

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

**«Metabolitos secundarios de origen marino.
Estudios biosintéticos y aplicaciones de rmn»**

**Autor: Antonio Manuel Hernández Daranas
Director: Dr. D. Manuel Norte Martín y
Dr. D. José Javier Fernández Castro**

Departamento de Química Orgánica

D. MANUEL NORTE MARTIN, CATEDRATICO DE QUIMICA ORGANICA, Y D. JOSE JAVIER FERNANDEZ CASTRO, PROFESOR TITULAR DE QUIMICA ORGANICA DE LA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

CERTIFICAN: Que el presente trabajo titulado "METABOLITOS SECUNDARIOS DE ORIGEN MARINO. ESTUDIOS BIOSINTETICOS Y APLICACIONES DE RMN" ha sido realizado bajo nuestra dirección en los laboratorios del Instituto Universitario de Bio-Orgánica, "Antonio González", durante los cursos académicos de 1994-1995, 1995-1996, 1996-1997, 1997-1998, 1998-1999, constituyendo la Memoria que presenta **D. Antonio Manuel Hernández Daranas** para optar al grado de Doctor en Farmacia.

AUTORIZAN: A la lectura de esta Memoria por considerar que reúne los requisitos de calidad necesarios para la presentación de la misma.

La Laguna, 12 de Mayo de 1999.

Fdo. Manuel Norte Martín

Fdo. José Javier Fernández Castro

Para Raquel.

Por su paciencia,

por su apoyo,

por su comprensión,

por ser quien soy,

en definitiva, por su amor infinito.

Los trabajos que constituyen la presente Memoria fueron realizados en el Instituto Universitario de Bio-Orgánica "Antonio González", bajo la dirección de los Dres. Manuel Norte Martín y José J. Fernández Castro a quienes expreso mi más sincero y profundo agradecimiento por haberme descubierto este mundo de la química y por haberme dado la libertad de equivocarme y aprender.

Redactar la Memoria de cinco años de trabajo es un proceso laborioso y largo, pero no se puede comparar con la dificultad de intentar condensar en unas pocas líneas los agradecimientos acumulados en ese tiempo. El trabajo recogido en esta Tesis ha sido realizado en la Unidad de Marinos del Instituto Universitario de Bio-orgánica de la Universidad de La Laguna. En este lugar he tenido la oportunidad de conocer a mucha gente de gran calidad científica y humana, cuya ayuda, apoyo y estímulo han hecho posible la realización del trabajo aquí recogido. Para todos ellos, por haber hecho que ésta fuera no sólo una experiencia científica formativa, sino vital y humana, mi más sincero agradecimiento.

Finalmente, quiero agradecer particularmente al Dr. Jose Adrian Gavin Sazatornil su INESTIMABLE y desinteresada ayuda, algo que en estos días escasea bastante, sin la cual esta tesis hubiera sido bien diferente. También quiero agradecerle el que haya compartido generosamente sus conocimientos conmigo.

INDICE

Capítulo 1

ESTUDIO DEL ZOANTHUS SP.

I.1.- INTRODUCCION

I.1a.- Metabolitos secundarios del género zoanthus. Antecedentes 2

I.1b.- Actividad farmacológica 7

I.1c.-biogénesis 9

I.2.- NUEVOS ALCALOIDES AISLADOS DE ZOANTHUS SP.

I.2a.- Aislamiento 11

I.2b.- Estudio de elucidación estructural 14

I.2b.1.- Norzoantamina 14

I.2b.2.- 3-hidroxnorzoantamina 27

I.2b.3.- 30-hidroxinorzoantamina 30

I.2b.4.- 11-hidroxinorzoantamina 36

I.2b.5.- 11-hidroxizoantamina 40

I.2b.6.- Zoantenol 43

I.2b.7.- Oxizoantamina y epioxizoantamina 48

I.2b.8.- Equilibrios de intercambio en la posición c-11 55

I.2c.- Experimentos biosintéticos realizados sobre zoanthus sp. 59

I.2d.- Estudio farmacológico 60

I.2c.1.- Evaluación de la actividad citotóxica 61

I.2c.2.- Actividad inhibitoria enzimatica in vitro 62

I.3.- PARTE EXPERIMENTAL

I.3a.- Técnicas experimentales generales 64

I.3b.- Recolección y extracción del celentereo zoanthus sp. 66

I.3c.- Marcha cromatográfica del extracto 67

I.3d.- Evaluación de la actividad citotóxica 79

I.3d.1.- Cultivos de células 79

I.3d.2.- Ensayos de citotoxicidad 79

Capítulo 2

ESTUDIOS CON MICROALGAS

II.1.- INTRODUCCION

<i>II. 1a. - Caracteres generales de las microalgas</i>	81
<i>II. 1b. - Microalgas tóxicas</i>	81
<i>II. 1b. 1. - Síndrome paralítico</i>	86
<i>II. 1b. 2. - Síndrome ciguatérico</i>	88
<i>II. 1b. 3. - Síndrome diarréico</i>	92
<i>II. 1b. 4. - Síndrome neurotóxico</i>	94
<i>II. 1b. 5. - Síndrome amnésico</i>	96
<i>II. 1b. 6. - Envenenamiento por cianobacterias</i>	98
<i>II. 1b. 7. - Miscelánea</i>	99
<i>II. 1c. - Metabolitos de dinoflagelados no tóxicos</i>	103
II. 2.- ESTUDIO DEL DINOFLAGELADO AMPHIDINIUM SP	
<i>II. -2a. - Condiciones idóneas para el cultivo del dinoflagelado</i>	106
<i>II. -2b. - Recolección, extracción y cromatografía del extracto</i>	111
<i>II. -2c. - Glicolípidos aislados del dinoflagelado amphidinium sp.</i>	113
<i>II. 2c. 1. - Heterosigma-glicolípido III</i>	114
<i>II. 2c. 2. - Hemolisina-1</i>	121
<i>II. 2c. 3. - Heterosigma-glicolípido iv</i>	125
<i>II. 2c. 4. - Monogalactosiltriacilglicerol</i>	130
II. 3 ESTUDIOS BIOSINTETICOS DEL ACIDO OKADAICO	
<i>II. 3a. - Antecedentes</i>	137
<i>II. 3b. - Experimento de adición de [2-13 cd3] acetato sódico</i>	147
<i>II. 3b. 1. - Optimización del experimento { 1 h-2 h} 13 c rmn</i>	150
<i>II. 3b. 2. - Descripción del experimento biosintético</i>	152
<i>II. 3b. 3. - Análisis de resultados del experimento biosintético con el ao ...</i>	153
<i>II. 3b. 4. - Discusión de los resultados</i>	164
II. 4- ESTUDIOS ESTRUCTURALES DEL ACIDO OKADAICO	
<i>II. 4a. - Introducción</i>	168
<i>II. 4b. - Estudios sobre la complejación del ácido okadaico</i>	171
<i>II. 4b. 1. - Antecedentes</i>	171
<i>II. 4b. 2. - Noesy y roesy del complejo del ácido okadaico</i>	173
<i>II. 4c. - Estudios de difusión mediante gradientes de campo magnético..</i>	179
<i>II. 4c. 1. - Secuencias de rmn utilizadas</i>	181
<i>II. 4c. 2. - Fenómenos de convección</i>	182
<i>II. 4c. 3. - Medida de los coeficientes de difusión</i>	184
<i>II. 4c. 4. - Determinación del estado de asociación</i>	185
<i>II. 4c. 5. - Confirmación de la estructura dimérica mediante espectrometría de</i>	

<i>masas</i>	186
II.4c.6.- Medida de los coeficientes de difusión en medio acuoso	187
II.4c.6.- Aproximación a la estructura del dímero	191
II.4d.- Estudios de rmn en presencia de análogos de membrana	192
II.5.- PARTE EXPERIMENTAL	
II.5a.- Técnicas experimentales generales	196
II.5b.- Estudio del dinoflagelado <i>amphidinium</i> sp.	199
II.5b.1.- Condiciones de cultivo	199
II.5b.2.- Recuento de células	203
II.5b.3.- Recolección y extracción de las células	203
II.5b.4.- Marcha cromatográfica del extracto	204
II.5b.5.- Transformaciones químicas	206
II.5c.- Estudio del dinoflagelado <i>prorocentrum</i> lima	212
II.5c.1.- Cultivo de <i>prorocentrum</i> lima	212
II.5c.1.1.- Condiciones de cultivo.....	212
II.5c.1.2.- Recolección de las células.....	216
II.5c.1.3.- Método de separación y purificación	217
II.5c.2.- Experimentos biosintéticos	219
II.5c.2.1.- Adición de precursores enriquecidos en isótopos estables	219
II.5c.2.2.- Análisis de los resultados mediante rmn	220
II.5c.2.3.- Medida del enriquecimiento isotópico en el ao.....	221
II.5c.2.4.- Precursores enriquecidos en ¹³ c	222
II.5c.3.- Estudios de difusión	224
II.5c.3.1.- Calibración de la fuerza de los gradientes	224
II.5c.3.2.- Adquisición de los datos	224
II.5c.3.3.- Procesado de los datos	225
II.5c.3.4.- Valoración del ácido okadaico con dpc en d ₂ o	227

Capítulo 1

I.1.- INTRODUCCIÓN

La mayor ocupación de los laboratorios químicos dedicados al estudio de productos de origen marino en la presente década ha sido la investigación del potencial farmacéutico de los mismos. En el caso particular de aquellos organismos sésiles, o con cubiertas y caparazones blandos que viven en arrecifes y distintos ecosistemas marinos sometidos a altos niveles de competitividad, se observa que producen una amplia variedad de compuestos bioactivos con estructuras únicas.



Figura 1.1.- Colonia de *Zoanthus sp.* (Foto A. Brito)

Un ejemplo de este tipo son los celentéreos del género *Zoanthus* (**Figura 1.1**). Estos se encuentran clasificados dentro de la clase *Antozoos*, subclase *Zoantarios*, son animales con simetría radial, coloniales, sedentarios y desprovistos de esqueleto que viven en aguas someras y cálidas. Poseen un cuerpo cilíndrico, en forma de saco estrecho y alargado que se ensancha ligeramente en la base donde se fija sobre las rocas o conchas. En la parte superior, en forma de disco se encuentra un orificio, la

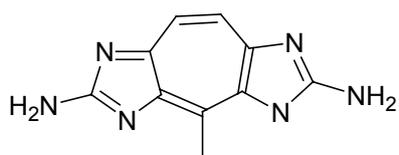
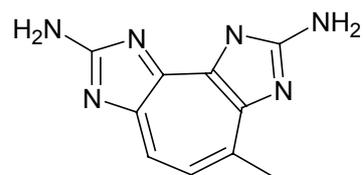
boca, rodeado por tentáculos. En la morfología del animal distinguimos una zona celular en contacto con el exterior denominada ectodermo, formada por células regulares en algunas de las cuales se distinguen en su base fibras musculares, y células nerviosas unidas entre sí por un retículo nervioso que se extiende por una capa gelatinosa central, más o menos delgada, denominada mesoglea. La parte interior del animal, o endodermo está formada por células de gran tamaño que constituyen el epitelio digestivo. Cuando se siente amenazado, puede retraerse considerablemente gracias al desarrollo de su musculatura, introduciendo los tentáculos en el interior del cuerpo o cavidad digestiva, manteniendo cerrado el orificio bucal por acción de un músculo circular muy potente. Así cuando en extensión total mide entre 1 y 2 cm, en estado de máxima contracción se reduce a una pequeña bola de 2 a 3 mm de diámetro.

I.1A.- METABOLITOS SECUNDARIOS DEL GENERO *ZOANTHUS*. ANTECEDENTES

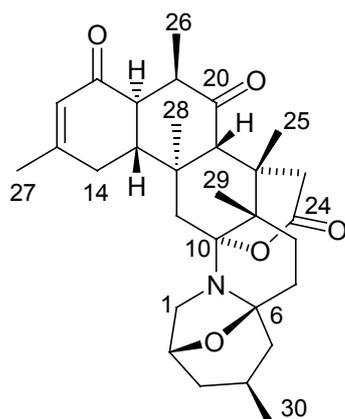
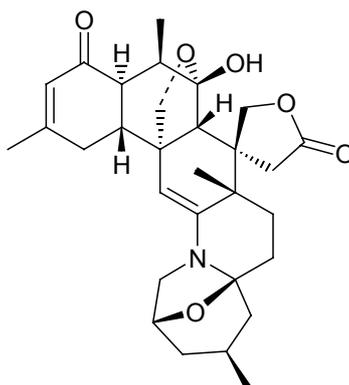
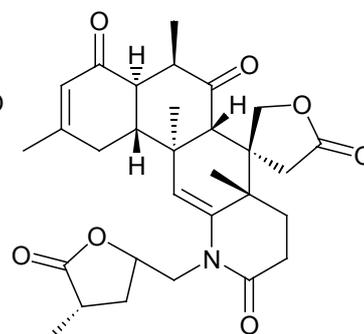
Los metabolitos secundarios aislados a partir de *Zoanthus* pueden dividirse en dos grandes grupos: el primero está constituido por metabolitos con un esqueleto cicloheptandiimidazol que a su vez se puede subdividir en derivados del tipo 2,6-diamino-4-metil-1H-ciclohepta[1,2-d:4,5-d']diimidazol (1)¹ y derivados del 2,8-diamino-4-metil-1H-ciclohepta[1,2-d:3,4-d']diimidazol (2).² El segundo grupo, que trataremos con mayor profundidad, incluye una familia de alcaloides con un esqueleto carbonado característico de esta especie que se consideran derivados de la zoantamina (3).

¹ Cariello, L. et al. *Experientia* **1974**, 30, 849.

² Cariello, L. et al. *Tetrahedron* **1974**, 30, 4191.

**1****2**

La zoantamina (**3**), descrita en 1984,³ fue el primer representante de la que sería una nueva clase de alcaloides. Su estructura fue determinada mediante un análisis de difracción de rayos X, revelando que no guardaba relación con ninguna estructura conocida hasta el momento. Inmediatamente después del aislamiento de la zoantamina, fueron descritos otros dos ejemplos de estructuras relacionadas, la zoantenamida (**4**) y la zoantamida (**5**),⁴ también aisladas a partir de una colonia de zoantidos recolectados en las costas de la India.

**Zoantamina (3)****Zoantenamida (4)****Zoantamida (5)**

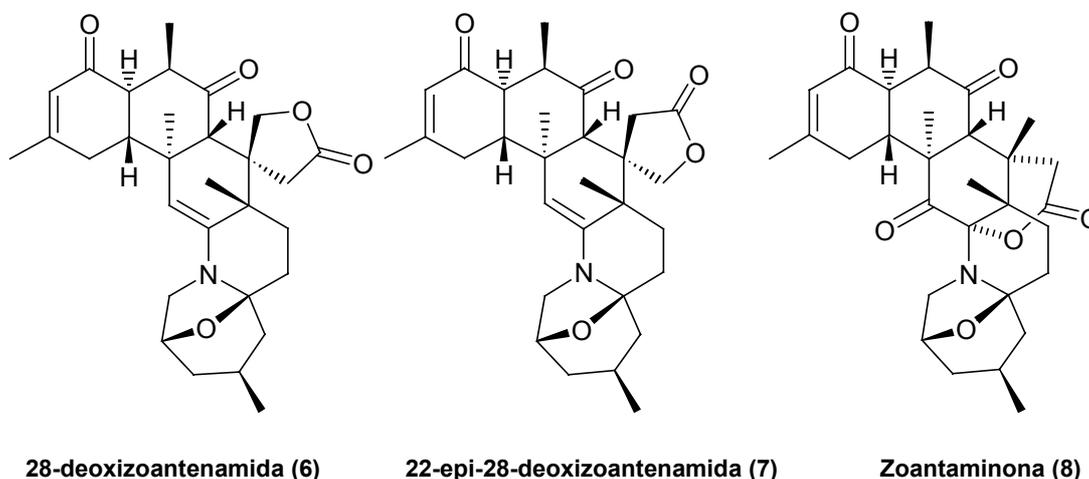
Pasaron algunos años hasta que fueron publicados otros tres metabolitos con estructuras similares, la 28-deoxizoantenamida (**6**) y la 22-epi-28-deoxizoantenamida (**7**), epímeros sobre el carbono C-22 donde se localiza la lactona.⁵ También fue

³ Rao, C.B.; Anjaneyula, A.S.R.; Sarma, N.S.; Venkateswarlu, Y.; Rosser, R.M.; Faulkner, D.J.; Chen, M.H.M.; Clardy, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 7983.

⁴ Rao, C.B.; Anjaneyula, A.S.R.; Sarma, N.S.; Venkateswarlu, Y.; Rosser, R.M.; Faulkner, D.J.; Chen, M.H.M.; Clardy, J. *J. Org. Chem.* **1985**, 50, 3757.

⁵ Rao, C.B.; Rao, D.V.; Raju, V.S.N.; Sullivan, B.W.; Faulkner, D.J. *Heterocycles* **1989**, 28, 103.

descrita la existencia de la zoantaminona (**8**),⁶ donde el carbono C-11 se encuentra oxidado como grupo carbonilo.

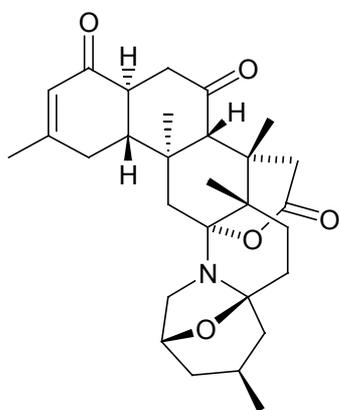


Recientemente, otros metabolitos con esqueletos relacionados fueron aislados a partir de especímenes de este género recogidos en costas Japonesas. En este caso, la norzoantamina (**9**) fue descrita como el metabolito mayoritario, inaugurando una nueva serie, ya que a diferencia de todos los alcaloides anteriormente descritos presenta un esqueleto con 29 átomos de carbono, carente del metilo C-26.⁷ A esta serie pertenecen también otros dos ejemplos como son la norzoantaminona (**10**), que resulta ser el derivado 26-nor de la zoantaminona (**8**) y la epinorzoantamina (**11**), donde el sistema β enónico localizado entre C-15-C-17 se modifica a un doble enlace exocíclico C-15-C-27 y un grupo hidroxilo en posición β en C-17. También fueron aislados dos nuevos ejemplos de la serie de la zoantamina, la oxizoantamina (**12**), donde el Me-26 se encuentra oxidado con un grupo hidroxilo, y la ciclozoantamina (**13**) en la que de nuevo se ve alterado el sistema β enónico produciéndose una ciclación

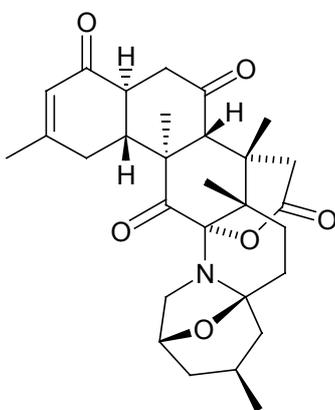
⁶ Atta-ur-Rahman, Alvi, K.A.; Abbas, S.A.; Choudhary, M.I.; Clardy, J. *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 6825.

⁷ Fukuzawa, S.; Hayashi, Y.; Uemura, D.; Nagastu, A.; Yamada, K.; Ijyuin, Y. *Heterocycl. Commun.* **1995**, 1, 207.

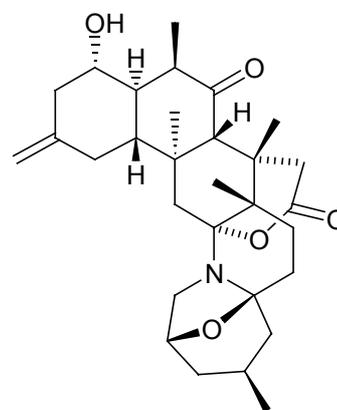
entre los carbonos C-16 - C-18, y de igual forma que en el caso anterior, uno de los metilos el Me-17, aparece oxidado a \blacksquare -CH₂-OH.



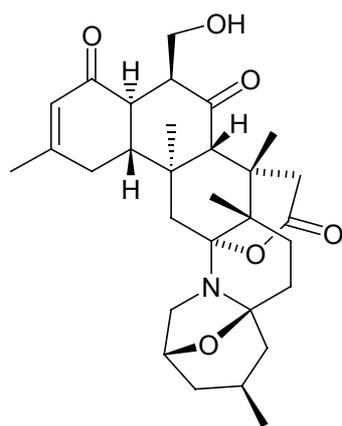
Norzoantamina (9)



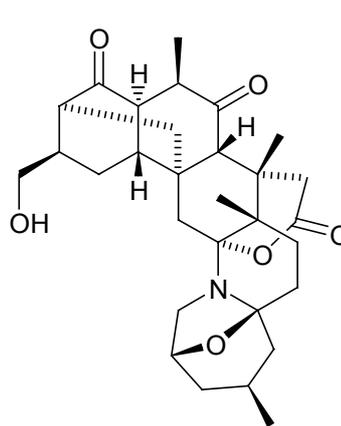
Norzoantaminona (10)



Epinorzoantamina (11)



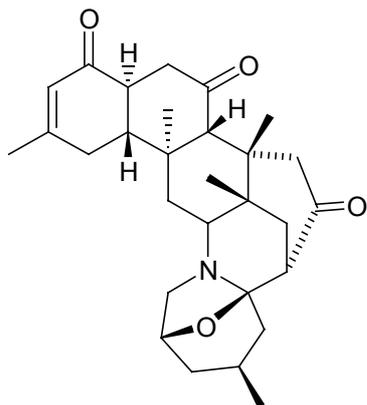
Oxizoantamina (12)



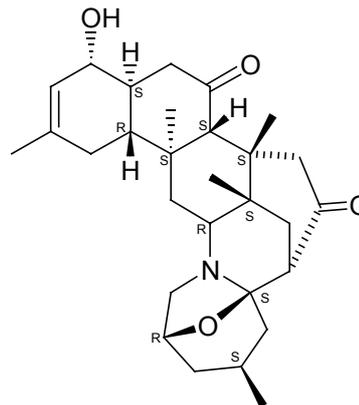
Ciclozoantamina (13)

Aunque la configuración relativa de la zoantamina (3) fue establecida mediante estudios de difracción de rayos X, la configuración absoluta de este grupo de sustancias permanecía, hasta fechas muy recientes, sin establecer. Con este fin, la norzoantamina (9) fue reducida con NaBH₄ para dar dos derivados, la deoxinorzoantamina (14) y la deoxidihidronorzoantamina (15).⁸ A continuación, la deoxidihidronorzoantamina (15) se trató con el cloruro de (-) y (+) α -metoxi- α -

(trifluorometil)fenilacetilo (MTPACI) para dar los esteres, S y R, MTPA correspondientes. Después de estudiar las diferencias en los desplazamientos químicos producidos, se concluyó que la configuración absoluta de la norzoantamina (**9**) es 2R, 4S, 6S, 9S, 10R, 12S, 13R, 18S, 21S y 22S.



Deoxinorzoantamina (**14**)

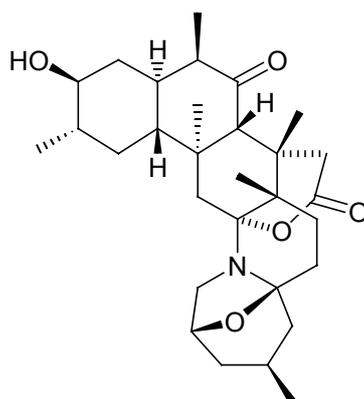


Deoxidihidronorzoantamina (**15**)

Recientemente ha sido descrito el aislamiento de un alcaloide que comparte todas las características estructurales de este grupo, la zooxantelamina (**16**) con la particularidad de haber sido aislado a partir de cultivos de un dinoflagelado, *Symbiodinium sp.*⁹ La semejanza que presenta este último alcaloide con los metabolitos aislados a partir de *Zoanthus sp.* incluyendo su configuración absoluta, sugiere que los alcaloides de la familia de la zoantamina (**3**) podrían tener un origen simbiótico o partir de la dieta de los zoántidos.

⁸ Uemura, D.; Ijyuin, Y.; Tuji, T.; Yamaguchi, K.; Fujitani, Y.; Hayashi, K.; Kuramoto, M. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 5683.

⁹ Nakamura, H.; Kawase, Y.; Maruyama, K.; Murai, A. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1998**, 71, 781.



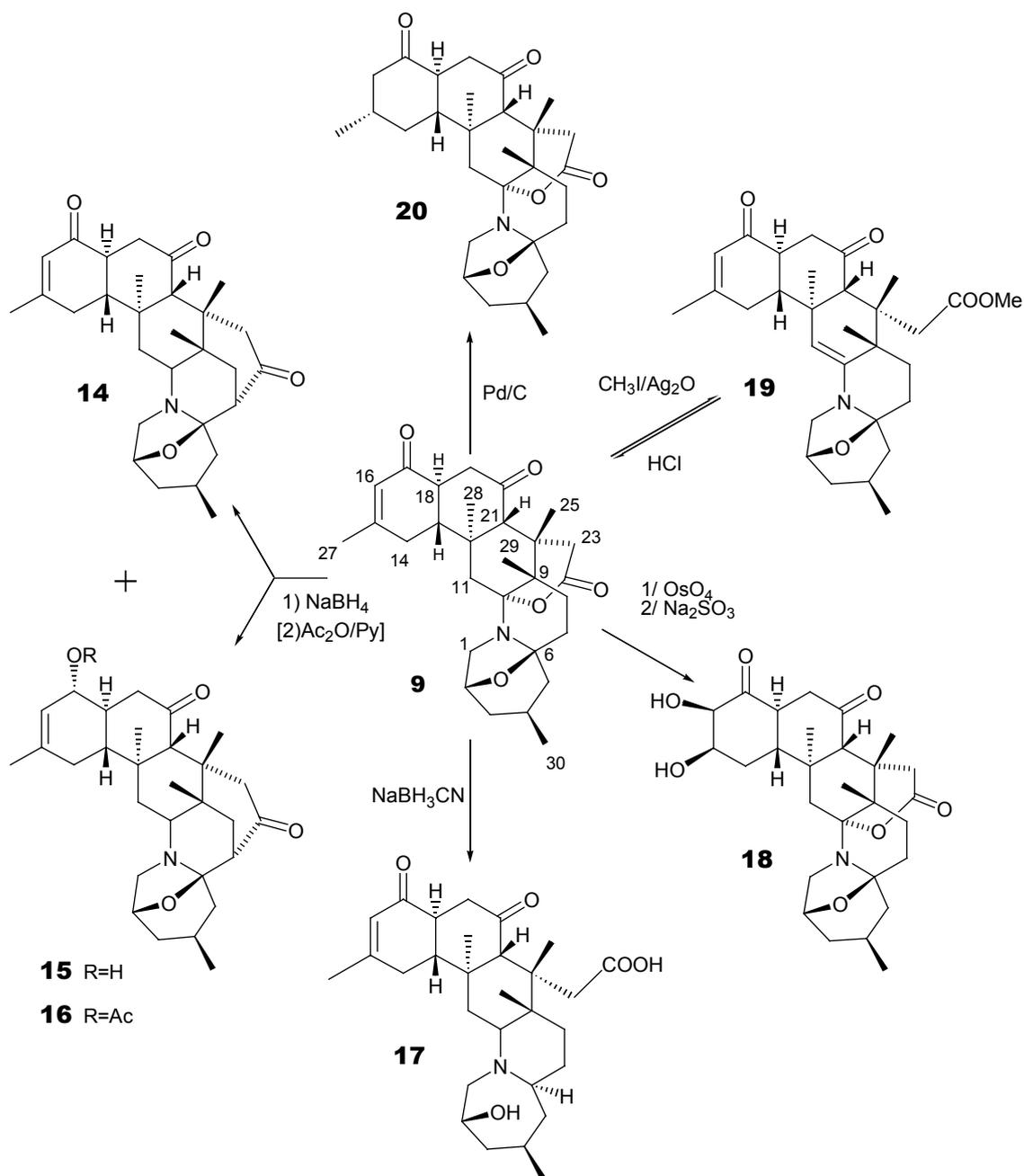
Zoonantelamina (16)

I. 1B.- ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA

Sobre este grupo de moléculas se han realizado diferentes ensayos de bioactividad. Así se encuentra descrito que la norzoantamina (**9**), la oxizoantamina (**12**), la norzoantaminona (**10**), la ciclozoantamina (**13**) y la epinorzoantamina (**11**) inhiben el crecimiento de líneas de células de leucemia linfocítica de ratón P-388, mostrando una IC_{50} de 24, 7.0, 1.0, 24 y 2.6 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente.⁷ También se ha comprobado que estas sustancias inhiben la inflamación inducida por los ésteres de forbol.⁵

La norzoantamina (**9**), cabeza de serie de estos metabolitos, posee la actividad farmacológica más interesante, que es su capacidad para inhibir la producción de la Interleuquina-6 (IL-6).¹⁰ Esta última es conocida como un inductor de la formación de osteoclastos, por lo que la supresión de la producción de esta interleuquina puede prevenir la osteoporosis. De hecho, la norzoantamina (**9**) y su clorhidrato inhiben la producción de IL-6 con valores de IC_{50} de 13 y 4.7 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Efectivamente, el clorhidrato de norzoantamina, inhibe la disminución del peso del

fémur de ratas a las que se les ha practicado una ovariectomía sin generar un incremento paralelo en el peso del útero, lo que sugiere un mecanismo de acción alternativo al de los estrógenos.



Esquema 1.1.- Modificaciones moleculares realizadas sobre la norzoantamina (9)

¹⁰ Kuramoto, M.; Hayashi, K.; Yamaguchi, K.; Yada, M.; Tsuji, T.; Uemura, D. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1998**, 71, 771.

Se han realizado algunos estudios para comprender mejor la relación estructura-actividad de estos compuestos. Así, la norzoantamina (**9**) ha sido sometida a diferentes transformaciones que se resumen en el **esquema 1.1**, generando una serie de derivados sobre los que posteriormente se ensayó su bioactividad (**Tabla 1.1**).

Muestra	IC₅₀ (µg/mL)
Norzoantamina	13
Clorhidrato de norzoantamina	4.7
14	25
15	30
16	23
17	42
18	35
19	>100
20	45

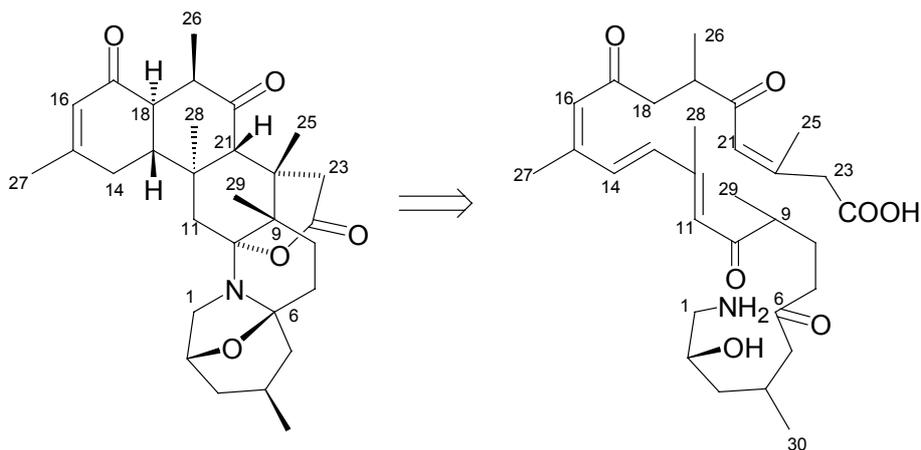
Tabla 1.1.- Valores de IC₅₀ de los derivados semisintéticos de la norzoantamina (9)

Como puede observarse, el efecto inhibitorio de la norzoantamina (**9**) se reduce en todas las transformaciones. En base a estos datos, Kuramoto y col. resaltan la importancia de la presencia simultánea del doble enlace C-15 – C-16 y de la lactona en C-24 para aumentar la bioactividad.¹⁰

I. 1C.- BIOGÉNESIS

Aunque las zoantaminas fueron consideradas en un principio de origen terpénico teniendo en cuenta sus estructuras, su ruta biogenética permanece todavía sin esclarecer.^{1,2}

Recientemente Nakamura y col.⁸ han especulado con la posibilidad de que podrían derivar biogénicamente a partir de la cadena de un policétido (**Esquema 1.2**) que se iniciaría en una unidad de glicina, como ocurre en otros muchos metabolitos de origen marino.



Esquema 1.2.- Propuesta biogénica a partir de un policétido

I. 2.- NUEVOS ALCALOIDES AISLADOS DE *ZOANTHUS SP*

A partir del estudio cromatográfico del extracto (acetona:metanol, 1:1) del celentéreo *Zoanthus sp.*, fueron aislados once alcaloides que poseen un esqueleto carbonado de tipo zoantamina (**3**).

Al mismo tiempo que estudiábamos este extracto, Uemura y col. analizaban muestras de *Zoanthus sp.* recolectados en la costa de Ayamaru, y como consecuencia, tres de los alcaloides que en el momento de ser aislados por nosotros no se encontraban descritos, la norzoantamina (**9**), oxizoantamina (**12**) y norzoantaminona (**10**)⁷ fueron publicados en el transcurso de nuestro trabajo. Sin embargo, en la presente memoria se hace la descripción de su estudio cromatográfico y estructural, tal y como se realizó en su momento. Así damos cuenta del aislamiento e identificación, mediante métodos espectroscópicos de la zoantamina (**3**), zoantaminona (**8**), norzoantamina (**9**), norzoantaminona (**10**) y oxizoantamina (**12**), junto a otros seis nuevos alcaloides. Con el fin de sistematizar su estudio, los nuevos alcaloides han sido agrupados en derivados de la norzoantamina (**9**): 3-hidroxinorzoantamina (**21**), 30-hidroxinorzoantamina (**22**), 11-hidroxinorzoantamina (**23**); y derivados de la zoantamina (**3**): 11-hidroxizoantamina (**24**), zoantenol (**25**) y epioxizoantamina (**26**).¹¹⁻¹²

I. 2A.- AISLAMIENTO

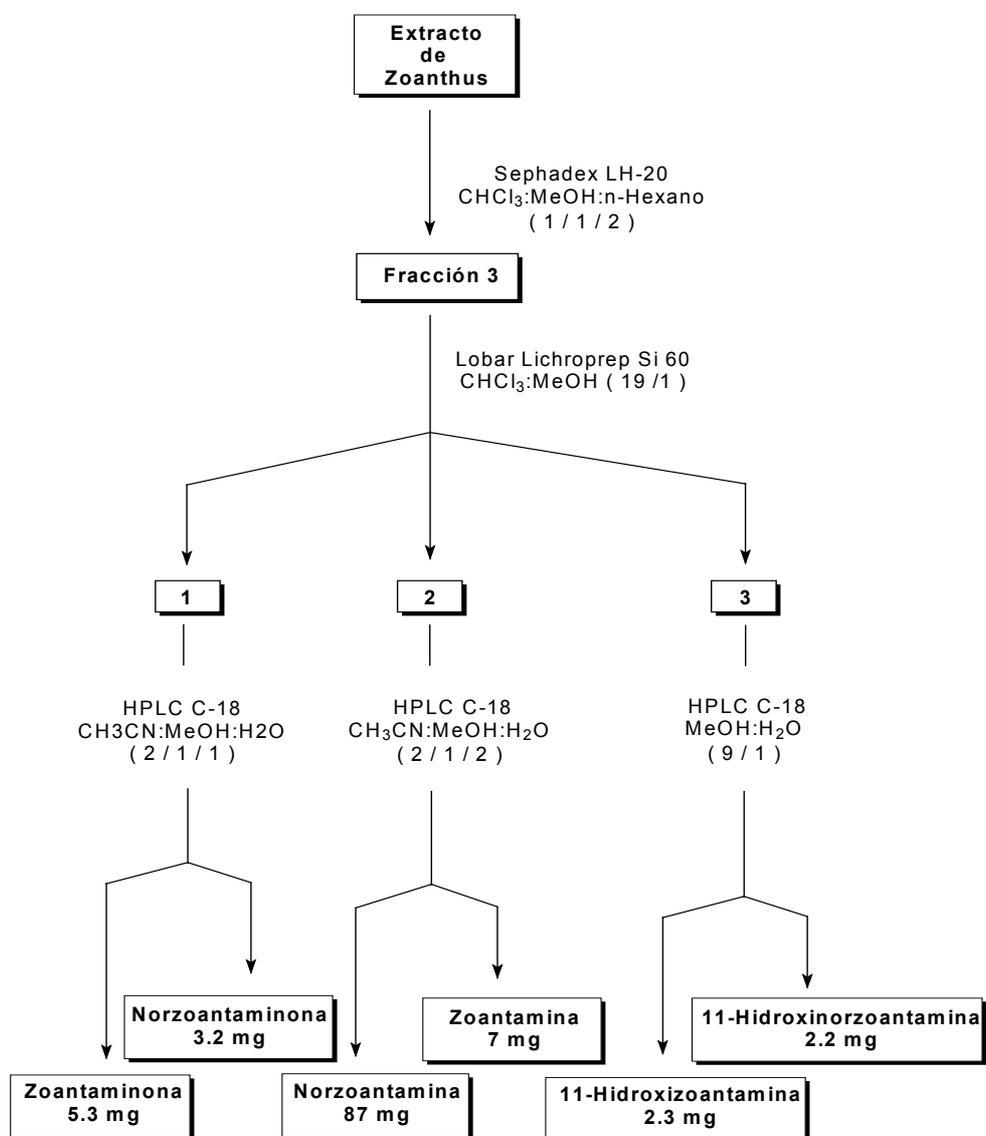
Una colonia de pólipos que constaba aproximadamente de 100 especímenes

¹¹ Daranas, A.H.; Fernández, J.J.; Gavín, J.A.; Norte, M. *Tetrahedron*, **1998**, 54, 7891.

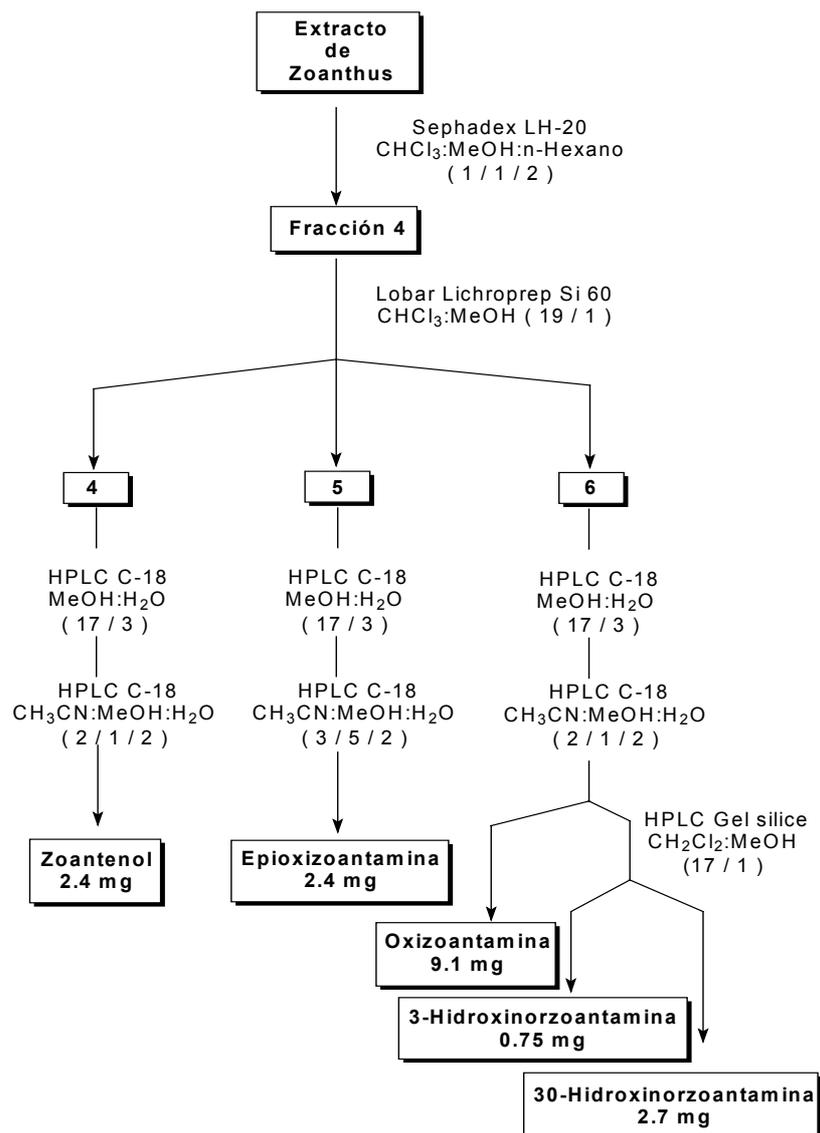
¹² Daranas, A.H.; Fernández, J.J.; Gavín, J.A.; Norte, M. *Tetrahedron*, **1999**, 55, 5539.

de *Zoanthus sp.* fue recolectada en Punta del Hidalgo (Tenerife), durante el mes de Enero de 1996.

La recolección se llevo a cabo a mano durante la bajamar e inmediatamente después fue llevado al laboratorio donde se limpió exhaustivamente de otras especies que crecen íntimamente ligadas al celentéreo. Posteriormente fue macerada repetidas veces a temperatura ambiente con una mezcla de acetona:metanol (1:1), hasta agotamiento de la muestra. Los extractos así obtenidos fueron mezclados y cromatografiados siguiendo la pauta indicada en los siguientes esquemas:



Esquema 1.3



Esquema 1.4

Tal y como se aprecia en los esquemas, la mayoría de los nuevos metabolitos citados fueron aislados en pequeñas cantidades, salvo en caso de la norzoantamina (9). Es por lo tanto lógico pensar que fuese ésta, dado que en ese momento todavía no se encontraba descrito en la literatura química, la elegida para realizar un estudio detallado de sus datos espectroscópicos con fines comparativos.

I. 2B.- ESTUDIO DE ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL

I. 2B. 1.- Norzoantamina (9)

La norzoantamina (9) fue aislada como un sólido blanco amorfo, cuya fórmula molecular $C_{29}H_{39}NO_5$ fue establecida en base a su espectro de masas de alta resolución, donde se puede observar su ion molecular a m/z 481.2857 (calc. 481.2828). Esta fórmula molecular sugiere además que la norzoantamina (9) debe ser una molécula heptacíclica.

A partir de los experimentos de RMN ^{13}C , se observó la presencia en el esqueleto carbonado de cinco metilos (δ_C 18.3, 18.4, 21.0, 21.7, 24.2), nueve metilenos (δ_C 23.6, 29.9, 31.9, 35.9, 38.8, 41.9, 42.4, 44.3, 47.1), seis metinos (δ_C 22.9, 46.4, 53.0, 59.1, 74.2, 125.6) y nueve carbonos cuaternarios (δ_C 36.4, 39.7, 39.8, 89.9, 101.5, 159.8, 172.4, 198.4, 208.9). De estos datos, junto con las absorciones observadas en el espectro de IR (Cl_3CH) a 1715 y 1673 cm^{-1} se pudo deducir la existencia de un éster, una cetona aislada y de una cetona α - β insaturada, hecho este último que se ve reforzado por la absorción en el UV (MeOH) a una $\lambda_{max} = 234$ nm.

