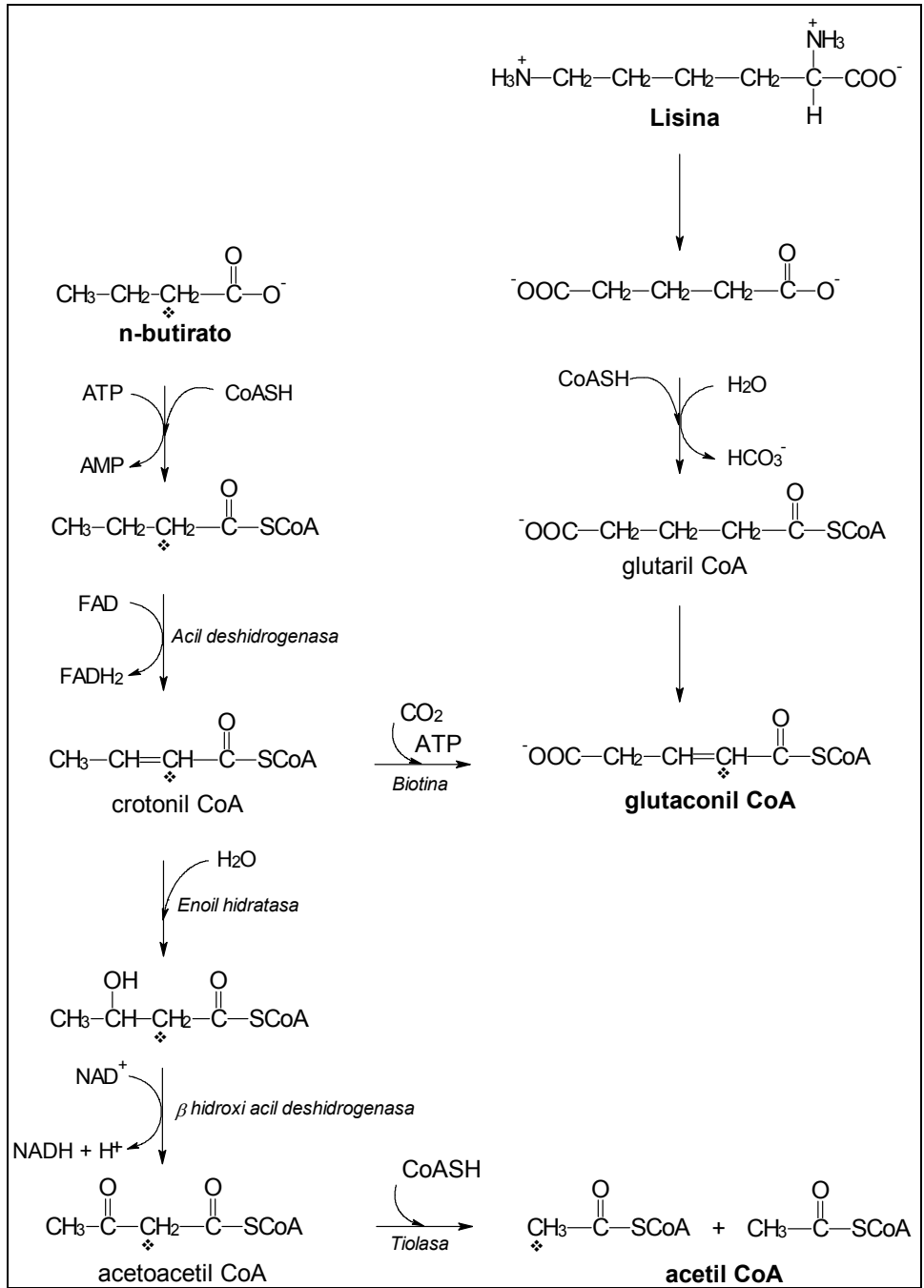
En lo concerniente a los carbonos C-1' y C-2', que no se enriquecen en los experimentos de acetato o butirato, aparecen enriquecidos en igual proporción que el resto de los carbonos de la molécula, cuando se utiliza como precursor [1,4-¹³C₂] succinato sódico. El origen exacto de C-1' y C-2' está todavía por determinar, aunque Wright en un éster similar pero con un carbono menos postula que proviene, al igual que C-37 y C-38, de la glicina.³⁰

En vista de los resultados anteriores, se confirma la implicación de rutas alternativas en la que los microorganismos pueden incorporar fragmentos de cuatro carbonos, lo que refuerza la hipótesis, a la que hicimos mención antes, propuesta por el Prof. Shimizu y col., sobre la utilización por parte de los dinoflagelados de diversos aminoácidos como fuente de ácidos carboxílicos para su utilización en las síntesis de estas estructuras polietéreas.

En nuestro caso la conexión directa entre la L-valina y el acetoacetato del fragmento C-21/C-26, ya ha sido mencionada. Pero, por otro lado, el glutaconil-CoA es también producto del catabolismo de la lisina (**Esquema 13**), por lo que, al menos formalmente, podría pensarse en este aminoácido como la fuente de glutaconil-CoA en el dinoflagelado.

Por tanto, el siguiente paso que nos planteamos para avanzar en el estudio biosintético de estas toxinas, fue tratar de verificar si realmente se da este papel de protagonismo de los aminoácidos.

30. J. Needham, T. Hu, J.L. McLachlan, J.A. Walter, J.L.C. Wright, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1995**, 1623-1624.



Esquema 13

III.2. EXPERIMENTOS DE ADICION DE AMINOACIDOS A CULTIVOS DE *P. LIMA*

Antes de pasar a realizar un marcaje con aminoácidos es necesario estudiar como se comporta el cultivo cuando se le adiciona este tipo de sustancias, ya que el precio de los

marcadores es muy elevado y debemos asegurarnos o tener las máximas garantías de que el cultivo se desarrolla adecuadamente en presencia de los mismos. Por lo tanto, como primer paso, se ensaya la adición de las sustancias sin marcar, realizando un estudio sobre como afecta al crecimiento del organismo y a la producción de toxinas. Además de la valina y la lisina, aminoácidos implicados en nuestra propuesta biosintética, decidimos completar este estudio con otros aminoácidos para lo que se llevó a cabo la elección considerando aquellos que nos parecieron más idóneos o con alguna posibilidad de participar en el metabolismo de estos poliéteres.

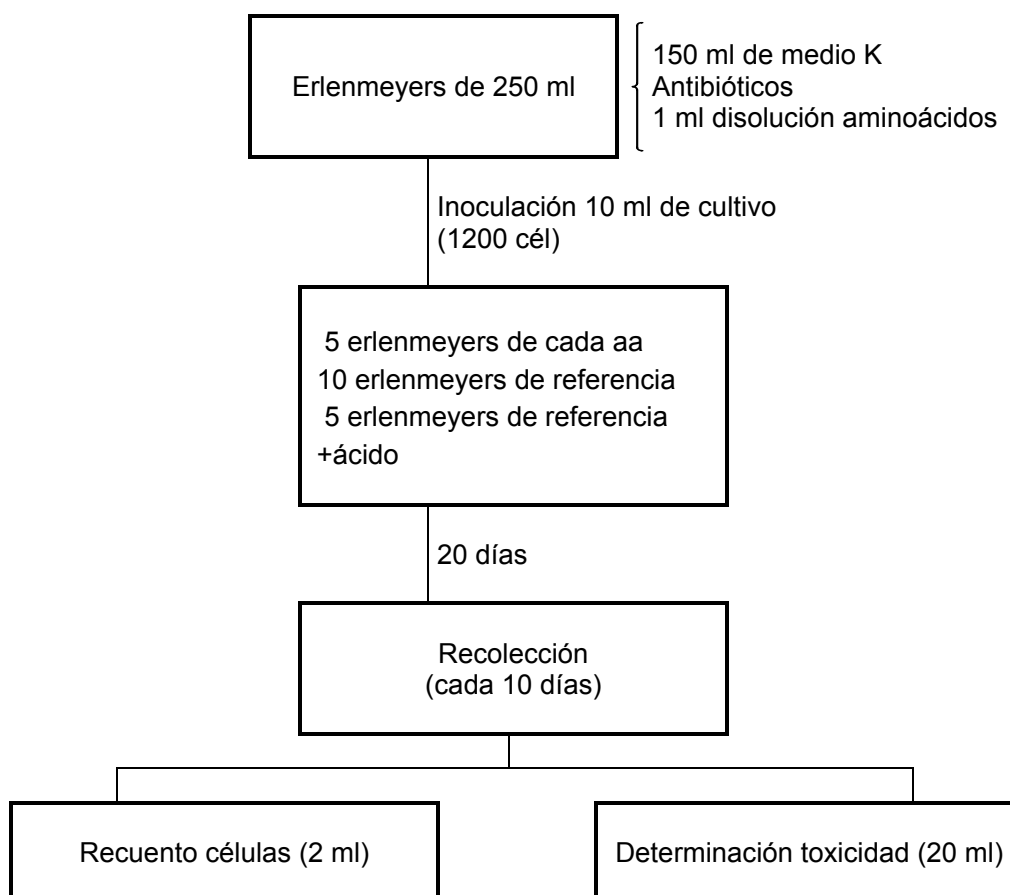
A. DESCRIPCIÓN GENERAL DEL EXPERIMENTO DE ADICIÓN DE AMINOÁCIDOS

Los aminoácidos sobre los que se realizó el estudio fueron: aspartato, cisteína, valina, leucina, lisina, serina y treonina (todos de la serie L). Fueron añadidos a los cultivos en la misma concentración y con un protocolo similar al que habíamos empleado en los marcajes con acetato (0.67 mM).

El tratamiento fue el mismo en todos los casos, con la excepción de que con el aspartato y la leucina, tuvo que añadirse 150 µl de HCl 5N para conseguir la total disolución de estos aminoácidos en agua bidestilada.

Cada experimento consistió en la inoculación con 10 ml de cultivo de *P. lima* (1200 células) de 150 ml de medio Guillard K al que se le habían adicionado antibióticos (40 UI de penicilina G y 200 UI de sulfato de estreptomina por ml de cultivo) y 1 ml de la disolución del aminoácido correspondiente para obtener una concentración final en el medio de 0.67 mM. Los recipientes empleados fueron erlenmeyers de 250 ml. En todos los casos, las condiciones fueron estériles, empleando una batería de filtros (1 µm, 0.45 µm y 0.22 µm) tanto para los medios de cultivo como para los antibióticos, así como filtros de membrana de 0.22 µm para filtrar las disoluciones de los aminoácidos. La manipulación se realizó en campana de flujo laminar y en materiales autoclavados. En estas condiciones se prepararon 5 erlenmeyers para cada aminoácido, 10 erlenmeyers de referencia con cultivos normales sin adición y 5 erlenmeyers de referencia a los que se les adicionó 150 µl de HCl

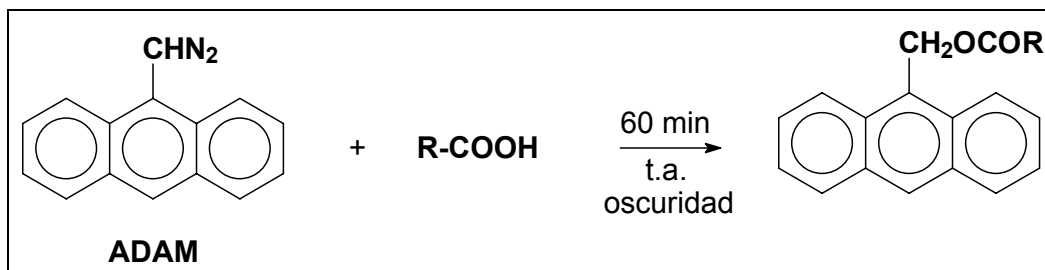
5N, para los casos en que había sido necesario recurrir a estas condiciones. El cultivo se dejó crecer 20 días y luego se procedió cada diez días a la recolección de células. Esta se realizó homogeneizando cada recipiente por agitación vigorosa y raspado del fondo, separando dos muestras para recuento de células al microscopio y cuatro para análisis de toxicidad (**Esquema 14**).



Esquema 14

Las muestras para recuento de células se prepararon con 2 ml de cada erlenmeyer y 50 μ l de Lugol a fin de mejorar la visualización al microscopio de tipo invertido. Se preparó el Lugol de la siguiente manera: 10 g de yoduro potásico disuelto en 100 ml de agua destilada se mezcla con una disolución de 5 g de yodo en 10 ml de ácido acético glacial. Las segundas, las muestras para el análisis de toxicidad se obtuvieron a partir de 20 ml de cultivo suspendido y filtrado a través de filtros de lana de vidrio de 2.4 cm de diámetro. Los filtros fueron extraídos con acetona, y los extractos resultantes analizados

por el método de Yasumoto, método analítico que consiste en derivatizar las toxinas con 9-antrildiazometano(ADAM), una estructura química que permite la detección por fluorescencia (**Esquema 15**).



Esquema 15

B. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE LA SUPLEMENTACIÓN DEL MEDIO CON AMINOÁCIDOS

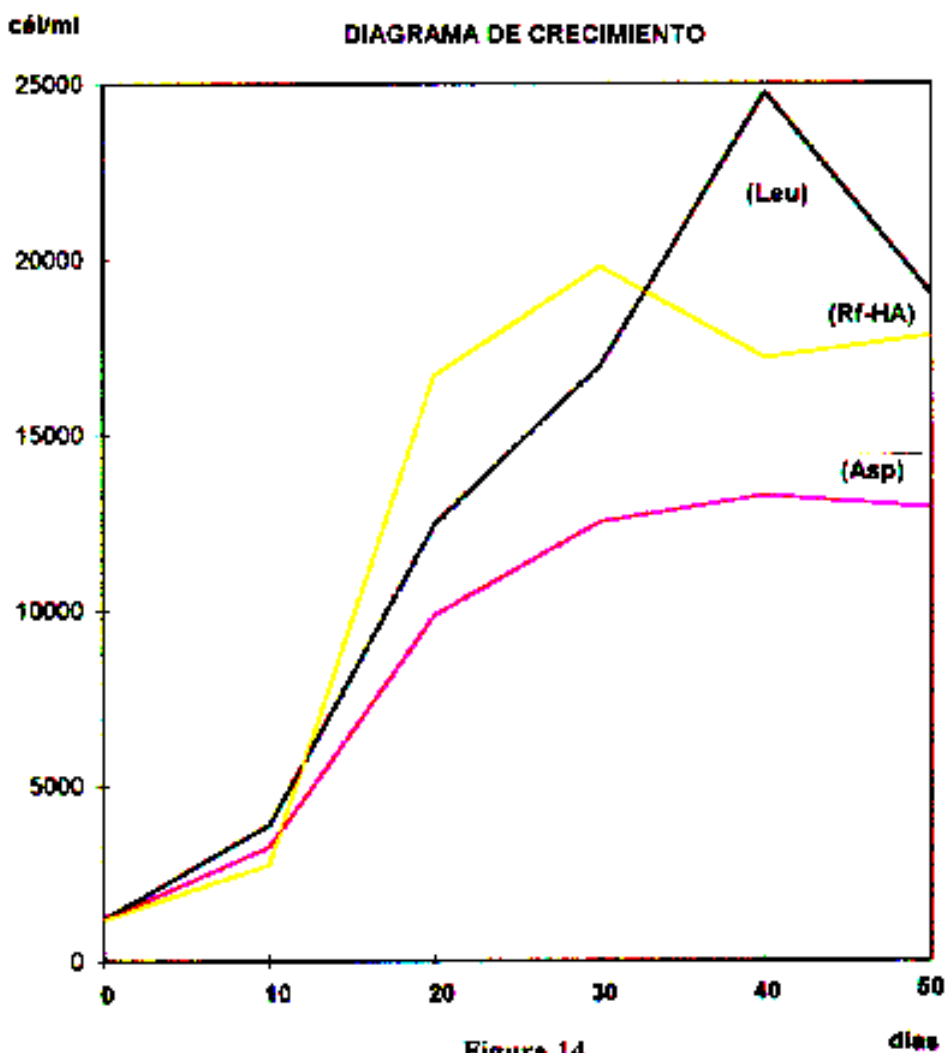
Los objetivos de este estudio, como hemos indicado, estaban encaminados a evaluar el comportamiento del cultivo y las posibles variaciones de toxicidad producidas al suplementar los medios con los distintos aminoácidos. Por tanto, como primer paso se analizó la evolución de los cultivos en lo referente al número de células/mililitro, además de examinar también la vitalidad de los mismos. Esto es razonable si consideramos que a la hora de adicionar los precursores, una evolución normal asegura un mejor rendimiento y una correcta incorporación.

Por otro lado, el segundo paso consistió en analizar el perfil tóxico de las muestras e ir midiendo a lo largo del período de cultivo como evoluciona la concentración de las toxinas por célula producidas por el *Prorocentrum lima*. Los aumentos o disminuciones de la producción de toxinas son un criterio importante a la hora de implicar un determinado aminoácido en la ruta de formación de las mismas. Los resultados alcanzados en esos experimentos se resumen en las **tablas 6-8**.

B.1. Crecimiento y vitalidad del cultivo.

Por lo que respecta al aspecto y a la vitalidad de las células resultaron equivalentes en todos los casos, excepto en el cultivo con cisteína. En éste, las células pierden su habitual pigmentación marrón mostrando un aspecto más blanquecino, falta de vitalidad y no llegan a alcanzar los 50 días que abarca el experimento.

En general, los cultivos evolucionan con los parámetros normales, presentando una fase de crecimiento exponencial, seguida de una cierta estabilización. Sin embargo, se observan ligeras diferencias en los períodos en que se alcanzan estas fases. Así, en las muestras acidificadas y suplementadas con aminoácidos, el máximo de crecimiento se alcanza en los cuarenta días de cultivo, en tanto que la muestra de referencia lo alcanza a los treinta días iniciándose posteriormente una disminución con estabilización (**Figura 14**).



La situación con el resto de aminoácidos que se suplementaron sin necesidad de acidificación, varía ligeramente respecto de la anterior. En efecto, el máximo de crecimiento se alcanza a los cuarenta días de cultivo con todos los aminoácidos, en tanto que el de referencia continúa en fase de crecimiento al cabo de cincuenta días (**Figura 15**).

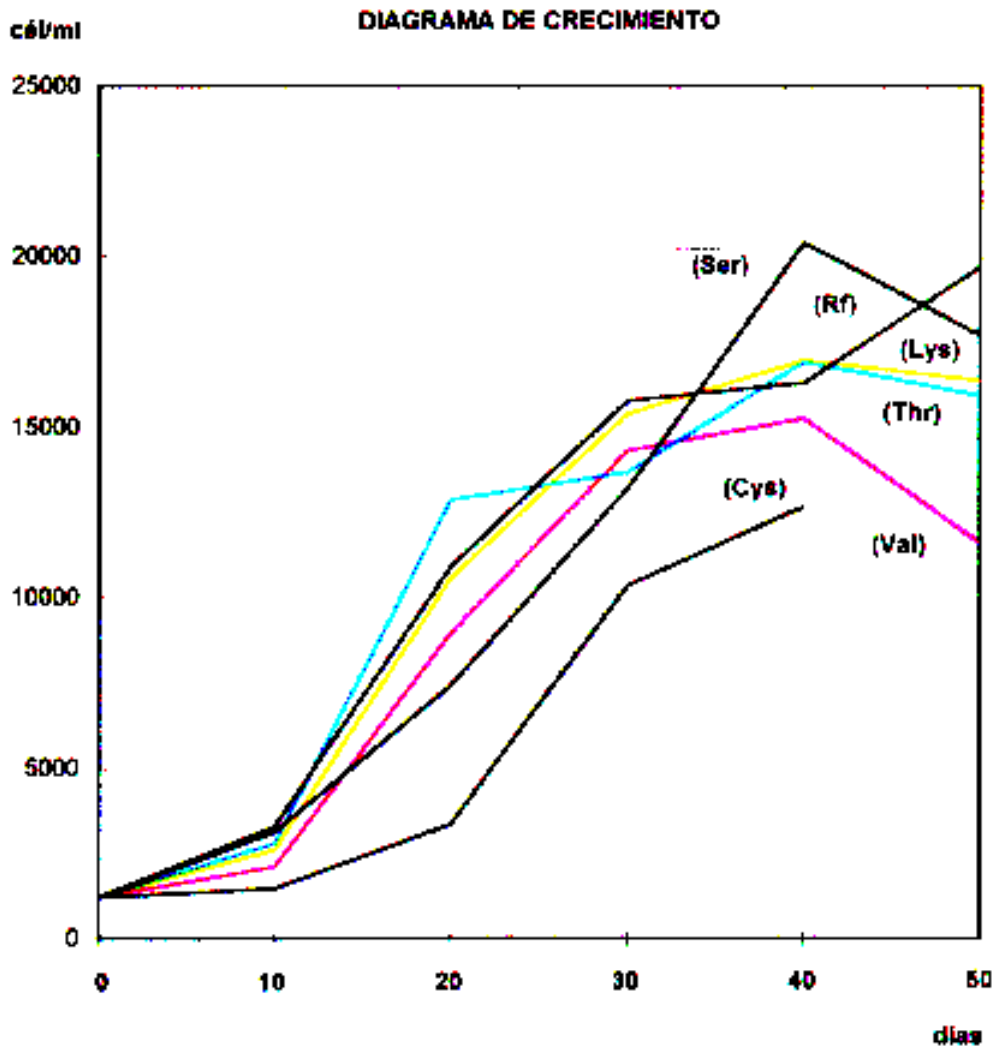


Figura 15

De forma general, el número de células de *P. lima* por mililitro es inferior a las observadas en los cultivos de referencia, excepto en el caso de la leucina que llega a alcanzar una concentración de 24766 células/ml a los 40 días frente a un máximo de 19793 células/ml en el de referencia y en el caso de la serina con 20400 células/ml frente a 19690 células/ml (referencia sin acidificar) (**Tabla 6**).