Con esta información, realizamos una búsqueda en la bibliografía donde pudimos comprobar que los datos anteriores encajaban con los de un grupo de alcaloides aislados a partir del género *Zoanthus* encabezado por la zoantamina (3). Sin embargo, una comparación detallada de los datos espectrocópicos que poseíamos nos llevaron a la conclusión de que la molécula aislada en nuestro laboratorio no se encontraba publicada por lo que decidimos abordar con mayor detalle su estudio.

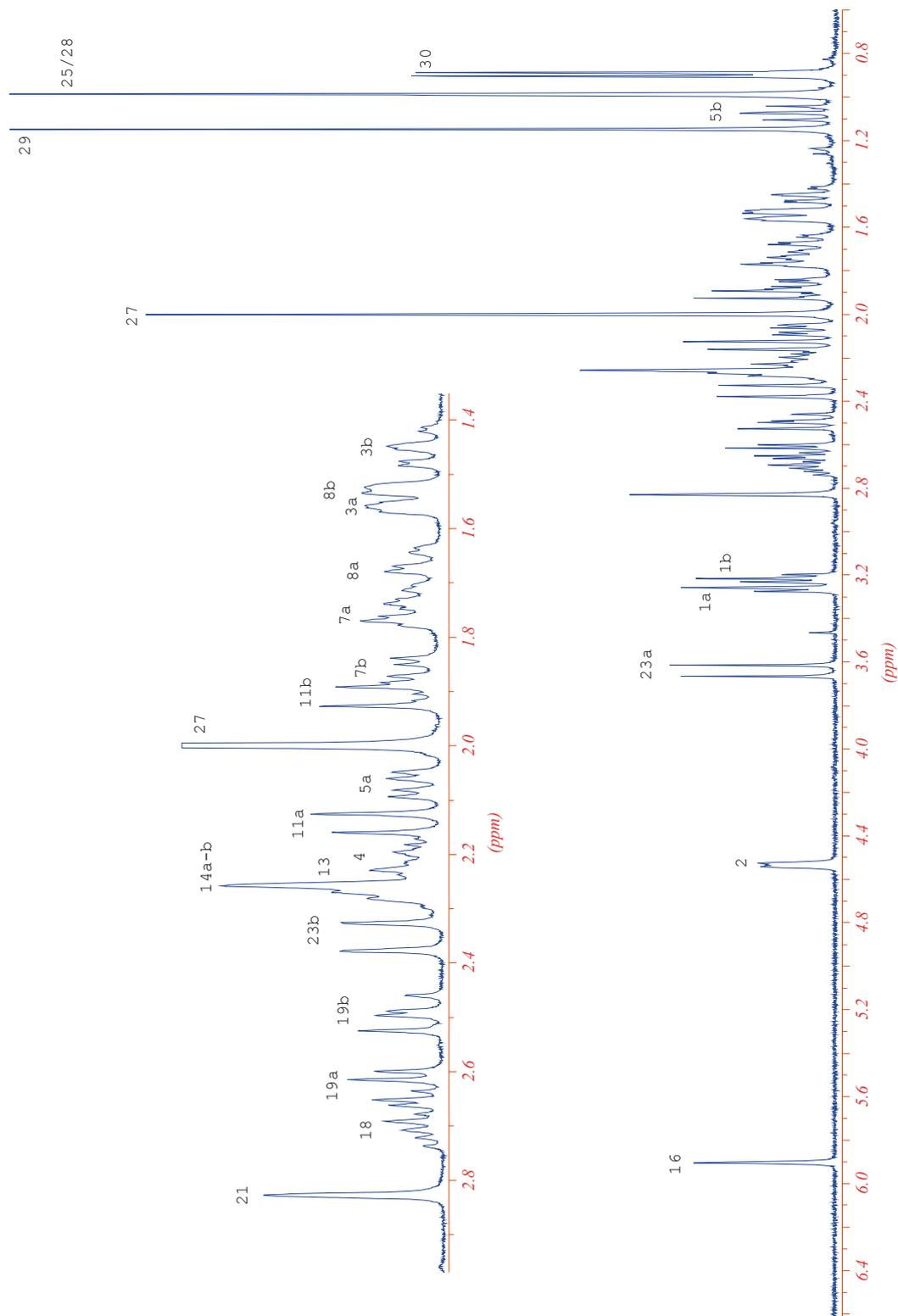
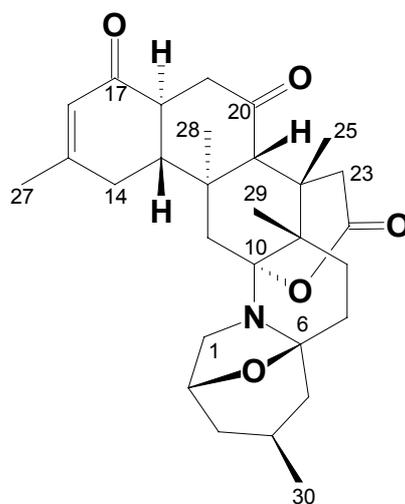


Figura 1.2.- ^1H RMN (400 MHz) de la norzoantamina (9)



Norzoantamina (9)

La asignación de protones en esta molécula comenzó con la señal que aparece a δ_H 4.55 (H-2) perteneciente a un único protón geminal a un oxígeno. Esta señal se correlaciona en el experimento COSY (**Figura 1.3**) con un sistema ABX para dos protones geminales a δ_H 3.27 (H-1 α , d, $J = 6.5$ Hz) y δ_H 3.22 (H-1 β , dd, $J = 6.5$ y 6.2 Hz) y con dos protones a δ_H 1.55 (H-3 α , ddd, $J = 3.4, 4.5$ y 12 Hz) y δ_H 1.46 (H-3 β , ddd, $J = 3, 11.3$ y 12 Hz), el último de los cuales muestra correlación con otra señal situada a δ_H 2.22 (H-4). Desafortunadamente, esta última señal de protón muestra un fuerte solapamiento con otras correspondientes a tres protones, lo que hace muy difícil obtener más información a partir del experimento COSY. El uso del experimento TOCSY (**Figura 1.4**) nos permitió resolver este problema, pues en el mismo pueden observarse conectividades de los protones situados a δ_H 1.55 y 1.46 con el único metilo doblete (Me-30, $J = 6.5$ Hz) situado a δ_H 0.88 y con dos sistemas AMX centrados a δ_H 2.08 (H-5 α , dd, $J = 4.7, 12.7$ Hz) y δ_H 1.08 (H-5 β , dd, $J = 12.1, 12.7$ Hz) a partir de los cuales ya no se observan más correlaciones en los experimentos COSY o TOCSY, como corresponde con su multiplicidad en el experimento de RMN 1H .

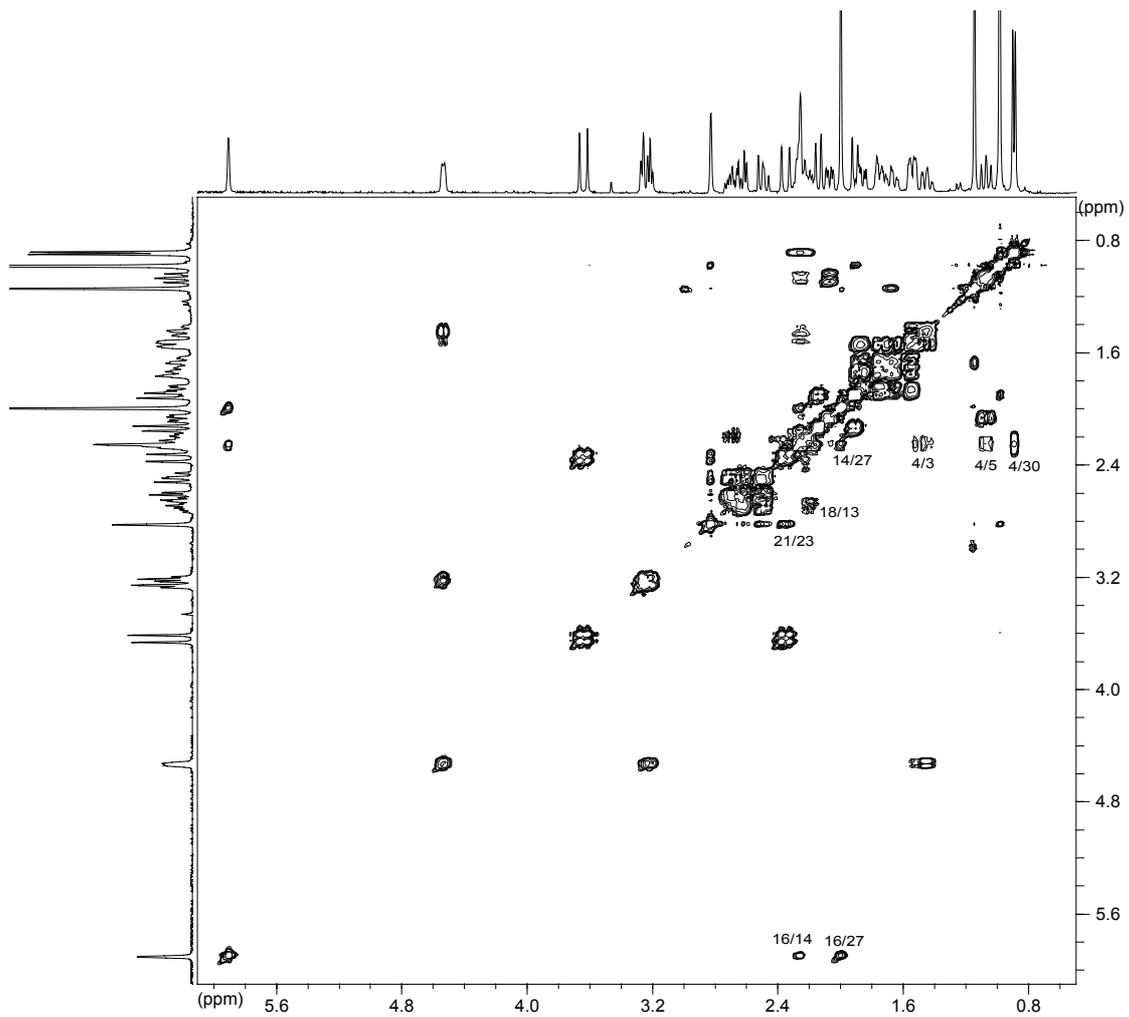


Figura 1.3.- COSY de la norzoantamina (9)

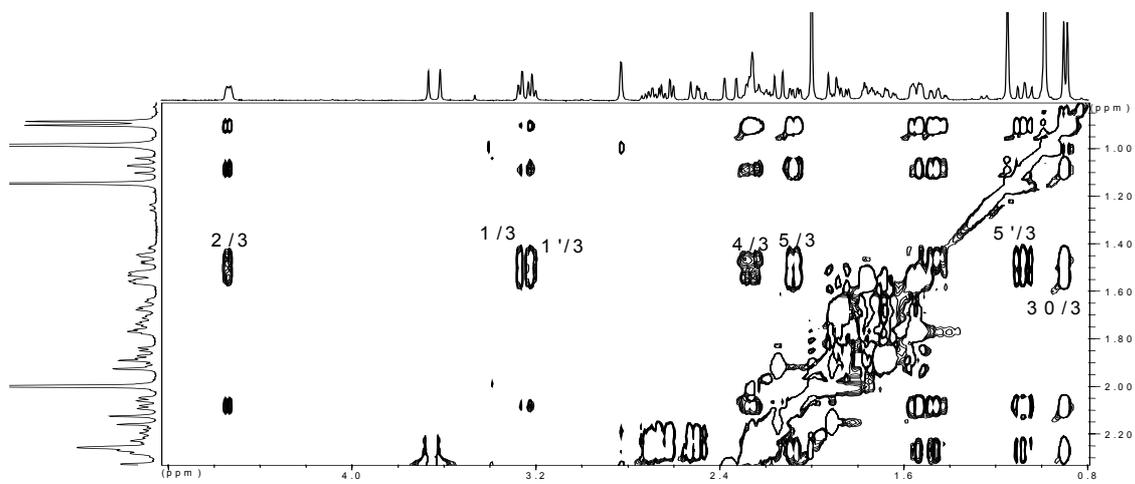


Figura 1.4.- Fragmento del experimento TOCSY de la norzoantamina (9)

A continuación procedimos a la asignación de los desplazamientos químicos de los carbonos implicados en la secuencia anterior utilizando para ello el experimento HSQC. De esta manera, comprobamos que las parejas de protones situados a δ_H 3.27 y 3.22, δ_H 1.55 y 1.46, y a δ_H 2.08 y 1.08 pertenecían todos ellos a carbonos metilénicos centrados en el espectro de ^{13}C RMN a δ_C 47.1, 38.8 y 44.3, respectivamente. De igual forma pudieron correlacionarse el metilo doblete (Me-30) con una señal centrada a δ_C 21.7 y la señal de protón a δ_H 4.55 con el metino de desplazamiento δ_C 74.1. Restaba únicamente la asignación del carbono cuya señal de protón a δ_H 2.22 está solapada con otras, para lo cual hubo que recurrir al experimento HMBC en el que se observan correlaciones de los protones del metilo δ_H 0.88 y de los protones metilénicos con δ_H 2.08 y 1.08 con la señal de carbono de un metino centrado a δ_C 22.9, que no puede ser otra que la correspondiente a (C-4). Teníamos por tanto asignado un fragmento **A**, ■-CH₂-CH-(X)-CH₂-CH(CH₃)-CH₂-■ (**Figura 1.5**).

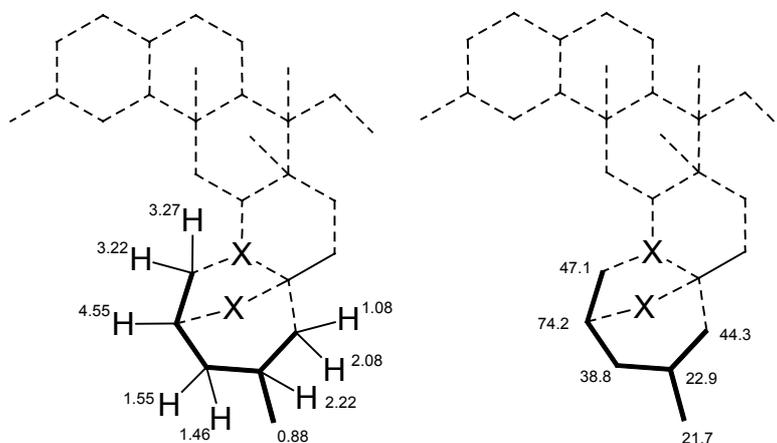


Figura 1.5.- Localización del fragmento A

Si seguimos analizando el experimento COSY puede observarse otro sistema compuesto por cuatro protones que acoplan todos entre sí, pero que no lo hacen con ningún otro protón más. Estos protones se corresponden con las señales situadas en el 1H RMN a δ_H 1.89 (H-7 β , ddd, $J = 4.7, 13, 13$ Hz), δ_H 1.77 (H-7 α , ddd, $J = 3, 4, 13$

Hz), δ_H 1.69 (H-8 α , ddd, $J = 4, 13, 13.7$ Hz) y δ_H 1.54 (H-8 β , ddd, $J = 3, 4.7, 13.7$ Hz). Estas señales de protón se correlacionan en el experimento HMQC (**Figura 1.6**) con las señales de dos metilenos, centradas a δ_C 29.9 para los dos primeros protones y a δ_C 23.6 para los dos últimos constituyendo un fragmento **B**, ■-CH₂-CH₂-■

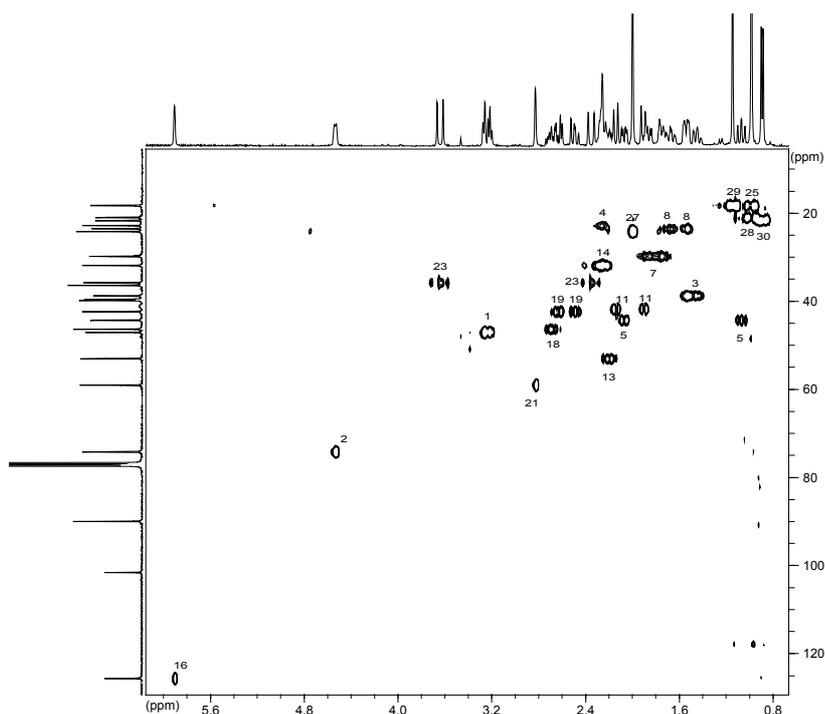


Figura 1.6.- HMQC de la norzoantamina (9)

En otra zona del espectro ¹H RMN puede verse un sistema ABX a δ_H 2.72 (H-18, ddd, $J = 6.4, 11.3, 12$ Hz) para un protón que se correlaciona en el COSY con otros dos protones acoplados entre sí, centrados a δ_H 2.51 (H-19 β , dd, $J = 11.3, 14.7$ Hz) y δ_H 2.65 (H-19 α , dd, $J = 6.4, 14.7$ Hz). Este último protón presenta otra correlación en el COSY con una señal centrada a δ_H 2.19 (H-13, m) que a su vez correlaciona con otra señal situada entre δ_H 2.25 y 2.32 (H-14 y H-14') cuyo desplazamiento es posible precisar sólo en el HMQC debido al solapamiento con otras

señales. Así, en este experimento vemos como las señales de protón situadas a δ_H 2.51 y 2.65 se correlacionan con un metileno centrado a δ_C 42.4 (C-19), al igual que ocurre con las que se encuentran entre δ_H 2.25 y 2.32 con otro metileno con δ_C 31.9 (C-14). En cuanto a las señales centradas en el 1H RMN a δ_H 2.19 (H-13) y 2.72 (H-18) estas se correlacionan con sendos metinos situados en el ^{13}C RMN a δ_C 53.0 y 46.4, respectivamente. A partir de esta información se deduce por tanto la secuencia ■-CH₂-CH-CH-CH₂-■ para el fragmento **C** (Figura 1.7).

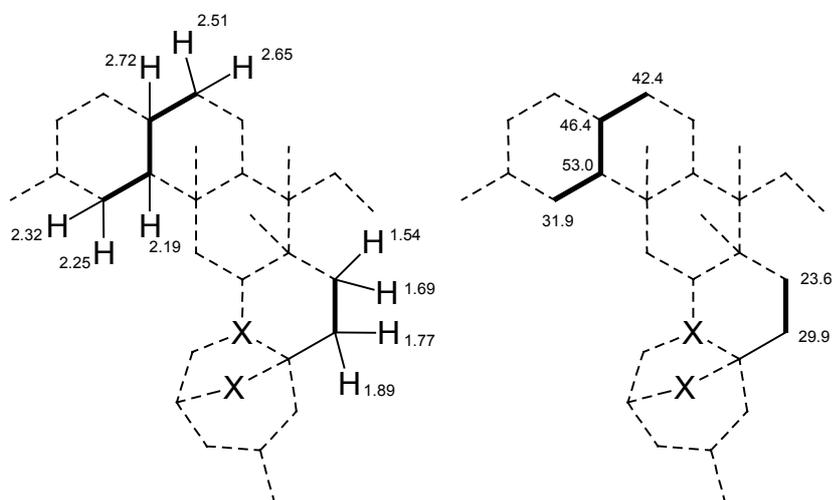


Figura 1.7.- Localización de los fragmentos B y C

Por último, en el COSY se observan una serie de sistemas de spin aislados, como el que forman las señales con δ_H 3.66 (H-23 α , d, J = 20.4 Hz) y δ_H 2.37 (H-23 β , d, J = 20.4 Hz) y las situadas a δ_H 2.15 (H-11 α , d, J = 13.8 Hz) y δ_H 1.92 (H-11 β , d, J = 13.8 Hz) que pertenecen a los metilenos centrados a δ_C 35.9 y δ_C 41.9, respectivamente. También se observa un protón de doble enlace con δ_H 5.92 (H-16, s) que en el COSY muestra acoplamiento a larga distancia con el metilo situado a δ_H 2.01 (Me-27, s) y con las señales situadas entre δ_H 2.25 y 2.32 (H-14). Es de destacar también la señal situada a δ_H 2.83 (H-21, s), correspondiente al protón de un metino

que muestra acoplamiento a larga distancia en el COSY con la señal situada a δ_H 2.37 (H-23 β).

Al tratarse de la asignación de una molécula con seis carbonos cuaternarios y tres carbonilos, el experimento que mayor información nos ofreció, fue sin ninguna duda el HMBC. Así, los protones situados a δ_H 3.22 (H-1 β) y δ_H 4.55 (H-2) muestran sendas correlaciones con el carbono cuaternario de un hemiaminal centrado a δ_C 89.9 (C-6) y las señales del H-1 α (δ_H 3.27) nos permiten asignar el otro carbono cuaternario del hemiaminal, centrado a δ_C 101.5 (C-10). Otra importante correlación observada entre el carbono con δ_C 44.3 (C-5) y la señal de protón situada a δ_H 1.89 (H-7 β) en el HMBC nos permitiría unir los fragmentos **A** y **B** descritos previamente a partir del COSY (**Figuras 1.8 y 1.9**).

A continuación asignaríamos la zona adyacente al sistema de la cetona α - β insaturada, cuya presencia había sido establecida en base a los desplazamientos de ^{13}C RMN, a la absorción en el UV y al espectro de IR. En el experimento COSY (**Figura 1.3**) se observa que tanto la señal de uno de los H-14 como la del metilo situado sobre el carbono β de la enona δ_H 2.01, (Me-27), muestran acoplamiento a larga distancia con el protón del doble enlace situado en α al carbonilo δ_H 5.92 (H-16). En el experimento HMBC se observa correlación entre H-16 y los carbonos centrados a δ_C 31.9 (C-14), 24.2 (Me-27) y 46.4 (C-18). De esta forma conectábamos el sistema enónico con dos carbonos del fragmento **C**. El otro extremo de esta secuencia se conecta también a través de la correlación existente entre el carbono carbonílico δ_C 198.4 (C-17) con la señal de protón centrada a δ_H 2.65 (H-19 α). El protón geminal H-19 β muestra una correlación con la señal situada a δ_C 59.0 (C-21), cuyo protón a su vez se correlaciona con el carbono centrado en δ_C 53.0 (C-13), lo que nos permite

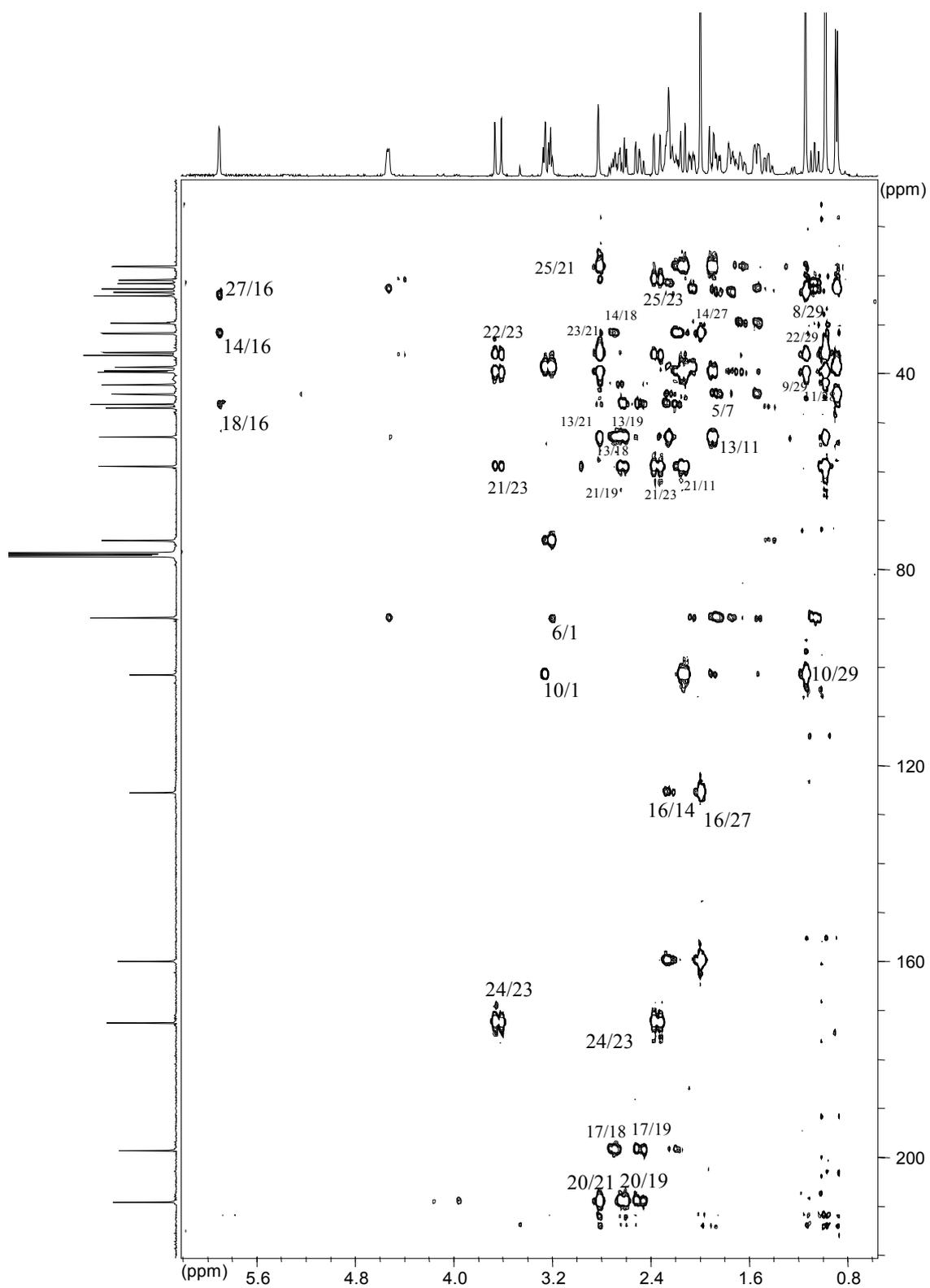


Figura 1.9.- HMBC de la norzoantamina (9)

cerrar un sistema de dos anillos de 6 miembros fusionados entre sí. Así mismo, la señal de H-21 (δ_H 2.83) muestra correlación con el Me-25 y con el carbono carbonílico a δ_C 208.9, que a su vez también se correlaciona con la señales centradas a δ_C 2.65 y 2.5 (H-19), permitiéndonos de esta manera situar a la otra cetona presente en la molécula (**Figuras 1.8 y 1.9**).

Finalmente abordamos la asignación de la parte más complicada de la molécula, pues contiene un anillo de seis miembros con cuatro carbonos cuaternarios. Para llevar a cabo esta tarea, fueron fundamentales las correlaciones que nos brindaron el H-21 y su señal de carbono, pues por un lado el C-21 muestra correlación con la señal centrada a δ_H 2.15 (H-11 α) y por otro con los protones de H-23 (δ_H 3.66 y 2.37). A su vez, el H-21 se correlaciona con la señal de carbono del Me-25 (δ_C 18.4). Así mismo, uno de los H-23 (δ_H 3.66) muestra correlación con un carbono cuaternario centrado a δ_C 39.8 (C-9) y con el carbonilo de la lactona a δ_C 172.4. Por último, las correlaciones observadas entre C-8 (δ_C 23.6) y el Me-29 (δ_C 1.18), y entre este metilo y las señales de C-10 (δ_C 101.5) y C-22 (δ_C 36.4) nos permitieron completar la asignación de la estructura plana de la molécula (**Figuras 1.8 y 1.9**).

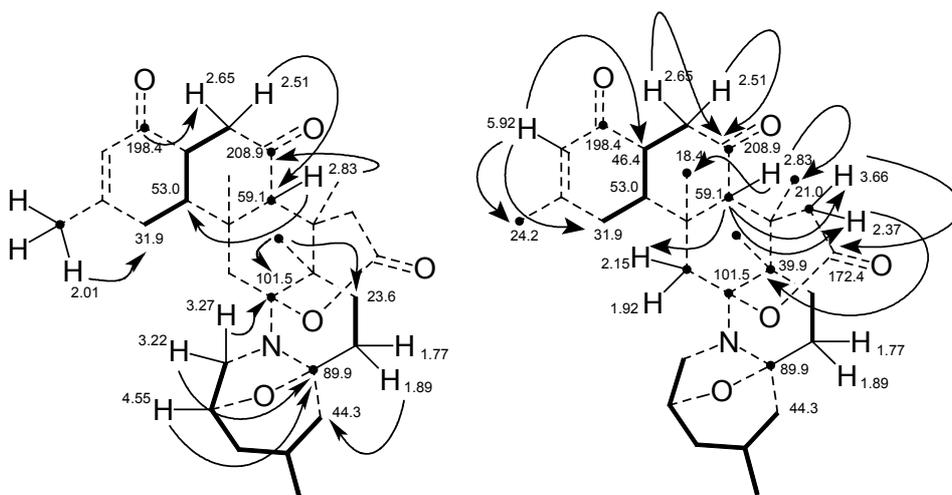


Figura 1.8.- Principales correlaciones observadas en el experimento HMBC.

Una vez realizada la asignación de la estructura plana de la norzoantamina procedimos a su estudio configuracional, utilizando las constantes de acoplamiento, y las relaciones ROE. Debido a la gran rigidez que presenta este sistema de anillos fusionados, conseguimos un modelo que era totalmente superponible al publicado anteriormente en los estudios de difracción de rayos X de la zoantamina **(9)** (Figuras 1.10 y 1.11).

En el experimento ROESY, al igual que en otros experimentos ya comentados, se hacen de nuevo fundamentales las correlaciones que muestra el H-21. Así, este protón muestra acoplamientos dipolares con la señal situada a δ_H 1.92 perteneciente a H-11 α , con H-19 β centrado a δ_H 2.51, con H-13 (δ_H 2.19) y con los protones del Me-29 (δ_H 1.18) y Me-25 (δ_H 1.00). Por lo tanto, todos estos protones deben encontrarse en la misma cara de la molécula.

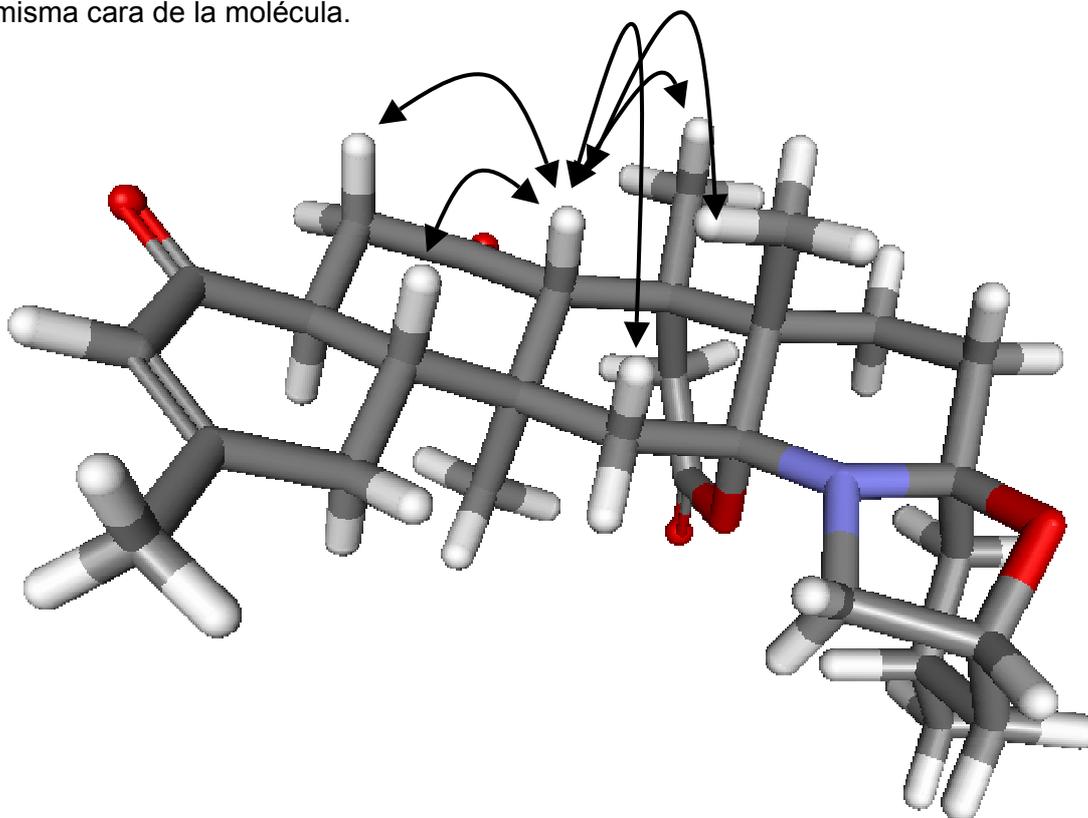


Figura 1.10.- Principales correlaciones ROE observadas en la norzoantamina (9)

La señal de H-19 β asignada de esta manera posee constantes de acoplamiento con el protón geminal H-19 α ($J_{19\alpha-19\beta} = 14.7$ Hz) y con el proton H-18 ($J_{18-19\beta} = 11.3$ Hz). A partir de estos últimos valores, se deduce que el H-18 se encuentra orientado hacia la cara α de la molécula, en posición trans-diaxial con respecto al H-13 ($J_{18-19\beta} = 12$ Hz). En cuanto a los protones del metileno C-23, observamos ROE entre H-8 α (δ_H 1.69) con la señal centrada a δ_H 2.37 (H-23 β) y entre el otro protón, H-23 α (δ_H 3.66) y el Me-28 (δ_H 1.00) situado también en la cara α de la molécula.

Finalmente, debemos comentar la correlación observada entre el H-4 con los protones del metileno C-1, lo que nos indica que ambos se encuentran en la misma cara de la molécula y por lo tanto el Me-30 se encuentra en la cara contraria, la β en este caso, al igual que ocurre con el puente éter que une C-2 y C-6. (**Figura 1.11**).

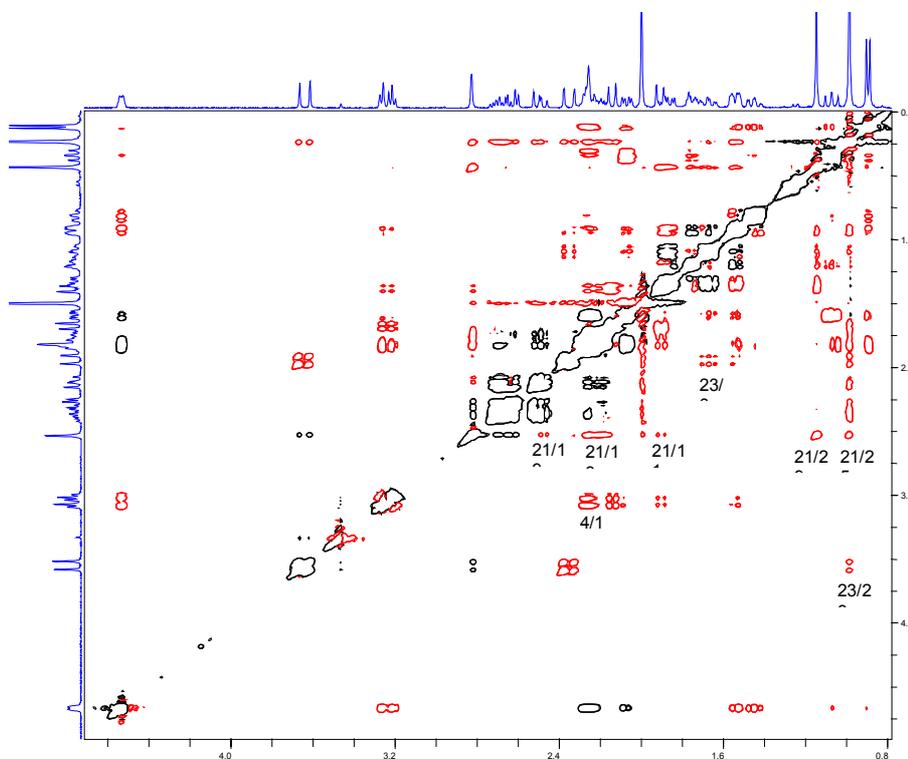


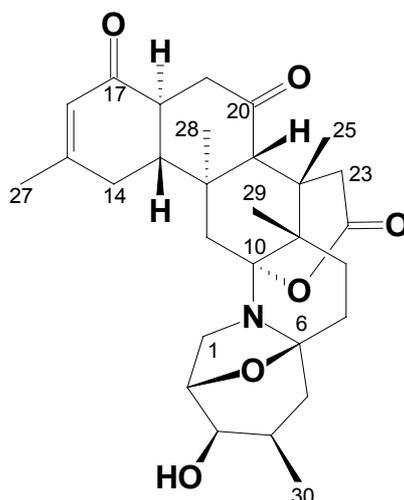
Figura 1.11.- ROESY de la norzoantamina (9)

n° C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$		J (Hz)
1	47.1	(α) 3.27	d	6.5
		(β) 3.22	dd	6.5; 6.2
2	74.2	4.55	m	-
3	38.8	(α) 1.55	ddd	3.4; 4.5; 12
		(β) 1.46	ddd	3.0; 11.3; 12
4	22.9	2.22	m	-
5	44.3	(α) 2.08	dd	4.7; 12.7
		(β) 1.08	dd	12.1; 12.7
6	89.9	-	-	-
7	29.9	(α) 1.77	ddd	3; 4; 13
		(β) 1.89	ddd	4.7; 13; 13
8	23.6	(α) 1.69	ddd	4; 13; 13.7
		(β) 1.54	ddd	3; 4.7; 13.7
9	39.8	-	-	-
10	101.5	-	-	-
11	41.9	(α) 2.15	d	13.8
		(β) 1.92	d	13.8
12	39.7	-	-	-
13	53.0	2.19	m	-
14	31.9	2.25/2.32	m	-
15	159.8	-	-	-
16	125.6	5.92	s	-
17	198.4	-	-	-
18	46.4	2.72	ddd	6.4; 11.3; 12
19	42.4	(α) 2.65	dd	6.4; 14.7
		(β) 2.51	dd	11.3; 14.7
20	208.9	-	-	-
21	59.1	2.83	s	-
22	36.4	-	-	-
23	35.9	(α) 3.66	d	20.4
		(β) 2.37	d	20.4
24	172.4	-	-	-
25	18.4	1.00	s	-
26	-	-	-	-
27	24.2	2.01	s	-
28	21.0	1.00	s	-
29	18.3	1.18	s	-
30	21.7	0.88	d	6.5

Tabla 1.2. RMN ^1H y ^{13}C de la norzoantamina (9)

I. 2B. 2.- 3-Hidroxinorzoantamina (21)

La 3-hidroxinorzoantamina (**21**) fue aislada como un sólido blanco amorfo, $[\alpha]_D^{25} = +12.0^\circ$ (c 0.075, eter etílico), estableciéndose su fórmula molecular como $C_{29}H_{39}O_6N$ en base al ion molecular de su espectro de masas de alta resolución (HREIMS, obs. 497.27542; calc. 497.27773) que nos indicaba que pertenecía a la serie de la norzoantamina (**9**). Al comparar los experimentos de RMN ^{13}C mostraron como principal diferencia la sustitución de un metileno a δ_C 38.8 por un metino unido a oxígeno a δ_C 71.0.



3-Hidroxinorzoantamina (**21**)

De igual forma al comparar los 1H RMN, se observó la aparición de dos nuevas señales de protón centradas a δ_H 3.34 (ddd, $J = 3.3, 3.3, 10.1$ Hz) y a δ_H 2.10 (d, $J = 10.1$ Hz). Además, desaparecen las señales correspondientes H-3 α y H-3 β centradas a δ_H 1.46 y 1.55, y los protones H-1 y H-5 sufren ligeros desplazamientos con respecto a los observados en la norzoantamina (**9**), datos que nos hacen suponer la existencia de un grupo hidroxilo en la posición C-3. (**Figura 1.12**)

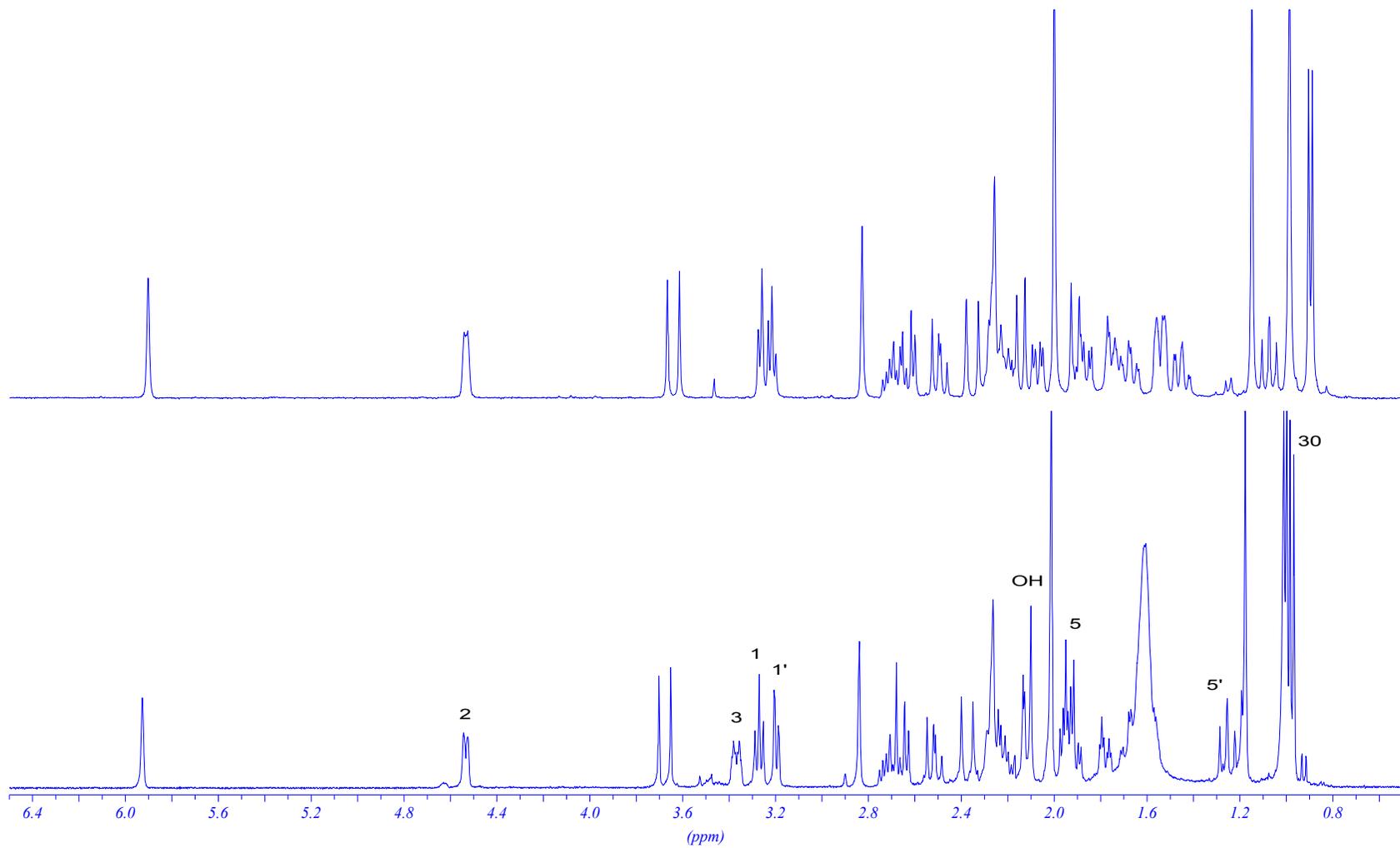


Figura 1.12.- Espectros ^1H de 3-hidroxinorzoantamina y de norzoantamina.