Aminoácidos añadidos al medio de cultivo a una concentración 0.67 mM	n° cél/ml.					
	Inóculo	Fecha de recolección				
		Día 10	Día 20	Día 30	Día 40	Día 50
Leucina	1200	3866	12433	16953	24766	19000
Aspartato	1200	3233	9846	12513	13266	12900
Referencia Medio Acidificado	1200	2743	16666	19793	17166	17805
Valina	1200	2100	8962	14300	15266	11600
Lisina	1200	2600	10566	15380	16960	16380
Treonina	1200	2800	12851	13673	16933	15930
Serina	1200	3133	7420	13186	20400	17690
Cisteína	1200	1466	3360	10353	12666	----
Referencia Sin Acidificar	1200	3300	10906	15780	16300	19690

Tabla 6. Valores del número de células por mililitro de los cultivos de *Prorocentrum lima* suplementados con aminoácidos.

Aminoácidos añadidos al medio de cultivo a una concentración 0.67 mM	AO en pg/cél.									
	Fecha de recolección									
	Día 20		Día 30		Día 40		Día 50			
	T.D.	T.T.	T.D.	T.T.	T.D.	T.T.	T.D.	T.T.	T.D.	T.T.
Leucina	3.8	4.3	3.6	4.7	6.7	7.8	8.4	9.7		
Aspartato	3.4	4.0	8.4	11.2	11.1	12.6	6.5	6.5		
Referencia Medio Acidificado	3.5	3.8	3.4	3.4	6.4	8.0	8.1	8.8		
Valina	7.4	7.9	6.9	6.9	9.0	9.6	9.4	10.0		
Lisina	5.3	7.8	6.4	6.7	8.1	10.9	10.6	12.5		
Treonina	2.5	3.3	6.7	7.8	6.9	6.9	10.2	11.2		
Serina	5.3	8.1	9.9	12.3	9.4	11.7	12.8	13.8		
Cisteína	14.1	17.3	7.9	7.9	7.4	9.3				
Referencia Sin Acidificar	5.4	6.1	4.2	4.6	4.6	4.8	4.8	6.2		

Tabla 7. T.D. (Toxicidad Directa)= Toxicidad medida directamente sobre los extractos;
T.T. (Toxicidad Total)= Toxicidad medida en los extractos una vez sometidos a hidrólisis básica

En cualquier caso, hay que indicar que las diferencias encontradas entre los máximos no son excesivas, pudiéndose considerar la producción celular con medios suplementados como satisfactoria.

B.2. Análisis de la toxicidad de los cultivos con aminoácidos

El perfil tóxico de estos cultivos se evaluó por el método de derivatización con el 9-antrildiazometano (ADAM), recogiendo en la **tabla 7** los datos obtenidos de la cantidad de AO por célula, medidos en pg/cél. Para la obtención de estos datos se midió la toxicidad directa del extracto y la toxicidad total del mismo a través de dos protocolos diferentes.

En efecto, por **Toxicidad Directa (TD)** entendemos la obtenida directamente a partir del extracto acetónico de las células sometidas previamente a ultrasonido. En esta medición se obtiene la concentración del ácido okadaico y de la DTX-1. Sin embargo, hay que indicar que en la cepa de *P. lima* utilizada en estos experimentos, la proporción de esta última toxina respecto de la del AO es muy baja, razón por la cual en lo sucesivo y durante el manejo de este dato, nos referiremos a la concentración de AO libre.

Por **Toxicidad Total (TT)** entendemos la obtenida a partir del mismo extracto acetónico que en el caso anterior, pero que es sometido a una hidrólisis alcalina previa a la medición de la toxicidad. De esta forma es liberado el ácido okadaico esterificado opaco al análisis anterior evaluándose así la concentración total de tóxicos presentes (**Figura 16**). En este caso, hay que comentar que se ha comprobado que la DTX-1 no aparece esterificada con diol ésteres.

Al analizar los valores finales de la **tabla 7**, vemos que los cultivos que sufren un aumento en la concentración de toxina por célula con respecto al cultivo de referencia, son aquellos que fueron suplementados con leucina, valina, lisina, treonina y serina.

Así, si tomamos en cuenta los datos de toxicidad total en la última medición, se observa que la concentración de toxina va desde 1.6 veces más con respecto al cultivo de referencia en el caso de la valina, hasta 2.2 veces más en el caso de la serina. De igual manera, esta producción va aumentando progresivamente con respecto al cultivo de referencia a medida que progresan los cultivos. En el caso de los aminoácidos

anteriormente citados, las concentraciones de toxina al cabo de veinte días de cultivo y respecto del de referencia, era 1.29 veces mayor para la valina y 1.32 veces mayor para la serina.

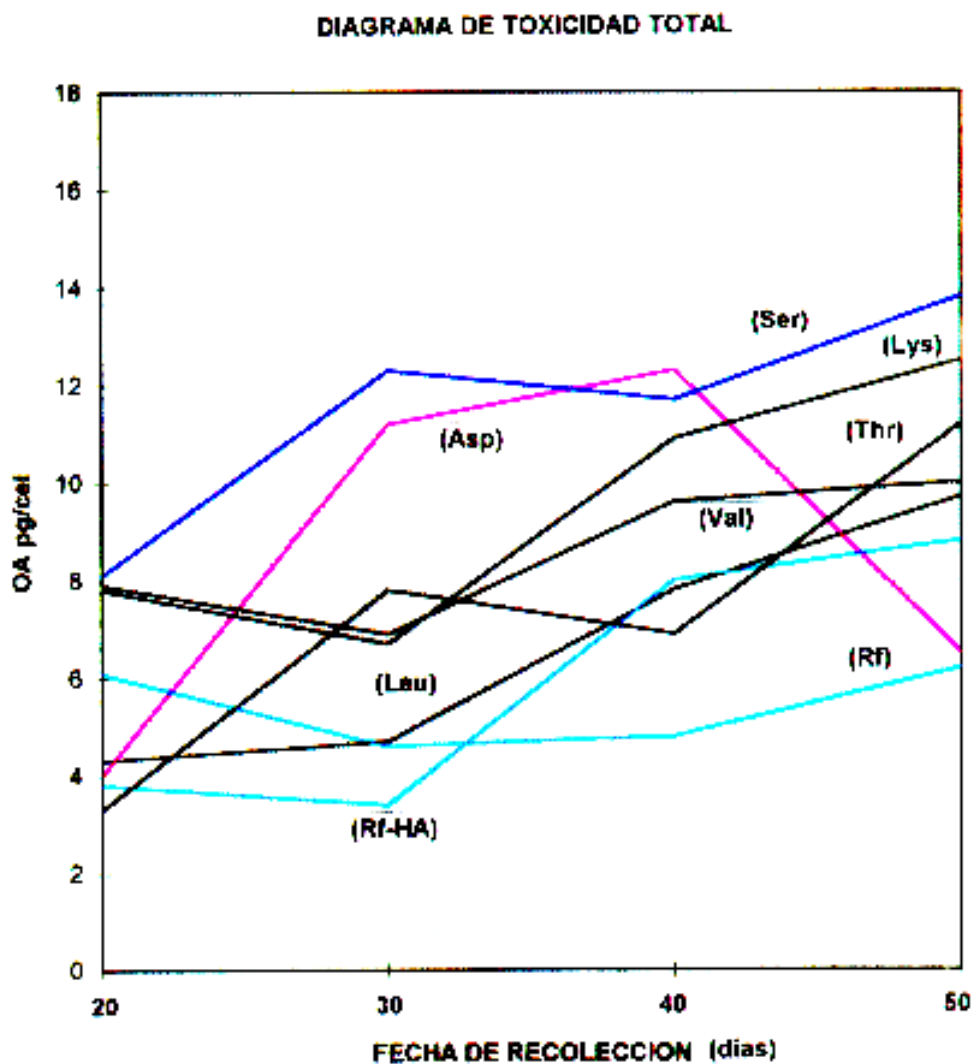
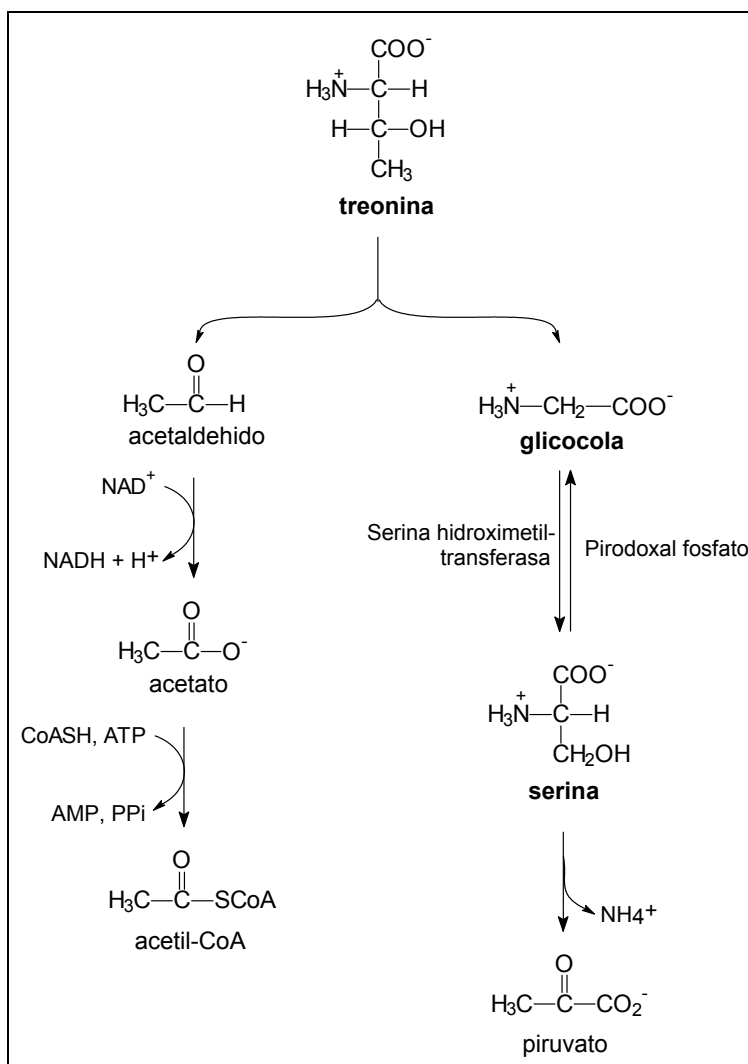


Figura 16

Si entendemos que el aumento de la concentración de las toxinas es una consecuencia de la presencia del aminoácido en el medio, debemos concluir que éstos, tal como ha sido puesto de manifiesto por otros autores, se implican en la biosíntesis de las toxinas. Esta posible participación de estos aminoácidos se podría justificar de la siguiente manera:

En el caso de la leucina, de acuerdo con los resultados obtenidos por el Profesor Y. Shimizu mediante adición de precursor [3,4-¹³C₂] leucina en la síntesis de toxinas marinas producidas por el *Gymnodinium breve*, la leucina es metabolizada a [3-¹³C] acetoacetato y [2-¹³C] acetato los cuales son incorporados en las rutas biosintéticas de las toxinas elaboradas por este dinoflagelado.²¹ Una situación similar podría aplicarse a nuestro caso.



Esquema 16

Con treonina y serina este incremento puede justificarse si consideramos que ambos aminoácidos se transforman por acción de la enzima serina hidroximetil transferasa de forma directa a glicina. La glicina, tal y como se ha puesto claramente de manifiesto en los

experimentos biosintéticos descritos, se considera el origen de los carbonos C-37 y C-38 del esqueleto carbonado de este tipo de toxinas y probablemente el de los carbonos 1' y 2' de los ésteres. Asimismo el catabolismo de estos aminoácidos generan acetil Co-A y piruvato, que pueden ser utilizados como productos de partida en la biosíntesis (**Esquema 16**).

En lo referente a la valina, y de acuerdo con nuestra hipótesis biogenética, suponemos que ésta se encuentra implicada en la biosíntesis del fragmento C-25/C-26(C-42) del esqueleto carbonado de las toxinas del grupo del ácido okadaico (**Esquema 3**). A su vez, la lisina se metaboliza a glutaconil-CoA (**Esquema 13**), otro de los precursores que proponemos para la biosíntesis de varios fragmentos. Por tanto nos parece lógico pensar que ambos, tal y como sucede, incrementen de forma notable la producción de tóxicos duplicando la cantidad de toxina que se encuentra en un medio de cultivo sin suplementar.

Un aspecto que nos llamó poderosamente la atención fueron las proporciones de producción de toxina esterificada. En efecto, en la **tabla 8**, damos las proporciones de AO libre y esterificado para cada una de las mediciones. Un análisis detallado de las toxicidades medidas de forma directa sobre los extractos y la obtenida después de realizada la hidrólisis alcalina de los mismos, pone de manifiesto que la esterificación no es un proceso que guarde ninguna pauta común. Así, si establecemos los porcentajes de AO libre y de su diol éster para cada una de las mediciones que hemos realizado, nos encontramos con que los valores son totalmente aleatorios. En el cultivo de referencia se observa que la proporción de diol éster se duplica al cabo de 50 días respecto de la medición a los 20 días de cultivo; para la serina es casi cinco veces mayor; para la treonina y la valina los valores se mantienen; finalmente, en el caso de la leucina la concentración se reduce a la mitad. Además, si se comparan los porcentajes obtenidos a lo largo de los diferentes tipos de cultivo, tampoco existe ninguna correlación lógica.

Otros autores, en cultivos realizados sobre cultivos de *P. lima*, han relacionado la cantidad de ésteres aislados con el procedimiento de extracción utilizado.³¹ En efecto, algunos de éstos proponen que durante el tratamiento con ultrasonido de las células recolectadas, se produce la ruptura de los compartimentos celulares. En dos

31. M.A. Quillian, W.R. Hardstaff, N. Ishida, J.L. McLachlan, A.R. Reeves, N.W. Ross, A.J. Windust, "Presentado en Sendai", Julio 1995.

compartimentos diferenciados se encontrarían, por un lado los ésteres y por otro la enzima responsable de su hidrólisis, que al entrar en contacto dan lugar al proceso enzimático. En nuestro caso, el protocolo de extracción fue idéntico en todos los casos, al margen de que el número y tipo de muestras analizadas es mayor, puesto que el estudio al que hacemos referencia sólo fue llevado a cabo sobre cultivos de *P. lima* sin suplementar. Pero sobre todo, hay un dato que nos resulta relevante. Se trata de que en el experimento ya comentado de adición de succínico enriquecido en ^{13}C , utilizando el mismo protocolo de extracción, sólo se aisló diol-éster del ácido okadaico, lo que entra en contradicción con la teoría anteriormente expuesta.

Además, y en estudios a gran escala llevados a cabo con anterioridad, hemos comprobado repetidamente que en las cepas donde hemos aislado diol-ésteres del ácido okadaico, la proporción encontrada de toxina libre/toxina esterificada, se mantuvo aproximadamente igual a lo largo de los diferentes cultivos.

En base a todos estos resultados, es difícil encontrar una explicación lógica a las proporciones de toxina libre y toxina esterificada presentes en las células de *P. lima*. Lo sensato, en nuestra opinión, es continuar estudiando sobre cultivos controlados estrictamente en sus condiciones. Habrá que, comparar datos obtenidos a partir de diferentes cepas de *P. lima* cultivadas en diferentes medios de cultivo. Asimismo habrá que observar el comportamiento, variando los ciclos de luz y temperatura, el grado de envejecimiento, utilizando condiciones de stress para las células, etc., antes de emitir hipótesis más o menos especulativas.

En cualquier caso, los resultados alcanzados por nosotros nos ponen de manifiesto que suplementando los cultivos con determinados aminoácidos, conseguimos un aumento en la producción de la toxina. Esto en sí mismo tiene un enorme interés de cara a la utilización de los cultivos como fuente de toxinas para su uso como patrones de referencia en los laboratorios de análisis, así como para estudios farmacológicos. Además y de cara a la continuación de los estudios biosintéticos, estos estudios nos abren la posibilidad razonable de utilizar aminoácidos marcados para avanzar en el estudio de la biosíntesis de este interesantísimo grupo de sustancias.

Aminoácidos añadidos al medio de cultivo a una concentración 0.67 mM	% en pg/cél.									
	Fecha de recolección									
	Día 20		Día 30		Día 40		Día 50			
	%AO	%E-AO	%AO	%E-AO	%AO	%E-AO	%AO	%E-AO	%AO	%E-AO
Leucina	88.3	11.7	76.5	23.5	85.8	14.2	86.5	13.5		
Aspartato	85.0	15	75	25	88	12	100	0		
Referencia Medio Acidificado	92.1	7.9	100	0	80	20	92	8		
Valina	93.6	6.4	100	0	93.7	6.3	94	6		
Lisina	67.9	32.1	95	5	74.3	25.7	84.8	15.2		
Treonina	75.7	24.3	85	15	100	0	91	9		
Serina	65.4	34.6	80.4	19.6	80.3	19.7	92.7	7.3		
Cisteína	81.5	18.5			79.5	20.5				
Referencia Sin Acidificar	88.5	11.5	91.3	8.7	95	5	77	23		

Tabla 8

IV. PARTE EXPERIMENTAL

IV.1. TÉCNICAS EXPERIMENTALES

Resonancia Magnética Nuclear

Para la realización de los experimentos de RMN, los productos fueron disueltos en CDCl_3 o Metanol deuterado, usando TMS como referencia interna. Dichos espectros, tanto de ^1H como de ^{13}C , fueron realizados en espectrómetros BRUKER[®] AMX 400 MHz. Se utilizaron los programas COSY, COSY DQF, NOESY, ROESY, DEPT, HMBC, INADEQUATE, HMQC y HMQC-TOCSY los cuales fueron suministrados por la casa BRUKER[®]. Los datos de adquisición obtenidos en el espectrómetro BRUKER[®] AMX 400 fueron procesados en un PC utilizando el programa WIN-NMR de BRUKER[®] versión 931115.

Masas

Para los espectros de masas realizados usando la técnica de electrospray se utilizó un espectrómetro de la marca VG-FISONS[®]. Como fase móvil se empleó $\text{MeOH:H}_2\text{O}+1\%\text{AcOH}$, a un flujo de 20 $\mu\text{l}/\text{min}$, inyectando una muestra de 20 μl de concentración 20 $\text{ng}/\mu\text{l}$. La temperatura de la fuente de ionización se fijó a 100° C.

Cromatografía en columnas

La cromatografía se realizó en columnas pre-empaquetadas LOBAR[®] GRÖBE B (310-25)- LICHROPREP RP 18 (40-63 μm) de la casa MERCK[®], y bombas de media presión con cabezal de émbolo de cerámica, de la casa FLUID METERING[®], modelo RP-SY.

Cromatografía HPLC

En este tipo de cromatografía se utilizó un sistema de HPLC compuesto por una bomba HPLC LKB[®], modelo 2248, columnas μ -Bondapak C-18 (D.I. 1.9 cm; longitud 15 cm) y un detector de fotodiodo 2MD RAPID SPECTRAL, LKB[®].

Las cromatografías en gradiente fueron realizadas en un HPLC de la marca SHIMADZU[®], compuesto por un sistema de dos bombas modelo LC-7A, con mezclador de alta presión, un controlador de gradientes modelo SCL-6B, un detector de fotodiodos de

la misma marca modelo SPD-M6A y una columna μ -Bondapak C-18 (D.I. 1.9 cm; longitud 15 cm).

Los análisis de los derivados de las toxinas con 9-antrildiazometano fueron realizados en un HPLC de la marca HEWLETT-PACKARD[®] HP104 A, con una columna Superspher 100 RP-18 (D.I. 0.4 cm, longitud 25 cm), conectado a un detector de fluorescencia en el que se fijan los valores de 365 nm para la excitación y 412 nm para la emisión. El eluyente empleado fue una mezcla Acetonitrilo:H₂O (80:20), a un flujo de 1.1 ml/min y a temperatura constante de 35° C.