El estudio del experimento COSY confirma esta suposición ya que mostró correlaciones escalares de la nueva señal situada a δ_H 3.34 con los H-2 (δ_H 4.51), con H-4 (δ_H 2.21) y con la otra señal a δ_H 2.10 perteneciente al protón de este nuevo alcohol situado sobre el C-3 (**Figura 1.13**).

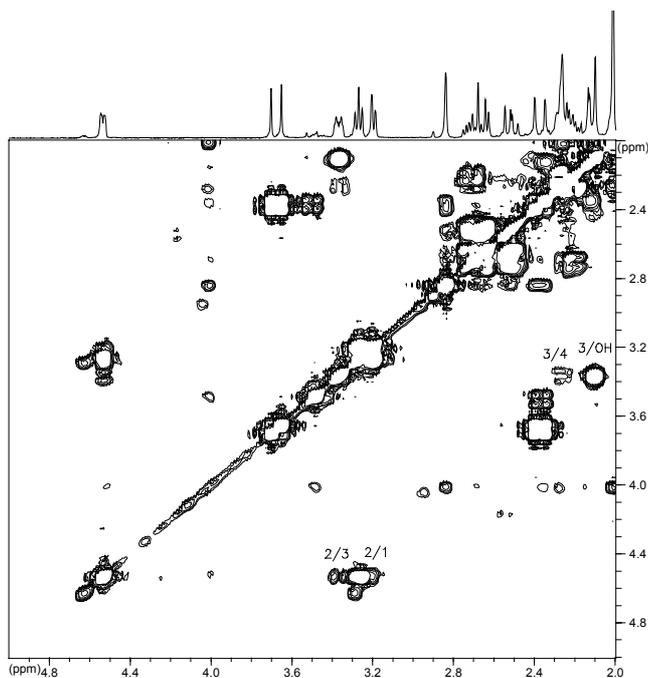


Figura 1.13.- COSY de la 3-hidroxinozantamina (21)

Estas conectividades fueron confirmadas mediante los experimentos HMQC, HMBC y la realización de dos experimentos 1D TOCSY excitando selectivamente los H-2 y H-30, pues la conectividad entre el H-3 y el H-4 es bastante débil (**Figura 1.14**).

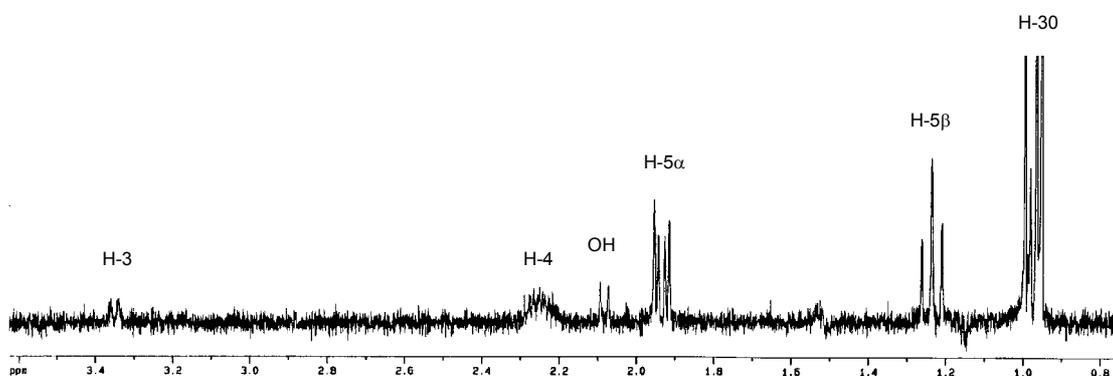


Figura 1.14.- TOCSY-1D de la 3-hidroxinozantamina (21)

La estereoquímica relativa del nuevo centro quiral (C-3), así como la del resto de los centros asimétricos presentes en la molécula fueron establecidas de acuerdo con las correlaciones observadas en el experimento ROESY. El ROE observado en dicho experimento entre el H-3 y el H-4 sólo puede ser explicado si la configuración relativa de C-3 es R*. Se observan las mismas correlaciones que en la norzoantamina (**9**) para el resto de los centros quirales presentes.

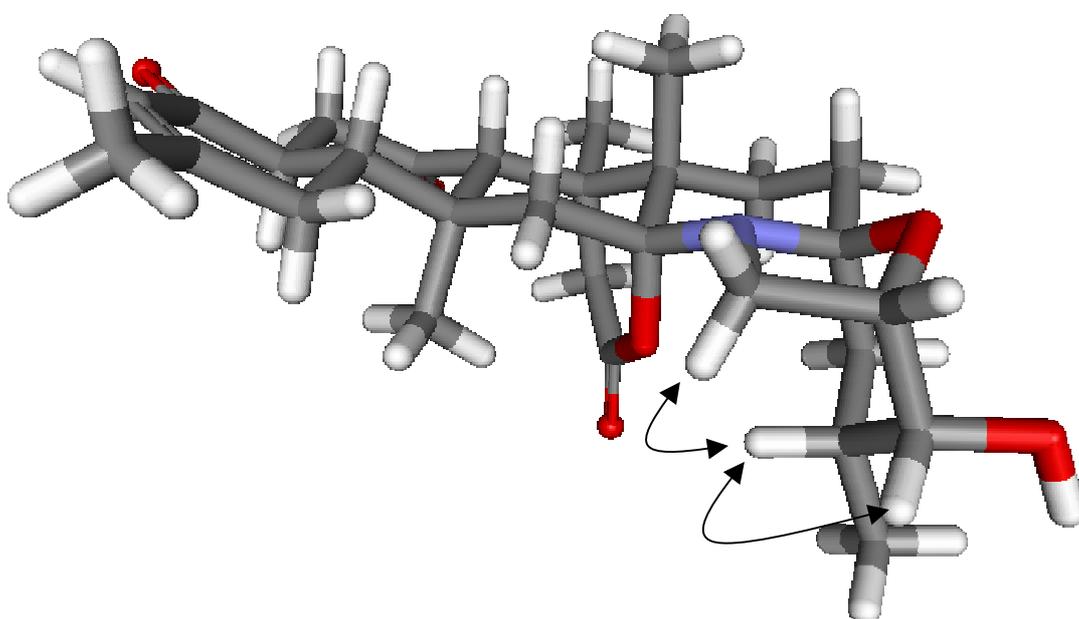


Figura 1.15.- Principales correlaciones ROE de la 3-hidroxinorzoantamina (**21**)

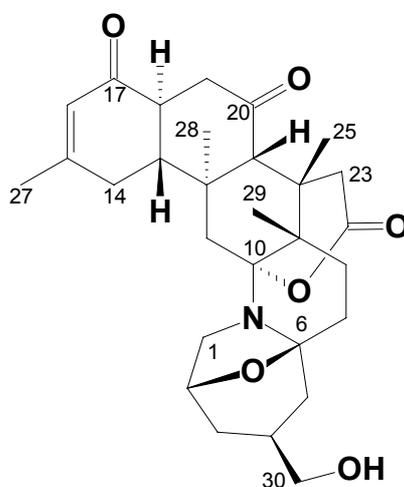
I. 2. B. 3.- 30-Hidroxinorzoantamina (**22**)

La 30-hidroxinorzoantamina (**22**), aislada como un sólido blanco amorfo con $[\alpha]_D^{25} = -1.1^\circ$ (c 0.27, Cl_3CH), resultó ser un isómero de la 3-hidroxinorzoantamina (**21**) al observar en el espectro de masas de alta resolución que su ion molecular (HREIMS,

n° C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	MULTIPLICIDAD	J (Hz)
1	44.98	(α) 3.17	br d	7.4
		(β) 3.25	dd	7 ; 7.4
2	78.4	4.51	br dd	3.3 ; 7
3	70.9	3.34	ddd	3.3 ; 3.3 ; 10
4	27.19	2.21	m	-
5	39.7	(α) 1.93	dd	5.1 ; 13.5
		(β) 1.23	dd	12.6 ; 13.5
6	90.2	-	-	-
7	29.6	(α) 1.78	ddd	3 ; 3.4 ; 12.4
		(β) 1.94	ddd	5 ; 12.4 ; 12.4
8	23.6	(α) 1.68	ddd	3.4 ; 12.4 ; 13.5
		(β) 1.58	ddd	3 ; 5 ; 13.5
9	40.1	-	-	-
10	100.8	-	-	-
11	41.8	(α) 1.94	d	13.8
		(β) 2.16	d	13.8
12	36.7	-	-	-
13	53.3	2.26	ddd	6 ; 11 ; 12
14	31.9	(α) 2.25	dd	13 ; 11
		(β) 2.23	dd	6 ; 13
15	159.8	-	-	-
16	125.6	5.93	s	-
17	198.4	-	-	-
18	46.4	2.72	ddd	6.4 ; 11.8 ; 12
19	42.3	(α) 2.66	dd	6.4 ; 14.2
		(β) 2.52	dd	11.8 ; 14.2
20	208.9	-	-	-
21	59.1	2.84	s	-
22	40.3	-	-	-
23	35.7	(α) 3.68	d	20.4
		(β) 2.38	d	20.4
24	172.2	-	-	-
25	20.9	1.01	s	-
26	-	-	-	-
27	24.2	2.02	s	-
28	18.4	1.01	s	-
29	18.3	1.18	s	-
30	16.6	0.98	d	6.9

Tabla 1.3. RMN ^1H y ^{13}C de la 3-hidroxinorzoantamina (21).

obs. 497.27731; calc. 497.27773) coincidía con el de aquel, estableciéndose su fórmula molecular en $C_{29}H_{39}NO_6$.



30-Hidroxinorzoantamina (22)

Tomando como referencia, igual que en caso anterior a la norzoantamina (**9**), en el 1H RMN la señal del único metilo doblete Me-30 (δ_H 0.88, $J= 6.5$ Hz) había desaparecido, y aparecía una nueva señal que integra para dos protones centrada a δ_H 3.48. Pensamos por tanto que el Me-30 se encuentra oxidado en forma de \blacksquare -CH₂-OH (**Figura 1.16**). Además, en el experimento de RMN ^{13}C se observan cambios en los desplazamientos químicos de C-3 (δ_C 33.9), C-4 (δ_C 31.6) y C-5 (δ_C 39.2) con respecto a los observados en la norzoantamina (**9**) a δ_C 38.8, 22.9 y 44.3, respectivamente, junto a la desaparición de la señal que correspondía al Me-30 y la presencia de un nuevo metileno centrado a δ_C 68.0, al que según se observó en el HSQC pertenecían los dos nuevos protones a δ_H 3.44 y 3.50.

En el experimento COSY, se estableció la secuencia H-1 (δ_H 3.28) \rightarrow H-2 (δ_H 4.62) \rightarrow H-3 (δ_H 1.60) \rightarrow H-4 (δ_H 2.46) \rightarrow H-5 (δ_H 2.16 y 1.19) pero en ningún momento se pudo observar conectividad alguna entre las nuevas señales δ_H a 3.44 y 3.50 (H-30

y H-30') y la señal a δ_H 2.46 (H-4). En el experimento HMBC ocurría lo mismo, no se observó conectividad alguna de la nueva señal con su entorno.

La clave para la asignación de la nueva señal fue un experimento de doble resonancia. Cuando irradiamos sobre las señales en δ_H 3.44 y 3.50 no se observaron cambios en la señal de H-4 a δ_H 2.46. Este hecho puede explicarse si tenemos en cuenta que el H-4 está acoplado con 6 protones, pertenecientes a los metilenos C-3, C-5 y C-30, y debido a su multiplicidad compleja y al solapamiento parcial con H-19 β fue difícil apreciar cambios. Sin embargo, al irradiar sobre la señal de H-4 δ_H 2.46 se observa la desaparición del acoplamiento en las señales situadas a δ_H 3.44 y 3.50 (Figura 1.16).

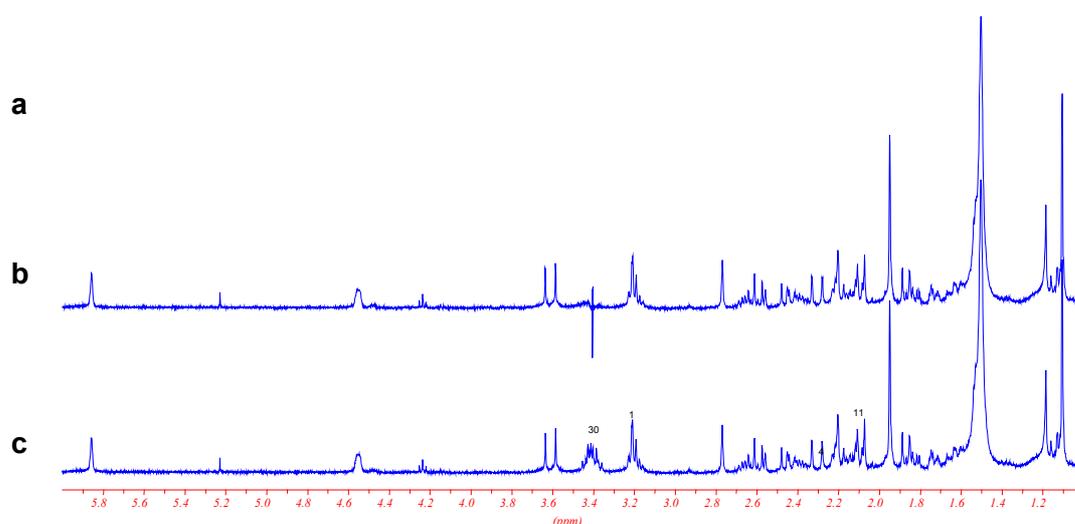


Figura 1.16.- a) ^1H NMR de la 30-hidroxinorzoantamina (22); b) ^1H NMR irradiando la señal de los protones H-30; c) ^1H NMR irradiando la señal del protón H-4.

La configuración relativa de C-4 fue establecida en base a los datos obtenidos del experimento ROESY (Figura 1.17). En éste se observan correlaciones entre los

protones H-1 y los protones H-4 y H-11 α . Esta correlación y el resto de la observadas en el citado experimento sólo son posibles si la configuración de todos los centros quirales presentes en la molécula, es idéntica a la observada en la norzoantamina (9).

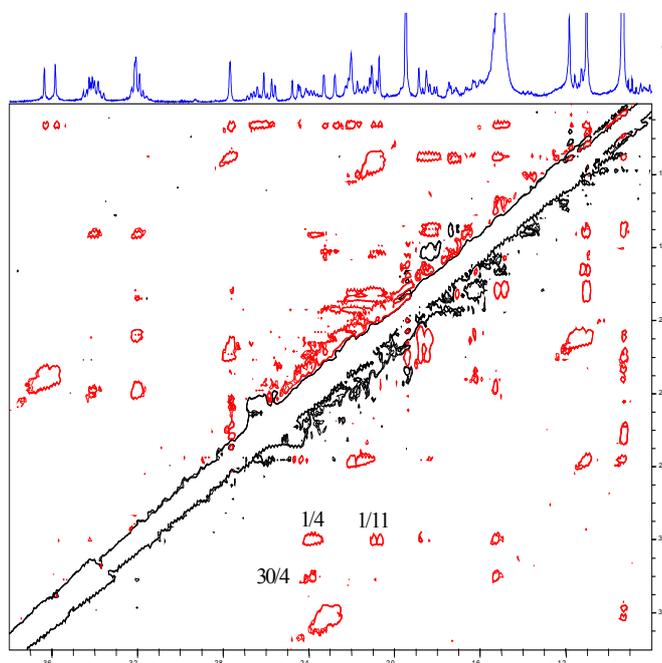


Figura 1.17.- ROESY de la 30-hidroxinorzoantamina (22)

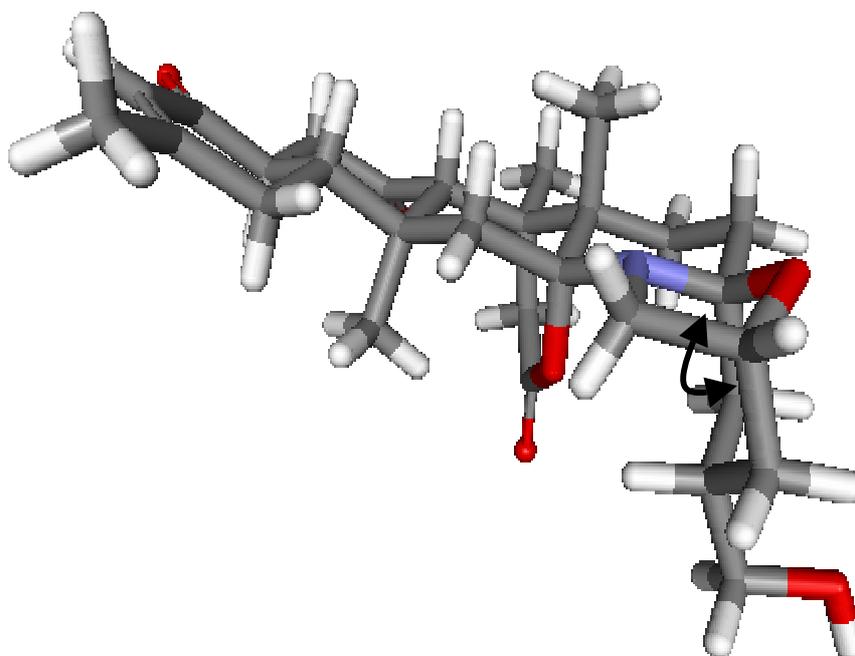
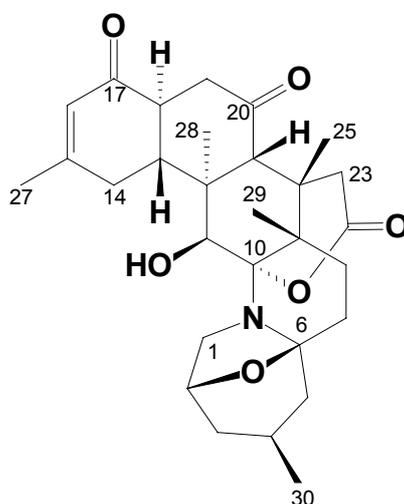


Figura 1.18.-Principales correlaciones ROE observadas en la 30-hidroxinorzoantamina (22)

n° C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multipli cidad	J (Hz)
1	47.6	(α) 3.27	br d	6.5
		(β) 3.28	dd	6.5 ; 6.5
2	74.3	4.62	m	-
3	33.8	(α) 1.60	ddd	3; 4; 12
		(β) 1.58	ddd	3; 12; 12
4	31.6	2.46	m	-
5	39.1	(α) 2.16	dd	4.6 ; 13
		(β) 1.19	dd	12 ; 13
6	90.4	-	-	-
7	30.6	(α) 1.79	ddd	4 ; 4 ; 13
		(β) 1.89	ddd	4.5 ; 13 ; 13
8	24.2	(α) 1.68	ddd	4 ; 13 ; 13
		(β) 1.58	ddd	4 ; 4.5 ; 13
9	40.3	-	-	-
10	102.0	-	-	-
11	42.3	(α) 1.94	d	14.1
		(β) 2.16	d	14.1
12	40.2	-	-	-
13	53.5	2.24	ddd	6 ; 11 ; 12
14	32.3	2.27	m	-
		(2H)		
15	160.0	-	-	-
16	126.0	5.93	s	-
17	198.7	-	-	-
18	46.8	2.71	ddd	6.3 ; 11.3 ; 12
19	42.8	(α)2.65	dd	6.3; 14
		(β)2.51	dd	11.3;14
20	209.2	-	-	-
21	59.5	2.84	s	-
22	36.9	-	-	-
23	36.3	(α) 3.69	d	20.3
		(β) 2.37	d	20.3
24	172.8	-	-	-
25	21.5	1.01	s	-
26	-	-	-	-
27	24.6	2.02	s	-
28	18.8	1.00	s	-
29	18.8	1.17	s	-
30	67.9	3.50	dd	6 ; 10.4
		3.44	dd	6.6; 10.4

Tabla 1.4. RMN ^1H y ^{13}C de la 30-hidroxinorzoantamina (22)**I. 2B. 4.- 11- Hidroxinorzoantamina (23)**

La 11-hidroxinorzoantamina (23), resultó ser un isómero de los dos metabolitos anteriormente descritos, 3-hidroxinorzoantamina (21) y de la 30-hidroxinorzoantamina (22), como se puso de manifiesto al realizar su espectro de masas. En éste se observa el ion molecular a m/z 497.27819, lo que nos permitió establecer su fórmula molecular como $\text{C}_{29}\text{H}_{39}\text{NO}_6$. De nuevo se observaba en el espectro de IR una absorción asociada a la presencia de un grupo hidroxilo en la molécula entre $3600\text{-}3300\text{ cm}^{-1}$.

**11-Hidroxinorzoantamina (23)**

La combinación de los experimentos HSQC y ^{13}C RMN pusieron de manifiesto la presencia de un nuevo metino cuya señal de carbono se encuentra centrada a δ_{C} 67.4, además en el experimento de ^1H RMN destaca poderosamente la desaparición de los dobletes correspondientes a los H-11 y la aparición de una nueva señal centrada a δ_{H} 4.27. Así mismo, se observan cambios en los desplazamientos químicos de H-13, H-14 y H-14', H-21, uno de los H-1 β y en los metilos Me-28 y Me-29. Estos datos nos llevaron a sospechar que uno de los H-11 había sido sustituido por un alcohol (**Figura 1.19**).

La localización del citado hidroxilo sobre el C-11 se confirmó en base a los datos de los experimentos 2D RMN. Debido a que el C-11 se encuentra flanqueado por dos carbonos cuaternarios (C-10, C-12) el experimento COSY no suministra información alguna a este respecto, si bien si fue de gran ayuda para la asignación del resto de las señales del espectro que habían sufrido cambios.

Fue el experimento HMBC el que nos permitió encontrar las conectividades de la nueva señal. Así el H-11 mostró correlaciones con los C-10 (δ_C 107.8), C-12 (δ_C 45.1), C-9 (δ_C 40.4), C-21 (δ_C 55.0) y el Me-28 (δ_C 20.1), de forma que no dejaban ninguna duda sobre la situación del nuevo hidroxilo (**Figura 1.20**)

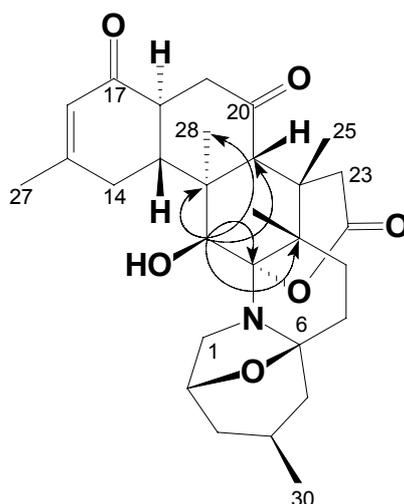


Figura 1.20.- Correlaciones HMBC observadas para el C-11 en la 11-Hidroxinorzoantamina (20).

La configuración relativa de este compuesto fue establecida a través del estudio del experimento ROESY. En el mismo, se observaron correlaciones del protón H-11 con los dos protones de los metilenos C-1, C-14 y con el Me-28. Correlaciones únicamente posibles si el grupo hidroxilo se encuentra en β . El resto de los centros quirales mantienen inalterada su configuración con respecto a la norzoantamina (**9**).

11-Hidroxinorzoantamina (22)					11-Hidroxizoantamina (23)			
n° C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Mult.	J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Mult	J (Hz)
		(
1	45.4	α) 3.23	br d	7	45.4	α) 3.24	br d	7
		β) 3.83	dd	7; 7		β) 3.84	dd	7; 7
2	74.1	4.61	m	-	74.0	4.61	m	-
3	38.6	α) 1.60	ddd	3.4 ; 4.5 ; 12	38.5	α) 1.62	ddd	4.5 ; 3 ; 12
		β) 1.49	ddd	3 ; 11.3 ; 12		β) 1.50	ddd	3 ; 12 ; 12
4	23.0	2.30	m		22.9	2.30	m	
5	44.3	α) 2.11	dd	4.9 ; 12.5	44.3	α) 2.21	dd	5.2 ; 13.4
		β) 1.10	dd	12.5; 12.5		β) 1.11	dd	12; 13.4
6	91.3	-	-	-	91.3	-	-	-
7	30.0	α) 1.78	ddd	3.5; 4; 13	29.9	α) 1.75	ddd	3 ; 4 ; 13
		β) 1.95	ddd	4.5 ; 13; 13		β) 1.97	ddd	4 ; 13 ; 13
8	26.6	α) 1.75	ddd	4 ; 13; 13	26.6	α) 1.72	ddd	4 ; 13 ; 13
		β) 1.55	ddd	4.5; 4.5 ; 13		β) 1.55	ddd	3 ; 4 ; 13
9	40.4	-	-	-	40.6	-	-	-
10	107.8	-	-	-	104.0	-	-	-
11	67.4	4.27	s	-	67.4	4.27	s	-
12	45.1	-	-	-	44.7	-	-	-
13	49.1	2.92	ddd	3.5 ; 12.1 ; 13	43.6	3.14	ddd	4.5; 11.5; 13.5
14	32.2	α) 2.25	dd	13 ; 17	30.8	α) 2.19	dd	11.5; 17.3
		β) 2.53	dd	3.5 ; 17		β) 2.49	dd	4.5; 17.3
15	161.4	-	-	-	160.9	-	-	-
16	125.1	5.91	s	-	125.1	5.90	s	-
17	198.0	-	-	-	196.8	-	-	-
18	46.3	2.61	ddd	5.6; 12.1; 12.5	48.2	2.59	dd	5.2; 13.5
19	43.0	α) 2.79	dd	5.6; 13.5	45.9	3.06	m	-
		β) 2.46	dd	12.5; 13.5				
20	209.5	-	-	-	212.0	-	-	-
21	55.0	3.00	s	-	49.14	3.39	s	-
22	37.0	-	-	-	36.4	-	-	-
23	36.7	α) 3.82	d	20.4	36.4	α) 2.19	d	20.7
		β) 2.41	d	20.4		β) 2.41	d	20.7
24	172.1	-	-	-	171.7	-	-	-
25	20.4	1.00	s	-	20.5	0.97	s	-
26	-	-	-	-	12.3	1.18	d	6.9
27	24.4	2.01	s	-	24.9	2.00	s	-
28	20.1	1.19	s	-	20.0	1.18	s	-
29	21.3	1.46	s	-	21.4	1.51	s	-
30	21.8	0.91	d	6.5	21.7	0.91	d	6.5

Tabla 1.5. RMN ^1H y ^{13}C de la 11-hidroxizoantamina (22) y 11-hidroxinorzoantamina (23).

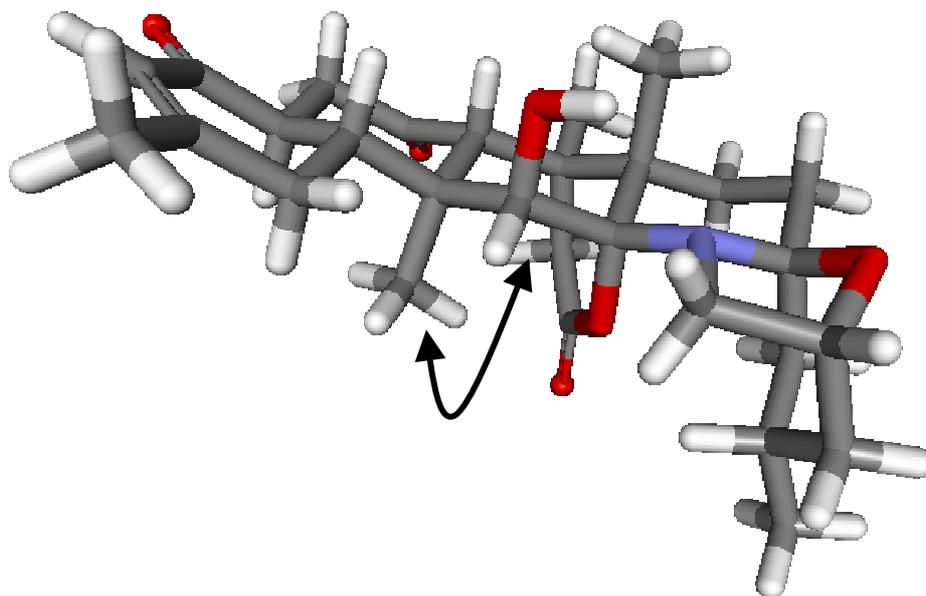
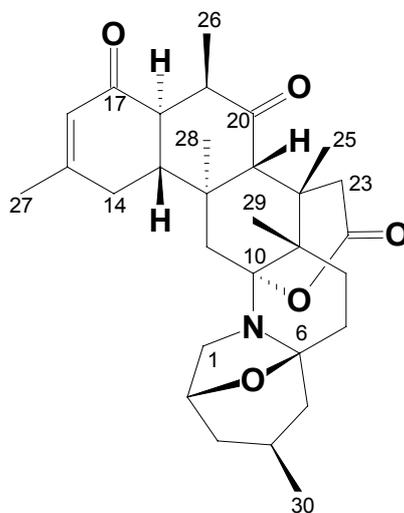


Figura 1.21.- Correlaciones ROE más importantes de la 11-Hidroxinozantamina (23).

I. 2B. 5.- 11-Hidroxizoantamina (24)

Cuando realizamos el espectro de masas de alta resolución, la 11-hidroxizoantamina (24) mostró un ion molecular a m/z 511.28825 que se corresponde con una fórmula molecular $C_{30}H_{41}NO_6$.



11-Hidroxizoantamina (24)

Cuando comparamos los experimentos de ^1H RMN, ^{13}C RMN y HSQC con los de la 11-Hidroxinorzoantamina (**23**), se observó la presencia de un nuevo carbono correspondiente a un metilo δ_{H} 1.18 (d, $J = 6.9$ Hz) y δ_{C} 12.3, y que el metileno C-19 (δ_{H} 2.46 y 2.79; δ_{C} 43.0) aparece ahora como metino centrado a δ_{C} 45.9 y δ_{H} 3.06 (m), junto con el desplazamiento del H-21 a campos más bajos y la simplificación de la zona comprendida entre 2 y 3 ppm (**Figura 1.22**).

La situación en la molécula del nuevo metilo se realizó apoyándonos en la información que nos brindó el experimento COSY. Se puede observar como el nuevo metilo (Me-26, δ_{H} 1.18, d, $J = 6.9$ Hz) se correlaciona con la señal que aparece centrada a δ_{H} 3.06 (H-19, m) y ésta última señal presenta conectividades con otra señal centrada a δ_{H} 2.59 (H-18, dd, $J = 5.2, 13.5$ Hz), que a su vez se encuentra acoplada con H-13 (δ_{H} 3.14, dd, $J = 4.5, 11.5, 13.5$ Hz) para finalizar la secuencia en H-14 (δ_{H} 2.19, dd $J = 11.5, 17.3$ Hz; δ_{H} 2.49, dd, $J = 4.5, 17.3$ Hz). Esta asignación fue corroborada con las conectividades observadas en el experimento HMBC.

La estereoquímica de la molécula se determinó a partir de la información obtenida en el experimento ROESY. El nuevo metilo presenta correlaciones dipolares con H-21 y con H-13, que sólo son posibles si se encuentra situado en la cara β de la molécula. El resto de los centros quirales en la molécula mantienen la misma estereoquímica observada en la norzoantamina (**9**).

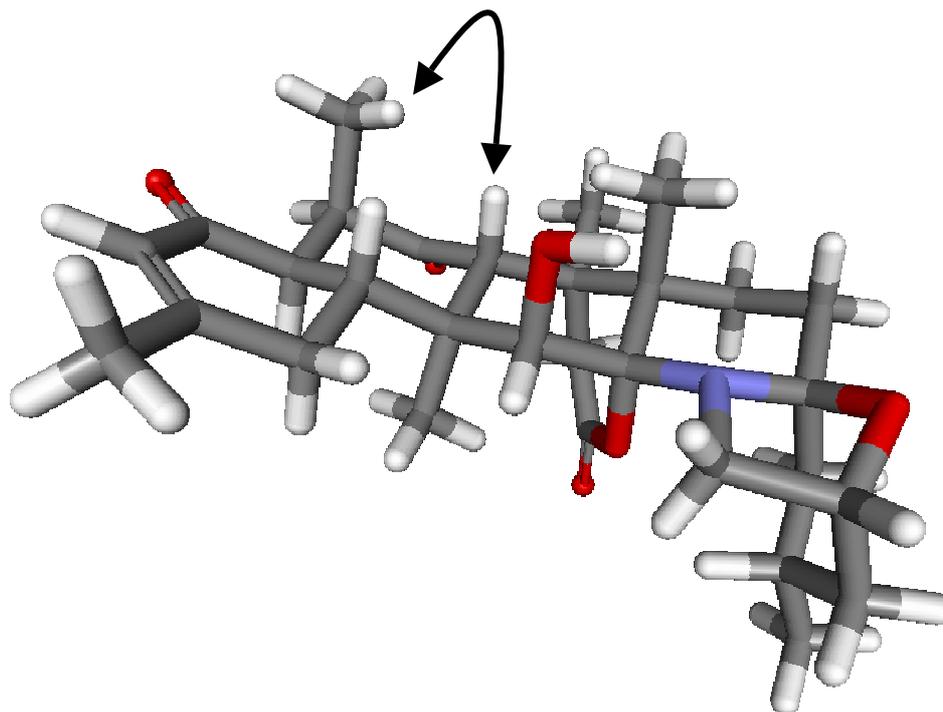
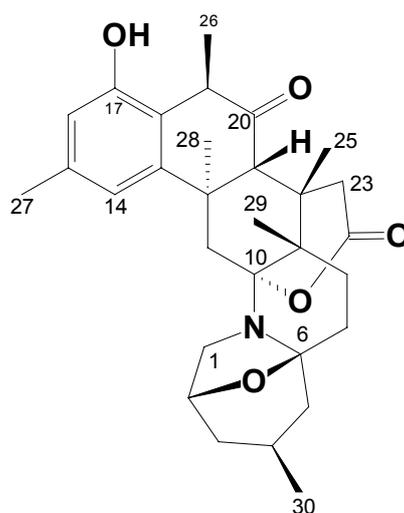


Figura 1.23.- Correlaciones ROE más importantes de la 11-Hidroxizantamina (24).

I. 2B. 6.- Zoantenol (25)

El zoantenol (25) fue aislado como un sólido blanco amorfo y su fórmula molecular, $C_{30}H_{39}NO_5$ fue establecida en base a los datos de la espectrometría de masas.



Zoantenol (25)

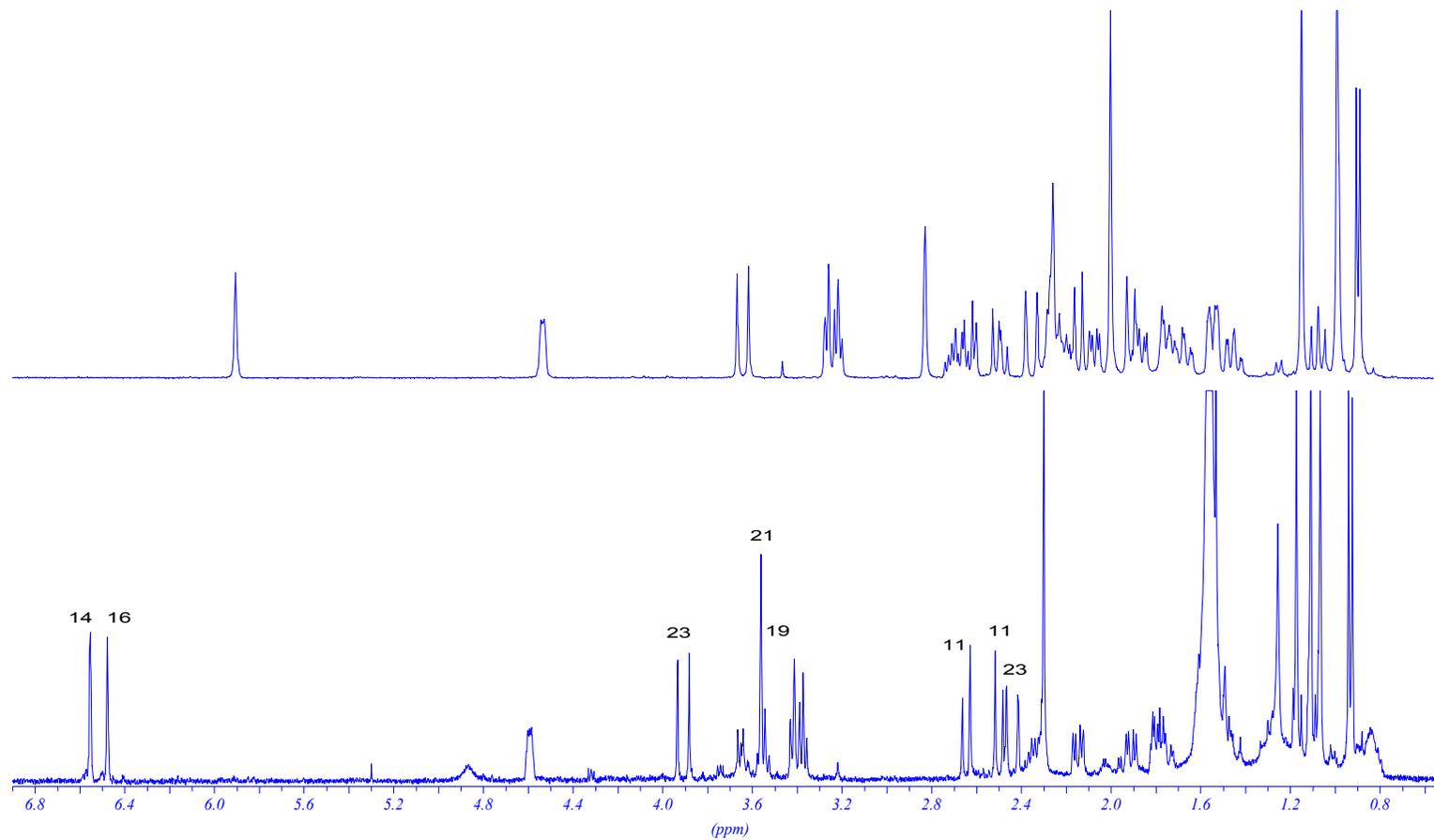


Figura 1.24.- Espectros ^1H de zoantenol y de norzoantamina.

La absorción observada en el espectro de ultravioleta en este compuesto era diferente a la observada en el resto de metabolitos aislados, presentando máximos de absorción situados a 204, 276 y 282 nm. Este hecho junto con el estudio de los espectros de ^1H y ^{13}C RMN sugirieron la presencia en la molécula de un anillo aromático en sustitución de la habitual ciclohexanona.

Así en el espectro de ^1H RMN del zoantenol (**25**) al compararlo con el de la norzoantamina (**9**), se observaron cambios tales como la desaparición de las señales correspondientes a los protones H-13 y H-18 de la norzoantamina (**9**), la sustitución de las señales del metileno H-14 por una señal de metino centrada a δ_{H} 6.56 y los desplazamientos de las señales de los protones H-16 y del metilo vinílico Me-27 hacia campos más bajos a δ_{H} 6.49 y δ_{H} 2.30, respectivamente. En el espectro de ^{13}C RMN, podemos apreciar cuatro señales de carbonos vinílicos centradas a δ_{C} 115.8, 120.5, 150.5 y 154.1 que se correlacionan en el HMQC con los carbonos C-14, C-18, C-13 y C-17.

Las correlaciones observadas en el experimento HMBC entre el carbono cuaternario situado a δ_{C} 120.5 (C-18) con los protones centrados a δ_{H} 3.56 (H-19) y δ_{H} 1.55 (Me-26) y con las señales de protón centradas a δ_{H} 6.56 y δ_{H} 6.49, nos permitieron establecer que éstas pertenecían a H-14 y H-16, respectivamente; ya que la señal situada a δ_{H} 6.56 (H-14) presentaba correlación con el C-12 a δ_{C} 40.4. Por otro lado la señal de C-13 (δ_{C} 150.5) fue identificada como tal, por sus correlaciones con las señales de protón centradas a δ_{H} 3.56 (H-19), 3.57 (H-21), 2.51 (H-11 β) y 1.11 (Me-28). Las correlaciones del metilo aromático (Me-27, δ_{H} 2.30) con las señales de carbono situadas a δ_{C} 114.8 (C-16), 115.8 (C-14) y 138.0 (C-15).