Cromatografía de gel-filtración

Para este tipo de cromatografía se usó la Sephadex LH-20, de PHARMACIA FINE CHEMICALS[®], y las columnas se montaron siguiendo las instrucciones del fabricante. La mezcla de eluyente utilizada fue n-Hexano:Cloroformo:Metanol (2:1:1).

Cromatografía en capa fina

La evolución de las cromatografías en columna se siguió mediante cromatografía en capa fina con placas de la casa SCHLEICHER & SCHULL[®], tipo F-1500/LS254. Para el revelado se siguieron diversos procedimientos:

a) Impregnación de la placa con una disolución de H₂SO₄:H₂O:AcOH (1:4:20) en forma de aerosol, y posterior calentamiento a 140° C.

b) Impregnación de la placa con una disolución al 10% de ácido fosfomolibdico en etanol, también en forma de aerosol, y posterior calentamiento a 140° C.

Las cromatografías fueron eluidas en un sistema formado por la mezcla Benceno:Acetona:Metanol:Acido acético 6N (150:80:19:1).

Ensayos farmacológicos

Los cambios en la tensión isométrica fueron recogidos por un transductor isométrico GRASS[®] FT-03, conectado a un amplificador LETICA[®], y a un sistema de registro plano ABB GOERZ[®] SE 130. Las preparaciones fueron mantenidas a 32° C de temperatura a través de un termostato eléctrico SELECTA[®] 3473100.

Filtración y esterilización de medios de cultivo

Para la filtración y esterilización del agua de mar y de los medios de cultivos en grandes volúmenes se utilizó un sistema de filtración compuesto por una bomba peristáltica MASTERFLEX[®] modelo 7521-25 conectado a un conjunto de filtros de 5 µm, 1 µm y 0.22 µm, de la marca GELMANS[®] que permite obtener un flujo de 2 l/min.

La esterilización por filtración de volúmenes pequeños, de las disoluciones stock de nutrientes y de precursores enriquecidos fueron realizadas con filtros COSTAR[®] Ref. 8374 de membrana de nylon 0.22 µm, y almacenadas en botellas de poliestireno de 0.5 l COSTAR[®] Ref. 8393.

Recolección por centrifugación

En la recolección de células fue utilizada una centrífuga SORVAL[®] RC-5B, con un sistema de alimentación en continuo, y todo el proceso se realiza con un control de la temperatura entre 5° C y 10° C.

Autoclavado

Todo el material estéril necesario para la realización de los cultivos de dinoflagelados fue autoclavado en un aparato MATACHANA[®] 80-LVR, con un programa de 120° C durante un período de 30 minutos.

Disolventes y reactivos

Los disolventes fueron secados mediante métodos estándar, y usados bajo atmósfera de argón. Los reactivos se usaron normalmente en su forma comercial sin purificación, excepto cuando las condiciones de extrema sequedad lo requerían.

Productos enriquecidos en ¹³C

Los precursores enriquecidos en ¹³C, nos fueron suministrados por la casa ISOTEC[®], y en todos los casos la riqueza era superior al 99 %.

IV.2. ESTUDIO DE COMPLEJACIÓN DEL ÁCIDO OKADAICO

A. QUELACIÓN DEL ÁCIDO OKADAICO LIBRE CON CATIONES ALCALINOS Y ALCALINOTÉRREOS

El procedimiento general seguido fue el mismo para la adición de cada uno de los cationes ensayados, disponiéndose además, en cada caso y de forma separada, de una disolución de ácido okadaico libre preparada en las mismas condiciones como patrón.

Experimento A. A 0.5 ml de una disolución 5.58×10^{-3} mM (2.79×10^{-3} mmol) de AO libre en CDCl_3 , se le añadió 0.4 ml de la disolución salina acuosa 200 mM (80 mmol) del catión correspondiente (Li^+ , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} o Mg^{2+}) preparadas a partir de sus cloruros (LiCl , NaCl , KCl , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ o MgCl_2). La mezcla resultante se sometió a agitación vigorosa durante 5 min y centrifugación. Una vez separada la fase orgánica, se monitorizó por espectroscopía de RMN ^1H .

Este experimento fue repetido de igual forma aumentando la concentración de la disolución salina a 400 mM y 600 mM.

Experimento B. A 0.4 ml de disolución de AO libre 5.58×10^{-3} mM (2.23×10^{-3} mmol) en Metanol- d_4 , se le añadió en el mismo tubo de resonancia 0.1 ml de disolución 200 mM en D_2O (20 mmol) del catión correspondiente (Li^+ , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} o Mg^{2+}), y fueron monitorizadas por espectroscopía de RMN ^1H .

Experimento C. Repetimos el mismo procedimiento anterior, pero aumentando la cantidad de disolución salina añadida, de forma que a 0.4 ml de AO 5.58×10^{-3} mM (2.23×10^{-3} mmoles), se le añadió 0.2 ml, 200 mM (40 mmoles) del catión correspondiente. A continuación, cada una de estas disoluciones fueron concentradas a vacío y el residuo resultante disuelto en 0.4 ml de CDCl_3 y monitorizadas por espectroscopía de RMN ^1H .

Experimento D. 2.23×10^{-3} mmoles de AO libre y 20 mmoles de los cloruros correspondientes se disolvieron en 5 ml de la mezcla MeOH:H₂O (85:15), fueron pasadas a través de un Sep-pak C-18 (Water[®]) de fase reversa lavando seguidamente con 5 ml de

MeOH, el disolvente fue evaporado a vacío y el residuo resultante disuelto en CDCl_3 y monitorizado por espectroscopía de RMN ^1H .

B. ENSAYOS DE DESCOMPLEJACIÓN DEL ÁCIDO OKADAICO CON ÉTERES CORONA

A dos muestras de 1.5 mg cada una de AO complejado obtenido de fuente natural y disuelto en 0.4 ml de CDCl_3 en sendos tubos para espectroscopía de RMN, se le añade 50 μl de disoluciones en CDCl_3 (0.1 M) de los siguientes éteres corona: el 18/6 (1,4,7,10,13,16-hexaoxaciclooctadecano) y el 15/5 (1,4,7,10,13-pentaoxaciclopentadecano)

C. ENSAYOS FARMACOLÓGICOS

Se utilizaron segmentos longitudinales de músculo liso uterino de ratas hembras vírgenes de raza Sprague-Dawley, con un peso medio de 200 a 250 gramos aproximadamente, a las que, 24 horas antes de comenzar la experiencia se les administró una inyección intraperitoneal de benzoato de 17- β -oestradiol (dosis de 4 mg/Kg), con el fin de unificar las condiciones experimentales y tener la seguridad de que todas ellas se encuentran en período “estro”. Los segmentos fueron depositados en placas de Petri conteniendo 4 ml de la disolución fisiológica de Sund's con la siguiente composición (mM): NaCl 154; KCl 5.6; CaCl_2 0.54; MgCl_2 0.95; NaHCO_3 5.95 y glucosa 2.78 (pH 7.4). Las preparaciones se sometieron a una tensión inicial de 0.5 g manteniéndolas a 32° C y bajo burbujeo continuo con 95% O_2 y 5% CO_2 . Los cambios en la tensión isométrica fueron recogidos por un transductor isométrico GRASS[®] FT-03, conectado a un amplificador LETICA[®], y a un sistema de registro plano ABB GOERZ[®] SE 130.

Al comienzo de los experimentos y después de un período de equilibración de 45 minutos con lavados cada 15 minutos, los segmentos fueron repetidamente expuestos durante un corto período (3 min) a oxitocina (1 μM) hasta que las respuestas fueron reproducibles. La última respuesta a la oxitocina se utilizó como estándar interno para la contracción en todos los experimentos. Seguidamente, se permite que el tejido recupere la línea basal durante un período de 45 minutos antes de la adición del ácido okadaico. Sólo

fue aplicada una dosis de AO libre o del complejo obtenido de fuente natural a cada segmento, ya que éstos no se eliminan con lavados.

Para la obtención de un medio exento de calcio, sodio o potasio, se suprime la adición de la sal correspondiente en la solución nutritiva de Sund's. En el caso del calcio, se le añade un agente complejante de este catión que elimine la posible interferencia de calcio extracelular residual, para lo cual adicionamos ácido etilglicol bis (2-aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetracético (EGTA) 1mM. En el caso del sodio o potasio, es necesario compensar la presión osmótica. Para ello se adiciona colina principalmente, aunque en el medio exento de sodio también se puede añadir K⁺.

IV.3. EXPERIMENTOS BIOSINTÉTICOS

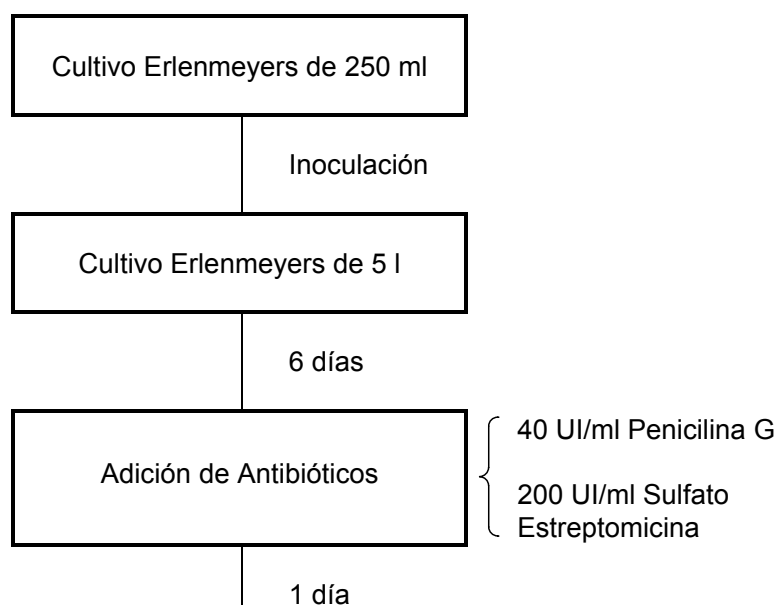
A. EXPERIMENTOS DE ADICIÓN DE [1,4- ¹³C₂] SUCCINATO SÓDICO Y DE [2- ¹³C₁] BUTIRATO SÓDICO

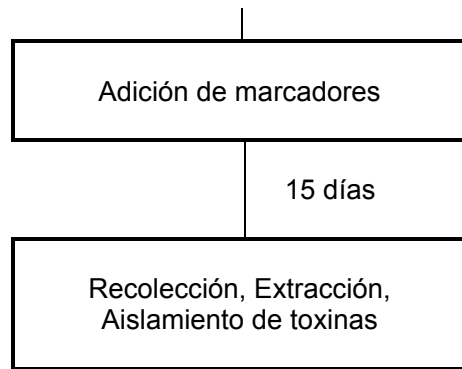
A.1. Preparación del medio de cultivo y adición de marcadores

Para la realización de los experimentos biosintéticos de adición tanto de [1,4- ¹³C₂] succinato sódico como de [2- ¹³C₁] butirato sódico a cultivos de *Prorocentrum lima*, se siguió el mismo protocolo.

El experimento se inició con la inoculación del medio de cultivo. Esta comienza con el trasvase de las células contenidas en dos erlenmeyers de 250 ml que contienen 150 ml de cultivo, a cada uno de los ocho erlenmeyers de 5 l, que contienen 3 l de medio donde se realizarían las experiencias de adición del marcador. Se llevaron a cabo en erlenmeyers, puesto que permite la correcta esterilización de los recipientes en autoclave y además toda la manipulación necesaria para realizar los experimentos podía hacerse en este estadio en campana de flujo laminar, manteniendo así el cultivo lo más inocuo posible. En cada trasvase todo el nuevo material que se utilizó fue convenientemente autoclavado, utilizando en la medida de lo posible material desechable, y el soporte del medio de cultivo (agua de mar “diluida” con un 5% de agua destilada) filtrado a través de un sistema de

filtros de 5, 1 y 0.22 μm (Cápsulas GELMAN[®], Ref. 12878) impulsado por una bomba peristáltica MASTERFLEX[®]. Las disoluciones de nutrientes que van a ser adicionadas fueron filtradas a través de un filtro COSTAR[®] (Ref. 8374), con membrana de nylon de 0.22 μm , almacenándolas en botellas de poliestireno de 0.5 l, también de la misma marca COSTAR[®] (Ref. 8393). Las botellas que contenían disoluciones de vitaminas fueron guardadas en refrigerador a 4° C, mientras que las que sólo contienen disoluciones salinas pueden mantenerse a temperatura ambiente. Para la preparación de 1 l de medio de cultivo debe añadirse 1 ml de cada una de estas disoluciones stock de nutrientes a cada litro de agua de mar diluida un 5% con agua destilada. El cultivo, se dejó crecer durante un período de tiempo de 6 días. Pasado éste se adicionaron los antibióticos Penicilina G (40 UI/ml) y Sulfato de Estreptomicina (200 UI/ml). Al día siguiente de la adición de los antibióticos, se añadieron los correspondientes marcadores. La concentración de ambos marcadores fue en un principio de 0.33 mM. Sin embargo, en el caso del succinato ocurrió que al adicionarlo a esta concentración, se observó la muerte generalizada del cultivo a los cuatro días. A la vista de este hecho se repitió el experimento disminuyendo la concentración de este marcador a la mitad 0,16 mM y aumentando el número de recipientes con medio a 12 erlenmeyers, y por tanto a 36 l de cultivo. Pasados 15 días se procedió a la recolección de las células, para realizar la extracción y el posterior aislamiento de las correspondientes toxinas marcadas (**Esquema 17**).

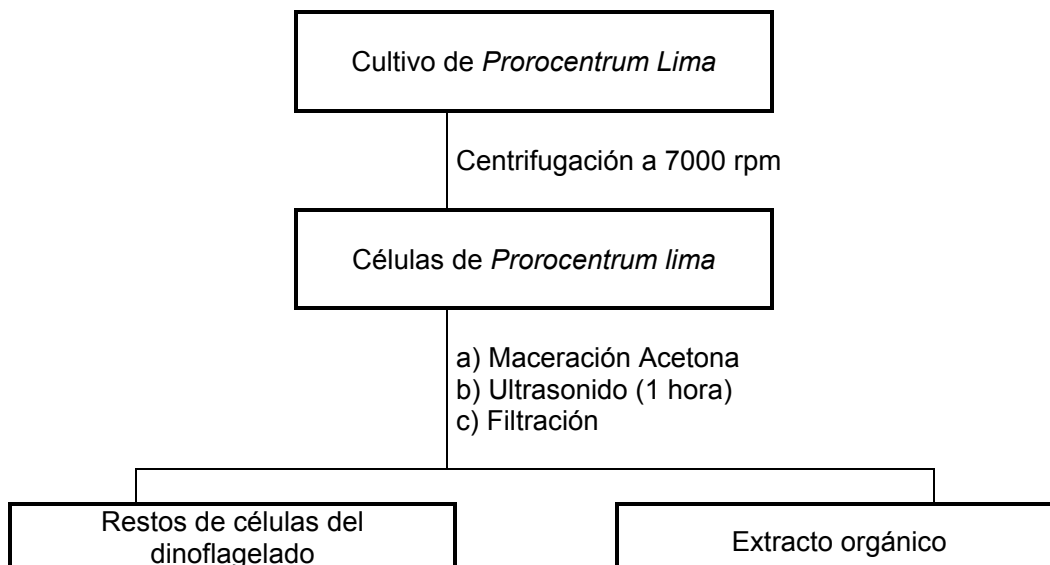




Esquema 17

A.2. Recolección y extracción

En ambos casos, cuando se procedió a la recolección, los fondos de los erlenmeyers fueron raspados con cuidado para levantar el dinoflagelado depositado en los mismos. Suspendidas las células, éstas se recolectaron por centrifugación a 7000 rpm. El sedimento, lo constituyó las células del dinoflagelado que fueron maceradas con acetona, al tiempo que para facilitar la rotura de la pared celular, se sometieron a ultrasonido durante 1 hora aproximadamente. Después de filtrar a través de placa de vidrio y proceder a la evaporación del disolvente se obtuvo un extracto de color verde oscuro (1-1.5 g). Este proceso se esquematiza de la forma siguiente (**Esquema 18**):



Esquema 18

A.3. Descripción general del aislamiento de las toxinas

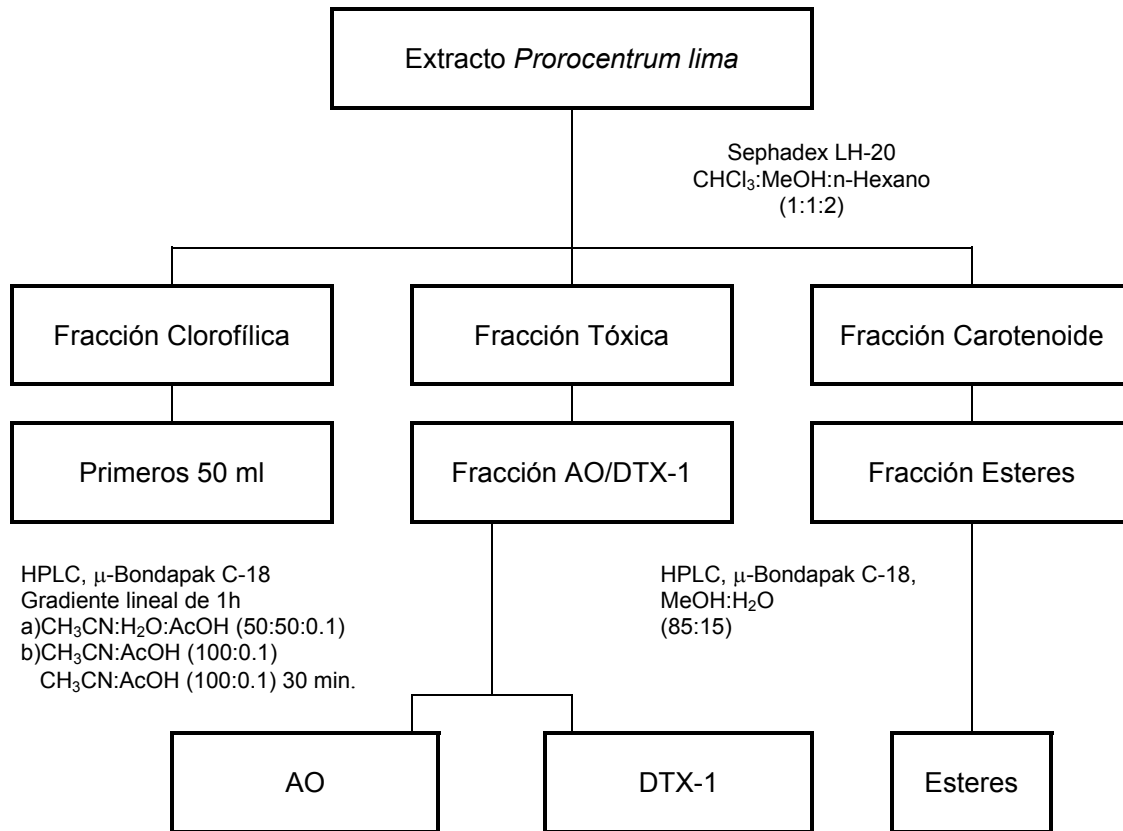
La ruta cromatográfica empleada durante el desarrollo de este trabajo comienza con una columna de Sephadex LH-20 de D.I. 7 cm x 60 cm de longitud, que se preparó dejando en maceración con MeOH toda la noche, 700 g de soporte. Luego se estabilizó la columna con el eluyente que se iba a utilizar en posteriores cromatografías: Cloroformo:Metanol:n-Hexano (1:1:2). Las dimensiones de esta columna permiten cromatografiar entre 1 y 4 g de extracto, de forma que las cantidades de extracto obtenidas durante los experimentos biosintéticos, que oscilan entre 1 y 1.5 g, eran unas cantidades óptimas para esta columna. La fracción tóxica que se obtuvo después de someter el extracto a esta columna contenía muy pocas cantidades de clorofilas, con lo que se pudo pasar directamente a la cromatografía en fase reversa. Por tanto, la fracción tóxica resultante de la primera cromatografía se vuelve a cromatografiar ahora en una columna Lobar[®] de fase reversa Lichroprep RP-18 que se eluyó con una mezcla MeOH:H₂O (85:15). Esta cromatografía permite separar ya los ésteres del AO de la mezcla AO/DTX-1, eluyendo en primer lugar la mezcla de estas dos toxinas y en segundo lugar los ésteres.

La purificación final del éster del AO se llevó a cabo en HPLC en una columna μ -Bondapak C-18 de 5 μ (D.I. 1.9 cm, longitud 15 cm), eluyendo con MeOH:H₂O (85:15) y con un flujo de 3 ml/min. Los tiempos de retención del éster son de 22 min.