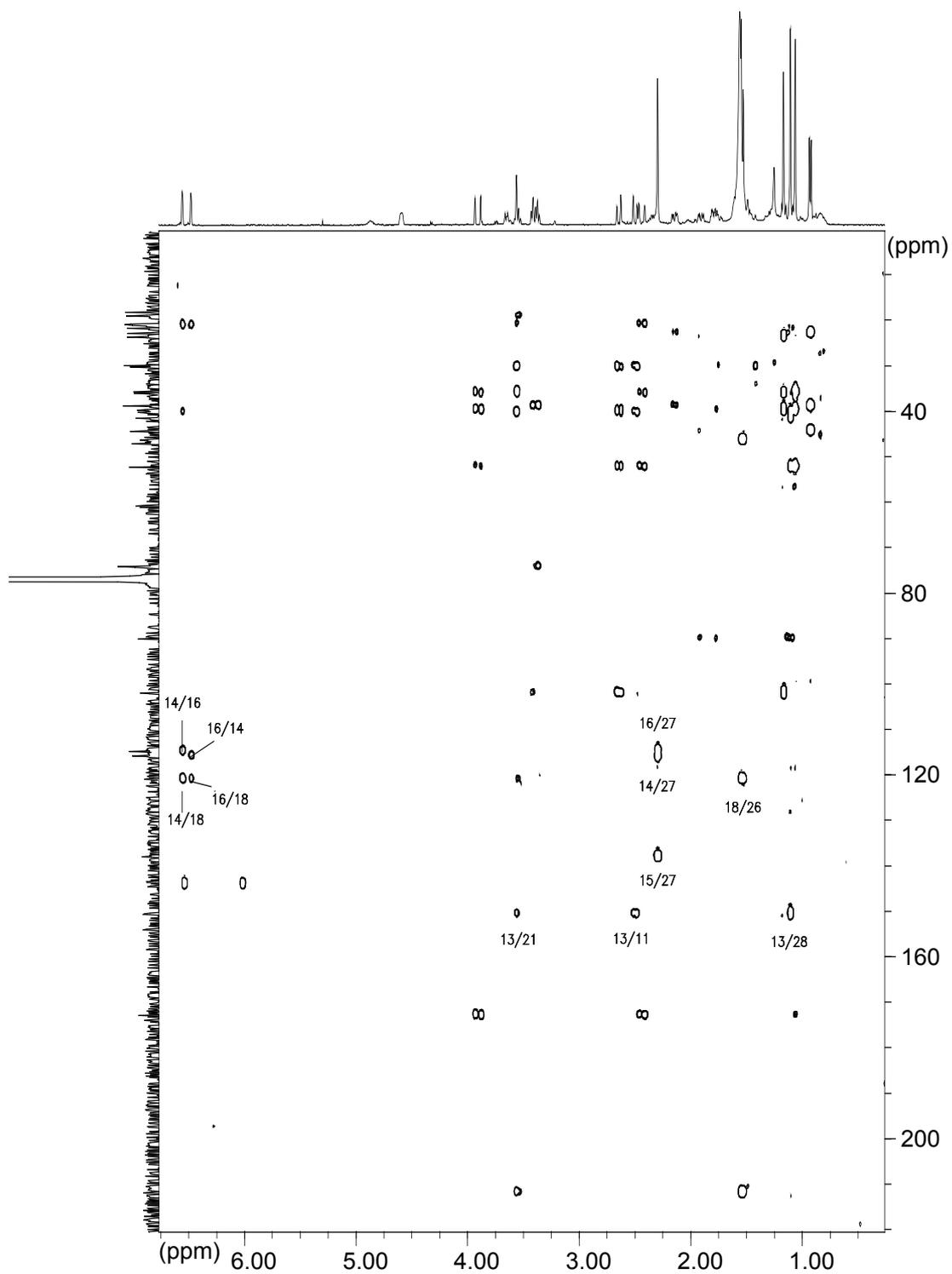
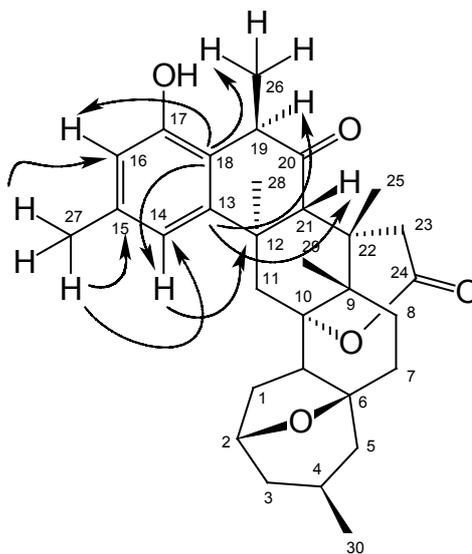


Figura 1.26.- HMBC del zoantenol

n° C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Mult.	J (Hz)
1	47.1	(α) 3.43	br d	6.8
		(β) 3.38	dd	6.8 ; 6.5
2	74.2	4.60	m	-
3	38.8	(α) 1.60	ddd	3 ; 4 ; 11.8
		(β) 1.50	ddd	3 ; 10.3 ; 11.8
4	22.8	2.33	m	-
5	44.3	(α) 2.15	dd	4.8 ; 13
		(β) 1.12	dd	12 ; 13
6	90.0	-	-	-
7	29.9	(α) 1.77	ddd	3 ; 4 ; 13
		(β) 1.93	ddd	4 ; 13 ; 13
8	23.6	(α) 1.80	ddd	3 ; 4 ; 13
		(β) 1.59	ddd	4 ; 13 ; 13
9	39.8	-	-	-
10	102.0	-	-	-
11	41.5	(α) 2.51	d	14.1
		(β) 2.65	d	14.1
12	40.4	-	-	-
13	150.5	-	-	-
14	115.8	6.56	s	-
15	138.0	-	-	-
16	114.8	6.49	s	-
17	154.1	-	-	-
18	120.5	-	-	-
19	46.3	3.56	m	-
20	212.0	-	-	-
21	52.3	3.57	s	-
22	36.1	-	-	-
23	35.8	(α) 3.91	d	20.2
		(β) 2.44	d	20.2
24	172.7	-	-	-
25	20.9	1.07	s	-
26	19.0	1.55	d	6.5
27	21.2	2.30	s	-
28	30.3	1.11	s	-
29	18.2	1.17	s	-
30	21.7	0.94	d	6.4

Tabla 1.6. RMN ^1H y ^{13}C del zoantenol (**25**).

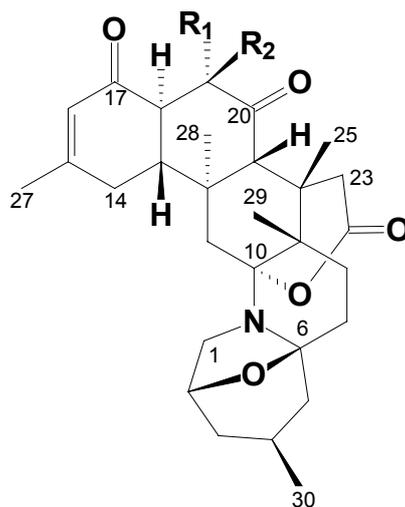
establecían que la señal de carbono situada a δ_{C} 154.1 debía ser asignada al C-17 (Figuras 1.25 y 1.26).

Figura 1.25.- Principales correlaciones observadas en el HMBC del zoantenol (**25**).

La estereoquímica relativa de los centros quirales presentes en el zoantenol (**25**) fue propuesta basandonos en las correlaciones dipolares observadas en el experimento ROESY y que coinciden con los propuestos para la norzoantamina (**9**).

I. 2B. 7.- Oxizoantamina (**26**) y epioxizoantamina (**27**)

La oxizoantamina (**26**) y epioxizoantamina (**27**) fueron aisladas como sólidos amorfos de color blanquecino, con $[\alpha]_D^{25} = -0.66^\circ$ (c 0.9, CHCl_3) y $[\alpha]_D^{25} = -17.5^\circ$ (c 0.24, CHCl_3), respectivamente. Para ambos, la fórmula molecular fue establecida como $\text{C}_{30}\text{H}_{40}\text{O}_6\text{N}$ por espectrometría de masas, observandose un ion a m/z 511 correspondiente al ion molecular.



Oxizoantamina (26): R₁= H; R₂= CH₂OH
Epioxizoantamina (27): R₁= CH₂OH; R₂=H

Sus espectros de RMN ¹³C confirmaban los datos anteriores y permitían establecer en las moléculas la presencia de cinco metilos, diez metilenos, seis metinos y nueve carbonos cuaternarios, destacando al compararlos con la zoantamina (**3**), la existencia de un metileno a δ_C 61.0 en la oxizoantamina (**26**) y a δ_C 60.6 en la epioxizoantamina (**27**).

Los espectros ¹H RMN (**Figura 1.27**) muestran modificaciones en la zona de bajas frecuencias siendo lo más significativo la presencia de dos protones situados a δ_H 3.91 y 3.99 en oxizoantamina (**26**) y δ_H 3.63 y 4.11 en epioxizoantamina (**27**), además de cambios en los desplazamientos de los H-21, H-19, H-18 y H-13.

En ambos casos los espectros HMQC confirman que los dos nuevos protones pertenecen efectivamente a un metileno que se encuentra formando un sistema **■-CH₂-OH**.

En el experimento COSY de la oxizoantamina (**26**) (**Figura 1.28**) se observa que los sistemas ABX formados por los protones centrados a δ_H 3.99 (H-26, ddd, $J = 6.5, 7.5, 11.1$ Hz) y δ_H 3.91 (H-26', ddd, $J = 4.2, 4.2, 11.1$ Hz) se correlacionan con la señal situada a δ_H 3.07 (H-19; ddd, $J = 4.2, 6.4, 6.5$ Hz), que a su vez se correlaciona con la señal situada a δ_H 2.79 (H-18; dd, $J = 6.3, 13$ Hz). La secuencia continúa llevándonos al protón H-13, situado a δ_H 2.58 (ddd, $J = 5.3, 11, 13$ Hz) y finalmente a los protones de C-14 (δ_H 2.26 y 2.23) fácilmente identificables como tales por comparación con la espectroscopía de la norzoantamina (**9**), a través de sus correlaciones con los C-15 y C-16 en el experimento HMBC. De ésta manera quedaba establecida la presencia de un hidroximetilo sobre C-19.

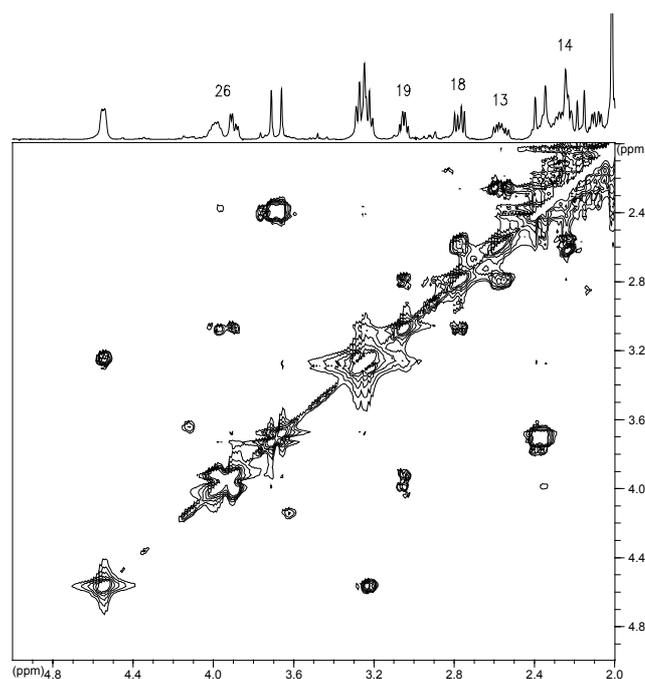


Figura 1.28.- COSY de la oxizoantamina (**26**).

Una vez realizados los experimentos COSY y HMBC de la epioxizoantamina (**27**) y al compararlos con los de la oxizoantamina (**26**) se llegaba a la misma estructura plana. Las diferencias más importantes fueron observadas en los

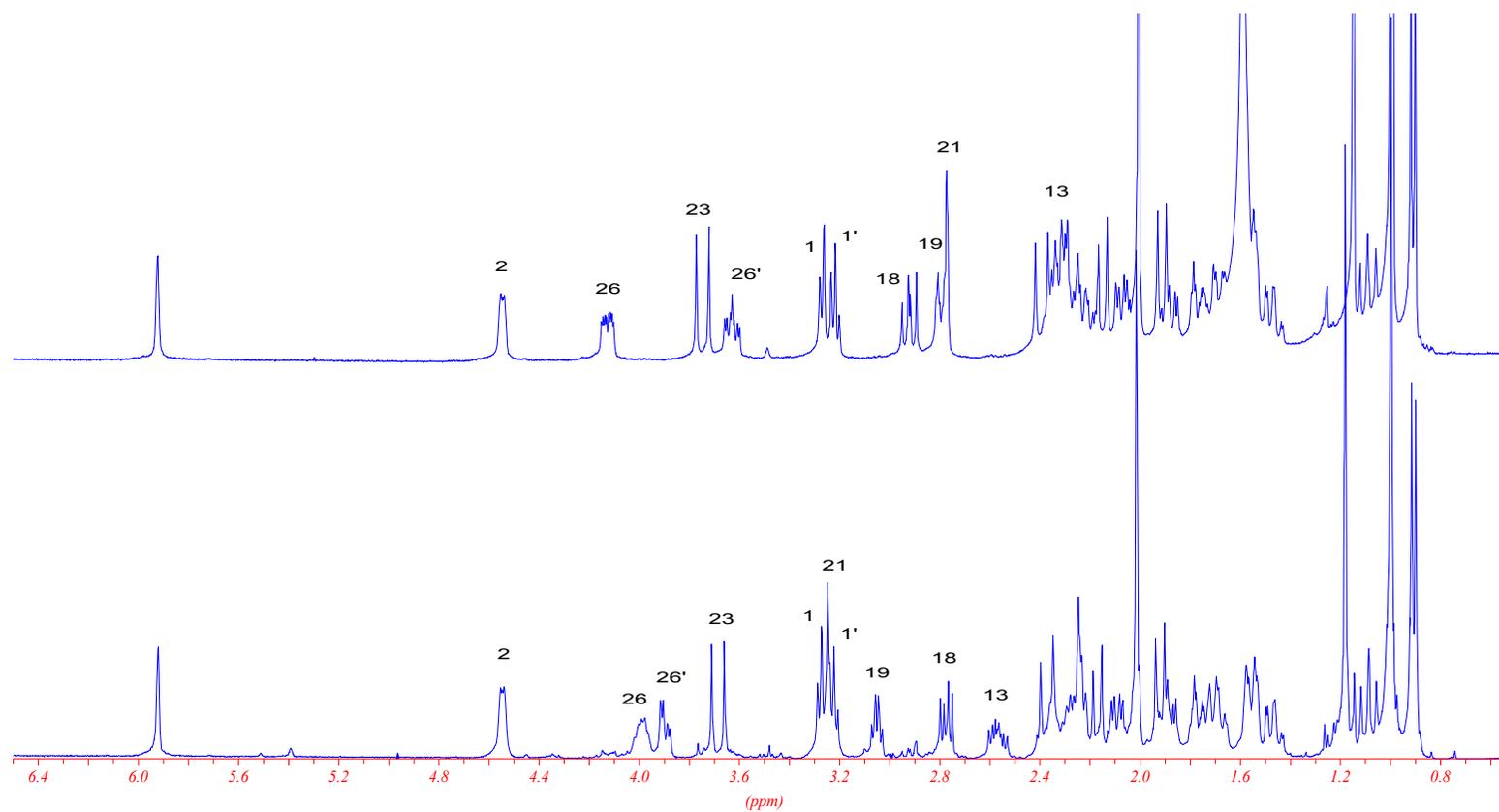


Figura 1.27.- Espectros ^1H de la oxizantamina y de la epioxizantamina.

desplazamientos químicos y en las constantes de acoplamiento de los protones H-18 (δ_H 2.91, dd, $J = 10$ y 13 Hz); H-19 (δ_H 2.80, ddd, $J = 2.6, 3.5$ y 10 Hz) y H-26 (δ_H 3.63, ddd, $J = 3.5, 9, 11.8$ Hz; δ_H 4.11, ddd, $J = 2.6, 5.4$ y 11.8 Hz). La constante de acoplamiento J_{18-19} que tiene un valor de 6.4 Hz en la oxizoantamina (**9**) se ve modificada a un valor de 10 Hz en éste compuesto, hecho que nos induce a pensar que ambas moléculas se diferenciaban en un cambio en la estereoquímica del C-19.

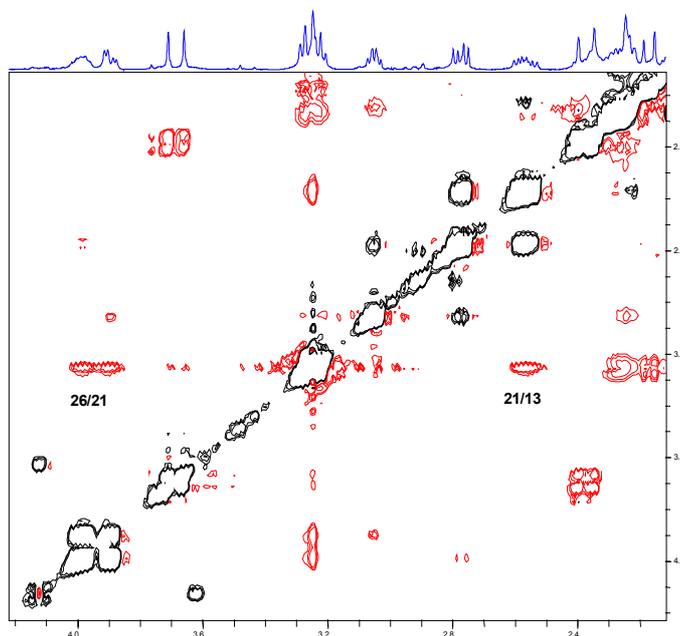


Figura 1.29.- ROESY de la Oxizoantamina (26)

La estereoquímica de ambos compuestos se estableció en base a los datos del experimento ROESY. En el mismo se observan correlaciones dipolares entre H-21 con H-13 y H-26 por lo fue establecida como S* para el C-19 para la oxizoantamina (**26**) y R* para la epioxizoantamina (**27**) ya que se observan correlaciones entre H-21 con H-13 y H-19 (Figura 1.29 y 1.30). La estereoquímica relativa del resto de los centros

quirales presentes en ambas moléculas C-2, C-4, C-6, C-9, C-10, C-12, C-13, C-18, C-21 y C-22 es idéntica a la observada en la norzoantamina (9).

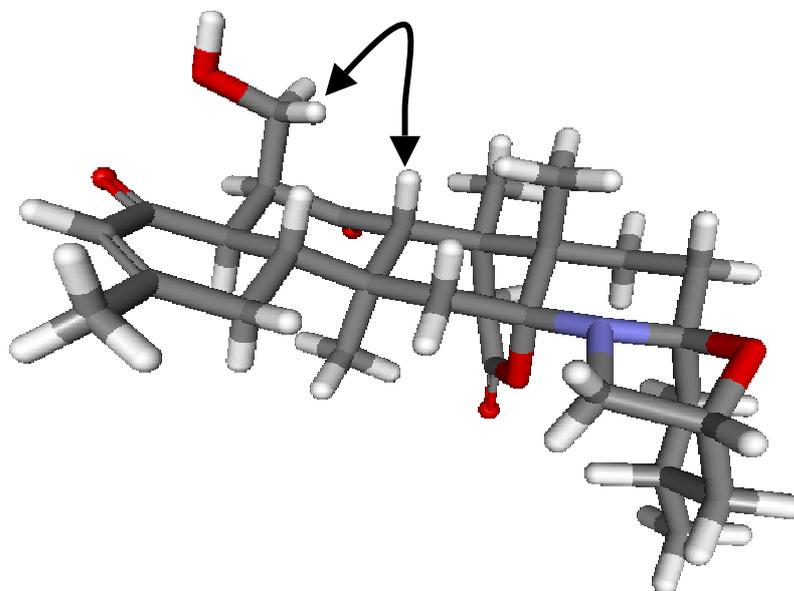
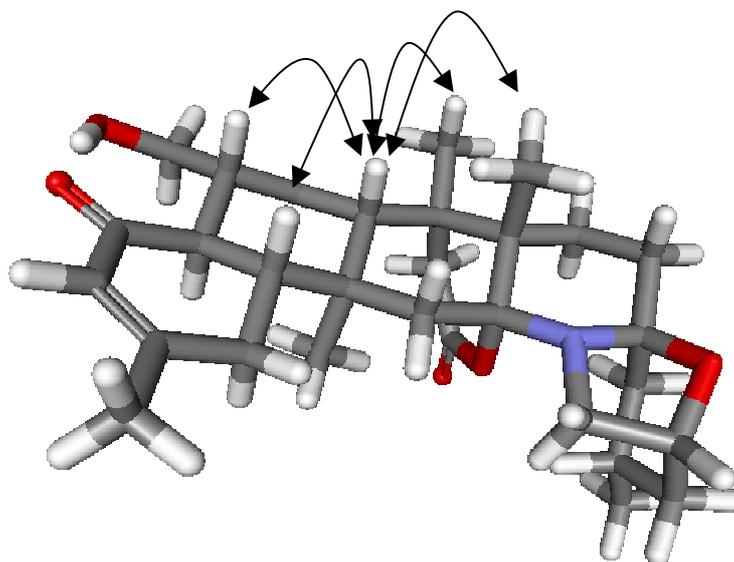


Figura 1.30.- Correlaciones ROE más importantes observadas en la oxizoantamina (26) y en la epioxizoantamina (27).



Oxizoantamina					Epioxizoantamina			
n° C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Mult	J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Mult	J (Hz)
1	47.2	(α) 3.29	br d	6.4	47.1	(α) 3.27	br d	6.5
		(β) 3.24	dd	6.4 ; 6.3		(β) 3.22	dd	6.5 ; 6.5
2	73.7	4.54	m	-	74.2	4.55	m	-
3	38.8	(α) 1.55	ddd	3.4 ; 4.5 ; 12	38.8	(α) 1.57	ddd	4.5 ; 3 ; 12
		(β) 1.47	ddd	3 ; 11.3 ; 12		(β) 1.47	ddd	3 ; 12 ; 12
4	22.9	2.28	m	-	22.9	2.26	m	-
5	44.4	(α) 2.10	dd	5.1 ; 12.8	44.2	(α) 2.08	dd	5 ; 12.9
		(β) 1.09	dd	12 ; 12.8		(β) 1.09	dd	11.8 ; 12.9
6	89.8	-	-	-	89.9	-	-	-
7	29.9	(α) 1.76	ddd	4 ; 4 ; 13	29.9	(α) 1.78	ddd	3 ; 4 ; 13
		(β) 1.90	ddd	4.5 ; 13 ; 13		(β) 1.89	ddd	4 ; 13 ; 13
8	23.7	(α) 1.70	ddd	4 ; 13 ; 13	23.6	(α) 1.71	ddd	4 ; 13 ; 13
		(β) 1.58	ddd	4 ; 4.5 ; 13		(β) 1.58	ddd	3 ; 4 ; 13
9	39.9	-	-	-	39.9	-	-	-
10	101.6	-	-	-	101.4	-	-	-
11	42.2	(β) 1.92	d	13.8	42.4	(β) 1.91	d	14.0
		(α) 2.17	d	13.8		(α) 2.14	d	14.0
12	39.1	-	-	-	39.8	-	-	-
13	49.9	2.57	ddd	5.3 ; 11 ; 13	53.3	2.23	ddd	5.4 ; 11 ; 13
14	31.2	(α) 2.26	dd	13 ; 11	32.9	(α) 2.27	dd	13 ; 11
		(β) 2.23	dd	5.3 ; 13		(β) 2.20	dd	5.4 ; 13
15	160.9	-	-	-	159.2	-	-	-
16	126.4	5.91	s	-	125.8	5.93	s	-
17	198.5	-	-	-	198.9	-	-	-
18	47.5	2.79	dd	6.4 ; 13	48.3	2.91	dd	10 ; 13
19	53.9	3.07	ddd	4.2 ; 6.4 ; 6.5	51.6	2.80	ddd	2.6 ; 3.5 ; 10
20	210.0	-	-	-	211.1	-	-	-
21	56.4	3.23	s	-	58.8	2.78	s	-
22	36.3	-	-	-	36.6	-	-	-
23	36.1	(α) 3.70	d	20.3	35.8	(α) 3.75	d	20.3
		(β) 2.39	d	20.3		(β) 2.39	d	20.3
24	172.5	-	-	-	172.2	-	-	-
25	20.7	1.00	s	-	21.1	1.00	-	-
26	61.0	3.91	ddd	4.2 ; 4.2 ; 11.1	60.6	4.11	ddd	2.6 ; 5.4 ; 11.8
		3.99	ddd	6.5 ; 7.5 ; 11.1		3.63	ddd	3.5 ; 9 ; 11.8
27	24.4	2.02	s	-	23.9	2.01	s	-
28	18.7	1.00	s	-	18.7	0.99	s	-
29	18.4	1.18	s	-	18.4	1.15	s	-
30	21.7	0.90	d	6.5	21.8	0.92	d	6.5
-OH		2.33	dd	4.2 ; 7.5		2.31	dd	5.4 ; 9

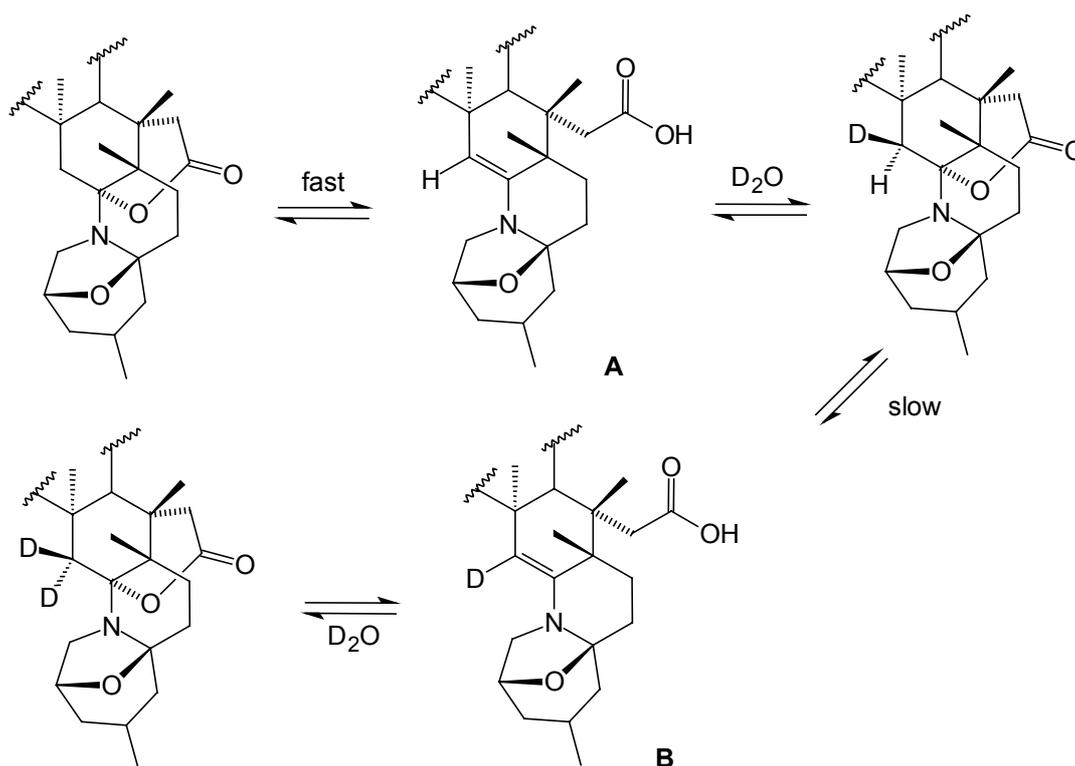
Tabla 1.7. RMN ^1H y ^{13}C de la oxizoantamina (26) y de la epioxizoantamina (27).

I. 2B. 8.- Equilibrios de intercambio en la posición C-11

Un hecho que nos pareció interesante fue el que tanto la oxizoantamina (25) como la epioxizoantamina (26) mostraron junto con la diasterotopidad de los protones del metileno 26, diferentes constantes de acoplamiento con el H-19. Esto podría ser debido a que la rotación alrededor del enlace C-19/C-26 se viese restringida como consecuencia de la formación de un enlace por puente de hidrógeno. Por este motivo decidimos realizar un experimento de intercambio de deuterio.

Después de la adición de D_2O a la muestra, se produjo un intercambio rápido del protón del grupo hidroxilo, pese a lo cual la diasterotopidad de los H-26 se mantenía. Sin embargo, observamos un sorprendente intercambio por deuterio de los protones H-11. Muy rápido en el caso del protón centrado a δ_{H} 1.91, ya que en menos de 5 minutos se había intercambiado casi en su totalidad y que fue identificado como H-11 β gracias a la correlación ROE que muestra con el Me-29. Y otro intercambio más lento para la señal situada a δ_{H} 2.14 (H-11 α) donde la desaparición total de la misma se alcanza en un plazo de aproximadamente 48 horas (**Esquema 1.5**). Seguidamente, el compuesto de partida completamente protonado, pudo ser obtenido de nuevo después del tratamiento de la muestra C-11D $_2$ con una mezcla de MeOH/H $_2$ O.

Un experimento exactamente igual fue realizado con la norzoantamina (9), en el que se pudo observar el mismo comportamiento.



Esquema 1.5

Con el fin de verificar las observaciones realizadas en el experimento ¹H RMN, llevamos a cabo un estudio de la incorporación de deuterio a través de ¹³C RMN. Para ello utilizamos una muestra de norzoantamina (**9**) enriquecida en ¹³C, que había sido obtenida a partir de un experimento de adición de [1,2-¹³C₂] acetato sódico a cultivos del celentéreo *Zoanthus sp* establecidos en el laboratorio, en los que el patrón de enriquecimiento obtenido fue totalmente aleatorio.

Esta muestra enriquecida fue disuelta en CDCl₃ y a continuación se le añadió una gota de D₂O. De esta manera fue posible obtener los espectros de ¹H RMN y ¹³C RMN para la norzoantamina monodeuterada y bideuterada en la posición C-11. Asimismo se observaron desplazamientos isotópicos en las señales de los carbonos C-9 y C-12 de ³Δδ -0.03 ppm y ²Δδ -0.09 ppm respectivamente. (**Figura 1.31**)

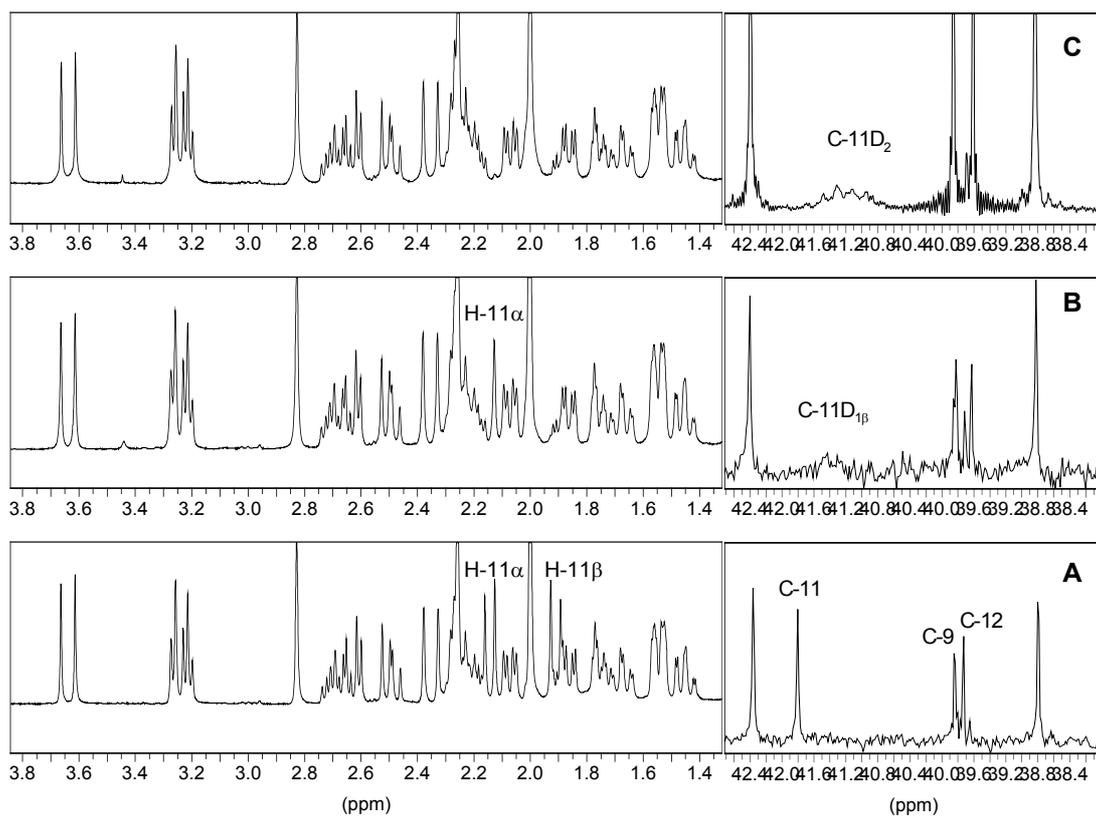
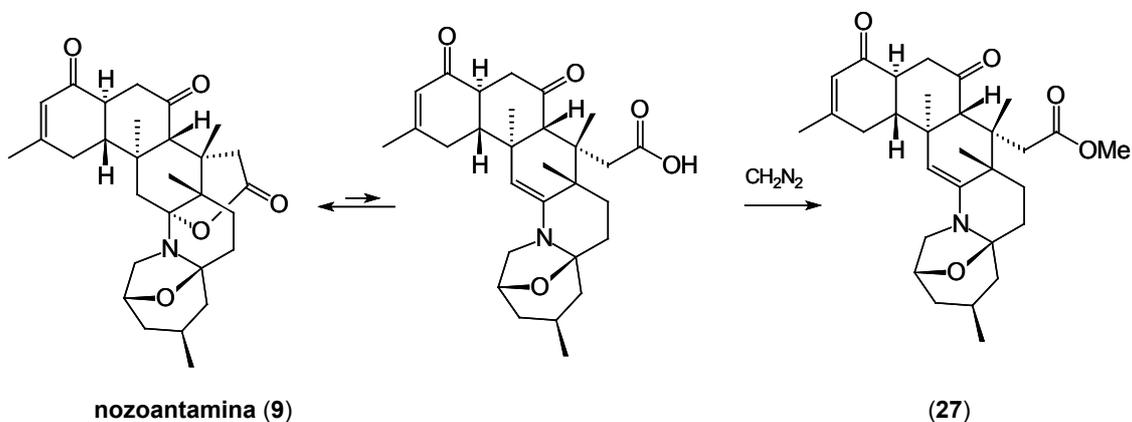


Figura 1.31.- Fragmento del espectro ^1H y ^{13}C NMR de norzoantamina enriquecida en ^{13}C ;
a) C-11H₂; b) C-11H α D β y c) C-11D₂

Este intercambio puede ser explicado por la existencia de un equilibrio en disolución entre la lactona y la enamina. Con el fin de verificar la existencia de este equilibrio, una disolución etérea de la norzoantamina (**9**) fue tratada con diazometano y después de 5 minutos se obtuvo como único producto del ester metílico de la norzoantamina (**27**). **Esquema 1.6.** y **Figura 1.32.**



Esquema 1.6. Tratamiento de la norzoantamina con diazometano.

Este experimento con D₂O fue llevado a cabo con todos los nuevos alcaloides aislados produciéndose un resultado idéntico en la norzoantamina (**9**), 3-hidroxinorzoantamina (**21**), 30-hidroxinorzoantamina (**22**), zoantenol (**23**) y los ya mencionados oxizoantamina (**25**) y epioxizoantamina (**26**). Por el contrario, los compuestos 11-hidroxinorzoantamina (**22**) y 11-hidroxizoantamina (**23**) no muestran este tipo de intercambio en la posición C-11. Este hecho refuerza la hipótesis propuesta en el **esquema 5** para explicar este fenómeno en esta serie de alcaloides, donde debe existir necesariamente un equilibrio en disolución entre las formas de lactona y enamina. Este equilibrio comienza con la eliminación *anti*, más favorecida en el protón H-11 β , para dar la forma **A** con un grupo carbonilo libre, que incorpora un átomo de deuterio cuando se reestablece la lactona. Debido al efecto isotópico en los enlaces C-H y C-D, el protón H-11 α se elimina de forma preferente para obtener la enamina **B**, que al recuperar la lactona da lugar al compuesto totalmente deuterado en la posición C-11. En los compuestos 11-hidroxinorzoantamina (**22**) y 11-hidroxizoantamina (**23**) no es posible realizar este intercambio ya que la posición 11 β se encuentra bloqueada por la presencia de un grupo hidroxilo.

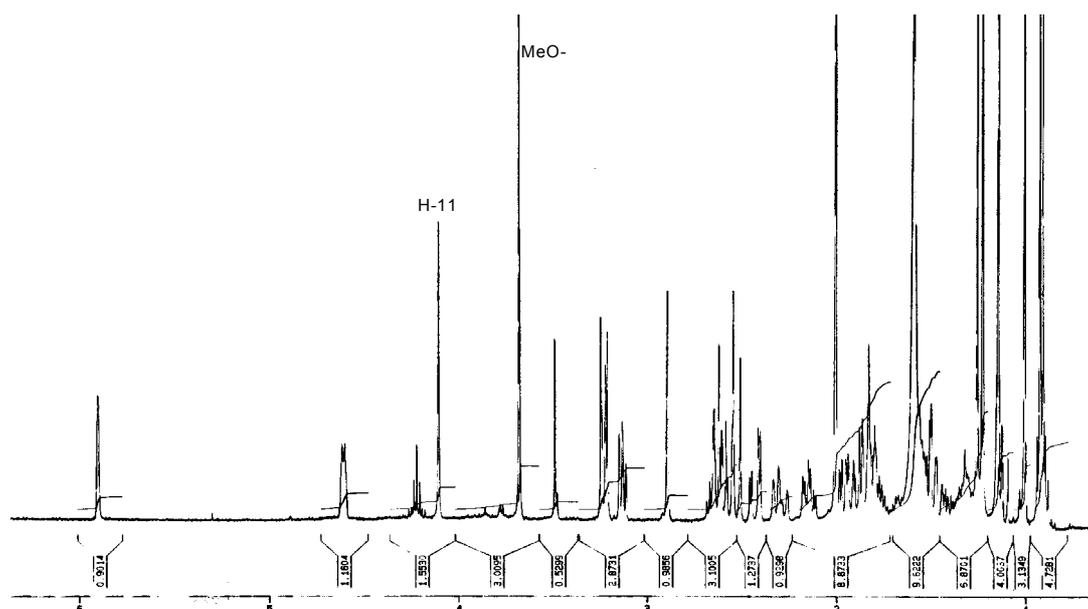


Figura 1.32.- Espectro ¹H RMN del ester metílico de la norzoantamina

I. 2C.- EXPERIMENTOS BIOSINTÉTICOS REALIZADOS SOBRE *ZOANTHUS SP.*

Para llevar a cabo estos experimentos el primer paso fue la recolección de pólipos de *Zoanthus* de una manera lo menos agresiva posible. Los especímenes recolectados fueron llevados rápidamente al laboratorio donde se mantuvieron en recipientes de 1L de capacidad, conteniendo unos 300 mL de agua de mar esterilizada por filtración (0.22 μ m) y burbujeando aire también estéril (0.22 μ m).

El primer experimento realizado consistió en añadir el precursor marcado, [1,2-¹³C] acetato sódico, hasta conseguir una concentración 10 mM en el medio. Después de 5 días, se recogieron los pólipos, se extrajeron y se purificó la norzoantina (9) siguiendo el protocolo ya descrito. El estudio del espectro de carbono obtenido mostraba el alto grado de enriquecimiento de la muestra pero en ningún caso de manera selectiva. Teniendo en cuenta que en el medio se encuentran gran número de bacterias, pues los pólipos no están estériles, podría haber ocurrido que estas hubiesen metabolizado el precursor generando otras sustancias enriquecidas que luego podrían haber sido utilizadas por el celentéreo.

A la luz de estos resultados, decidimos repetir el experimento pero ahora inyectando (1-2 μ L) del precursor directamente en cada uno de los pólipos cada 24 horas durante una semana, pero nuevamente se observó un enriquecimiento aleatorio de la muestra.

Dado que existen antecedentes de que los pólipos de *Zoanthus* incorporan glicina al metabolismo de proteínas y lípidos,¹³ decidimos usar [¹³C₂] glicina de las dos

¹³ Reimer, A. *Comp. Biochem. Physiol.* **1971**, 39, 743

formas anteriormente descritas, sin embargo, el grado de incorporación fue menor que en el caso anterior y de nuevo fue aleatoria.

Finalmente decidimos llevar a cabo un experimento de adición de [$^{13}\text{C}_6$] glucosa pero tampoco conseguimos una incorporación distintiva, siendo los resultados obtenidos igualmente aleatorios.

I. 2D.- ESTUDIO FARMACOLÓGICO.

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 metabolitos anteriormente citados, 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 fueron dirigidos en este sentido.

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

I. 2C. 1.- Evaluación de la actividad citotóxica.

Los ensayos de actividad citotóxica se realizaron, utilizando una adaptación del método descrito por Bergeron y colaboradores,¹³ 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 Minimum 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 estreptomina (0.1 g/L). 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

¹³ Bergeron, R.K.; Cavanaugh, P.F.; Kline, S.J.; Hughes Jr, R.G.; Elliott, G.T.; Porter, C.W. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, **1984**, 121(3), 848

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-respuesta 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.

Los resultados de estos ensayos de citotoxicidad quedan resumidos en la **tabla 1.8.**

I. 2C. 2.- Actividad inhibitoria enzimática *in vitro*.

De forma simultánea, al haber firmado la empresa Biomar S.A., un proyecto de trabajo con la fundación ONCE, también fueron evaluadas las actividades inhibitorias frente a Aldosa reductasa de esta serie de alcaloides.¹⁴ Desafortunadamente ninguno de los metabolitos ensayados mostraron actividad significativa.

¹⁴ a) Nishimura, Ch.; Yamaoka, T.; Mizutani, M.; Yamashita, K.; Akera, T.; Tanimoto, T. *Biochim. Biophys. Acta*, **1991**, 1078, 171. b) Rink, H.; Baumstark-Khan, C. "*Manual of Oculotoxicity*". Eds. Hockwin, O.; Green, K.; Rubin, L.F.; Gustav Fisher Verlag, Stuttgart, Germana, **1992**, p 389.

Compuestos	IC ₅₀			
	P388	A549	HT29	MEL28
n°	μg/mL	μg/mL	μg/mL	μg/mL
12 Oxizoantamina	>10	>10	>10	>10
21 3-Hidroxinorzoantamina	>10	>10	>10	>10
22 30-Hidroxinorzoantamina	>10	>10	>10	>10
23 11-Hidroxinorzoantamina	>10	>10	>10	>10
24 11-hidroxizoantamina	>10	>10	>10	>10
25 Zoantenol	>10	>10	>10	>10
27 Epioxizoantamina	>10	>10	>10	>10

Tabla 1.8. Valores de IC₅₀ correspondientes a los alcaloides aislados de *Zoanthus sp.*

I. 3.- PARTE EXPERIMENTAL

I. 3A.- TECNICAS EXPERIMENTALES GENERALES

I. 3A. 1.- Resonancia Magnética Nuclear

Para la realización de los experimentos de RMN, los productos fueron disueltos en CDCl_3 , usando la señal del CHCl_3 residual (7.26 ppm) como referencia interna. Dichos espectros, tanto de ^1H como de ^{13}C , fueron realizados en espectrómetros BRUKER®, AMX 400, AVANCE 300 y 400 MHz según las necesidades. Se utilizaron los programas ^1H , ^{13}C , DEPT, TOCSY-1D, GOESY, COSY, COSY DQF, TOCSY, ROESY, HMBC, HMQC, HSQC que fueron suministrados por la casa BRUKER®. Los datos de adquisición obtenidos en el espectrómetro fueron procesados en un PC usando el programa WIN-NMR.

I. 3A. 2.- Infrarrojo

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

I. 3A. 3.- Masas

Los espectros de masas de baja y alta resolución fueron realizados en un espectrómetro VG-Autospec FISIONS.

Rotación óptica

Las determinaciones de las actividades ópticas se realizaron en un polarímetro PERKIN-ELMER®, modelo 241, a 25°C, usando la línea D del sodio y en disolución de cloroformo o éter seco usando células de 1 dm.

I. 3A. 5.- Cromatografía de gel-filtración

Para este tipo de cromatografía se usó como soporte 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)

I. 3A. 6.- Cromatografía en columna

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 se 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 usado para formar el lecho. La relación de peso de producto/peso de gel de sílice, fue siempre superior a 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 una bomba de émbolo, FLUID METERING® modelo RP-SY. En este procedimiento, la relación peso de mezcla de productos / peso de gel de sílice, fue como mínimo de 1/200.