La separación y purificación final del AO y DTX-1 se llevó a cabo también en HPLC con la misma columna μ -Bondapak C-18 de 5 μ , pero se empleó una cromatografía en gradiente lineal binario que utiliza a) Acetonitrilo:Agua:Acido acético (50:50:0.1) y b) Acetonitrilo:Acético (100:1). El gradiente lineal es de 1 hora y comienza con la mezcla (a) y se termina con la mezcla (b), que se mantiene durante 30 minutos adicionales. El flujo se mantuvo siempre en 2.5 ml/min. En estas condiciones de trabajo los tiempos de elución del AO están en torno a los 25-27 min y de la DTX-1 a los 38-39 min.

El seguimiento de todas las cromatografías se hizo por capa fina, eluyendo las placas con la mezcla Benceno:Acetona:Metanol: Acido acético 6N (150:80:19:1) en las que el AO y la DTX-1 presentan un R_f de 0.7 y los ésteres un R_f de 0.8.

En el **esquema 19** se resume la marcha cromatográfica descrita:



Esquema 19

B. ADICIÓN DE AMINOÁCIDOS A CULTIVOS DE *P. LIMA*

B.1. Descripción general del experimento de adición de aminoácidos

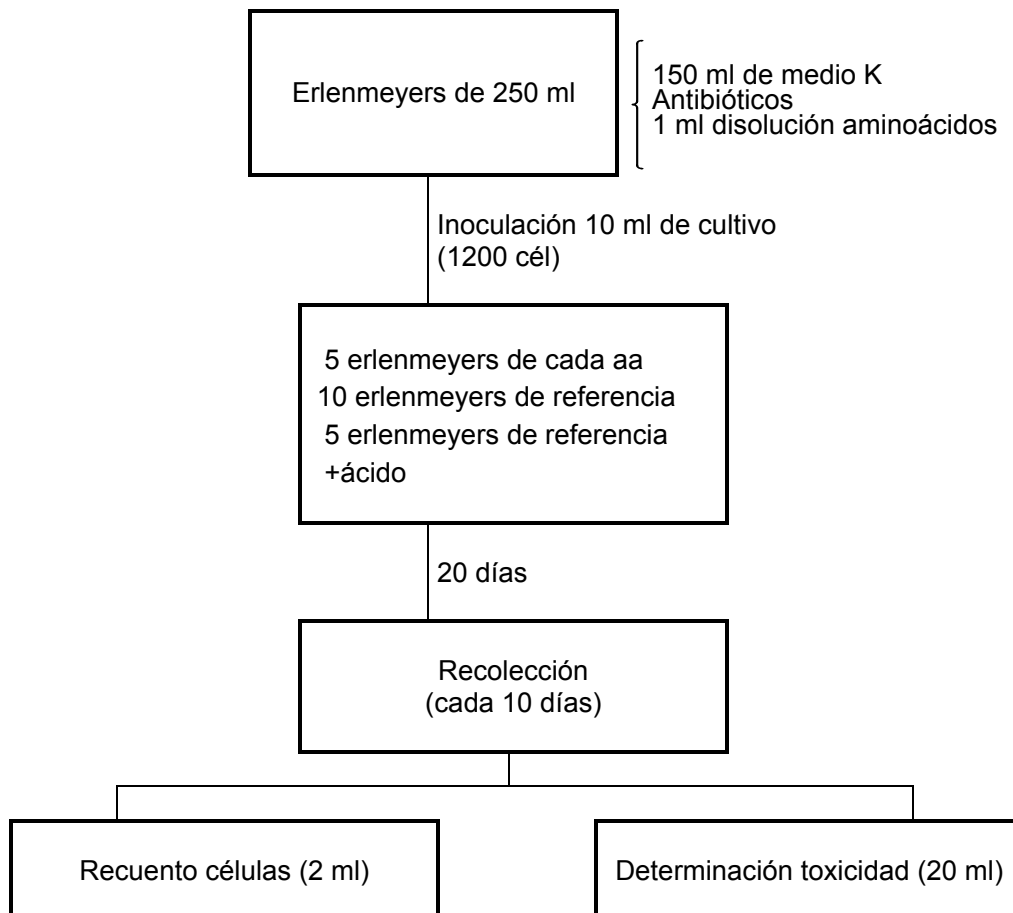
Los aminoácidos con los que se realizó el estudio fueron: aspartato, cisteína, valina, leucina, lisina, serina y treonina (todos de la serie L). Fueron añadidos a los cultivos en las mismas condiciones y con un protocolo similar al que habíamos empleado en los marcajes con acetato enriquecido en ^{13}C , empleando la cantidad suficiente de producto para alcanzar una concentración final de 0.67 mM.

Las soluciones con los aminoácidos a añadir fueron preparados de la forma siguiente:

a) Para valina, lisina, cisteína, serina y treonina se prepara una disolución en agua bidestilada de concentración tal que 1 ml de ella, al ser añadido a 150 ml de medio, rinda una concentración final de aminoácidos de 0.67 mM.

b) Para aspartato y leucina, se prepara una disolución de agua bidestilada, a la que se le añade 150 µl de HCl 5N, para conseguir la total disolución de la muestra. De igual forma 1 ml de ésta, añadida a 150 ml de medio debería conseguir una concentración final de aminoácido en el cultivo de 0.67 mM.

La realización del experimento se llevó a cabo como se resume en el siguiente **esquema 20**.



Esquema 20

Por lo tanto, cada experimento consistió en la inoculación de 10 ml de cultivo de *P. lima* (1200 células) en erlenmeyers de 250 ml que contenían 150 ml de medio Guillard K con antibióticos (40 UI de penicilina G y 200 UI de sulfato de estreptomina por ml de cultivo), y 1 ml de la disolución del aminoácido correspondiente. En todos los casos, las condiciones fueron estériles. Se empleó una batería de filtros (1 μm , 0.45 μm y 0.22 μm , anteriormente descrita) tanto para los medios de cultivo como para los antibióticos, así como, filtros de membrana de 13 mm de diámetro y de 0.22 μm para las disoluciones de los aminoácidos. La manipulación se realizó en campana de flujo laminar con todos los materiales autoclavados y en la medida de lo posible que fuesen estériles y desechables.

En estas condiciones se prepararon 5 erlenmeyers para cada aminoácido, 10 erlenmeyers de referencia con cultivos normales sin adición y 5 erlenmeyers de referencia a los que se les adicionó 150 μl de HCl 5N, para los casos en que los aminoácidos fueron disueltos en estas condiciones. El cultivo se dejó crecer 20 días y se procedió luego cada diez días a la toma de muestras y recolección de células.

B.2. Recuento de células

Para proceder al recuento de células se realiza la suspensión de las mismas en el medio de cultivo, tal y como se describe en el apartado de recolección. Se toma una alícuota de 2 ml a la que se le añade 50 μl de Lugol preparado de la forma siguiente. Deben disolverse 10 g de IK en 100 ml de agua, y esta disolución mezclarse con otra de 5 g de Iodo en 10 ml de Acido Acético.

Con las células debidamente teñidas y fijadas de esta forma se procede al recuento en el microscopio. Este se lleva a cabo de la forma habitual utilizando una cámara de Neubauer.

B.3. Derivatización con ADAM

El protocolo seguido fue el mismo para todas las muestras obtenidas al añadir a cultivos de cepas PL2 del dinoflagelado *Prorocentrum lima*, disoluciones de los distintos aminoácidos.

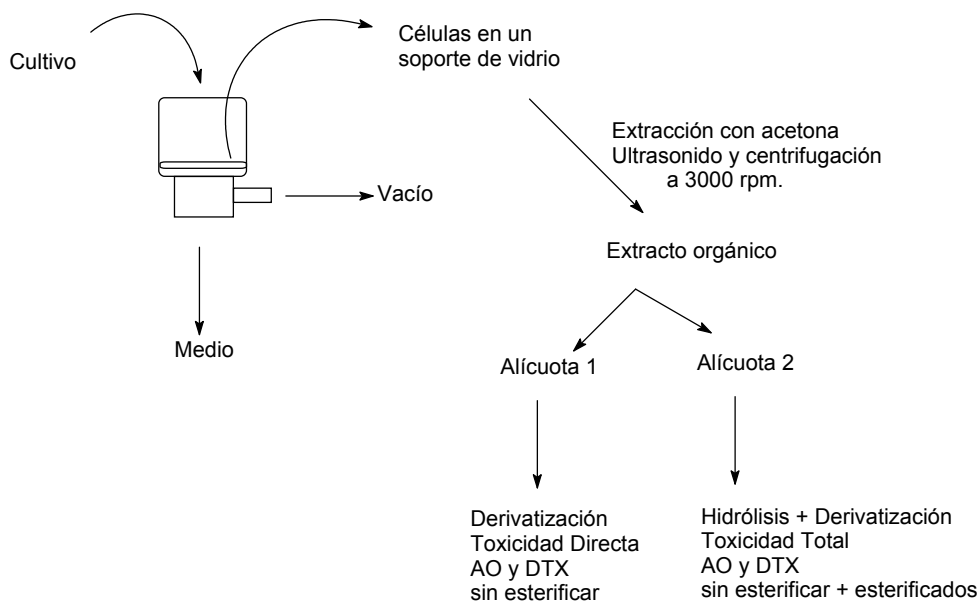
Para la obtención de la curva de calibrado se utilizó una disolución de $1\mu\text{g/ml}$ de AO (Suministrada por Boehringer Ref. 1355-554, con $25\mu\text{g}$) en metanol a temperatura ambiente.

1) Extracción

Se homogeneizaron los cultivos por agitación vigorosa y raspado del fondo de los erlenmeyers, pasándose 20 ml del cultivo por filtros de lana de vidrio (Whatman, glass microfibre filters Cat. No. 1822024). Los filtros fueron extraídos dos veces por maceración con volúmenes iguales de acetona ($2 \times 2\text{ ml}$), al tiempo que para facilitar la rotura de la pared celular, se sometieron a ultrasonido durante una hora aproximadamente en la primera extracción y treinta minutos en la segunda, centrifugando a continuación, a 3000 rpm durante 5 minutos cada vez. De esa disolución acetónica se separan dos alícuotas (**Esquema 21**).

La primera se somete al protocolo de derivarización de forma directa, y en ella se puede evaluar la cantidad de AO y DTXs libres, sin esterificar presentes. Se le añade 1 ml de agua y 4 ml de cloroformo, se agita durante 1 minuto y se centrifuga a 3000 rpm durante 5 minutos. Nos quedamos con la fase clorofórmica, y la fase acuosa-acetónica la extraemos de nuevo con cloroformo. Reunimos las fases clorofórmicas y se secan sobre Na_2SO_4 anhidro, teniendo ya listas la muestras para derivatizar.