En los últimos estadios del aislamiento la cromatografía se realizó en columnas preempaquetadas LOBAR® GRÖBE B (310-25) LICHROPREP RP 18 (40-63 µm) de la casa MERCK® y bombas de media presión.

I. 3A. 7.- Cromatografía HPLC

En este tipo de cromatografía se utilizó un sistema de HPLC compuesto por una bomba HPLC LKB[®], modelo 2248, con columnas μ -Bondapak C-18 (D.I. 1.9 cm, longitud 15 cm) y Spherisorb (D.I. 0.65 cm; longitud 30 cm) usando un detector de fotodiodo 2MD RAPID SPECTRAL, LKB[®].

I. 3A. 8.- 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) Pulverización sobre la placa de una disolución de $H_2SO_4:H_2O:AcOH(1:4:20)$ y posterior calentamiento a $140^\circ C$.
- b) Pulverización sobre la placa de una disolución de Vainillina(3g) : $AcOH(40mL) : H_2SO_4(30mL) : EtOH(450mL)$ y posterior calentamiento a $140^\circ C$.
- c) Pulverización sobre la placa de una disolución del reactivo de Dragendorff $KI(0.11M) : AcOH(3.5M) : 4BiNO_3(OH)_2(0.6mM)$.
- d) Visualización de la placa a la exposición de luz UV(254nm).

Las cromatografías fueron eluidas en un sistema formado por la mezcla Cloroformo:Metanol (95:5).

I. 3B.- RECOLECCIÓN Y EXTRACCIÓN DEL CELENTEREO *ZOANTHUS SP.*

La recolección principal del celentéreo fue realiza en Punta del Hidalgo, Tenerife, durante el mes de Enero de 1996. Posteriormente se realizaron otras recolecciones en diferentes épocas del año sin que se observaran diferencias en su composición química. La recolección se realizó a mano durante la bajamar, tras lo cual

se llevó inmediatamente a nuestro laboratorio. Una vez separada de otros organismos con los que es inevitablemente recogida, la muestra fue macerada con una mezcla de acetona:metanol (1/1) a temperatura ambiente hasta agotamiento. La muestra no pudo ser pesada pues está fuertemente adherida a las rocas. La reunión de los extractos así obtenidos fue evaporada al vacío obteniéndose un extracto de aspecto oleoso y de color marrón verdoso que pesó 7.75 g.

I. 3C.- MARCHA CROMATOGRÁFICA DEL EXTRACTO

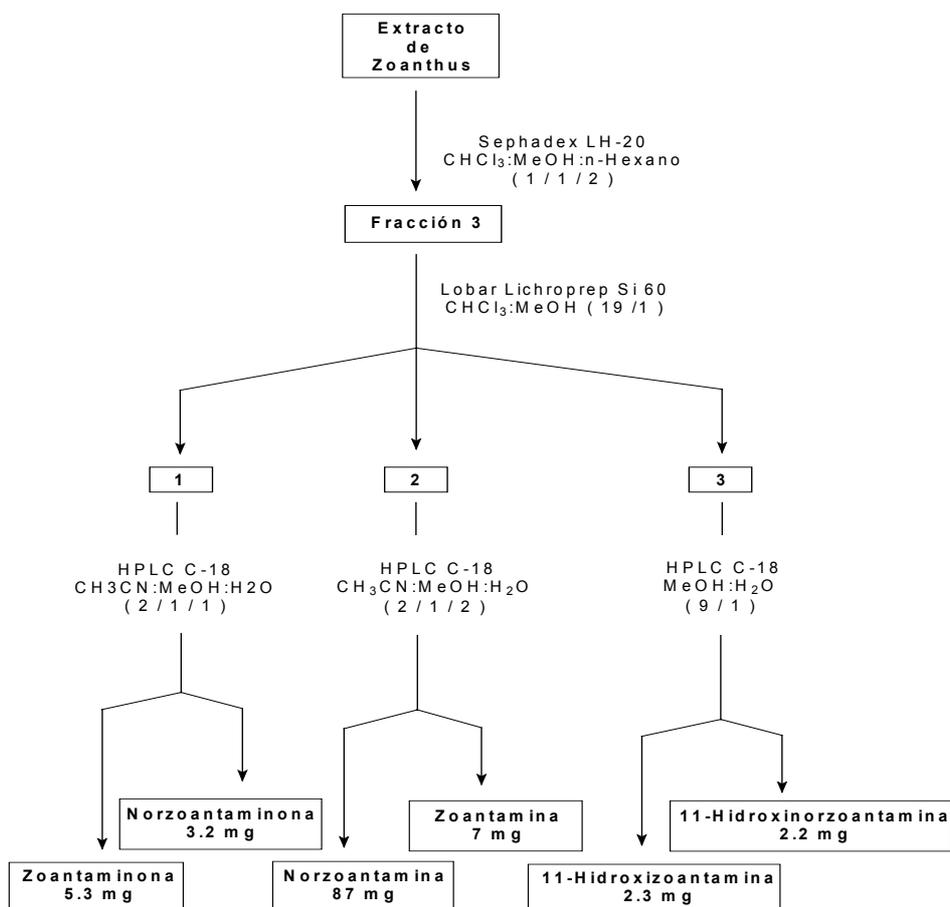
El extracto fue cromatografiado en cuatro porciones en una columna de Sephadex LH-20 de D.I. 7 cm x 60 cm de longitud, que se preparó dejando en maceración durante un día 700 g de fase estacionaria con metanol. A continuación la columna se estabilizó con el eluyente que se utilizaría como fase móvil, Cloroformo:Metanol:n-Hexano (1:1:2). Se recogieron fracciones de 25 mL, correspondiendo los metabolitos descritos en esta memoria, a las fracciones eluidas entre los 750 mL y 1000 mL (fracción 3) por un lado y entre los 1000 mL y los 1250 mL (fracción 4) por otro.

Después de la evaporación del disolvente, el residuo obtenido en ambos casos, fue cromatografiado en una columna Lobar Lichroprep Si 60 (D.I. 2.5 cm, longitud 31 cm) usando como eluyente inicialmente una mezcla de cloroformo: metanol 19:1, hasta llegar a la proporción 9:1, recogiendo fracciones de 10 mL.

Estudio de la fracción 3

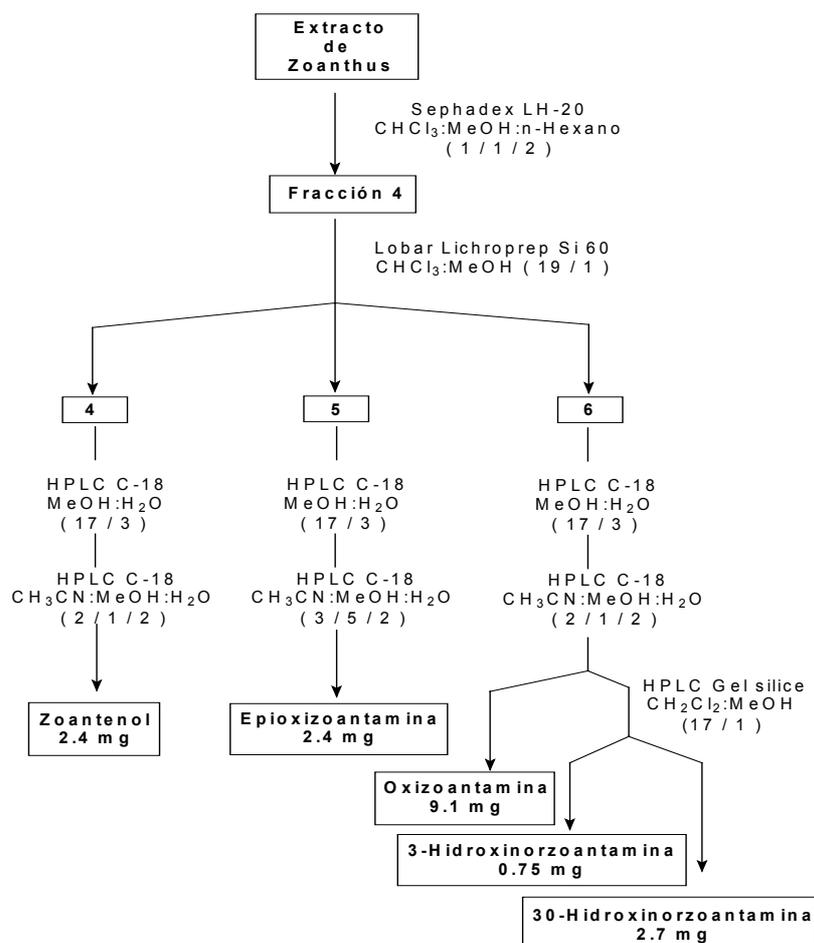
Resultado de las cromatografías anteriores, en el caso de la fracción 3, se separaron tres mezclas de alcaloides. Para la purificación de estos alcaloides fue necesario recurrir en todos los casos a la cromatografía HPLC de fase reversa usando

en todos los casos una columna μ -Bondapak C-18 variando la composición de la fase móvil según las necesidades en cada caso. La pareja de alcaloides que eluye en primer lugar en la cromatografía de gel de sílice, está formada por la norzoantaminona (**10**) (3.2 mg) y la zoantaminona (**8**) (5.3 mg), y para su separación se eluyó con una mezcla ternaria compuesta por CH₃CN:MeOH:H₂O (2:1:1). Para separar la segunda mezcla norzoantamina (**9**) (87 mg) y zoantamina (**3**) (7 mg) la fase móvil hubo de ser modificada, usando en este caso CH₃CN:MeOH:H₂O (2:1:2) como eluyente. La tercera mezcla estaba compuesta por la 11-hidroxinorzoantamina (**23**) (2.2 mg) y la 11-hidroxizoantamina (**24**) (2.3 mg) y fue separada por HPLC usando ahora MeOH:H₂O (9:1) como fase móvil.



Estudio de la fracción 4

A partir de esta fracción se obtuvieron 5 alcaloides, para cuya purificación se procedió en todos los casos a un primera cromatografía de HPLC usando una columna μ -Bondapak C-18 eluyendo con una mezcla MeOH:H₂O (17:3). Después de este primer paso común, se obtuvo el zoantenol (**25**) (2.4 mg) que fue purificado con un sistema CH₃CN:MeOH:H₂O (2:1:2), la epioxizoantamina (**26**) (2.4mg) para la que cambiamos las proporciones de la mezcla CH₃CN:MeOH:H₂O (3:5:2) y finalmente una mezcla compleja formada por oxizoantamina (**12**) (9.1 mg), 3-hidroxinorzoantamina (**21**) (0.75 mg) y 30-hidroxinorzoantamina (**22**) (2.7 mg) para cuya separación fue necesario un primer paso a través de la columna de fase reversa usando CH₃CN:MeOH:H₂O (2:1:2) y un segundo paso por una columna μ -Porasil de gel de sílice usando CH₂Cl₂:MeOH (19:1)



DATOS FÍSICOS DE LA ZOANTAMINA (3)

Sólido cristalino.

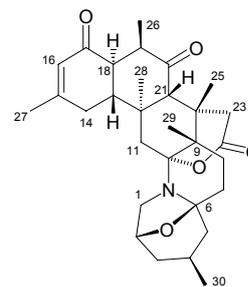
p.f. :306-308 °C

$[\alpha]_D^{25} = +18^\circ$ (c 0.4, CHCl₃)

UV λ_{\max} : 233nm (CH₃CN)

IR ν_{\max} (CHCl₃): 3020, 1720, 1660 cm⁻¹

RMN ¹H y ¹³C (CDCl₃):

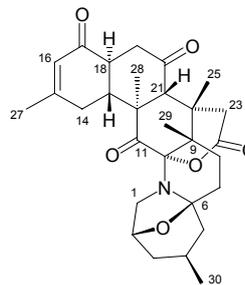


n° C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	J (Hz)
1	47.2	(α) 3.29 (β) 3.24	m dd	7 6; 7
2	74.2	4.56	m	-
3	38.8	(α) 1.56 (β) 1.48	ddd ddd	4; 12 2; 12; 13
4	24.5	2.28	m	-
5	44.4	(α) 2.10 (β) 1.10	dd dd	4; 13 13; 13
6	89.8	-	-	-
7	30.6	(α) 1.76 (β) 1.87	m m	- -
8	23.7	(α) 1.89 (β) 1.60	ddd ddd	4; 13; 14 3; 5; 14
9	40.1	-	-	-
10	101.6	-	-	-
11	41.9	(α) 2.17 (β) 1.92	d d	14 14
12	34.9	-	-	-
13	45.8	2.42	m	-
14	29.9	2.23	m	-
15	159.9	-	-	-
16	126.8	5.92	s	-
17	197.2	-	-	-
18	48.0	2.66	dd	5; 13
19	48.0	3.0	dq	5; 7
20	212.0	-	-	-
21	53.8	3.22	s	-
22	39.5	-	-	-
23	35.9	(α) 3.67 (β) 2.37	d d	20 20
24	172.5	-	-	-
25	18.4	1.00	s	-
26	13.8	1.17	d	7
27	22.9	2.01	s	-
28	20.7	0.98	s	-
29	18.3	1.20	s	-
30	21.8	0.92	d	7

HRMS: 495.2969 (calc. 495.2985, C₃₀H₄₁NO₅)

DATOS FÍSICOS DE LA ZOANTAMINONA (8)

Sólido cristalino.

 $[\alpha]_D^{25} = +30^\circ$ (c 0.1, CHCl₃)UV λ_{\max} : 234 nm (MeOH)IR ν_{\max} (CHCl₃): 3020, 1765, 1725, 1670 cm⁻¹RMN ¹H y ¹³C (CDCl₃):

n° C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	J (Hz)
1	48.1	(α) 3.00 (β) 3.99	m dd	- 7.4; 8.0
2	74.5	4.53	m	-
3	38.5	(α) 1.55 (β) 1.45	m ddd	- 2.8; 11.3; 12
4	24.5	2.28	m	-
5	44.0	(α) 1.02 (β) 1.83	m m	- -
6	90.6	-	-	-
7	30.9	(α) 1.76 (β) 1.87	m m	- -
8	24.2	(α) 1.89 (β) 1.60	m m	- -
9	43.5	-	-	-
10	103.4	-	-	-
11	202.7	-	-	-
12	36.8	-	-	-
13	45.7	2.89	ddd	4; 11.6; 13.6
14	29.9	(α) 3.27 (β) 2.10	dd dd	4; 17.8 11.6; 17.8
15	162.1	-	-	-
16	125.8	5.89	s	-
17	197.7	-	-	-
18	48.6	2.58	dd	5.3; 13.6
19	48.6	3.01	m	-
20	210.5	-	-	-
21	53.8	3.34	s	-
22	38.5	-	-	-
23	35.2	(α) 4.12 (β) 2.53	d d	20.4 20.4
24	171.0	-	-	-
25	17.2	1.01	s	-
26	13.5	1.15	d	6.6
27	22.9	2.01	s	-
28	20.8	0.97	s	-
29	15.9	1.26	s	-
30	21.7	0.88	d	6.5

HRMS: 509.2882 (calc. 509.2863, C₃₀H₃₉NO₆)

DATOS FÍSICOS DE LA NORZOANTAMINA (9)

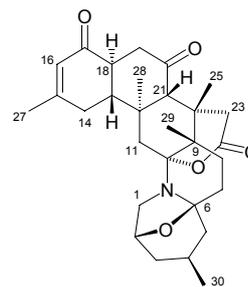
Sólido blanco amorfo

$[\alpha]_D^{25} = -3.8^\circ$ (c 0.4, CHCl₃)

UV λ_{\max} : 234 nm (EtOH)

IR ν_{\max} (CHCl₃): 3015, 2956, 1715, 1673, 1215 cm⁻¹

RMN ¹H y RMN ¹³C (CDCl₃):



n° C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	J (Hz)
1	53.1	(α) 3.27	d	6.5
		(β) 3.22	dd	6.5; 6.2
2	74.2	4.54	m	-
3	38.8	(α) 1.55	ddd	3.4; 4.5; 12
		(β) 1.46	ddd	3.0; 11.3; 12
4	22.9	2.22	m	-
5	44.4	(α) 2.09	dd	4.7; 12.7
		(β) 1.09	dd	12.1; 12.7
6	89.9	-	-	-
7	29.9	(α) 1.77	ddd	3; 4; 13
		(β) 1.89	ddd	4.7; 13; 13
8	23.6	(α) 1.69	ddd	4; 13; 13.7
		(β) 1.54	ddd	3; 4.7; 13.7
9	39.9	-	-	-
10	101.5	-	-	-
11	41.9	(α) 2.15	d	13.8
		(β) 1.92	d	13.8
12	39.7	-	-	-
13	53.0	2.19	ddd	5.6; 9.6; 12
14	31.9	2.25	m	-
15	159.8	-	-	-
16	125.6	5.92	s	-
17	198.4	-	-	-
18	46.4	2.72	dd	6.4; 12
19	42.4	(α) 2.65	dd	6.4; 14.7
		(β) 2.51	dd	11.3; 14.7
20	208.9	-	-	-
21	59.1	2.83	s	-
22	36.4	-	-	-
23	35.9	(α) 3.66	d	20.4
		(β) 2.37	d	20.4
24	172.4	-	-	-
25	18.4	1.00	s	-
26	-	-	-	-
27	24.2	2.01	s	-
28	21.0	1.00	s	-
29	18.3	1.18	s	-
30	21.7	0.88	d	7

HRMS: 481.2857(calc. 481.2828, C₂₉H₃₉NO₅)

DATOS FÍSICOS DE LA OXIZOANTAMINA (12)

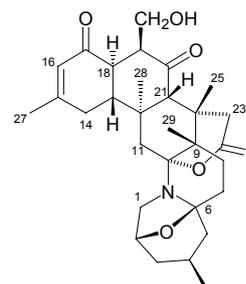
Sólido amorfo de color blanquecino.

$$[\alpha]_D^{25} = -0.66^\circ \text{ (c 0.91, CHCl}_3\text{)}$$

UV λ_{max} : 234 nm (EtOH)

IR ν_{max} (CHCl₃): 3684, 3020, 1711, 1663, 1521, 1214 cm⁻¹

RMN ¹H y ¹³C (CDCl₃):



n° C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	J (Hz)
1	47.2	(α) 3.29	br d	6.4
		(β) 3.24	dd	6.4; 6.3
2	73.7	4.54	m	-
3	38.8	(α) 1.55	ddd	3.4; 4.5; 12
		(β) 1.47	ddd	3; 11.3; 12
4	22.9	2.28	m	-
5	44.4	(α) 2.10	dd	5.2 ; 12.8
		(β) 1.09	dd	12; 12.8
6	89.8	-	-	-
7	29.9	(α) 1.76	ddd	4; 4; 13
		(β) 1.90	ddd	4.5; 13; 13
8	23.7	(α) 1.70	ddd	4; 13; 13
		(β) 1.58	ddd	4; 4.5; 13
9	39.9	-	-	-
10	101.6	-	-	-
11	42.2	(β) 1.92	d	13.8
		(α) 2.17	d	13.8
12	39.1	-	-	-
13	49.9	2.57	ddd	5.3; 11; 13
14	31.2	(α) 2.26	dd	13; 11
		(β) 2.23	dd	5.3; 13
15	160.9	-	-	-
16	126.4	5.91	s	-
17	198.5	-	-	-
18	47.5	2.79	dd	6.4; 13
19	53.9	3.07	ddd	4.2; 6.4; 6.5
20	210.0	-	-	-
21	56.4	3.23	s	-
22	36.3	-	-	-
23	36.1	(α) 3.70	d	20.3
		(β) 2.39	d	20.3
24	172.5	-	-	-
25	20.7	1.00	s	-
26	61.0	3.91	ddd	4.2; 4.2; 11.1
		3.99	ddd	6.5; 7.5; 11.1
27	24.4	2.02	s	-
28	18.7	1.00	s	-
29	18.4	1.18	s	-
30	21.7	0.90	d	6.5
-OH		2.33	dd	4.2; 7.5

HRMS: 511.29193 (calc. 511.29338, C₃₀H₄₁NO₆)

496.26631 (calc. 496.26991, C₂₉H₃₈NO₆)

DATOS FÍSICOS DE LA 3-HIDROXINORZOANTAMINA (21)

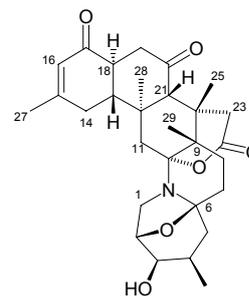
Sólido amorfo de color blanquecino.

$$[\alpha]_D^{25} = +12^\circ \text{ (c 0.075, Et}_2\text{O)}$$

UV λ_{max} : 234 nm (EtOH)

IR ν_{max} (CHCl₃): 3688, 3609, 2951, 1711, 1601, 1363 cm⁻¹

RMN ¹H y ¹³C (CDCl₃) :



n° C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	J (Hz)
1	45.0	(α) 3.17	br d	7.4
		(β) 3.25	dd	7; 7.4
2	78.4	4.51	br dd	3.3; 7
3	70.9	3.34	ddd	3.3; 3.3; 10
4	27.2	2.21	m	-
5	39.7	(α) 1.93	dd	5.1; 13.5
		(β) 1.23	dd	12.6; 13.5
6	90.2	-	-	-
7	29.6	(α) 1.78	ddd	3; 3.4; 12.4
		(β) 1.94	ddd	5; 12.4; 12.4
8	23.6	(α) 1.68	ddd	3.4; 12.4; 13.5
		(β) 1.58	ddd	3; 5; 13.5
9	40.1	-	-	-
10	100.8	-	-	-
11	41.8	(α) 1.94	d	13.8
		(β) 2.16	d	13.8
12	36.7	-	-	-
13	53.3	2.26	ddd	6; 11; 12
14	31.9	(α) 2.25	dd	13; 11
		(β) 2.23	dd	6; 13
15	159.8	-	-	-
16	125.6	5.93	s	-
17	198.4	-	-	-
18	46.4	2.72	ddd	6.4; 11.8; 12
19	42.3	(α) 2.66	dd	6.4; 14.2
		(β) 2.52	dd	11.8; 14.2
20	208.9	-	-	-
21	59.1	2.84	s	-
22	40.3	-	-	-
23	35.7	(α) 3.68	d	20.4
		(β) 2.38	d	20.4
24	172.2	-	-	-
25	20.9	1.01	s	-
26	-	-	-	-
27	24.2	2.02	s	-
28	18.4	1.01	s	-
29	18.3	1.18	s	-
30	16.6	0.98	d	6.9

HRMS: 497.27542 (calc. 497.27773, C₂₉H₃₉NO₆)

DATOS FÍSICOS DE LA 30-HIDROXINORZOANTAMINA (22)

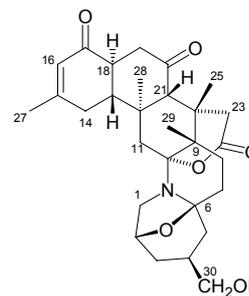
Sólido amorfo de color blanquecino.

$$[\alpha]_D^{25} = -1.1^\circ \text{ (c 0.27, CHCl}_3\text{)}$$

UV λ_{max} : 234 nm (EtOH)

IR ν_{max} (CHCl₃): 3600-3300, 2953, 2920, 2851, 1711, 1666 cm⁻¹

RMN ¹H y ¹³C (CDCl₃):



n° C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	J (Hz)
1	47.6	(α) 3.27	br d	6.5
		(β) 3.28	dd	6.5; 6.5
2	74.3	4.62	m	-
3	33.8	(α) 1.60	ddd	3; 4; 12
		(β) 1.58	ddd	3; 12; 12
4	31.6	2.46	m	-
5	39.1	(α) 2.16	dd	4.6; 13
		(β) 1.19	dd	12; 13
6	90.4	-	-	-
7	30.6	(α) 1.79	ddd	4; 4; 13
		(β) 1.89	ddd	4.5; 13; 13
8	24.2	(α) 1.68	ddd	4; 13; 13
		(β) 1.58	ddd	4; 4.5; 13
9	40.3	-	-	-
10	102.0	-	-	-
11	42.3	(α) 1.94	d	14.1
		(β) 2.16	d	14.1
12	40.2	-	-	-
13	53.5	2.24	ddd	6; 11; 12
14	32.3	(2H) 2.27	m	-
15	160.0	-	-	-
16	126.0	5.93	s	-
17	198.7	-	-	-
18	46.8	2.71	ddd	6.3; 11.3; 12
19	42.8	(α) 2.65	dd	6.3; 14
		(β) 2.51	dd	11.3; 14
20	209.2	-	-	-
21	59.5	2.84	s	-
22	36.9	-	-	-
23	36.3	(α) 3.69	d	20.3
		(β) 2.37	d	20.3
24	172.8	-	-	-
25	21.5	1.01	s	-
26	-	-	-	-
27	24.6	2.02	s	-
28	18.8	1.00	s	-
29	18.8	1.17	s	-
30	67.9	3.50	dd	6; 10.4
		3.44	dd	6.6; 10.4

HRMS: 497.27731 (calc. 497.27773, C₂₉H₃₉NO₆)

DATOS FÍSICOS DE LA 11-HIDROXINORZOANTAMINA (23)

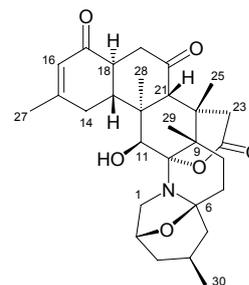
Sólido amorfo de color blanquecino.

$$[\alpha]_D^{25} = -11.5^\circ \text{ (c 0.13, Et}_2\text{O)}$$

UV λ_{max} : 234 nm (EtOH)

IR ν_{max} (CHCl₃): 3600-3300, 2954, 2925, 1715, 1668 cm⁻¹

RMN ¹H y ¹³C (CDCl₃):



n° C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	J (Hz)
1	45.4	(α) 3.23	br d	7
		(β) 3.83	dd	7; 7
2	74.1	4.61	m	-
3	38.6	(α) 1.60	ddd	3.4; 4.5; 12
		(β) 1.49	ddd	3; 11.3; 12
4	23.0	2.30	m	-
5	44.3	(α) 2.11	dd	4.9; 12.5
		(β) 1.10	dd	12.5; 12.5
6	91.3	-	-	-
7	30.0	(α) 1.78	ddd	4; 4; 13
		(β) 1.95	ddd	4.5; 13; 13
8	26.6	(α) 1.75	ddd	4; 13; 13
		(β) 1.55	ddd	4; 4.5; 13
9	40.4	-	-	-
10	107.8	-	-	-
11	67.4	4.27	s	-
12	45.1	-	-	-
13	49.1	2.92	ddd	3.5; 11.2; 13
14	32.2	(α) 2.25	dd	11.2; 17
		(β) 2.53	dd	3.5; 17
15	161.4	-	-	-
16	125.1	5.91	s	-
17	198.0	-	-	-
18	46.3	2.61	ddd	5.6; 12.5; 13
19	43.0	(α) 2.79	dd	5.6; 13.5
		(β) 2.46	dd	12.5; 13.5
20	209.5	-	-	-
21	55.0	3.00	s	-
22	37.0	-	-	-
23	36.7	(α) 3.82	d	20.4
		(β) 2.41	d	20.4
24	172.1	-	-	-
25	20.4	1.00	s	-
26	-	-	-	-
27	24.4	2.01	s	-
28	20.1	1.19	s	-
29	21.3	1.46	s	-
30	21.8	0.91	d	6.5

HRMS: 497.27819 (calc. 497.27773, C₂₉H₃₉NO₆)

DATOS FÍSICOS DEL ZOANTENOL (25)

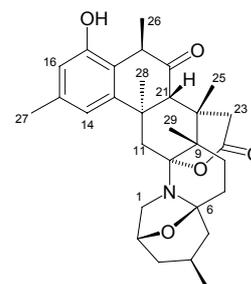
Sólido amorfo de color blanquecino.

$$[\alpha]_D^{25} = +7.1^\circ \text{ (c 0.24, CHCl}_3\text{)}$$

UV $_{\lambda_{\max}}$ (EtOH) = 204 nm (ϵ 4500); 276 nm (ϵ 300); 282 nm (ϵ 300).

IR ν_{\max} (CHCl₃): 3600-3300, 2963, 2925, 1714, 1681, 1258 cm⁻¹

RMN ¹H y ¹³C (CDCl₃):



n° C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	J (Hz)
1	47.1	(α) 3.43 (β) 3.38	br d dd	6.8 6.8; 6.5
2	74.2	4.60	m	-
3	38.8	(α) 1.60 (β) 1.50	ddd ddd	3; 4; 11.8 3; 10.3; 11.8
4	22.8	2.33	m	-
5	44.3	(α) 2.15 (β) 1.12	dd dd	4.8; 13 12; 13
6	90.0	-	-	-
7	29.9	(α) 1.77 (β) 1.93	ddd ddd	3; 4; 13 4; 13; 13
8	23.6	(α) 1.80 (β) 1.59	ddd ddd	3; 4; 13 4; 13; 13
9	39.8	-	-	-
10	102.0	-	-	-
11	41.5	(α) 2.51 (β) 2.65	d d	14.1 14.1
12	40.4	-	-	-
13	150.5	-	-	-
14	115.8	6.56	s	-
15	138.0	-	-	-
16	114.8	6.49	s	-
17	154.1	-	-	-
18	120.5	-	-	-
19	46.3	3.56	m	-
20	212.0	-	-	-
21	52.3	3.57	s	-
22	36.1	-	-	-
23	35.8	(α) 3.91 (β) 2.44	d d	20.2 20.2
24	172.7	-	-	-
25	20.9	1.07	s	-
26	19.0	1.55	d	6.5
27	21.2	2.30	s	-
28	30.3	1.11	s	-
29	18.2	1.17	s	-
30	21.7	0.94	d	6.4

HRMS: 493.28104 (calc. 493.28282, C₃₀H₃₉NO₅)

DATOS FÍSICOS DE LA EPIOXIZOANTAMINA (26)

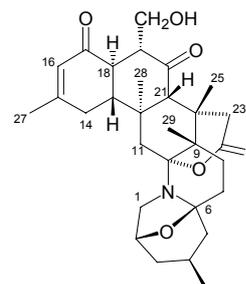
Sólido amorfo de color blanquecino.

$$[\alpha]_D^{25} = -17.5^\circ \text{ (c 0.24, CHCl}_3\text{)}$$

UV λ_{max} : 234 nm (EtOH)

IR ν_{max} (CHCl₃): 3694, 3010, 2956, 1705, 1675, 1248 cm⁻¹

RMN ¹H y ¹³C (CDCl₃):



n° C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	J (Hz)
1	47.1	(α) 3.27	br d	6.5
		(β) 3.22	dd	6.5; 6.5
2	74.2	4.55	m	-
3	38.8	(α) 1.57	ddd	4.5; 3; 12
		(β) 1.47	ddd	3; 12; 12
4	22.9	2.26	m	-
5	44.2	(α) 2.08	dd	5; 12.9
		(β) 1.09	dd	11.8; 12.9
6	89.9	-	-	-
7	29.9	(α) 1.78	ddd	3; 4; 13
		(β) 1.89	ddd	4; 13; 13
8	23.6	(α) 1.71	ddd	4; 13; 13
		(β) 1.58	ddd	3; 4; 13
9	39.9	-	-	-
10	101.4	-	-	-
11	42.4	(β) 1.91	d	14.0
		(α) 2.14	d	14.0
12	39.8	-	-	-
13	53.3	2.23	ddd	5.4; 11; 13
14	32.9	(α) 2.27	dd	13; 11
		(β) 2.20	dd	5.4; 13
15	159.2	-	-	-
16	125.8	5.93	s	-
17	198.9	-	-	-
18	48.3	2.91	dd	10; 13
19	51.6	2.80	ddd	2.6; 3.5; 10
20	211.1	-	-	-
21	58.8	2.78	s	-
22	36.6	-	-	-
23	35.8	(α) 3.75	d	20.3
		(β) 2.39	d	20.3
24	172.2	-	-	-
25	21.1	1.00	-	-
26	60.6	4.11	ddd	2.6; 5.4; 11.8
		3.63	ddd	3.5; 9; 11.8
27	23.9	2.01	s	-
28	18.7	0.99	s	-
29	18.4	1.15	s	-
30	21.8	0.92	d	6.5
-OH		2.31	dd	5.4; 9

HRMS: 511.29222 (calc. 511.29338, C₃₀H₄₁NO₆)

496.27402 (calc. 496.26991, C₂₉H₃₈NO₆)

I. 3D.- EVALUACION DE LA ACTIVIDAD CITOTOXICA

I. 3D. 1.- CULTIVOS DE CELULAS

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 linfóide 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 Minimum 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).

I. 3D. 2.- 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-respuesta 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.

Capítulo 2

II.1B.5.- Síndrome amnésico

II.1B.6.- Envenenamiento por cianobacterias

II.1B.7.- Miscelánea

II.1C.- Metabolitos de dinoflagelados no tóxicos

II. 1.- INTRODUCCIÓN

II. 1A.- CARACTERES GENERALES DE LAS MICROALGAS

Las microalgas juegan un importante papel en el ecosistema marino, pues su capacidad fotosintética hace de ellas las mayores productoras de biomasa y de compuestos orgánicos en los océanos. Esta introducción está orientada hacia la producción de metabolitos secundarios, por microalgas de origen marino.

Existen más de 5000 especies de microalgas marinas conocidas, clasificadas fundamentalmente en 5 divisiones:

- *Chlorophyta* (algas verdes)
- *Chrysophyta* (diatomeas, algas amarillas y marrón doradas)
- *Pyrrophyta* (dinoflagelados)
- *Euglenophyta*
- *Cyanophyta* (algas verde-azuladas)

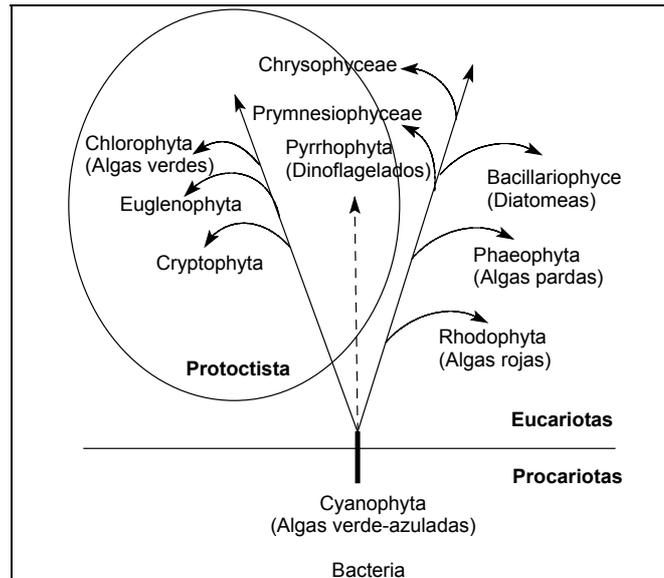


Figura 2.1

Las relaciones filogenéticas existentes entre la mayoría de los organismos citados se muestran en la **figura 2.1**. Sin embargo, tanto en estas relaciones como en la taxonomía, es algo en lo que los botánicos no están del todo de acuerdo. De hecho, la división *Cyanophyta* también conocida como algas verde-azuladas, es considerada por muchos dentro del grupo de las bacterias y no como algas por ser procariotas, pese a que son organismos fotosintéticos y comparten otras características con las algas.

Otro asunto pendiente para la taxonomía es si los organismos no fotosintéticos pueden ser incluidos en el reino vegetal o no, ya que por ejemplo muchos dinoflagelados no tienen clorofilas y son heterótrofos, por lo que también son clasificados como Protozoos dentro del reino animal, mientras que ciertos euglenoides a pesar de su capacidad fotosintética son incluidos en el reino animal. De hecho, los dinoflagelados ocupan una posición filogenética única, situados en la frontera entre los procariotas y los eucariotas, por lo que algunos autores los denominan “mesocariotes”.

Recientemente, se ha propuesto el reino *Protoctista* para incluir a todos aquellos organismos que no son ni plantas ni animales propiamente dichos. Dentro de este grupo se encuentran casi todos los organismos que se citarán a continuación.

Estas microalgas que se encuentran en los océanos, constituyen el alimento básico tanto para moluscos bivalvos como mejillones, ostras, vieiras, etc., o para las larvas de crustáceos que son cada vez más importantes desde el punto de vista comercial. En la mayoría de los casos la proliferación del fitoplancton (hasta millones de células por litro), beneficiosa para la acuicultura en general, puede tener efectos negativos en ciertas situaciones, ya que este crecimiento puede producir un importante impacto ambiental, pérdidas económicas y un problema para la salud pública.

De entre las aproximadamente 5000 especies de fitoplancton conocidas, son 300 las que en ocasiones pueden proliferar de manera descontrolada alcanzando niveles tan altos que producen coloración en la superficie del agua dando lugar al fenómeno conocido como "mareas rojas". De ellas sólo unas 40 tienen capacidad para producir toxinas, que a través de marisco y peces pueden llegar al hombre.¹⁵

La mayoría de las especies que originan estas mareas rojas, permanecen en forma de quistes que descansan entre los sedimentos marinos, donde pueden mantenerse durante años. Cuando las condiciones de temperatura, luz, concentración de nutrientes y salinidad del agua son las adecuadas, se produce la germinación de estos quistes dando lugar a una célula que se reproduce por división después de unos días. Si las condiciones se mantienen adecuadas, estas células continuarán dividiéndose exponencialmente, con lo que a partir de una única célula pueden originarse entre 6000 y 8000 células en el plazo de una semana. Cuando las condiciones dejan de ser favorables, el crecimiento se detiene y se forman los

gametos, dos de los cuales se unirán para formar una célula que dará lugar a un cigoto y posteriormente a un quiste, que volverá a descansar en el fondo del mar, listo para germinar cuando las condiciones vuelvan a ser propicias.

Si bien las "mareas rojas" son fenómenos completamente naturales, en los últimos 20 años su impacto económico y en la salud pública ha incrementado la atención hacia ellas observándose un aumento tanto en su frecuencia, como en su intensidad y distribución. Aunque este hecho ha sido objeto de numerosos debates, fundamentalmente son cuatro los motivos que pueden argumentarse para justificar este aparente incremento:

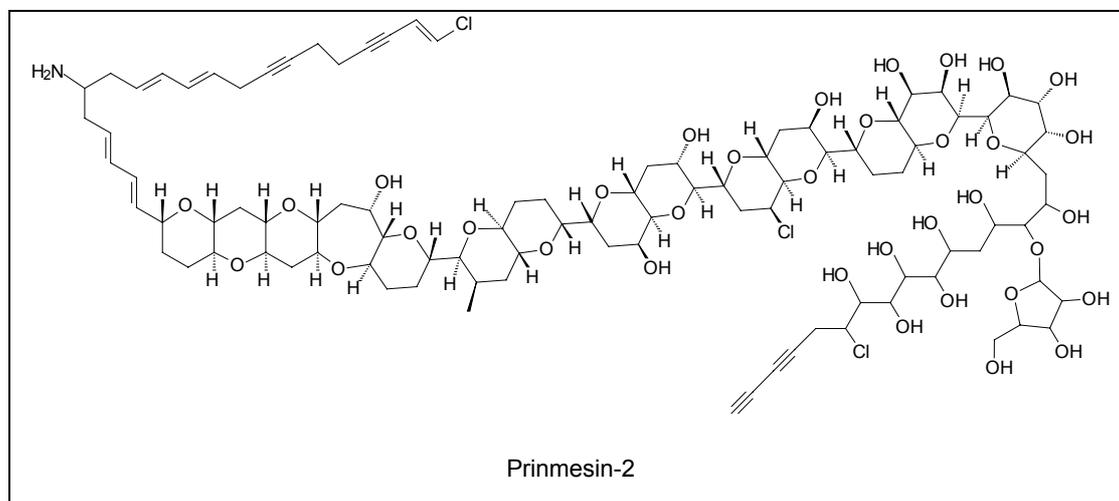
- La creciente preocupación científica por la detección de estos hechos.
- El creciente auge de la acuicultura.
- La eutrofización de las aguas y/o las condiciones climáticas cambiantes.
- El transporte de quistes por el arrastre de barcos pesqueros o asociados al movimiento del marisco de un área a otra distinta.

Básicamente estas "mareas rojas" pueden clasificarse en tres grandes grupos atendiendo a los problemas a los que dan lugar. Cronológicamente, el primero en hacerse aparente es el que integran aquellas especies no tóxicas que producen una coloración del agua ("...y las aguas del río se convirtieron en sangre. Los peces del río murieron y el río se hizo maloliente; los egipcios no podían beber de él." *Exodo 7:20-21*), pero que en determinadas condiciones su crecimiento puede llegar a ser tan importante que producen la muerte incontrolada de peces e invertebrados por anoxia, debida a la disminución del oxígeno disuelto en el agua durante la noche, o más comúnmente producida por la respiración bacteriana asociada a la descomposición de

¹⁵ Sournia, A.; Chretiennot, D.; Ricard, M. *J. Plankton Res.* **1991**, 13, 1093

los organismos muertos. Ejemplos de este tipo son los dinoflagelados *Gonyaulax polygramma*, *Noctiluca scintillans*, *Scrippsiella trochoidea*, y cianobacterias como *Trichodesmium erythraeum*.

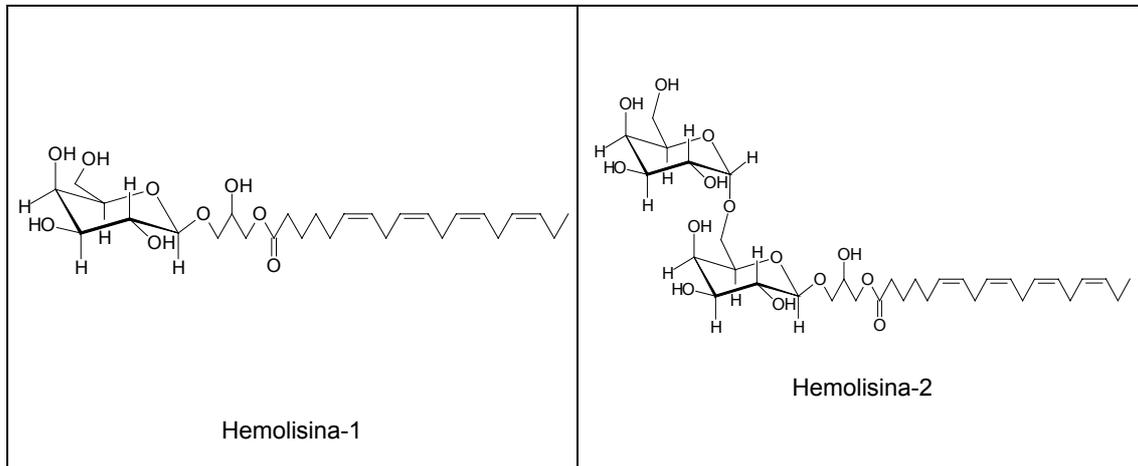
Un segundo grupo de reciente aparición, surge como resultado del creciente interés manifestado en la acuicultura. Se trata de especies que si bien no son tóxicas para el hombre, ni para los peces en libertad que pueden escapar de estas mareas rojas, sí lo son en las zonas de cultivo donde causan daños en sus branquias, bien mecánicamente o por la producción de sustancias hemolíticas. Recientemente se ha aislado a partir de cultivos de *Prymnesium parvum* una potente ictiotoxina, denominada primnesin-2,¹⁶ cuya existencia era conocida desde hace unos 30 años, pero que no había podido ser purificada con anterioridad dada la extrema dificultad que presentaba el hacerlo.¹⁷



¹⁶ Yasumoto, T.; Igarashi, T.; Satake, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 479.

¹⁷ Shilo, M.; Rosenberger, R. *Annals New York Academy of Sciences*, **1960**, 866.

Dentro de este grupo de ictiotoxinas, también podemos englobar a las hemolisinas aisladas a partir de *Amphidinium carteri*, con estructura de gliceroglicolípidos.¹⁸



Otros especies que englobamos dentro de este grupo son diatomeas como *Chaetoceros convolutus*, dinoflagelados como *Gymnodinium mikimotoi*, prymnesiofitos como *Chrysochromulina polylepis*, *Prymnesium parvum*, *P. patelliferum*, rafidoficeos como *Heterosigma carterae* o *Chattonella antiqua* que produjo en Japón en 1972 la pérdida de 500 millones de dólares por la muerte masiva de peces.

En último lugar tenemos el grupo compuesto por aquellas especies que producen potentes toxinas que pueden llegar al hombre a través de la cadena alimentaria, causando una amplia variedad de síntomas gastrointestinales y neurológicos, que detallaremos a continuación.

II.1B.- MICROALGAS TOXICAS

Atendiendo a la sintomatología que producen en el hombre los metabolitos secundarios producidos por estas microalgas podemos distinguir seis grandes grupos:

¹⁸ Yasumoto, T.; Seino, N.; Oshima, Y.; Murata, M. *Biol. Bull.* **1987**, 172, 128.

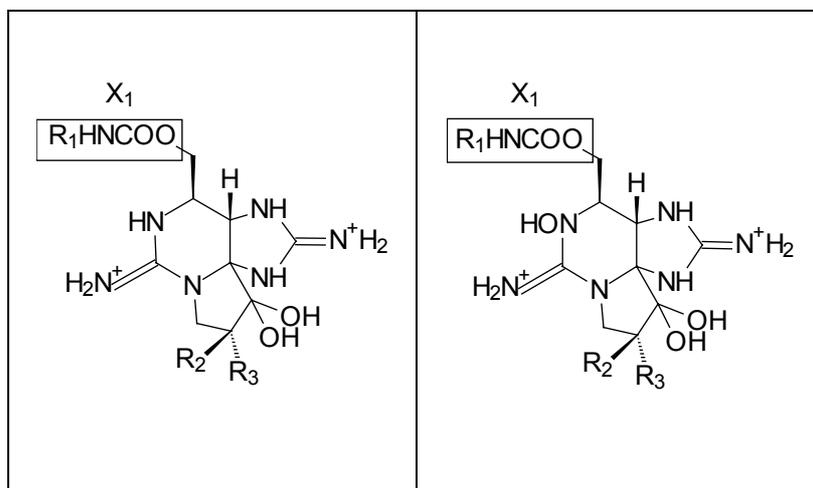
las que producen *Síndrome Paralítico*, *Ciguatera*, *Síndrome Diarréico*, *Síndrome Neurotóxico*, *Síndrome Amnésico* y *Envenenamiento por cianobacterias*.

II.1B. 1.- Síndrome paralítico (*PSP*, *Paralitic Shellfish Poisoning*)



- Agentes causales: *Alexandrium* spp., *Gymnodinium catenatum*, *Pyrodinium bahamense*.
- Toxinas producidas: Saxitoxinas.

La saxitoxina (STX) fue la sustancia que se reconoció como agente causal del *Síndrome Paralítico (PSP)* y también la primera molécula cuyo origen fue atribuido al plancton.¹⁹ Posteriormente, más de una docena de estos compuestos han sido aislados de los dinoflagelados *Alexandrium* spp., *G. catenatum* y *P. bahamense*.²⁰ Estructuralmente estas toxinas pueden ser divididas en dos grandes grupos, el de la saxitoxina (**1**) - (**11**) y el de la neosaxitoxina (**12**) - (**18**).



¹⁹ Sommer, H.; Meyer, K.F. *Arch. Pathol.* **1937**, 24, 560.

²⁰ Shimizu, Y. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*; Herz, W., Grisebach, H., Kirby, G. W., Eds.; Springer: New York, **1984**, 235.

1 $R_1=R_2=R_3=H$ Saxitoxina	12 $R_1=R_2=R_3=H$ Neosaxitoxina
2 $R_1=R_2=H, R_3=OSO_3^-$	13 $R_1=R_2=H, R_3=OSO_3^-$
3 $R_1=R_3=H, R_2=OSO_3^-$	14 $R_1=R_3=H, R_2=OSO_3^-$
4 $R_1=SO_3^-, R_2=R_3=H$	15 $R_1=SO_3^-, R_2=R_3=H$
5 $R_1=SO_3^-, R_2=H, R_3=OSO_3^-$	16 $R_1=SO_3^-, R_2=H, R_3=OSO_3^-$
6 $R_1=SO_3^-, R_2=OSO_3^-, R_3=H$	17 $R_1=SO_3^-, R_2=OSO_3^-, R_3=H$
7 $X_1=OH, R_2=H, R_3=OSO_3^-$	18 $R_1=OH, R_2=R_3=H$
8 $X_1=OH, R_3=H, R_2=OSO_3^-$	
9 $R_1=R_2=R_3=H$	
10 $R_1=R_2=H, R_3=OSO_3^-$	
11 $R_1=R_3=H, R_2=OSO_3^-$	

Así mismo, estas toxinas también son producidas por el alga verde-azulada de agua dulce *Aphanizomenon flos-aquae*, hecho este que fue aprovechado para estudiar su biogénesis.²¹ Hoy en día se sugiere que el origen de las saxitoxinas es bacteriano, de forma análoga a la tetrodotoxina, hipótesis que se ve apoyada por el aislamiento de STX a partir de cultivos de la bacteria *Moraxella sp.* que fue aislada en cultivos de *Alexandrium tamarense*.²²

El síndrome paralítico puede ser mortal.²³ Los síntomas son únicamente neurológicos y de comienzo rápido, dentro de los primeros 30 minutos se manifiestan hormigueos en la cara y en el cuello, cosquilleo en los dedos, dolor de cabeza, fiebre, náuseas y vómitos. En los casos más severos, se produce parálisis muscular y dificultad respiratoria que puede llevar a la muerte del individuo dentro de las 24 horas que siguen al consumo del marisco contaminado. No existe hasta el momento un antídoto para esta intoxicación, este hecho unido a su gravedad hace que existan programas de prevención que consisten en determinar los niveles de estas toxinas en el marisco de consumo humano.

²¹ Shimizu, Y.; Norte, M.; Hori, A., Genenah, A.; Kobayashi, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 6433.

²² Kodama, M.; Ogata, T.; Sakamoto, S.; Sato, S.; Honda, T.; Miwatani, T. *Toxicon*, **1990**, 28, 707.

²³ Jan, Ch.; Lee, E. *Ann. Acad. Med. Singapor*, **1986**, 77.

II.1B.2.- Síndrome ciguatérico (*CFP, Ciguatera Fish Poisoning*)



- Agentes causales: *Gambierdiscus toxicus*, *Prorocentrum spp.?*, *Ostreopsis spp.?*, *Coolia monitis?*, *Thecadinium sp.?* y *Amphidinium carterae?*
- Toxinas producidas: Ciguatoxinas, Maitotoxina, Palitoxina? y Gambierol?.

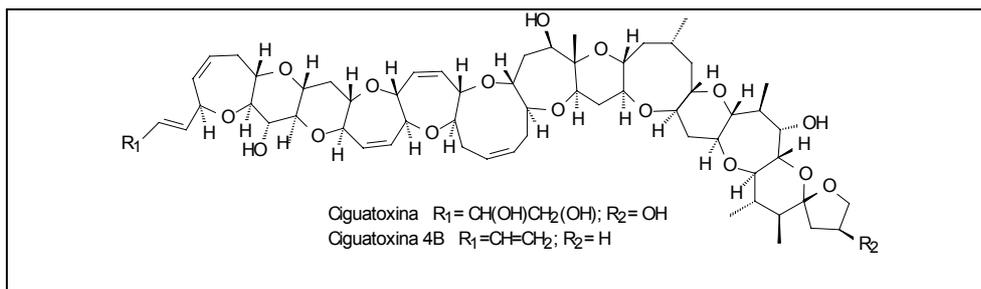
La ciguatera es un envenenamiento causado por la ingestión de pescado que se ha convertido en tóxico a través de su dieta y que habita en arrecifes coralinos de áreas circuntropicales. Dos son los principales grupos de toxinas responsables de este envenenamiento, las ciguatoxinas (CTX) y la maitotoxina, producidas por el dinoflagelado epífito *Gambierdiscus toxicus*. La ciguatoxina, principal responsable de este síndrome, fue aislada por primera vez en 1980,²⁴ si bien su estructura no se conoció completamente hasta 1989,²⁵ fecha desde la cual han sido aislados numerosas toxinas relacionadas.²⁶ Es interesante el hecho de que los metabolitos con mayor grado de oxidación (la ciguatoxina por ejemplo) se encuentran en organismos que están en lo alto del ecosistema coralino pero no en los dinoflagelados, lo que sugiere que son los sistemas enzimáticos de los peces los encargados de realizar la transformación en metabolitos más oxidados cuya toxicidad es generalmente mayor, sirva de ejemplo la CTX, once veces más tóxica que su posible precursor la CTX-4B.



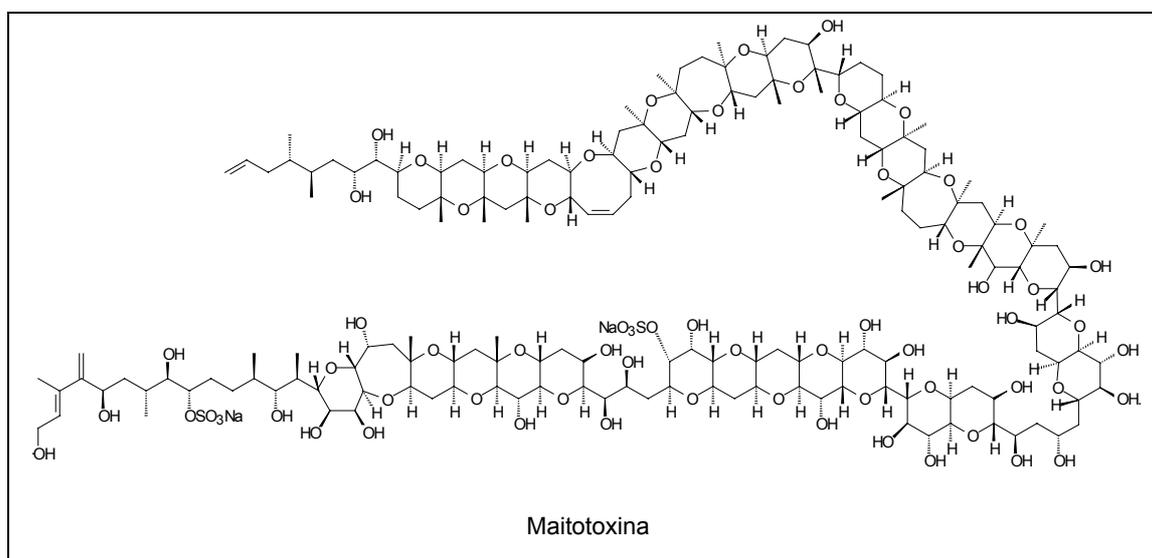
²⁴ Takahashi, J.; Tsutsumi, J.; Yoshida, T.; Scheuer, P.J. *Science*, **1976**, 155, 1267.

²⁵ Murata, M.; Legrand, A.M.; Ishibashi, Y.; Yasumoto, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 8927.

²⁶ Legrand, A-M.; Teai, T.; Cruchet, P.; Satake, M.; Murata, K.; Yasumoto, T. *Harmful Algae*, Eds. Reguera, B.; Blanco, J.; Fernández, M.L.; Wyatt, T. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO **1998**, p 473.



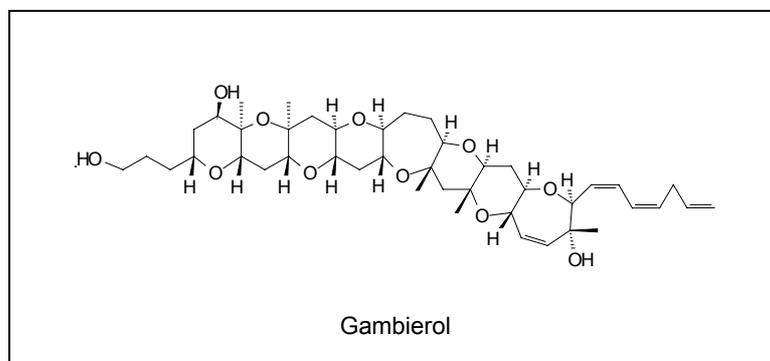
La maitotoxina ha despertado interés básicamente por tres razones: La primera, tiene un peso molecular de 3422 Da (como sal disódica) lo que hace que sea el producto natural conocido de mayor peso si exceptuamos los biopolímeros.²⁷ Así para la determinación de la estructura tridimensional de la molécula fue necesario el uso de experimentos 3D NOESY-HMQC de una muestra enriquecida en ¹³C.^[28] En segundo lugar por su papel en la ciguatera y finalmente por su bioactividad pues probablemente es la toxina no protéica conocida más potente ($\text{LD}_{50} = 50 \text{ ng/kg, ip}$). Hoy sabemos que esta toxina activa los canales de Ca^{2+} voltaje independientes provocando la entrada de Ca^{2+} extracelular a través de la membrana.



²⁷ Yokoyama, A.; Murata, M.; Oshima, Y.; Iwashita, T.; Yasumoto, T. *J. Biochem.* **1988**, 104, 184.

²⁸ Satake, M.; Ishida, S.; Yasumoto, T.; Murata, M.; Utsumi, H.; Hinomoto, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 7019.

Otra toxina implicada en este fenómeno es el gambierol, aislado a partir de *G. toxicus*,²⁹ que muestra efectos tóxicos similares a los mostrados por las ciguatoxinas.



Asimismo, se ha encontrado palitoxina en ciertos peces tropicales lo que sugiere su implicación en algunos casos de ciguatera.³⁰ La palitoxina, una de las toxinas marinas más potentes y de mayor complejidad, apareció por primera vez asociada a celentéreos (zoantidos) del género *Palythoa*. Posteriormente, se han aislado a partir de cultivos del dinoflagelado *Ostreopsis siamensis* una serie de toxinas denominadas ostreocinas que guardan una estrecha relación estructural con la palitoxina.³¹ Sin embargo, no puede afirmarse que este dinoflagelado sea el productor de la palitoxina pues el contenido de toxina en los pólipos no está relacionado con la cantidad de algas simbiotes presentes en los mismos.³²

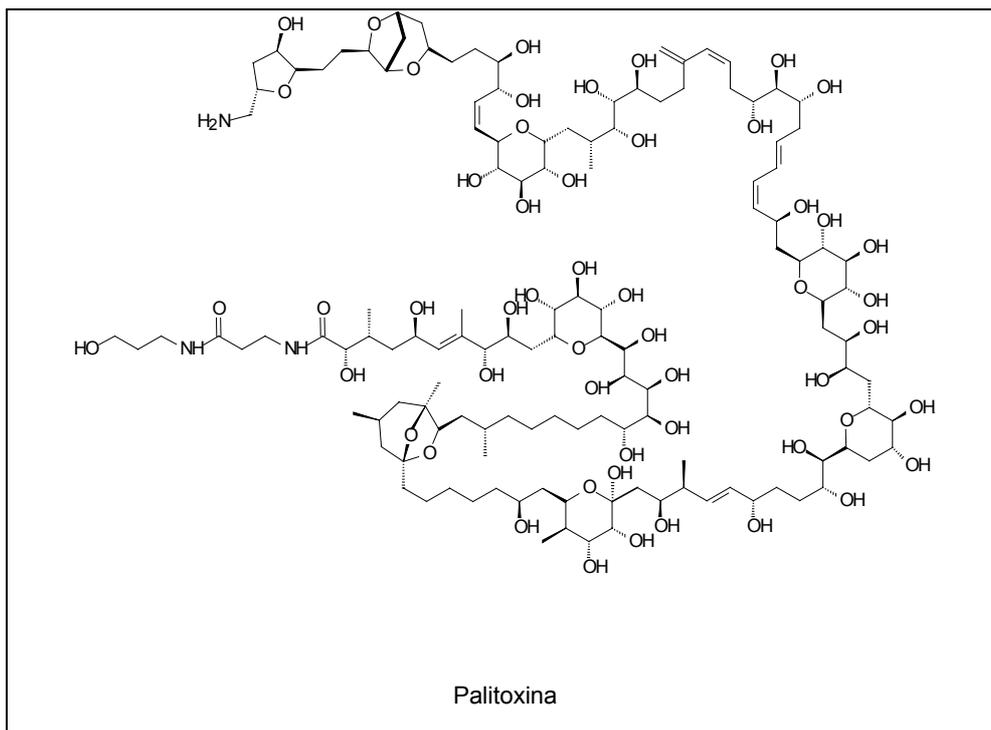


²⁹ Satake, M.; Murata, M.; Yasumoto, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 361.

³⁰ Halstead, B.W. *Poisonous and Venonous Marine Animals of the World*, U.S. Government Printing Office: Washington, DC, **1967**, vol.2, p 124.

³¹ Usami, M.; Satake, M.; Ishida, S.; Inoue, A.; Kan, Y.; Yasumoto, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 5389.

³² Gleibs, S.; Mebs, D.; Werding, B. *Toxicol.* **1995**, 33, 1531.



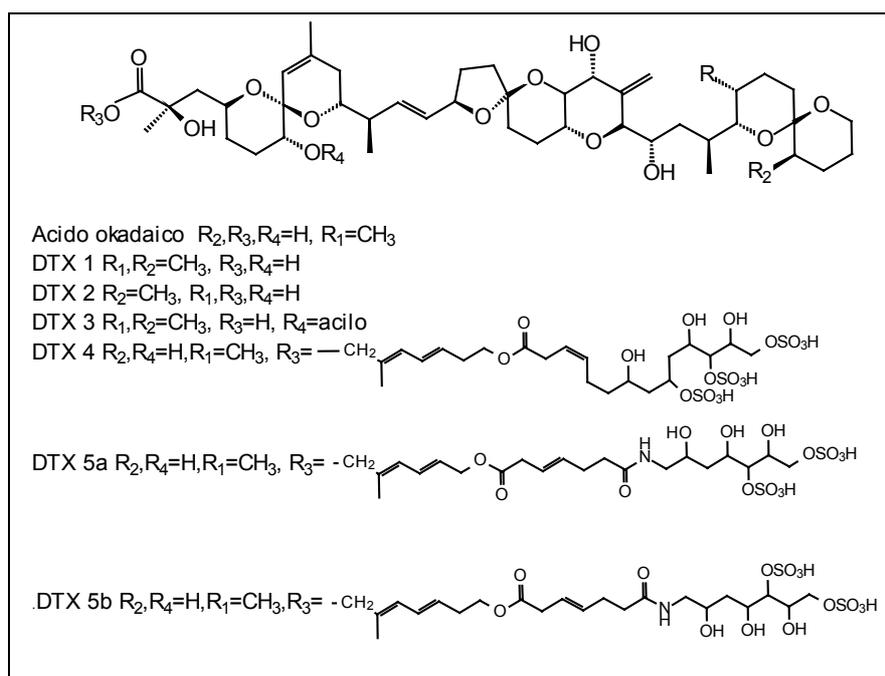
El síndrome ciguatérico (*CFP*, *Ciguatera Fish Poisoning*) provoca desordenes gastrointestinales, neurológicos y cardiovasculares. Generalmente diarrea, vómitos y dolor abdominal son los primeros síntomas, seguidos por disfunciones neurológicas, como calambres musculares, inversión de las sensaciones térmicas, vértigo, ansiedad, así como entumecimiento y hormigueo de la boca y los dedos. En los casos de intoxicación más severa se puede producir muerte por parálisis respiratoria. El tiempo de recuperación es variable, pudiendo tomar semanas, meses o incluso años. No hay antídoto para esta intoxicación, si bien el tratamiento inmediato (dentro de las 24 horas) con manitol y calcio parece que mejora algunos síntomas. La prevención de este tipo de intoxicaciones se consigue con una completa abstinencia en el consumo de peces tropicales, ya que no hay hasta el momento una manera sencilla de medir rutinariamente la presencia de ciguatoxinas y/o maitotoxina en los alimentos antes de su consumición.



II.2B. 3.- Síndrome diarréico. (DSP, Diarrhetic Shellfish Poisoning)

- Agentes causales: *Dinophysis sp.*, *Prorocentrum lima*.
- Toxinas producidas: Acido okadaico, dinofisistoxinas, yessotoxinas y pectenotoxinas.

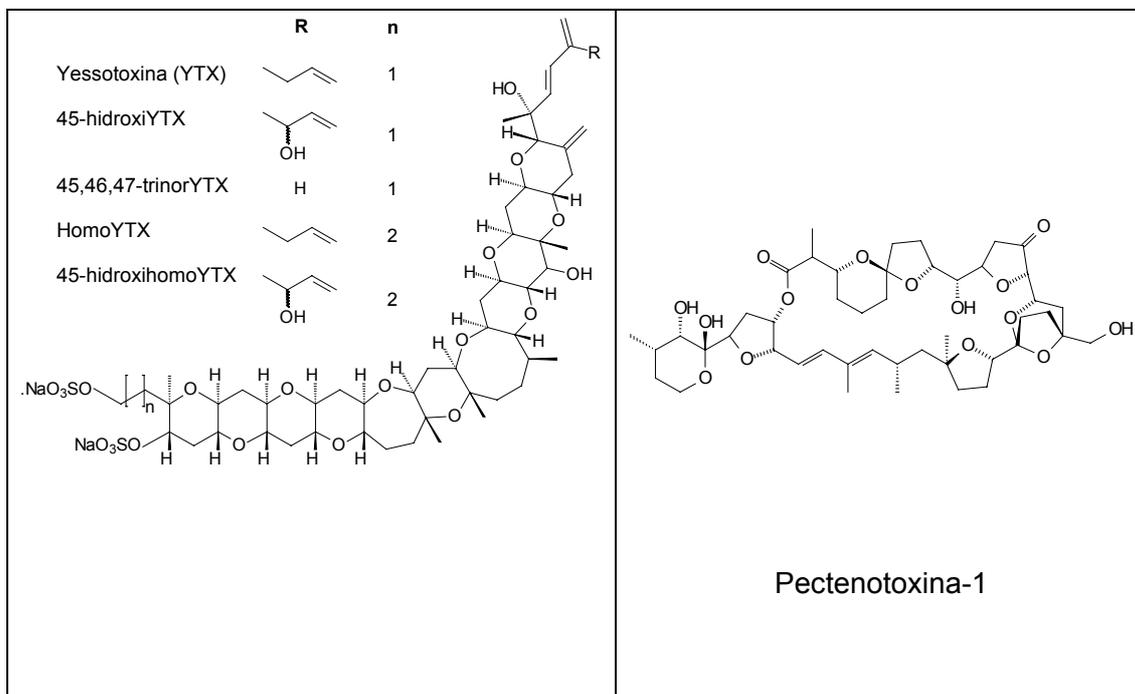
La primera referencia a este fenómeno data del año 1976 cuando tuvo lugar una intoxicación por mejillones en el Noreste de Japón,³³ si bien hoy sabemos que estos y otros bivalvos acumulan las toxinas producidas por ciertos dinoflagelados. El ácido okadaico (AO) aislado por primera vez en 1981 de las esponjas *Halichondria okadai* y *Halichondria melanodocia* y sus derivados las dinofisistoxinas (DTX) son los responsables de la mayoría de estas intoxicaciones en humanos.



La yessotoxina (YTX) fue detectada por primera vez en vieiras (*Patinopecten yessoensis*) recogidas en la bahía de Mutsu, Japón,³⁴ en una marea roja en la que concurrían DTX-1 y DTX-3, siendo su inclusión dentro de este grupo la que más controversias ha suscitado. Efectivamente, estudios posteriores indican que la YTX no

³³ Yasumoto, T.; Oshima, Y.; Sugawara, W.; Fukuyo, Y.; Oguri, H.; Igarashi, T.; Fujita, N. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **1980**, 46, 1405.

sólo difiere en su estructura química de la mayoría de las toxinas DSP, sino también en sus propiedades toxicológicas. Las YTX se han aislado recientemente en células de *Protoceratium reticulatum* y la homoYTX en células de *Gonyaulax polyedra*.³⁵



La pectenotoxina-1 (PTX-1) también fue aislada de la misma vieira que la YTX en Japón y su estructura elucidada por estudios de rayos-X.³⁶ Posteriormente han sido identificados nuevos homólogos aislados de *Dinophysis fortii*,³⁷ todos ellos con una potente acción hepatotóxica.³⁸

Las toxinas DSP producen un cuadro clínico caracterizado por diarreas, náuseas, vómitos y fuerte dolor abdominal que suele manifestarse en el plazo comprendido entre los 30 minutos y las dos horas siguientes al consumo de marisco

³⁴ Murata, M.; Kumagai, M.; Lee, J.S.; Yasumoto, T. *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 5869.

³⁵ MacKenzie, L.; Truman, P.; Satake, M.; Yasumoto, T.; Adamson, J.; Mountfort, D.; White, D. *Harmful Algae*, Eds. Reguera, B.; Blanco, J.; Fernández, M.L.; Wyatt, T. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO **1998**, p 74

³⁶ Yasumoto, T.; Murata, M.; Oshima, Y.; Matsumoto, G.K.; Clardy, J. *Tetrahedron*, **1985**, 41, 1019.

³⁷ Murata, M.; Sano, M.; Iwashita, T.; Naoki, H.; Yasumoto, T. *Agric. Biol. Chem.* **1986**, 50, 2693.

contaminado, produciéndose la recuperación después de tres días independientemente del tratamiento recibido. Sin embargo, la exposición crónica a este tipo de toxinas puede inducir la formación de tumores en el aparato digestivo. La elevada incidencia de este tipo de intoxicaciones así como el impacto económico que tiene sobre la industria marisquera hacen que exista una importante red de monitorización de este tipo de toxinas.

II.1B. 4.- Síndrome Neurotóxico (*NSP, Neurotoxic Shellfish Poisoning*)



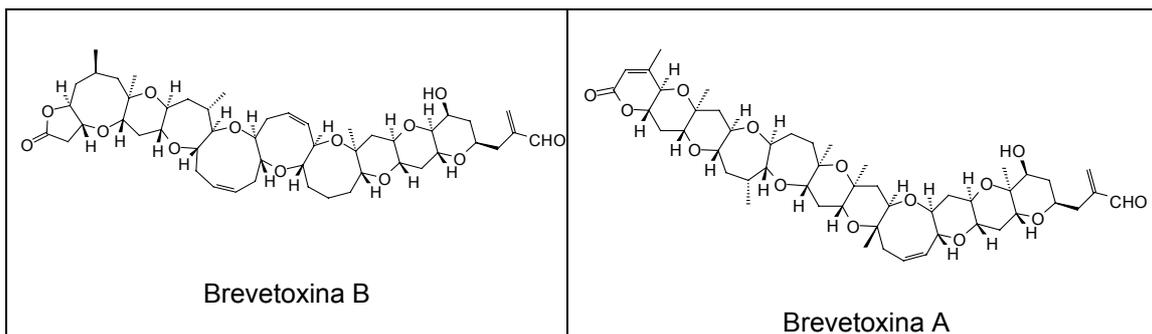
- Agente causal: *Gymnodinium breve*.
- Toxinas producidas: Brevetoxinas.

Las toxinas NSP constituyen uno de los grupos de compuestos más característicos y espectaculares producidos por microalgas. El responsable de su producción es un dinoflagelado que suele formar mareas rojas con cierta frecuencia en el Golfo de México, causando la muerte masiva de peces. La brevetoxina-B fue el primer miembro de este grupo de sustancias aisladas a partir del dinoflagelado *Gymnodinium breve*, cuya estructura fue determinada por estudios de difracción de rayos X,³⁹ si bien posteriormente han sido aislados nuevos derivados de la misma como la brevetoxina-A, que es la que presenta mayor ictiotoxicidad.⁴⁰

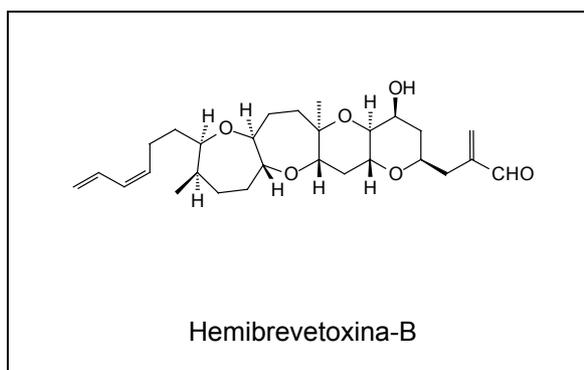
³⁸ Lee, J.S.; Igarashi, T.; Fraga, S.; Darhl, E.; Hovgaard, P.; Yasumoto, T. *J. Appl. Phycol.* **1989**, 147.

³⁹ Lin, Y.; Risk, M.; Ray, S.M.; Van Engen, D.; Clardy, J.; Golik, J.; James, J.C.; Nakanishi, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103, 6773.

⁴⁰ Nakanishi, K. *Toxicon*, **1985**, 23, 473.



Más recientemente, se identificaron a partir de cultivos de *G. breve*, las hemibrevetoxinas, compuestos con una toxicidad similar a las BTX pero con un esqueleto que es aproximadamente la mitad de estas.⁴¹



Esta intoxicación tiene una sintomatología muy similar a la que produce el síndrome ciguaterico, predominando en este caso los síntomas gastrointestinales y neurológicos, aparte de los cuales puede producir un cuadro similar al del asma ya que durante los episodios de marea roja, las células de los dinoflagelados pueden romperse y sus toxinas quedar libres en el agua, con lo cual pasan al spray marino, que es respirado por la población de los lugares afectados. Hasta el momento no se han descrito muertes producidas por este síndrome, que es menos severo que el ciguaterico siendo la recuperación en estos casos prácticamente completa en unos

⁴¹ Prasad, A.; Shimizu, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 2184.

días. Los programas de prevención basados en el conteo de células de *G. breve*, generalmente suelen ser suficientes.



II.1B. 5.- SÍNDROME AMNÉSICO (ASP, AMNESIC

- SHELLFISH POISONING)
- Agentes causantes: *Pseudonitzchia sp.*

Toxina producida: Acido domóico

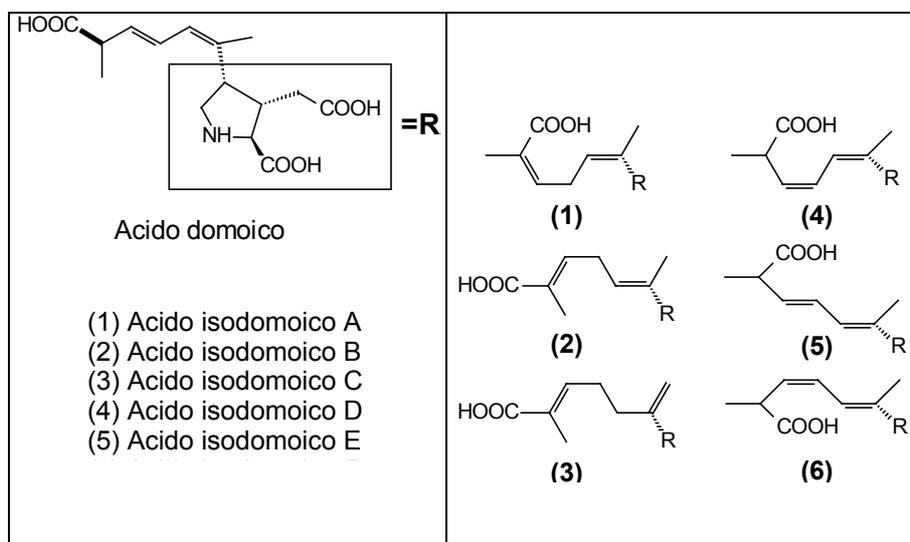
De entre todos los tipos de intoxicaciones citados, el último en ser descubierto es el causado por las toxinas ASP. En el otoño de 1987 se registró en el Este de Canadá un nuevo tipo de intoxicación alimentaria causada por mejillones, con más de un centenar de casos agudos y cuatro muertos.⁴² Los síntomas eran gastroenteritis dentro de las primeras 24 horas tras la ingestión de los mejillones o síntomas neurológicos, que incluyen desorientación, pérdida de memoria, dificultad respiratoria y coma, dentro de las primeras 48 horas. Por estos síntomas en los que la amnesia era el fenómeno más aparente se denominó a este tipo de intoxicación “*Amnesic Shellfish Poisoning*”. Posteriormente se identificó como responsable de esta intoxicación al ácido domóico, un potente neuroexcitador que actúa como agonista de los receptores de glutamato aumentando por tanto la entrada de Ca^{2+} en la neurona. Estudios subsiguientes permitieron identificar a la diatomea *Pseudonitzchia multiseries* como el verdadero productor del ácido domóico causante de esas intoxicaciones.

Actualmente sabemos que junto con el ácido domóico, producto mayoritario aislado inicialmente a partir del alga roja *Chondria armata domoi*,⁴³ hay otros isómeros

⁴² Bates, S.S.; Bird, C.J.; A.S.W. de Freitas; Foxall, R.; Gilgan, M.; Hania, L.A.; Johnson, G.R.; McCulloch, A.W.; Odense, P.; Pocklington, R.; Quilliam, M.A.; Sim, P.G.; Smith, J.C.; Subba Rao, D.V.; Todd, E.C.D.; Walter, J.A.; Wright, J.L.C. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **1989**, 1203.

⁴³ Takemoto, T.; Diago, K. *Chem. Pharm. Bull.* **1958**, 6, 578.

implicados en este tipo de intoxicaciones. La actividad de los ácidos isodomóicos D, E y F es similar a la del ácido domóico, mientras que la de los ácidos isodomóicos A, B y C es menor.⁴⁴



Al igual que ocurre con las toxinas *PSP* se piensa que hay bacterias implicadas en su producción, pues en cultivos de *Pseudonitzchia multiseriis* axénicos el rendimiento es 20 veces menor que en cultivos no axénicos.⁴⁵ Un hecho importante con respecto a este tipo de toxinas es que en experimentos de toxificación/destoxificación realizados con *Mytilus edulis* se observa que en los moluscos la depuración del ácido domóico es mucho más rápida (menos de una semana) que la que tiene lugar con las toxinas *PSP* (varias semanas). Por el contrario en la vieira *Placopecten magellanicus*, tanto la acumulación como la eliminación es más lenta que en el mejillón.⁴⁶ También se sabe que las vísceras de pescados y cangrejos pueden contener ácido domóico, por lo que el peligro para el consumo humano es mayor de lo que se creía en un principio.

⁴⁴ Hampson, D.R.; Huang, X.P.; Wells, J.W.; Walter, J.A.; Wright, J.L.C. *Eur. J. Pharmacol.*, **1992**, 218, 1.

⁴⁵ Douglas, D.J.; Bates, S.S.; Bourque, L.A.; Selvin, R.C. *Toxic Phytonplankton in the Sea*; Smayda, T.J.; Shimizu, Y. Eds; Elsevier Amsterdam, **1993**, 595.

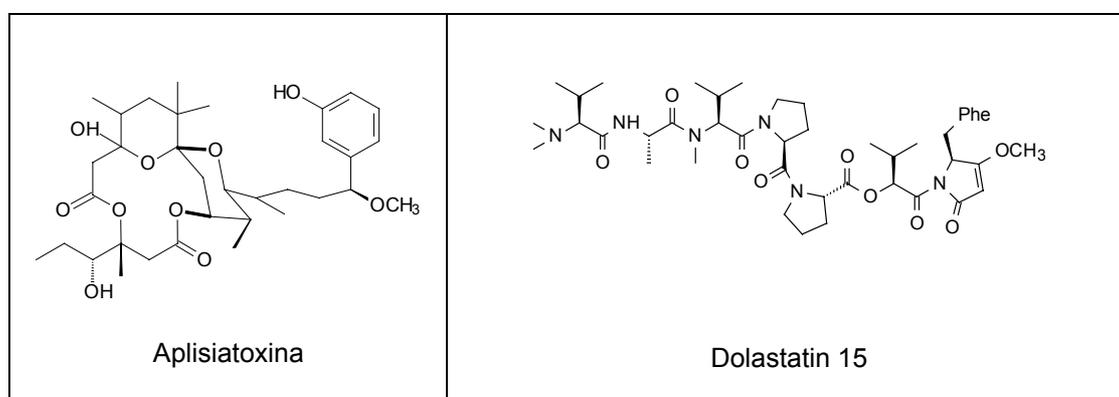
⁴⁶ Wohlgeschaffen, G.D.; Mann, K.H.; Subba Rao, D.V.; Pocklington, R. *J. Appl. Phycol.*, **1992**, 4, 297.

II. 1B. 6.- Envenenamiento por cianobacterias

Un gran número de metabolitos han sido aislados de las cianobacterias también conocidas como algas verde-azuladas. Sin embargo, la mayoría proceden de cianobacterias terrestres o de agua dulce y sólo unos pocos tienen su origen en cianobacterias marinas.

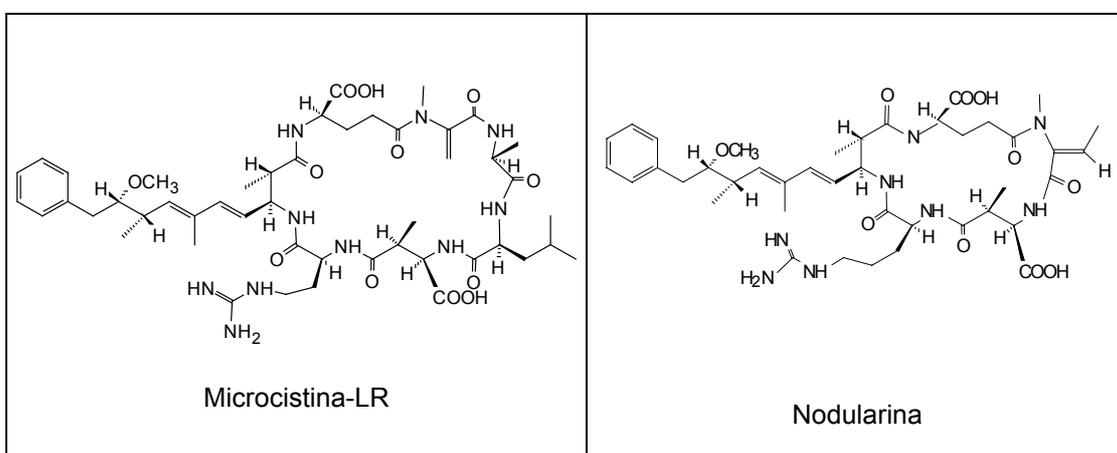
Las toxinas *PSP*, aunque son conocidas fundamentalmente como toxinas producidas por dinoflagelados, también han sido aisladas a partir de cultivos de cianobacterias.

Desde hace tiempo es conocido el hecho de que la aplisiatoxina, aislada inicialmente en el caracol *Aplysia* es realmente producida por el alga verde-azulada *Lyngbya majuscula*.⁴⁷ De manera análoga, se postula que otros muchos metabolitos aislados de invertebrados marinos son realmente producidos por cianobacterias simbiotes. Ejemplos de esta última hipótesis son el péptido antitumoral dolastatin 15 aislado de *Dolabella auricularia*, o el didemnina B, otro potente agente antiviral y antitumoral aislado del tunicado *Didemnum sp.*



⁴⁷ Moore, R.E. *Marine Natural Products*; Scheuer, P.J., Ed.; Academic Press: New York, **1981**; Vol. IV, p1

Quizás el metabolito más conocido de entre los producidos por cianobacterias, sea la microcistina,⁴⁸ extraída inicialmente del alga de agua dulce *Microcystis aeruginosa* o sus análogos estructurales las nodularinas producidas por *Nodularia spumigena*, especie de agua salada.⁴⁹ Se trata de potentes hepatotoxinas cuya intoxicación puede llegar a producir la muerte. Actualmente se conocen mas de 60 variantes de la microcistina, todas y cada una de las cuales contienen el aminoácido Adda (ácido 2S,3S,8S,9S-3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-dienoico) esencial para su actividad y cuya presencia no se conoce en ninguna otra molécula.



II. 1B. 7.- Miscelánea

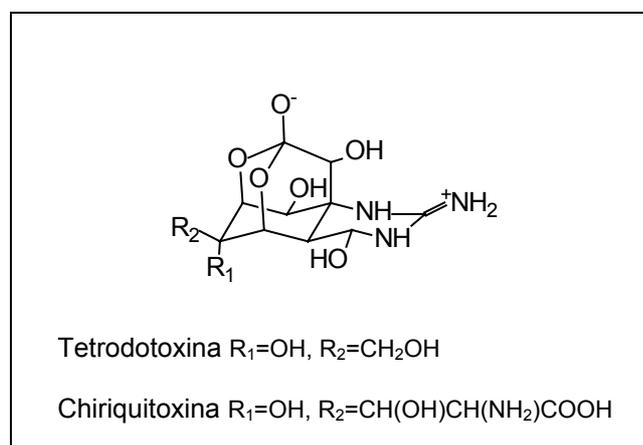
En el transcurso de las innumerables investigaciones que han sido realizadas tanto sobre cultivos de fitoplancton como sobre moluscos y otros productos de la mar destinados al consumo humano han sido descubiertas otras toxinas cuya clasificación no está en este momento del todo clara.

⁴⁸ Carmichael, W.W.; Mahmood, N.A. *Seafood Toxins*, Ragelis, E.P. Ed.; Am. Chem. Soc, Washington, **1984**, 377.

⁴⁹ Rinehart, K.L.; Harada, K.; Namikoshi, M.; Chen, C.; Harvis, C.A.; Munro, M.H.G.; Blunt, J.W.; Mulligan, P.E.; Beasley, V.R.; Dahlem, A.M.; Carmichael, W.W. *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, 110, 8557.