A la segunda, se le realiza un proceso de hidrólisis para determinar por diferencia el contenido de ésteres en las muestras. Para la hidrólisis, esta alícuota, dependiendo del número de células, es llevada a sequedad bajo corriente de nitrógeno. Se le añade entonces 0.5 ml de una disolución 0.5 N de NaOH:MeOH (10:90) y se somete a agitación magnética durante 60 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, es evaporada nuevamente bajo nitrógeno y se acidula con 2 ml de HCl 0.125 N agitando durante un minuto aproximadamente sobre un agitador de tubos. Es extraída dos veces con cloroformo ($2 \times 2\text{ ml}$) y la fase orgánica es secada sobre Na_2SO_4 anhidro. Al igual que en el caso anterior, una vez concluido este proceso tenemos ya listas la muestras para derivatizar.



Esquema 21

2) Derivatización

Las derivatizaciones fueron realizadas basándonos en el método de Lee y colaboradores, usando una disolución metanólica aproximadamente al 0.2% de 9-antrildiazometano (ADAM), preparada a partir de 1.8 mg de ADAM disuelto en 1.2 ml de MeOH y unas gotas de acetona, agitación, filtrado a través de 0.45 μm (Millipore, SJHV004NS), almacenándola protegida de la luz.

El protocolo fue indistinto tanto para la muestra hidrolizada como para la normal y consiste en que una alícuota de la disolución clorofórmica, generalmente 0.5 ml una vez evaporado el disolvente mediante una corriente de nitrógeno, se le añaden 200 μl de la disolución del ADAM (0.2%), se agita durante 2 minutos, y se mantiene a 40° C durante una hora en oscuridad. El producto de reacción es llevada a sequedad bajo corriente de N_2 y sometido a un proceso de clarificación también similar al descrito por Lee y colaboradores.

3) Clarificación de las muestras derivatizadas (Clean-up)

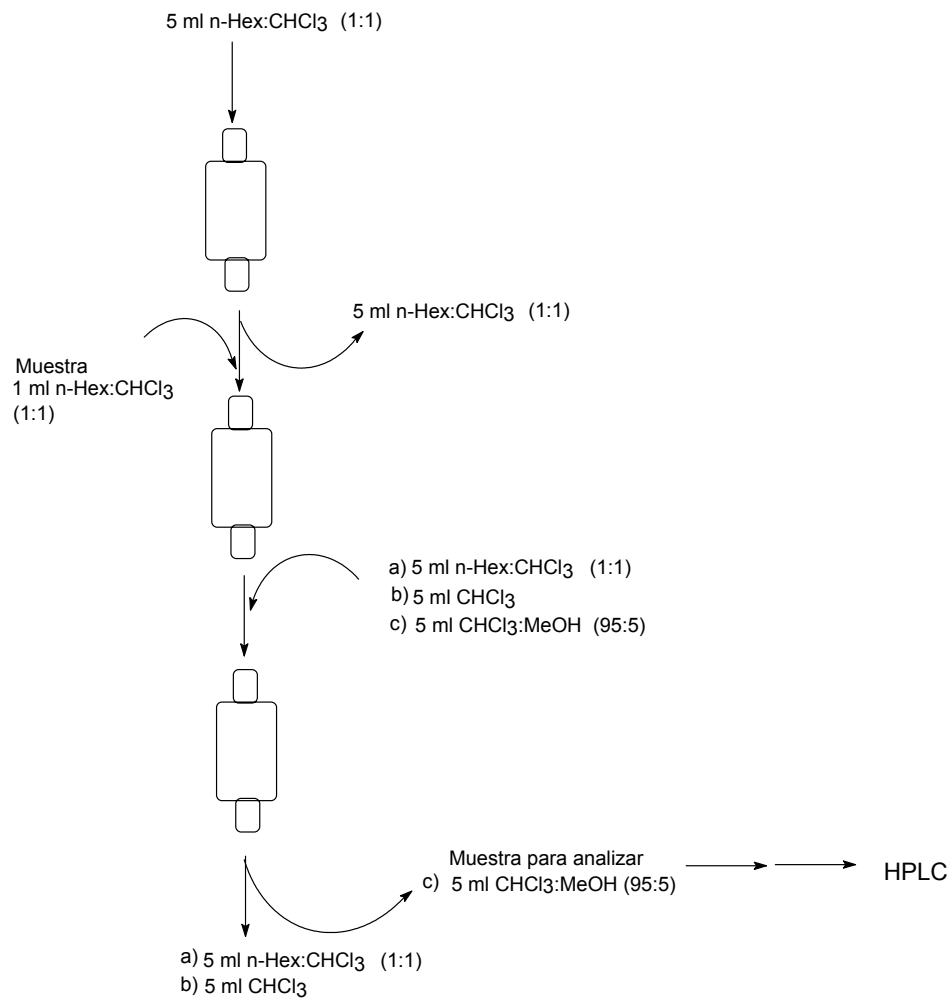
El residuo obtenido en el proceso anterior se disuelve en 1 ml de n-Hexano: CHCl_3 (1:1) y se transfiere a un Sep-pak de gel de sílice (Waters®, WAT051900), mediante el

siguiente proceso:

- 3.1.- Se hacen pasar 5 ml de n-Hexano:CHCl₃ (1:1).
- 3.2.- Se adiciona entonces, como ya se ha descrito, la muestra disuelta en 1 ml de n-Hexano:CHCl₃ (1:1).
- 3.3.- Una vez adicionada la muestra debe lavarse por primera vez con 5 ml de n-Hexano:CHCl₃ (1:1).
- 3.4.- Un segundo lavado se realiza con 5 ml de CHCl₃.
- 3.5.- Las muestras derivatizadas se eluyen con 5 ml de CHCl₃:Metanol (95:5).

La fracción final fue evaporada y redisuelta en 100 µl de Metanol para análisis en HPLC.

El proceso se resume en el **esquema 22**:



Esquema 22

4) Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

Los análisis fueron realizados en un Hewlett-Packard HP1046 A, utilizando una columna de fase reversa Superspher 100 RP-18 (D.I. 0,4 cm, longitud 25 cm). La elución fue llevada a cabo a 35° C usando un flujo de 1.1 ml/min con CH₃CN:H₂O (80:20).

En general se inyecta un volumen de 10 µl de muestra y se fija el detector de fluorescencia en unos valores de 365 nm para la excitación y 412 nm para la emisión.

CONCLUSIONES

1. Se estudia el alga roja *Laurencia viridis*, recolectada en Callao Salvaje (Adeje), de la cual se aíslan una serie de metabolitos nuevos en la literatura, dos diterpenos de la clase ciclofitano, los viridiales A y B **41-42**, y nueve triterpenos con estructuras derivadas del escualeno pertenecientes a la serie del tirsiferol **43**: isodehidrotirsiferol **56**, 16-hidroxidehidrotirsiferol **57**, tirsenol A **58**, tirsenol B **59**, 10-epidehidrotirsiferol **60** y 10-epi-15,16-dehidrotirsiferol **61**; y a la serie del venustatriol **50**: dehidrovenustatriol **61**, 15,16-dehidrovenustatriol **63** y acetato de predehidrovenustatriol **64**. Sus estructuras fueron determinadas a través de la interpretación de sus datos espectroscópicos.
2. A la luz de la identificación de los nuevos derivados del escualeno se pone en cuestión la propuesta biogénica clásica para la formación de estos poliéteres triterpénicos que pasa por la ciclación de un intermedio común, un tetraepoxiescualeno, inducida por la formación de un ion bromonio entre los carbonos C-2/C-3. El aislamiento del acetato de predehidrovenustatriol **64** como un derivado que presenta el anillo A abierto y un doble enlace terminal en C-2/C-3 parece indicar que no es necesaria la inducción del ion bromonio para que se produzca la ciclación, y los cambios de estereoquímica mostrados en el C-10 en los isómeros del 10-epidehidrotirsiferol **60**, así como la presencia en los tirsenoles A y B **58-59** de un agrupamiento enol-éter entre las posiciones C-13/C-14, apoyan la posibilidad de que la ciclación no se produzca a través de un proceso concertado.
3. Se lleva a cabo la evaluación de la actividad citotóxica de todos los nuevos metabolitos aislados del alga *Laurencia viridis*, observándose que los derivados de escualeno aislados presentan potentes y altamente selectivas actividades mientras que las de los viridiales, aunque presentan valores sensiblemente más bajos, son también significativas.
4. Pequeños cambios químicos dentro de la estructura de la molécula de los triterpenos aislados, condicionan tremendamente su potencia citotóxica. Asimismo, se establece a través del análisis de relaciones estructura-actividad y estudios conformacionales, que el plegamiento y la orientación que adopta la cadena carbonada entre los carbonos C-

14/C-19 condiciona en gran medida la potencia de la actividad antileucémica de estos metabolitos.

5. Los derivados del escualeno presentan nula actividad inhibitoria enzimática *in vitro* mientras que el viridiol A **41** muestra inhibición frente a la síntesis de RNA, a concentraciones de 3 µg/ml frente a cultivos de células P-388 de leucemia linfocítica de ratón.
6. Ninguno de los metabolitos ensayados del alga *L. viridis* presenta una manifiesta actividad antiviral frente al virus HIV (virus que produce inmunodeficiencia humana).
7. El análisis de los resultados tanto de los estudios de complejación como de los farmacológicos, confirman que el complejo del ácido okadaico que obtenemos de nuestros cultivos de *Prorocentrum lima*, es un complejo formado por ácido okadaico y un catión potasio. Asimismo, reflejan que la presencia de este catión juega un importante papel en la actividad de este poliéter aunque todavía se desconoce el mecanismo a través del que actúa.
8. Los resultados de los experimentos biosintéticos de adición de [1,4-¹³C₂] succinato sódico y de [2-¹³C₁] butirato sódico ponen de manifiesto que la biogénesis del esqueleto carbonado del ácido okadaico debe producirse por el ensamblamiento de precursores cetogénicos de origen diverso. Estos experimentos confirman la implicación de rutas metabólicas en la que los microorganismos pueden incorporar fragmentos de 4 carbonos. Esto refuerza la hipótesis sobre la utilización por parte de los dinoflagelados de diversos aminoácidos como fuente de ácidos carboxílicos, hipótesis que se confirmó con el hecho experimental de que la suplementación del medio de cultivo con determinados aminoácidos produce un aumento en la concentración de toxinas.