La tetrodotoxina (TTX) es una de las toxinas marinas mejor conocidas ya que frecuentemente se encuentra implicada en intoxicaciones con desenlace muchas veces fatal.⁵⁰ Su estructura química es única, y posee acción específica como agente bloqueante de los canales de sodio. Esta ampliamente distribuida en el mundo animal, tanto en organismos marinos, fundamentalmente en la familia del pez globo (*Tetraodontidae*) de la que deriva su nombre, como en organismos terrestres, por ejemplo en ranas como la *Atelops chiriquiensis* de la que se aisló uno de sus derivados, la chiriquitoxina.⁵¹

La elevada fluctuación observada en la concentración de toxina en los animales, con diferencias individuales, geográficas y estacionales, hicieron sospechar del origen exógeno de estas toxinas en estos animales. Finalmente, la fuente primaria quedó establecida en una bacteria, *Shewanella alga*,⁵² si bien posteriormente se han encontrado nuevas bacterias productoras de la toxina.⁵³



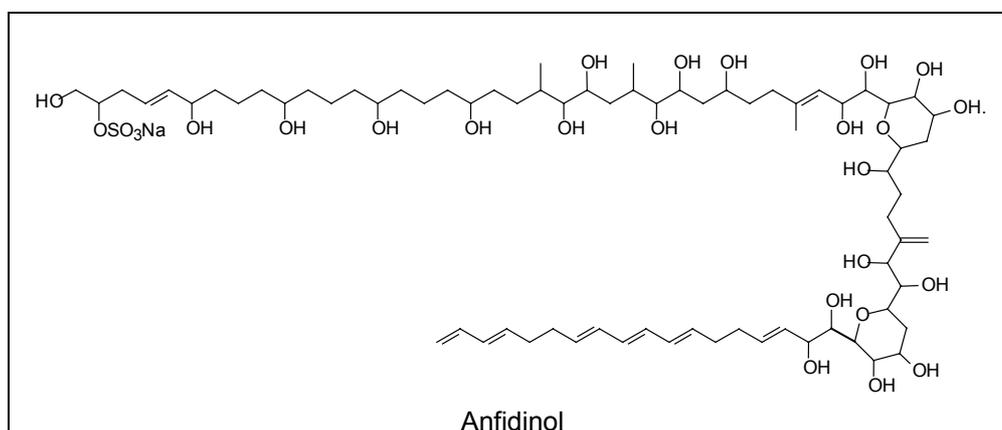
⁵⁰ *Marine Toxins*, ACS Symposium Series 418, Hall, S.; Strichartz, G.; Eds. Am. Chem. Soc. Washington D.C. **1990**.

⁵¹ Yotsu, M.; Yasumoto, T.; Kim, Y.H.; Naoki, H.; Rao, C.Y. *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 3187.

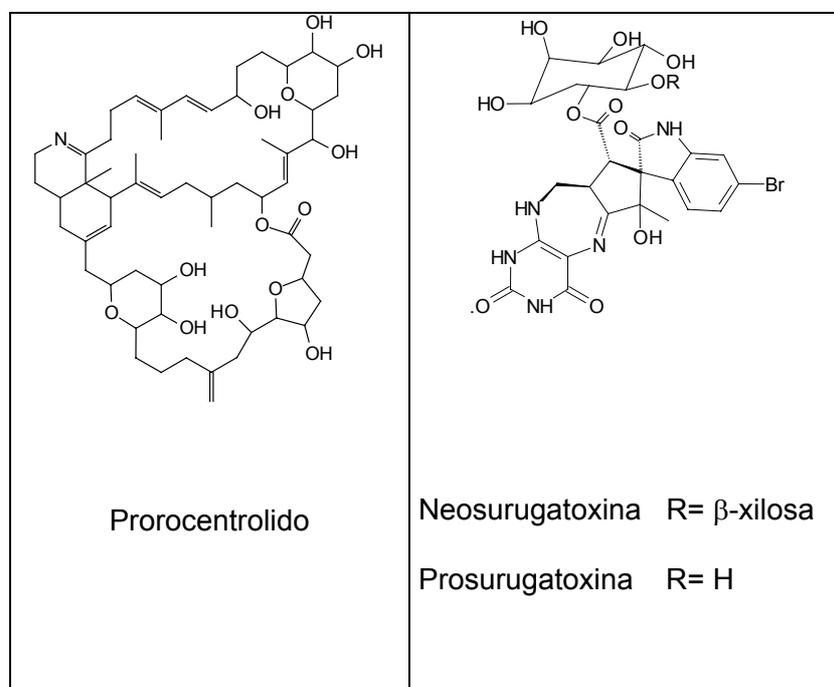
⁵² Simidu, U.; Kita-Tsukamoto, K.; Yasumoto, T.; Yotsu, M. *Int. J. System. Bacteriol.* **1990**, 40, 331.

⁵³ Simidu, U.; Noguchi, T.; Hwang, D.F.; Shida, Y.; Hashimoto, K. *Appl. Env. Microbiol.* **1987**, 53, 714.

Del estudio del dinoflagelado *Amphidinium klebsii* se aisló el anfidinol, que pertenece a una nueva clase de polihidroxipolienos con una potente actividad hemolítica.⁵⁴



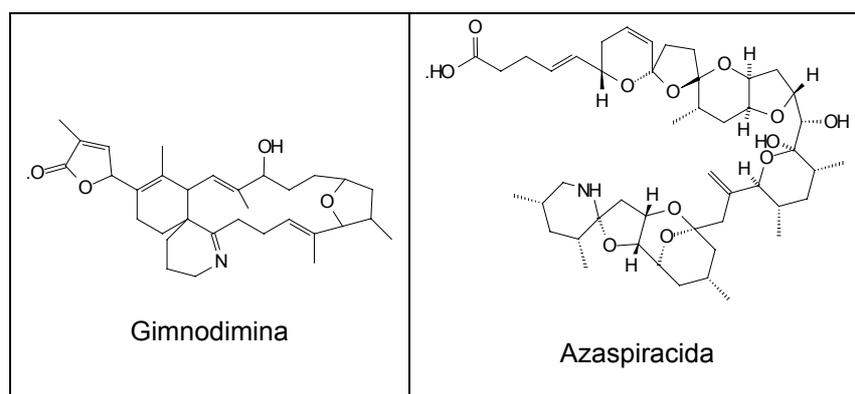
En el dinoflagelado *Prorocentrum lima* productor del ácido okadaico se aisló una nueva lactona polietérea denominada prorocentrolido,⁵⁵ con efectos similares a las DSP pero de acción rápida.



⁵⁴ Satake, M.I.; Murata, M.; Yasumoto, T.; Fujita, T.; Naoki, H.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 113, 9859.

La concha marina *Babylonia japonica* ampliamente consumida en Japón, causó la intoxicación de 26 personas en 1965. Los síntomas eran principalmente alteraciones visuales, entumecimiento en la cara y disuria. Las toxinas responsables, prosurugatoxina y neosurugatoxina bloquean específicamente los receptores nicotínicos en los ganglios.⁵⁶ Actualmente se sabe que ambas toxinas son producidas por bacterias *Coryneformes*.⁵⁷

La gimnodimina, una nueva toxina nitrogenada fue descubierta en Nueva Zelanda por el consumo de ostras contaminadas con una toxina de efecto similar a las *NSP*, si bien ya sabemos que también son producidas por el dinoflagelado *Gymnodinium cf. mikimotoi*.⁵⁸



Quizás la última toxina en ser descubierta es la azaspiracida.⁵⁹ En este caso fue un episodio de *DSP* que se produjo en noviembre de 1995 en las costas de Francia, Irlanda y Escocia, el que puso sobre la pista de su existencia. Aunque los síntomas de la intoxicación eran similares a los de una intoxicación *DSP*, la contaminación por este tipo de toxinas era prácticamente nula, por lo que se pensó en

⁵⁵ Torigoe, K.; Murata, M.; Yasumoto, T.; Iwashita, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 7876.

⁵⁶ Kosuge, T.; Tsuji, K.; Fukuyama, T.; Nukaya, H.; Ishida, H. *Chem. Pharm. Bull.* **1985**, 33, 2890.

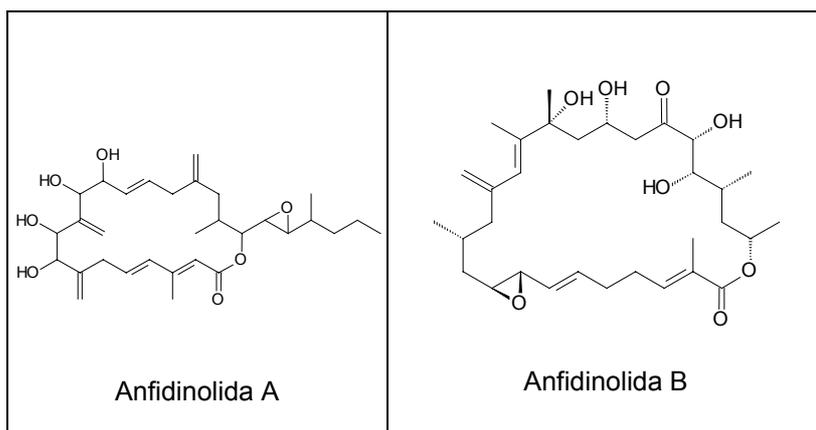
⁵⁷ Kosuge, T.; Tsuji, K.; Fukuyama, T.; Hirai, K. *Chem. Pharm. Bull.* **1985**, 33, 3059.

⁵⁸ Seki, T.; Satake, M.; Mackenzie, L.; Kaspar, H.F.; Yasumoto, T. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 7093.

la existencia de otra toxina no conocida hasta el momento. Cuando la toxina es inyectada vía intraperitoneal en ratones les produce una parálisis progresiva, igual a la causada por las toxinas *PSP*.

II. 1C.- METABOLITOS DE DINOFLAGELADOS NO TOXICOS

La mayoría de los metabolitos aislados a partir de microalgas marinas son tóxicos, sin embargo también se conocen ciertos metabolitos con un prometedor futuro terapéutico. Dentro de este grupo brillan con luz propia las anfidinolidas, que constituyen un grupo formado por algo más de una decena de macrólidos antineoplásicos aislados del dinoflagelado *Amphidinium sp.*^{60,61}



A partir del medio de cultivo del dinoflagelado *Gambierdiscus toxicus*, se han aislado los ácidos gambiéricos, de entre los que destaca el ácido gambiérico A por su potente acción fungicida ya que excede en unas 2000 veces a la de la anfotericina B, y lo convierte en el fungicida conocido más potente.⁶² También con actividad fungicida

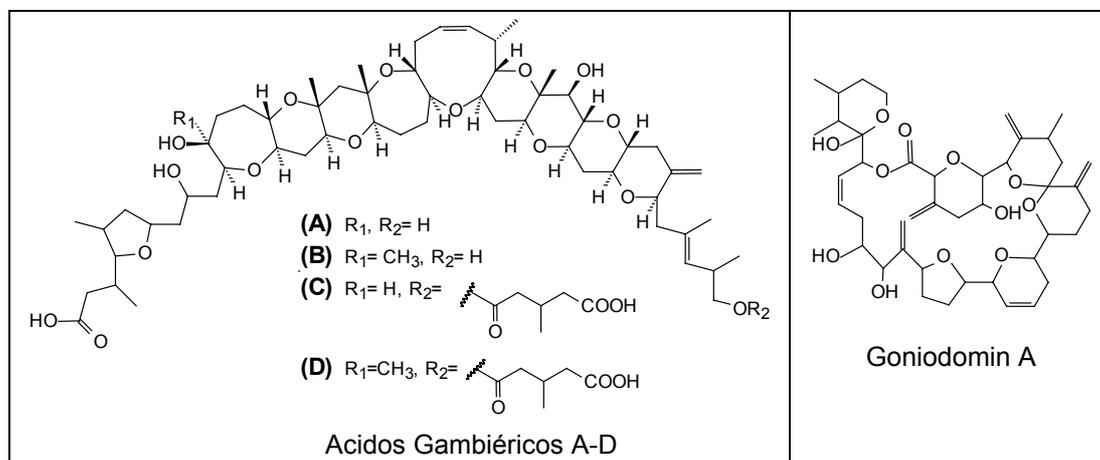
⁵⁹ Satake, M.; Ofuji, K.; Naoki, H.; James, K.J.; Furey, A.; McMahon, T.; Silke, J.; Yasumoto, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 9967.

⁶⁰ Kobayashi, J.; Ishibashi, M.; Nakamura, H.; Ohizumi, Y.; Yamasu, T.; Sasaki, T.; Hirata, Y. *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 5755.

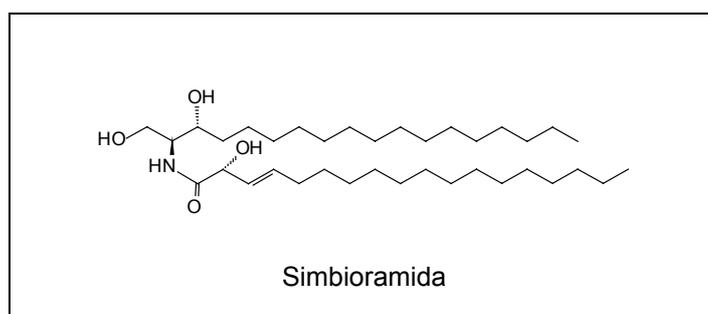
⁶¹ Kobayashi, J.; Ishibashi, M.; *Chem. Rev.* **1993**, 93, 1753.

⁶² Nagai, H.; Torigue, K.; Satake, M.; Murata, M.; Yasumoto, T.; Hirota, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 1102.

se aisló del dinoflagelado *Goniodoma pseudogoniaulax* un macrólido polietérico que denominó goniodomin A.⁶³



Pertenciente a otro grupo químico totalmente diferente, tenemos a la simbioramida, una ceramida aislada de un dinoflagelado del género *Symbiodinium* que resultó ser un potente activador de la ATPasa de Ca²⁺ de retículo sarcoplasmático, lo que hace de ella una valiosa herramienta de estudio farmacológico.⁶⁴

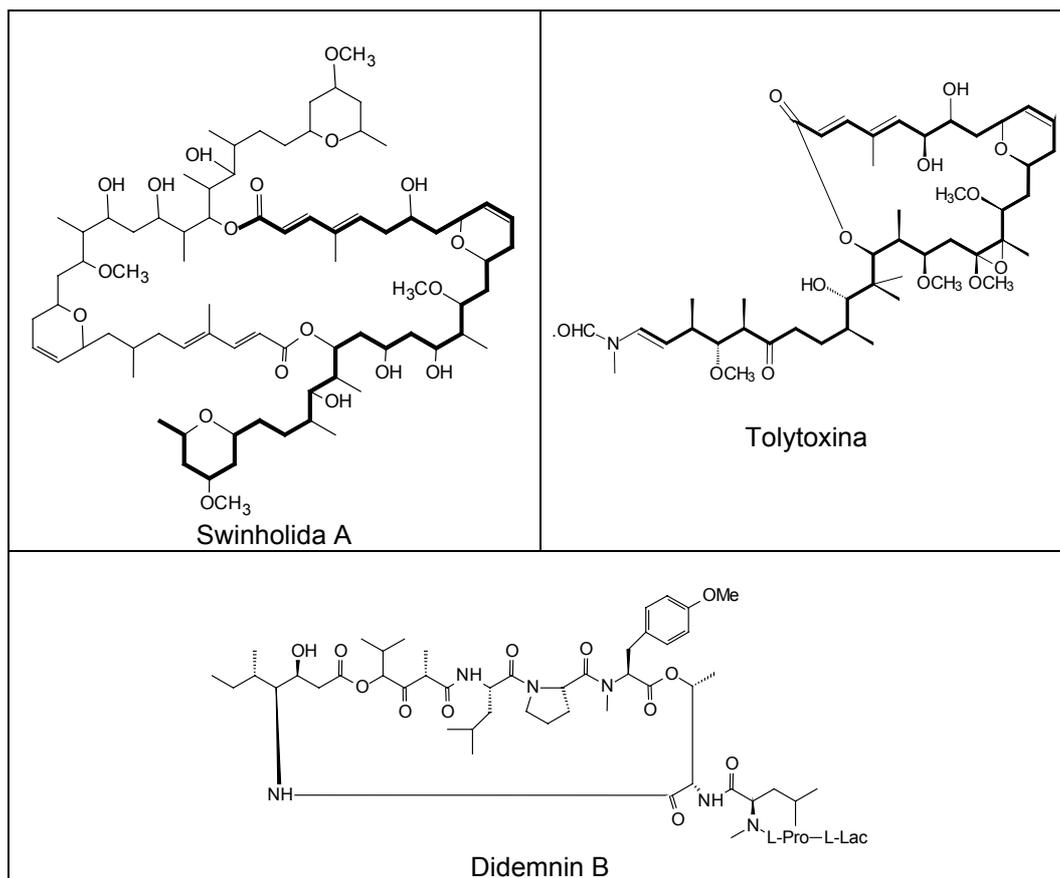


Por último, quizás el grupo de microalgas con un futuro más prometedor sea el de las verde-azuladas, ya que actualmente hay razones para pensar que son los verdaderos productores de muchos de los metabolitos aislados de invertebrados

⁶³ Murakami, M.; Makabe, K.; Yamaguchi, K.; Komosu, S.; Wälchli, M.R. *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 1149.

⁶⁴ Kobayashi, J.; Ishibashi, M.; Nakamura, H.; Hirata, Y.; Yamasu, T.; Sasaki, T.; Ohizumi, Y. *Experientia* **1988**, 44, 800.

marinos, como por ejemplo la bilactona swinholida A un potente agente citotóxico aislado de esponjas del género *Theonella*,^{65,66} que tiene el mismo esqueleto que la tolytoxina aislada en algas verde-azuladas.⁶⁷ Igual origen se piensa que tiene el potente antiviral y antitumoral, didemnin B, aislado del tunicado *Didemnum sp.*⁶⁸



⁶⁵ Carmely, S.; Kashman, Y. *Tetrahedron Lett.* **1985**, 26, 511.

⁶⁶ Kobayashi, M.; Tanka, J.; Katori, T.; Matsuura, M.; Kitagawa, I. *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 2963.

⁶⁷ Carmely, S.; Moore, R.E.; Patterson, G.M.L. *J. Nat. Prod.* **1990**, 53, 1533.

⁶⁸ Rinehart, K.L.; Kishore, V.; Bible, K.C.; Sakai, R.; Sukina, D.W.; Li, K.M. *J. Nat. Prod.* **1988**, 51, 1.

II. 2.- CULTIVO DEL DINOFLAGELADO *AMPHIDINIUM SP.*

En el año 1994 iniciamos en nuestro laboratorio el estudio del dinoflagelado *Amphidinium sp.* La cepa de éste microorganismo nos fue cedida por la Dra. Isabel Bravo del Instituto de Oceanografía Centro Costero de Vigo y con el fin de conseguir un cultivo a gran escala con el mejor rendimiento posible, fue necesario optimizar las condiciones de crecimiento y tener un conocimiento exacto de la cinética del mismo para lograr las mayores cantidades de biomasa, a partir de la cual se extraerán los metabolitos secundarios producidos generalmente en muy pequeñas cantidades.

II. 2A.- CONDICIONES IDONEAS PARA EL CULTIVO DEL DINOFLAGELADO.

Existen numerosos factores que afectan tanto al crecimiento como a la productividad de los cultivos de microalgas. A continuación vamos a ir detallándolos y comentando cuales fueron las condiciones más favorables encontradas por nosotros:

a) Factores químicos:

a.1.- Composición del medio de cultivo: Es quizás el aspecto con mayores posibilidades de variación. Básicamente los medios pueden clasificarse en dos grandes grupos:

- El primero incluye a los medios de cultivo totalmente artificiales, en los que se usa agua destilada a la que se añaden diferentes cantidades de *nutrientes* de

naturaleza química perfectamente conocida. Medios de este tipo son el ASP-2,⁶⁹ ASP-6.⁶⁸ ASP-12.⁶⁸ ASP-M⁷⁰ o el Müller.⁷¹

- El segundo grupo está formado por los medios que usan agua de mar suplementada por la adición de *nutrientes* de composición conocida o no. Ejemplos de este tipo son el medio Provasoli ES,⁷² el medio f/2,⁷³ o el medio K.⁷⁴

Los medios artificiales se han usado con éxito en el cultivo de algas de agua dulce pero no en el caso de especies marinas, donde se utiliza generalmente agua de mar como base del medio cultivo.⁷⁵

⁶⁹ Provasoli, L. *Growing marine seaweeds*. Proc. Int. Seaweed Symp. Pergamon Press, **1963**, 4, 9.

⁷⁰ McLachlan, J. *Can. J. Microbiol.* **1964**, 10, 769.

⁷¹ Müller, D. *Bot. Marina*, **1962**, 4, 140.

⁷² Provasoli, L. *Culture and Collection of Algae*; Watanabe, A., Hattori, A., Eds.; Japanese Society of Plant Physiology: Tokio, **1968**, p 63.

⁷³ Guillard, R.R.L.; Ryther, J.H. *Can. J. Microbiol.* **1962**, 8, 229.

⁷⁴ Keller, M.D.; Selvin, R.C.; Claus, W.; Guillard, R.R.L. *J. Phycol.* **1987**, 23, 633.

⁷⁵ Los medios de cultivo que usan como base el agua de mar consisten fundamentalmente en :

Constituyentes mayoritarios:

Nitrógeno, generalmente se añade en forma de nitrato pues en forma amónica puede volatilizarse si se somete a esterilización por calentamiento o ser tóxico para algunas especies.

Fósforo, que se suele añadir en forma de ortofosfato. Otra forma muy utilizada es la del glicerofosfato, con el que hay que tener cuidado pues precipita cuando se calienta.

Silicio, usado únicamente en el cultivo de diatomeas.

Tampones, sólo hay dos tampones ampliamente utilizados en medios marinos. El más usado es el tris-hidroximetilaminometano (conocido como TRIS). En otras ocasiones se usa la glicilglicina, pero presenta el inconveniente de ser rápidamente metabolizada por todo tipo de microorganismos.

Micronutrientes inorgánicos:

En los medios que usan el agua de mar se añaden Fe, Co, Cu, Mn, Mo y Zn. Todos ellos se acompañan de un agente quelante que suele ser el EDTA con el fin de evitar su precipitación. La relación de quelante:metal suele ser de 1.5 a 3 equivalentes de quelante por cada uno de metal.

Micronutrientes orgánicos:

Sólo tres vitaminas son necesarias para el crecimiento de algas marinas, la cianocobalamina, la tiamina y la biotina. Algunos medios llevan extractos de algas, levaduras, etc. o los llamados factores de crecimiento como el ácido indolacético, la adenina o el ácido giberélico.

Considerando los precedentes encontrados en la literatura química sobre cultivos de fitoplancton decidimos restringir los ensayos dentro de la gran diversidad de medios existentes, al medio de cultivo Provasoli ES y al medio K. En cultivos realizados a pequeña escala se pudo comprobar que el dinoflagelado crecía con mayor vigor y rapidez en el medio ES, por lo que nos decantamos por él para llevar a cabo los cultivos a gran escala.

En la preparación de los medios de cultivo, debe considerarse la salinidad total de los mismos, pues esta podría aumentar peligrosamente con la adición de los *nutrientes* anteriormente citados y detener el crecimiento del microorganismo o producir su muerte. Con el fin de relacionar el crecimiento del cultivo con la salinidad del medio, decidimos diluir agua de mar con agua destilada llevándola hasta concentraciones de 15‰, 20‰, 25‰, 30‰ y 35‰. Comprobamos que el crecimiento es óptimo en el rango 30‰-35‰ ya que valores inferiores provocan progresivamente una inhibición del crecimiento y después la muerte de las células.

a.2.- Necesidades de CO₂: Si los requerimientos de CO₂ del cultivo son pequeños, este puede desarrollarse sin movimiento alguno, simplemente con una cámara de aire en el recipiente. Si las necesidades son mayores, puede mejorarse la difusión del gas burbujeando aire o incluso usando CO₂ directamente. Un caso representativo es el de los cultivos de *Prymnesium parvum*,⁷⁶ en los que tanto el número de células como la cantidad de toxina producida por célula aumentan 4 ó 5 veces cuando son sometidos a fuerte aireación.

⁷⁶ Yasumoto, T.; Igarashi, T.; Osima, Y.; Murata, M. *Harmful Marine Algal Blooms*. Eds. Lassus, P.; Arzul, G.; Erard, E.; Gentien, P.; Marcaillou, C.; Lavoisier, Intercept Ltd, **1995**, p 303.

En el caso de *Amphidinium*, observamos que el burbujeo lento y continuo de aire filtrado (0.22 μm) era lo más conveniente, pues ensayos con cantidades mayores (uso directo de CO_2) o menores (cultivo estático) producían peores rendimientos.

a.3.- pH: El pH del agua de mar esta entre 8.2 y 8.4 y el CO_2 del medio juega un papel muy importante en su control. En las condiciones experimentales empleadas se añaden tampones para regular el pH ajustándolo a valores de 7.5.

b) Factores físicos

b.1.- Luz: Generalmente se recomienda mantener un periodo de oscuridad pues suele favorecer los ritmos celulares. En nuestro caso se comprobó experimentalmente que si bien con ciclos de luz/oscuridad 12:12 ó 16:8 el crecimiento es óptimo, bajo iluminación continua el crecimiento se mantenía a buen ritmo. Por tanto, el cultivo fue desarrollado bajo la luz continua suministrada por tubos fluorescentes de neón, con una intensidad lumínica equivalente al 10% de la existente en la superficie del mar a pleno sol.

b.2.- Temperatura: Lo más recomendable suele ser mantener el cultivo a una temperatura similar o ligeramente superior a aquella en la que el dinoflagelado prolifera de forma natural. Experimentalmente encontramos que el crecimiento de las células era óptimo en el rango comprendido entre los 20-25°C, por lo que decidimos realizar el cultivo a 23°C.

b.3.- Turbulencias: Se trata de un factor de gran importancia en algunos cultivos, pues mantiene a las microalgas en movimiento, de esta manera las células se exponen regularmente a la luz, se distribuyen regularmente los nutrientes en el tanque

y se evita la anaerobiosis en los fondos. En el cultivo de *Amphidinium sp.* el movimiento era generado por el burbujeo lento y continuo del aire.

Con el fin de conocer cuando alcanza el cultivo su fase estacionaria, (n° de nuevas células = n° de células muertas) fue necesario realizar un seguimiento del crecimiento del mismo. De esta manera estableceríamos una relación lo más adecuada posible entre el tiempo empleado en cada cultivo y el número de células recogidas. Dado que el dinoflagelado no se adhiere fuertemente a las paredes del recipiente, es posible mediante una suave agitación homogeneizar el cultivo para tomar alícuotas y realizar el seguimiento por conteo directo del número de células al microscopio,⁷⁷ usando un hematocitómetro de Neubauer. La **figura 2.1** muestra la curva de crecimiento obtenida donde se aprecia que la recolección de las células debía llevarse a cabo entre los 15 y los 20 días después de la inoculación.

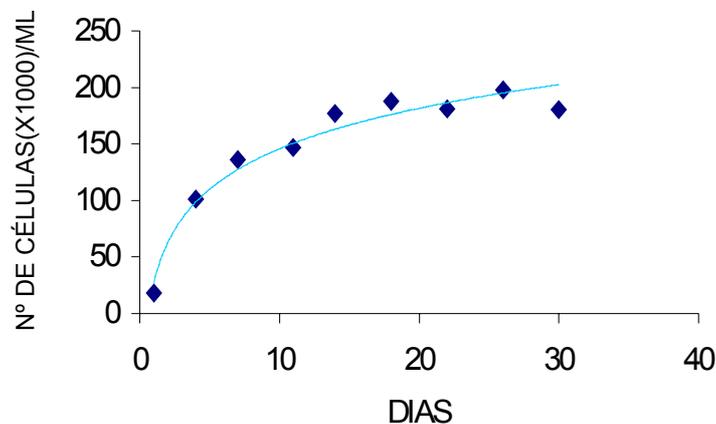
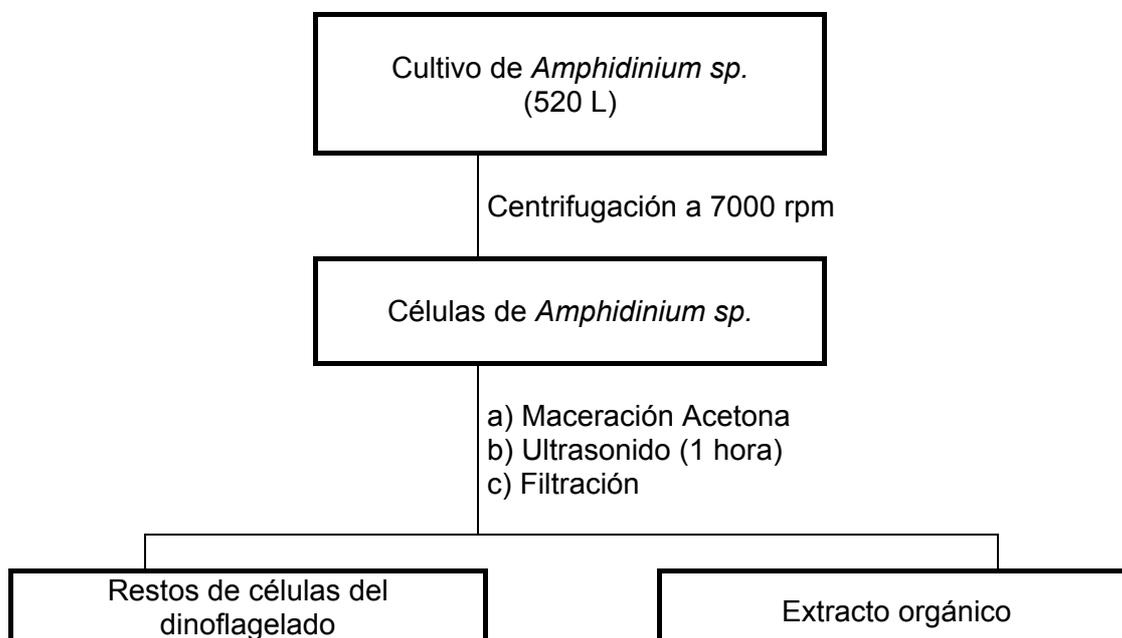


Figura 2.1.- Evolución del crecimiento del cultivo de *Amphidinium sp.*

⁷⁷ Monographs on Oceanographic Methodology 6. *Phytoplankton manual*. UNESCO. Ed. A. Sournia.

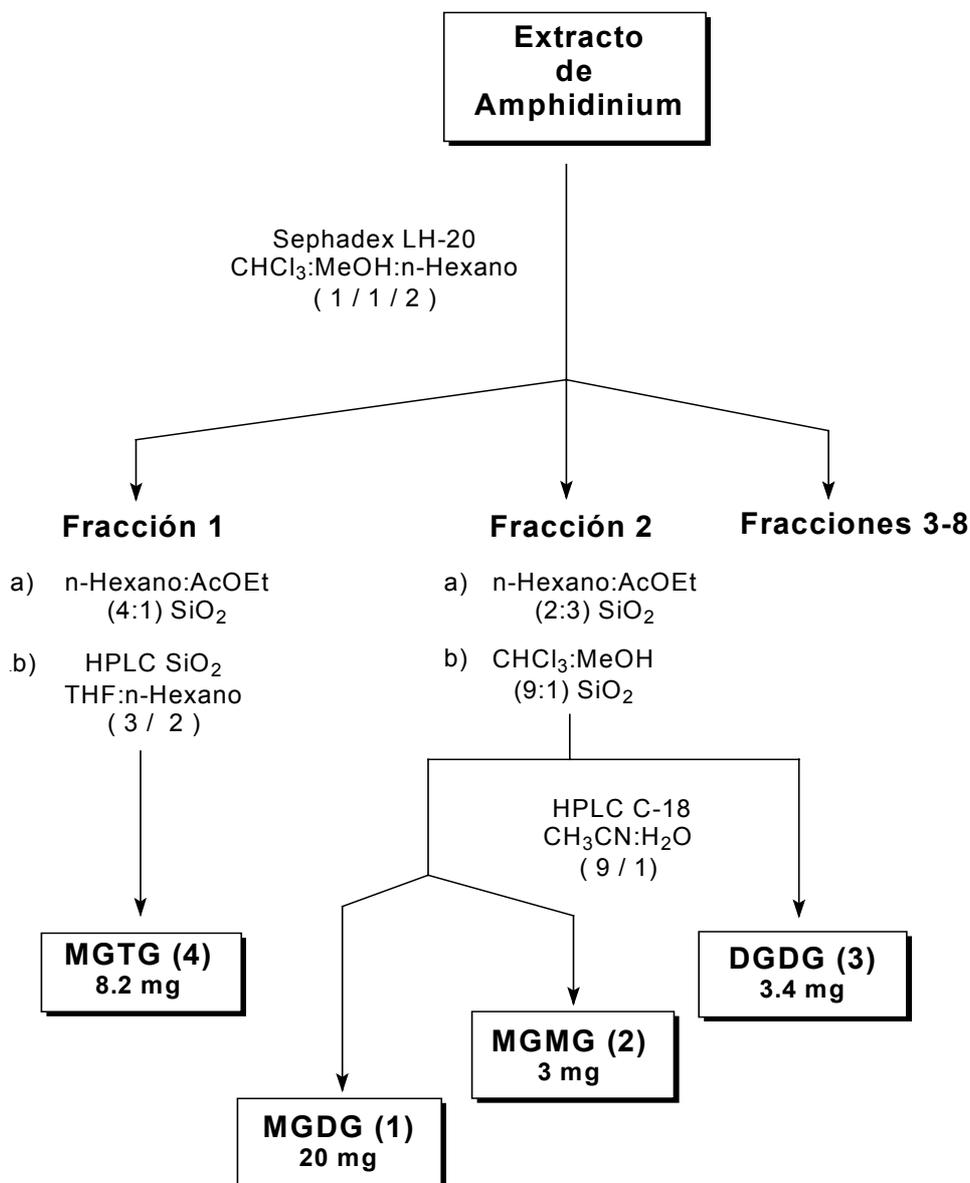
II.2B.- RECOLECCION, EXTRACCIÓN Y CROMATOGRAFIA DEL EXTRACTO

Una vez optimizadas las condiciones de cultivo, desarrollamos este a gran escala, tras lo cual procedimos a la recolección de las células. Dado que el dinoflagelado muestra una gran movilidad, esta se lleva a cabo por centrifugación continua a 7000 r.p.m. y a 0 °C. Cuando los volúmenes de agua son muy grandes se puede optar por inducir la floculación de las células añadiendo al medio $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ hasta conseguir una concentración final de 200-300 ppm y llevando el cultivo a la oscuridad, transcurrido un tiempo se decanta el sobrenadante y se centrifuga un volumen menor. Las células recolectadas se maceran hasta agotamiento en acetona en un baño de ultrasonidos para romper la pared celular. Después de filtrar a través de una placa de vidrio y proceder a la evaporación del disolvente, se obtuvo un extracto de color verde oscuro (9.2 g). Este proceso se resume en el siguiente esquema:



Esquema 2.1

A la reunión de los extractos se le realizó cromatografía de acuerdo con la marcha expuesta en el siguiente **esquema 2.2**:



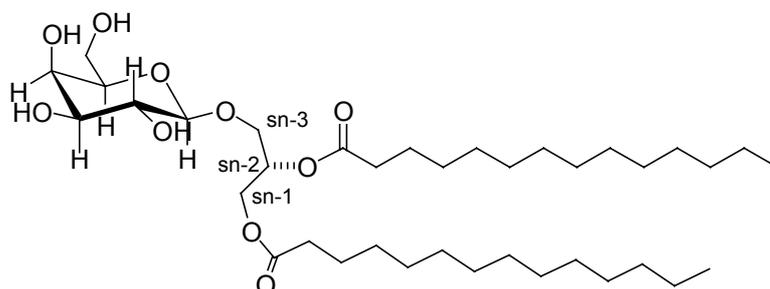
Esquema 2.2

En el curso del estudio de la hemolisina-1 (2) comprobamos la inestabilidad de este tipo de sustancias, lo que motivó que para el estudio de los glicolípidos (1) y (3) decidieramos acetilarlos, mejorando tanto su estabilidad como la resolución del espectro de ^1H RMN. En el caso del MGTG (4) no tuvimos estos problemas por lo que su estudio se hizo tal y como se aisló originalmente.

II. 2C.- GLICOLIPIDOS AISLADOS DEL DINOFLAGELADO *AMPHIDINIUM SP*

Los glicolípidos marinos, al igual que ocurre con aquellos aislados a partir de organismos terrestres, son sustancias anfipáticas que pueden ser divididas fundamentalmente en dos grandes grupos: Glicoglicerolípidos (GGLs) y glicosfingolípidos (GSLs). Hay otro tercer grupo, que no comentaremos, que incluye aquellos glicolípidos cuya porción lipídica deriva de mevalonato, como por ejemplo los glicósidos esteroidicos.

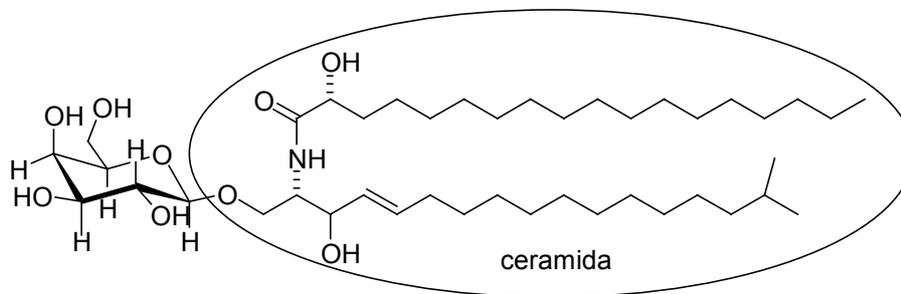
Químicamente, los GGLs presentan en su estructura una unidad de glicerol glicosilada en un alcohol primario junto con los otros grupos hidroxilos acilados y/o alquilados por una cadena más o menos larga.



Los GGLs más frecuentes como metabolitos de organismos marinos son los monogalactosildiacylgliceroles (MGDG), digalactosildiacylglicerol (DGDG) y los sulfoquinovosildiacylgliceroles (SQDG). Todos ellos son constituyentes habituales de las membranas de organismos fotosintéticos, por lo que en el ambiente marino están presentes casi exclusivamente en las algas y cianobacterias.

La estructura de los GSLs está formada por un resto de carbohidrato y un ácido graso que están unidos a una cadena larga de un aminoalcohol. La cadena del ácido

graso está unido por un enlace amídico al aminoalcohol formando lo que se conoce como una ceramida.



Los GSLs son constituyentes habituales de las membranas de animales y plantas y se cree que poseen un amplio espectro de actividades biológicas, implicados en fenómenos de reconocimiento celular, adhesión celular y otros fenómenos de membrana.

A continuación describimos el estudio espectroscópico de cuatro GGLs aislados de los cultivos del dinoflagelado *Amphidinium sp.* realizados en nuestro laboratorio.

II. 2C. 1.- Heterosigma-glicolípido III (1)

En el espectro de ^1H RMN de este metabolito (**Figura 2.2**) se puede observar un grupo de señales a campos bajos que pueden ser atribuidas a un monosacárido, a un glicerol y a un número elevado de protones vinílicos, mientras que a campos altos se presenta un conjunto de señales pertenecientes a las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos. Esta información se ve refrendada por el experimento de ^{13}C RMN

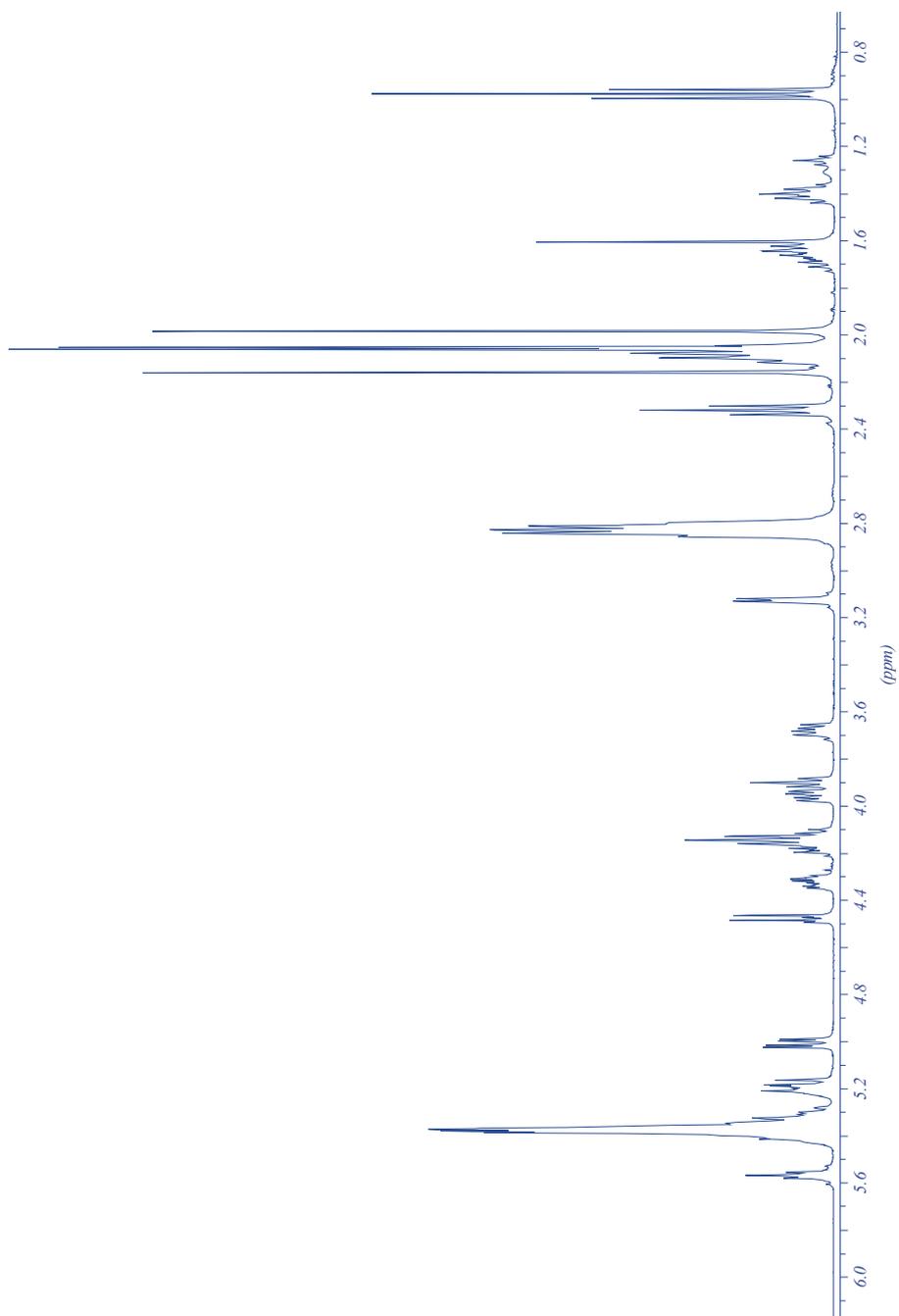


Figura 2.3.- Espectro ^{13}C RMN del Heterosigma-glicolípido III (1)

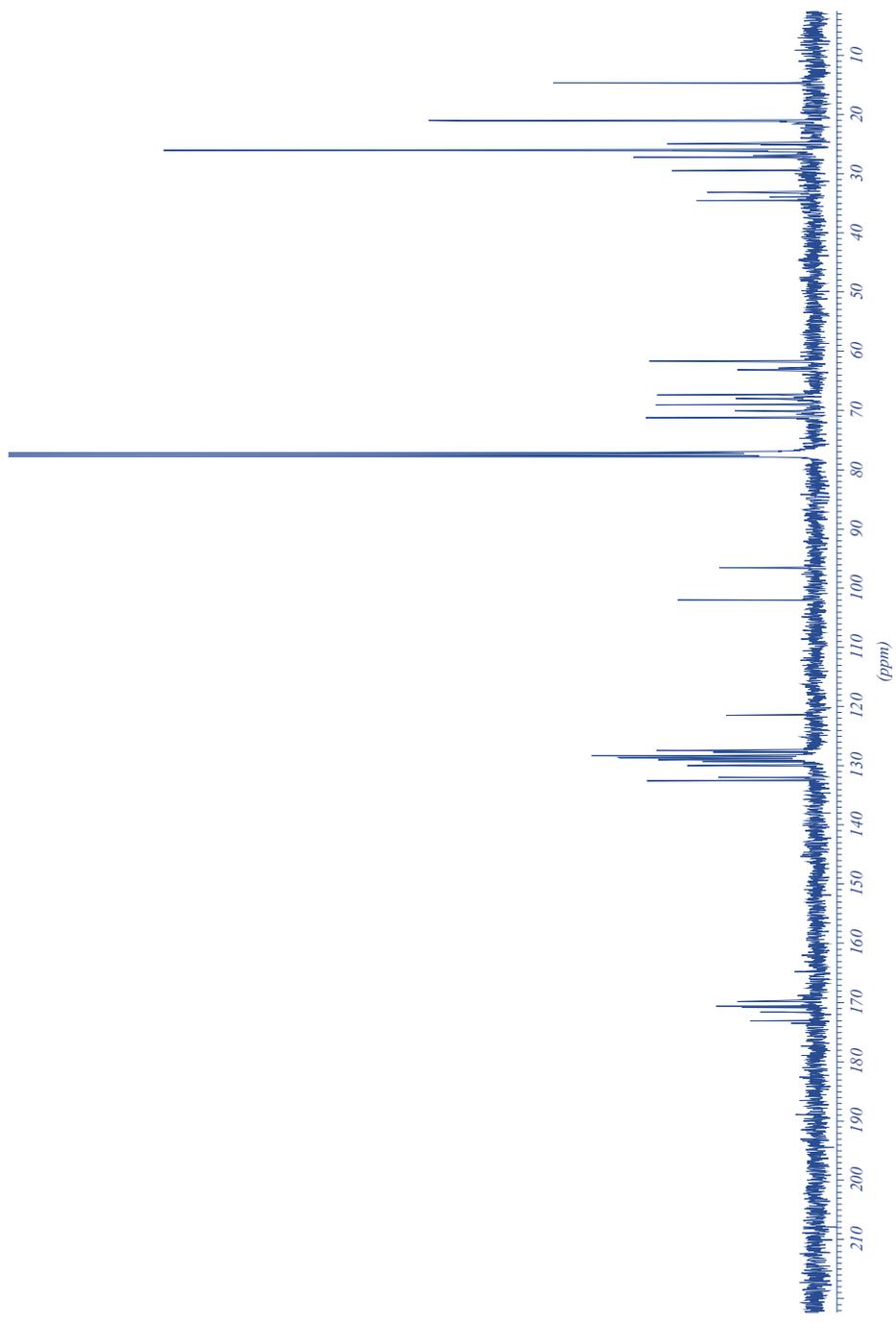


Figura 2.3.- Espectro ¹³C RMN del Heterosigma-glicolipido III (1)

(Figura 2.3), en el que se observan 3 metilenos (δ_C 67.6, 62.7, 61.2) y 5 metinos (δ_C 70.8, 70.7, 69.7, 68.6, 66.9) unidos a oxígeno así como un metino hemicetálico (δ_C 101.6), contabilizando además un total de 18 carbonos vinílicos

El estudio del experimento COSY nos permitió establecer las siguientes secuencias:

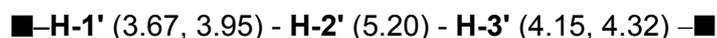
■-H-1 (4.47) - H-2 (5.18) - H-3 (5.00) - H-4 (5.37)-■

■-H-5 (3.89) - H-6 (4.14)-■

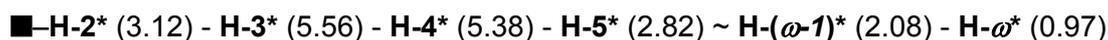
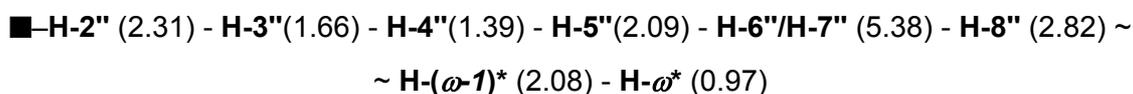
Ambas secuencias fueron unidas gracias al experimento HMBC, asignando de esta manera todos los protones del monosacárido.

Hecha esta asignación, pasamos a estudiar sus constantes de acoplamiento, que nos permitirían determinar la naturaleza del azúcar. La señal del protón situado sobre el carbono anomérico se presenta como un doblete con una $J_{1-2} = 7.9$ Hz, a su vez H-2 muestra un segundo acoplamiento, $J_{2-3} = 10.4$ Hz; por lo tanto H-2 presenta dos acoplamientos diaxiales. Sin embargo, el H-3 se acopla con H-4 con una $J_{3-4} = 3.4$ Hz característica de un acoplamiento axial-ecuatorial y este último no muestra ningún otro acoplamiento, por lo que debe encontrarse formando un ángulo $\approx 90^\circ$ con H-5. El H-5 muestra únicamente dos acoplamientos idénticos entre sí $J_{5-6} = J_{5-6'} = 6.6$ Hz. A partir de estas observaciones y de las correlaciones observadas en el experimento ROESY, se pudo deducir que el monosacárido en cuestión debía ser una β galactosa. Este resultado justifica el que no se observen conectividades entre los H-4 y H-5.

El otro grupo de señales que se observan a campos bajos en el ^1H RMN, pertenecientes al fragmento del glicerol, también pudieron ser conectados entre sí a través del experimento COSY, estableciendo la secuencia :



En cuanto a las señales que pertenecen a los dos grupos acilo presentes en la molécula, se pueden observar las siguientes conectividades en el experimento COSY:



Considerando el valor de las integrales de protón y el número de carbonos presentes en la molécula, propusimos que los grupos acilo presentes en la molécula eran el 6,9,12,15-octadecatetraenoilo, para la primera de las secuencias y el 3,6,9,12,15 - octapentaenoilo, para la segunda.

Para situar los dos grupos acilo anteriores en la molécula, recurrimos al experimento HMBC (**Figura 2.4**). En primer lugar establecimos que carbonilos pertenecían a los grupos acetato presentes en la molécula y a continuación buscamos conectividades de las otras dos señales. Así puede observarse correlación del H-3' con el carbonilo centrado a δ_{C} 171.6, que a su vez se correlaciona con uno de los protones de H-2* (δ_{H} 3.12), por lo que la cadena del 3,6,9,12,15-octapentaenoilo queda localizada sobre el extremo del glicerol. Por lo tanto la otra cadena quedaba situada sobre el C-2'.

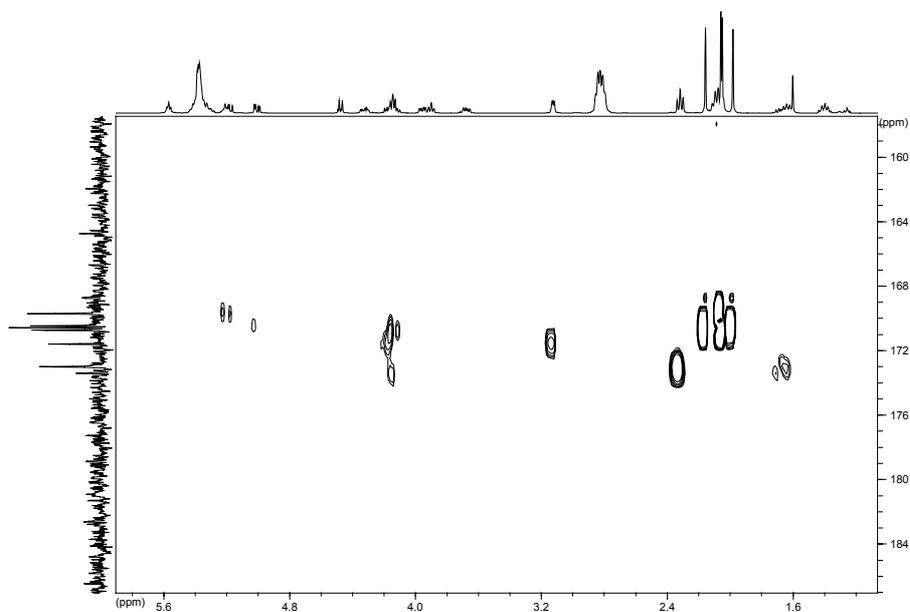
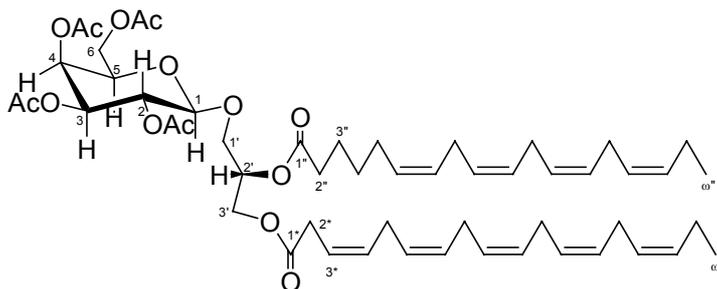


Figura 2.4.- Fragmento del experimento HMBC del Heterosigma-glicolípido III (1)

Consultada la bibliografía encontramos que todos los datos anteriores encajaban perfectamente con los que habían publicado Kitagawa y col. en 1992 para el que denominaron Heterosigma-glicolípido III como metabolito aislado del dinoflagelado *Heterosigma akashiwo*.⁷⁸



Heterosigma-glicolípido III (1)

⁷⁸ Kobayashi, M.; Hayashi, K.; Kawazoe, K.; Kitagawa, I. *Chem. Pharm. Bull.* **1992**, 40, 1404.

n ^o C	δ ¹³ C	δ ¹ H	Multiplicidad	J (Hz)
1	101.6	4.47	d	7.9
2	68.6	5.18	dd	7.9; 10.4
3	70.7	5.00	dd	10.4; 3.4
4	66.9	5.37	d	3.4
5	70.8	3.89	dd	6.6; 6.6
6	61.2	4.14	m	-
1'	67.6	3.67	dd	5.7; 11
		3.95	dd	4.8; 11
2'	69.6	5.20	dddd	3.6; 4.8; 5.7; 6.6
3'	62.7	4.15	dd	6.6; 11.9
		4.32	dd	3.6; 11.9
1''	173.2	-	-	-
2''	34.1	2.31	m	-
3''	24.5	1.66	m	-
4''	29.1	1.39	m	-
5''	26.8	2.09	m	-
6''	◆	5.38	m	-
7''	◆	5.38	m	-
8''	◆◆	2.82	m	-
ω''-1	26.8	2.08	m	-
ω''	14.3	0.97	t	7.6
1*	171.6	-	-	-
2*	32.7	3.12	m	-
3*	121.0	5.56	m	-
4*	◆	5.38	m	-
5*	◆◆	2.82	m	-
ω*-1	26.8	2.08	m	-
ω*	14.3	0.97	t	7.6

◆ Señal localizada entre 127 y 132 ppm.

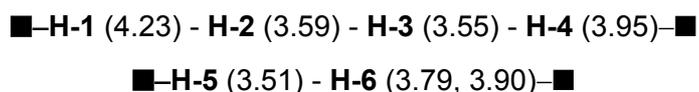
◆◆ Señal localizada entre 25 y 26 ppm.

Tabla 2.1. RMN ¹H y ¹³C del Heterosigma-glicolípido III (1)

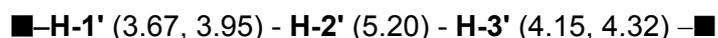
II. 2C. 2.- Hemolisina-1 (2)

El espectro de ^1H RMN de la hemolisina-1 (**Figura 2.5**) presentaba las mismas características generales que el del Heterosigma-glicolípido III (**1**), pero con una diferencia importante, la señal de los protones de doble enlace ahora integra únicamente para ocho protones. Esta observación fue confirmada en el ^{13}C RMN donde el número de señales de carbonos vinílicos se corresponde con los datos anteriores.

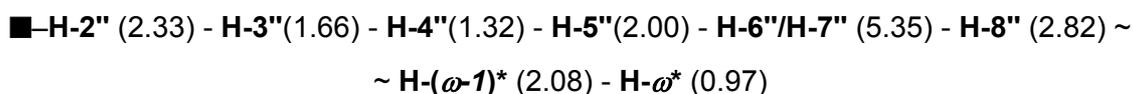
La asignación de la unidad de monosacárido fue realizada nuevamente, utilizando el experimento COSY, quedando de la siguiente manera:



Las constantes de acoplamiento de estas señales nos indican al igual que en el caso anterior, la presencia de una β -galactosa, sobre el C-1 se encuentra unido de nuevo un resto de glicerol cuyas señales fueron asignadas como:



En lo referente a las señales de protón de la cadena del ácido graso es posible establecer la siguiente secuencia, con lo que quedan asignadas las señales pertenecientes al único grupo acilo presente en la molécula:



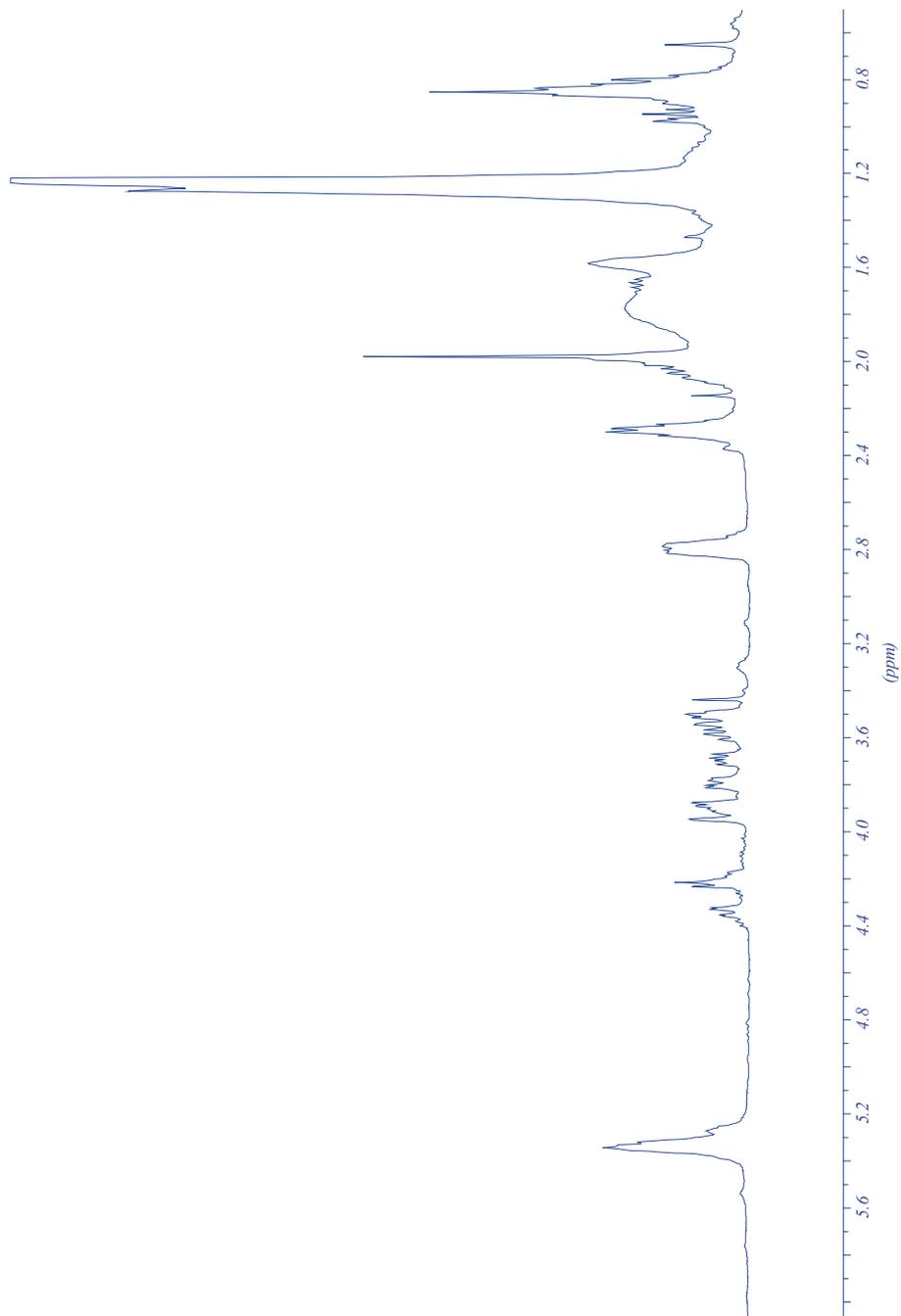


Figura 2.5.- ^1H RMN de la Hemolisina-1 (2)

Considerando el valor de las integrales de protón y el número de carbonos presentes en la molécula, concluimos que se trataba de nuevo del 6,9,12,15-octadecatetraenoilo. La localización de este grupo acilo fue establecida gracias a la información suministrada por el experimento HMBC (**Figura 2.6**) donde puede observarse correlación del carbonilo centrado a δ_C 171.6 con uno de los H-3 (δ_H 4.19).

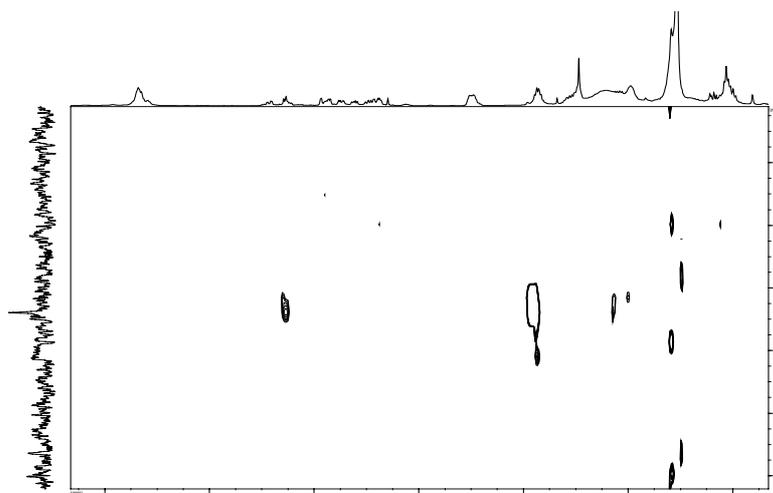
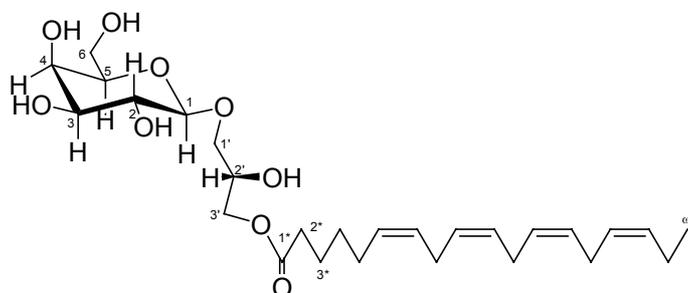


Figura 2.6.- Fragmento del experimento HMBC de la Hemolisina-I

Consultada la bibliografía encontramos que todos los datos anteriores encajaban perfectamente con los que habían publicado Yasumoto y col. para la Hemolisina-1, metabolito aislado del dinoflagelado *Amphidinium carteri*.⁷⁹



Hemolisina-1 (2)

⁷⁹ Yasumoto, T.; Seino, N.; Murakami, Y.; Murata, M. *Biol. Bull.* **1987**, 172, 128.

n°C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	J (Hz)
1	103.6	4.23	d	7.9
2	71.4	3.59	dd	7.9; 10.4
3	74.7	3.55	dd	10.4; 3.4
4	73.3	3.95	d	3.4
5	69.2	3.51	dd	6.6; 6.6
6	62.3	3.79	m	-
		3.90		
1'	68.1	3.69	dd	5.7; 11
		3.92	dd	4.8; 11
2'	70.2	5.30	dddd	3.6; 4.8; 5.7; 6.6
3'	62.7	4.19	dd	6.6; 11.9
		4.34	dd	3.6; 11.9
1''	173.2	-	-	-
2''	34.1	2.28	m	-
3''	24.5	1.65	m	-
4''	29.1	1.30	m	-
5''	26.8	2.05	m	-
6''	◆	5.4	m	-
7''	◆	5.4	m	-
8''	◆◆	2.8	m	-
$\omega''\text{-1}$	26.8	2.1	m	-
ω''	14.2	0.97	t	7.6

◆ Señal localizada entre 127 y 132 ppm.

◆◆ Señal localizada entre 25 y 26 ppm.

Tabla 2.2.- RMN ^1H y ^{13}C de la Hemolisina-1 (2)

II. 2C. 3.- Heterosigma-glicolípido IV (3)

El ^1H RMN mostraba de nuevo un espectro característico de un glicolípido (**Figura 2.7**), pero con una diferencia substancial con respecto a los casos anteriores, el numero de señales presentes a campos bajos había aumentado, pensamos pues que la nueva molécula incluía un disacárido. Esta observación se verificó en el espectro de ^{13}C RMN donde pudieron observarse dos carbonos hemiacetálicos (δ_{C} 101.7, 96.8), cuatro metilenos (δ_{C} 67.6, 62.4, 66.5, 61.5) y nueve metinos (δ_{C} 71.5, 70.9, 69.7, 68.6, 67.9, 67.5, 67.4, 67.1, 66.6) unidos a oxígeno.

La asignación de las señales de protón del disacárido fue realizada de la misma forma que en el caso anterior usando fundamentalmente el experimento COSY, estableciéndose las siguientes secuencias en la zona de campos bajos, para las dos unidades del disacárido:

■—H-1 (4.48) - H-2 (5.18) - H-3 (5.00) - H-4 (5.38)—■

■—H-5 (3.84) - H-6 (3.44, 3.77)—■

■—H-1' (4.95) - H-2' (5.11) - H-3' (5.29) - H-4' (5.42)—■

■—H-5' (4.20) - H-6' (4.13)—■

mientras que para el glicerol:

■—H-1'' (3.65, 3.99) - H-2'' (5.18) - H-3'' (4.14, 4.31)—■

Estos fragmentos fueron conectados entre sí haciendo uso del experimento HMBC, donde observamos las correlaciones entre H-1' y C-6 y la existente entre H-1 y C-1'' que permiten unir los dos azucares entre sí y estos a su vez con el glicerol.

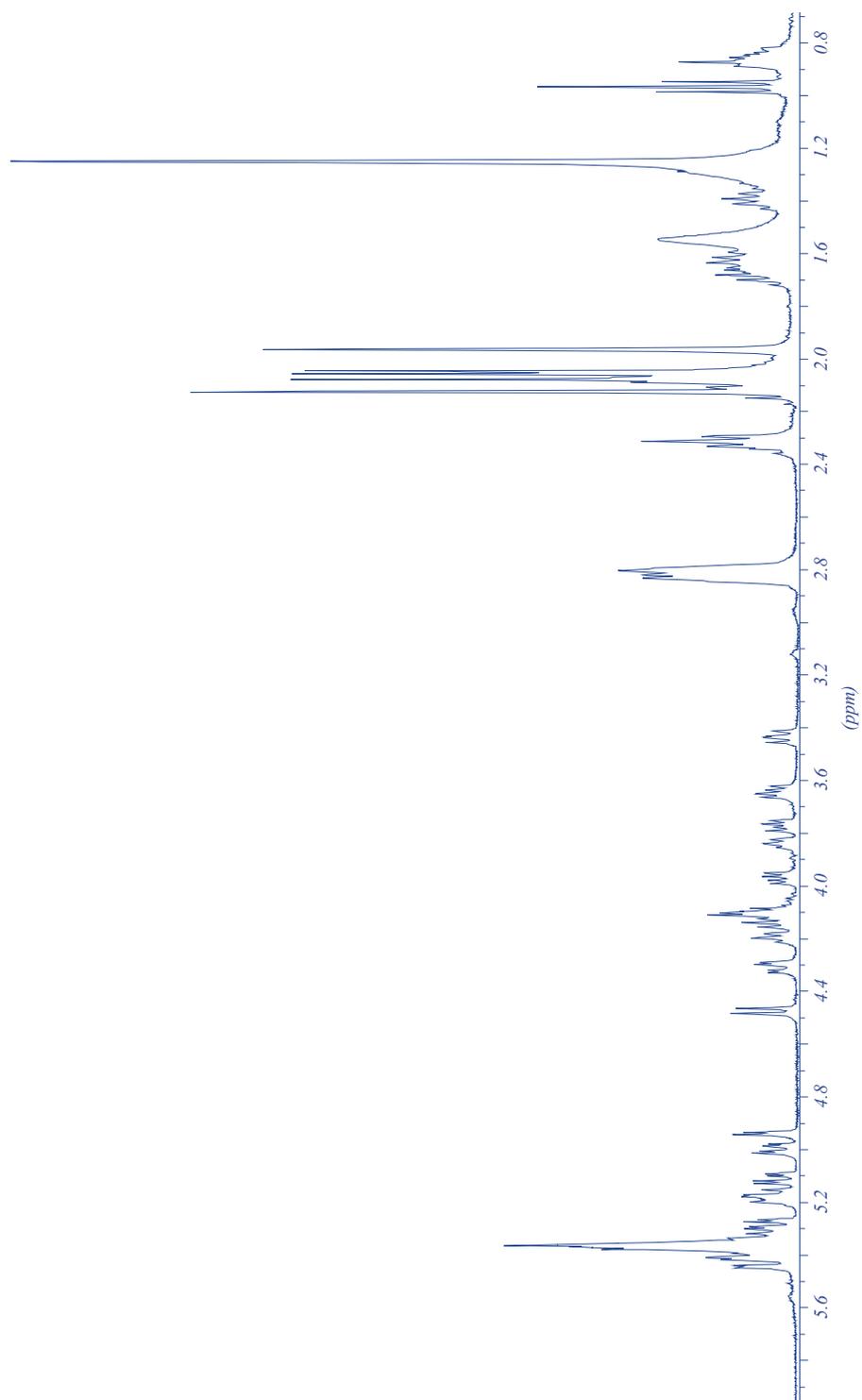
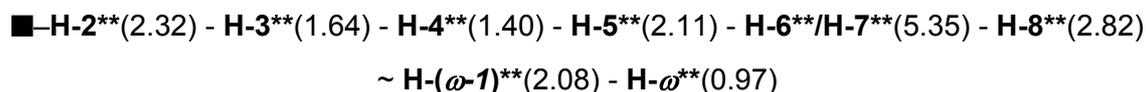
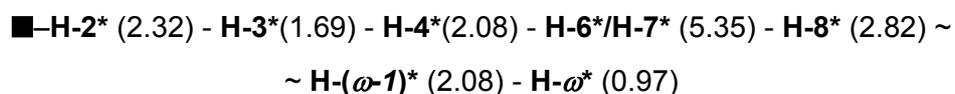


Figura 2.7.- ^1H RMN del Heterosigma-glicolípido IV (3)

El estudio del ROESY y de las constantes de acoplamiento demostró de nuevo que las dos unidades constituyentes del disacárido eran galactosa. La unión entre las dos unidades era α 1-6 (H-1', $J_{1'-2'} = 3.4$ Hz) mientras que la otra unidad se tenía el glicerol unido en posición β (H-1, $J_{1-2} = 7.8$ Hz), por lo que el glicerol digalactosido presente en esta molécula tenía que ser el 1''-O-gliceril 6-O-(α -D-galactopiranosil)- β -D-galactopiranosido.

Teniendo en cuenta las conectividades observadas en el COSY junto con el número de carbonos que aparecen en el experimento de ^{13}C y las integrales de protón, los dos ácidos grasos que esterifican los C-2'' y C-3'' del glicerol deben ser el 6,9,12,15-octadecatetraenoico y el 5,8,11,14,17-eicosapentaenoico.



Utilizando el experimento HMBC (**Figura 2.8**) se pudo observar que los protones H-3'' se correlacionan con el carbonilo centrado a δ_{C} 173.4 que a su vez mostraba correlaciones con las señales de protón centradas a δ_{H} 2.32 (H-2'') y 1.64 (H-3''), datos con los que situamos al grupo de 6,9,12,15 octadecatetraenoilo sobre el C-3''.

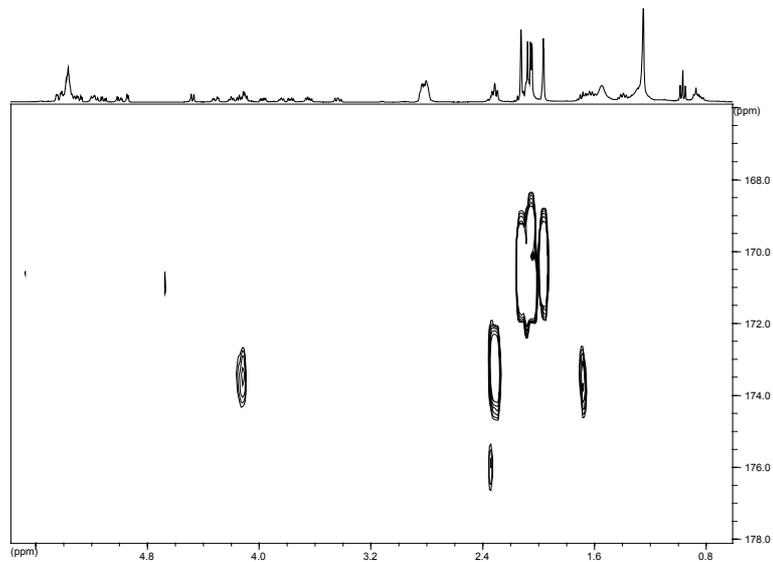
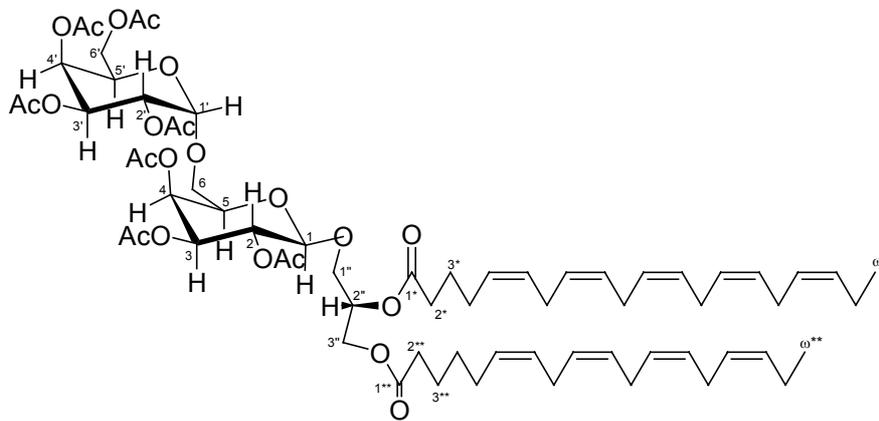


Figura 2.8.- Fragmento del HMBC del Heterosigma-glicolípido IV (3)

La estructura propuesta coincidía con la del Heterosigma-glicolípido IV también aislado por Kitagawa y col. a partir de *Heterosigma akashiwo*.⁷⁷



Heterosigma-glicolípido IV (3)

n° C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	J (Hz)
1	101.7	4.48	d	7.8
2	68.6	5.18	dd	7.8; 10.3
3	79.9	5.00	dd	3.4; 10.3
4	67.1	5.38	d	3.4
5	71.5	3.84	dd	6.4; 6.4
6	65.5	3.44	dd	6.9; 9.3
		3.77	dd	6.4; 9.8
1'	96.8	4.95	d	3.4
2'	67.5	5.11	dd	3.4; 10.8
3'	67.4	5.29	dd	10.8; 3.4
4'	67.9	5.42	d	3.4
5'	66.6	4.2	dd	6.1; 6.1
6'	61.5	4.13	dd	6.1
			dd	6.1
1''	67.6	3.65	dd	10.8; 5.4
		3.99	dd	10.8; 4.9
2''	69.7	5.18	dddd	3.4; 4.9; 5.4; 6.4
3''	62.4	4.14	dd	12.2; 6.4
		4.31	dd	12.2; 3.4
1*	173.6	-	-	-
2*	33.4	2.3	m	-
3*	24.4	1.7	m	-
4*	26.8	2.1	m	-
5*	♦	5.4	m	-
6*	♦	5.4	m	-
7*	♦♦	2.8	m	-
ω^*-1	26.8	2.1	m	-
ω^*	14.2	0.97	t	7.6
1**	173.4	-	-	-
2**	33.0	2.3	m	-
3**	24.7	1.6	m	-
4**	29.1	1.4	m	-
5**	26.8	2.1	m	-
6**	♦	5.4	m	-
7**	♦	5.4	m	-
8**	♦♦	2.8	m	-
$\omega^{**}-1$	26.8	2.1	m	-
ω^{**}	14.2	0.97	t	7.6
				-

♦ Señal localizada entre 127 y 132 ppm.

♦♦ Señal localizada entre 25 y 26 ppm.

Tabla 2.3.- RMN ^1H y ^{13}C del Heterosigma-glicolípido IV (3)

II. 2C. 4.- Monogalactosiltriacilglicerol (4)

El siguiente metabolito fue aislado como un aceite incoloro $[\alpha]_D^{25} = -3.85$; ($c=0.39$, CHCl_3), sobre el que todos los intentos de obtener un buen espectro de masas fueron infructuosos.

Los datos espectroscópicos del producto (4) mostraron la presencia de señales centradas a δ_C 105.6, 73.1, 72.4, 71.6, 67.9, y 62.2 en el ^{13}C RMN pertenecientes a un monosacarido (**Figura 2.9**). Tomando como punto de partida la señal de H-1 ($\delta_H=4.22$, d, $J_{1-2}=7.4$ Hz), de nuevo el experimento COSY nos permitió establecer las siguientes secuencias que fueron conectadas entre sí usando el experimento HMBC:

■—H-1 (4.42) - H-2 (3.60) - H-3 (3.58) - H-4 (3.87)—■

■—H-5 (3.68) - H-6 (4.29, 4.40)—■

Los valores medidos para las constantes de acoplamiento en el experimento ^1H RMN (**Figura 2.10**) $J_{2-3}= 9.5$ Hz (diaxial) y $J_{3-4}= 1.7$ Hz (axial-ecuatorial) nos permiten conocer las disposiciones relativas de los protones de la primera secuencia (H-1- H-4). De nuevo, el H-5 ($\delta_H=3.68$, dd, $J_{5-6}=J_{5-6}=6.4$ Hz) acopla únicamente con los protones del C-6 situados a $\delta_H=4.29$ y 4.40 (dd, $J_{6-6}= 11.3$ Hz). Estos datos unidos a las correlaciones espaciales observadas en el experimento ROESY, nos indicaron la presencia de una unidad de β -galactopiranososa.

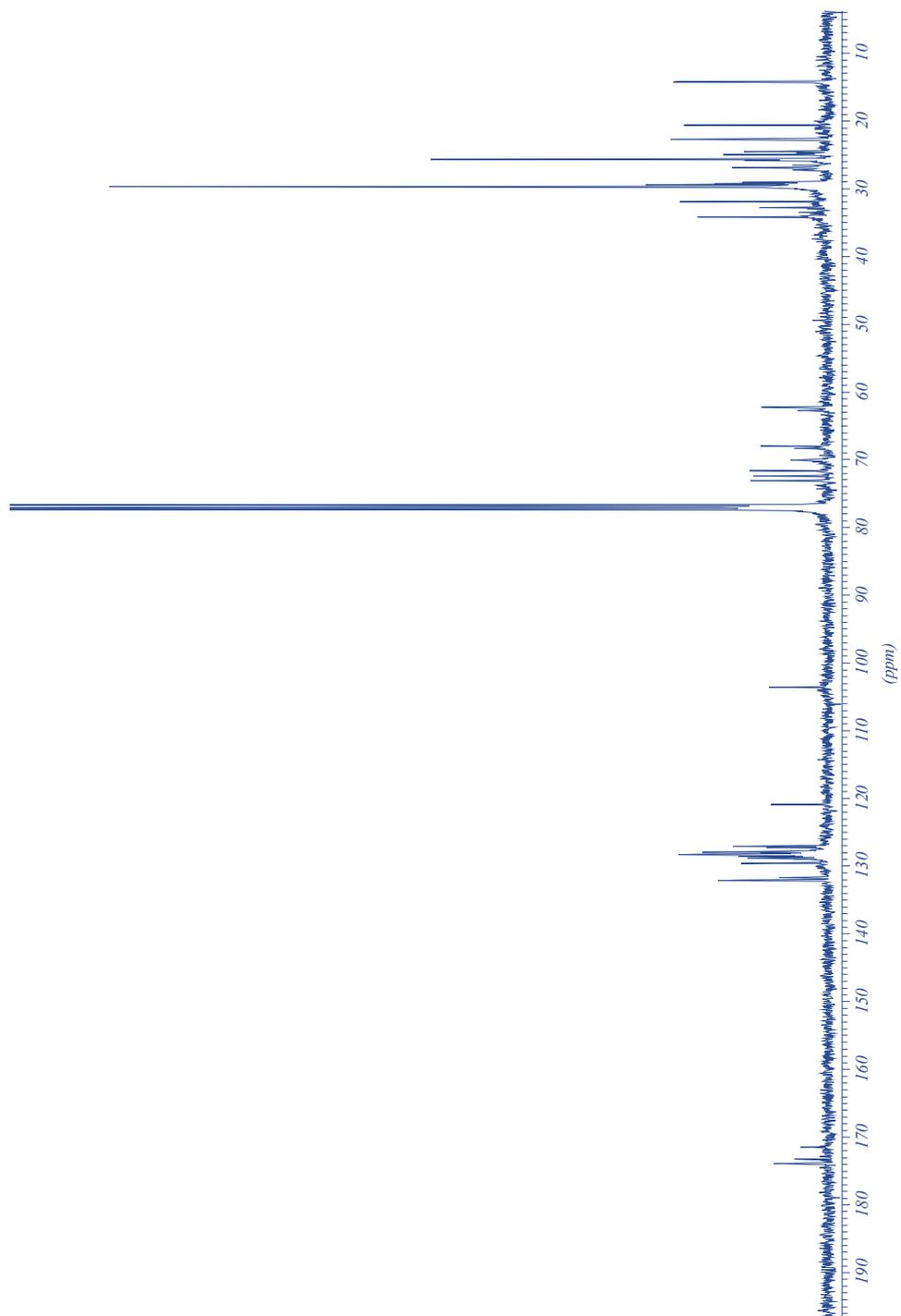


Figura 2.9.- ^{13}C RMN del monogalactosiltriácido (4)

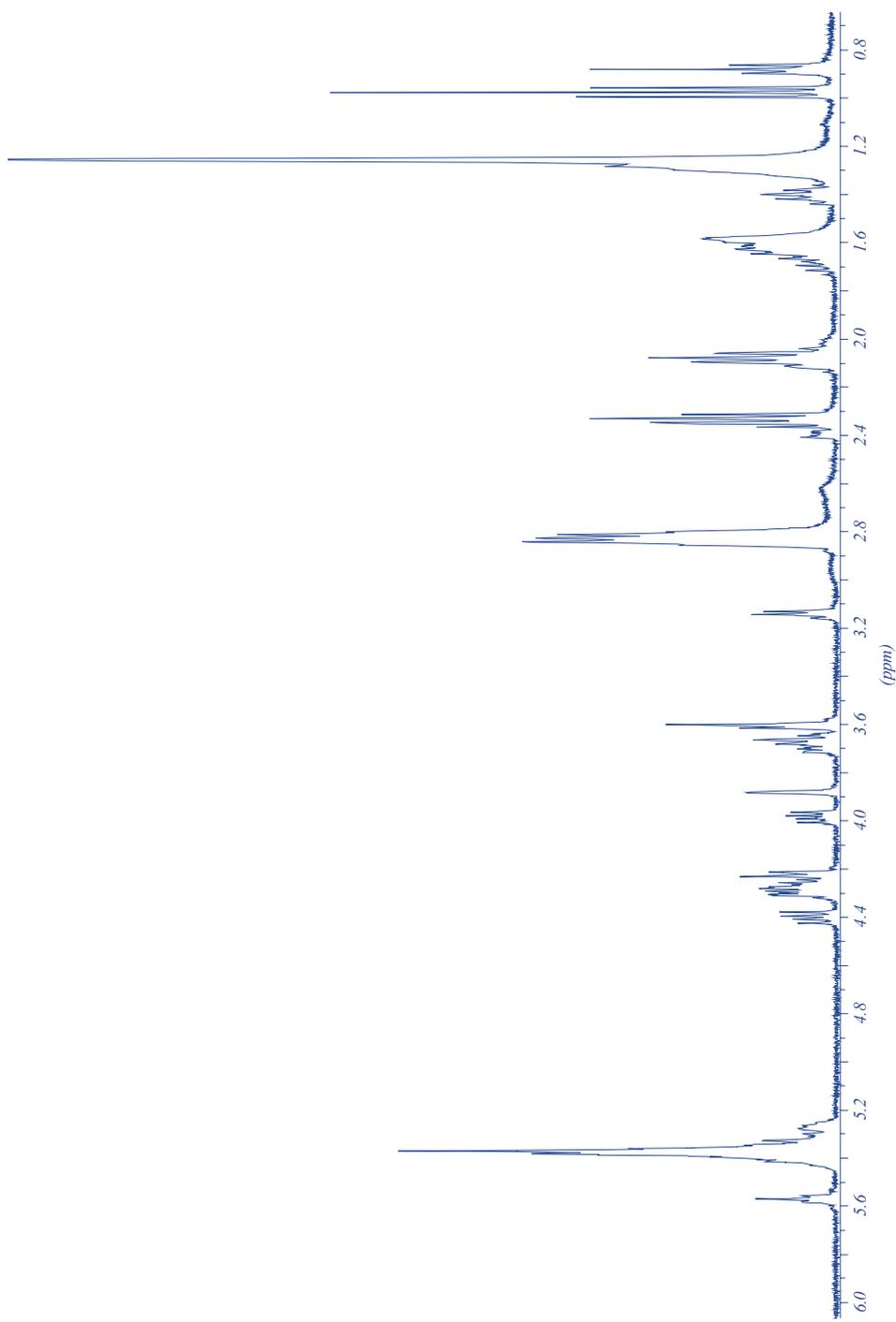
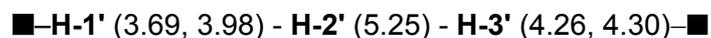


Figura 2.10.- ¹H RMN del monogalactosiltriacilglicerol (4)

La existencia de la unidad de glicerol fue confirmada por el establecimiento de la secuencia de protones:



que se correlacionan en el experimento HMQC con las señales de carbono centradas a δ 68.2, 70.0 y 62.7 respectivamente.

En esta molécula, a diferencia de lo que ocurría anteriormente, se observa la existencia de tres carbonilos de éster (δ_{C} 171.4, 173.2 y 173.9). Dos pertenecen a grupos acilo poliinsaturados, mientras que el otro pertenece a un grupo acilo totalmente saturado como puede deducirse de la interpretación de los experimentos de RMN.

El carbonilo centrado a δ_{C} 171.4 muestra conectividades con los protones H-3' del glicerol en el experimento HMBC (**Figura 2.11**), lo que nos permite situar la primera de las cadenas que esterifican el glicerol. Este mismo carbonilo se correlaciona con la señal centrada a δ_{H} 3.14 (H-2''), señal que en el COSY acopla con dos protones de doble enlace H-3''-H-4'' (δ_{H} 5.75) que a su vez llevan a la señal situada a δ_{H} 2.83 (H-5'').

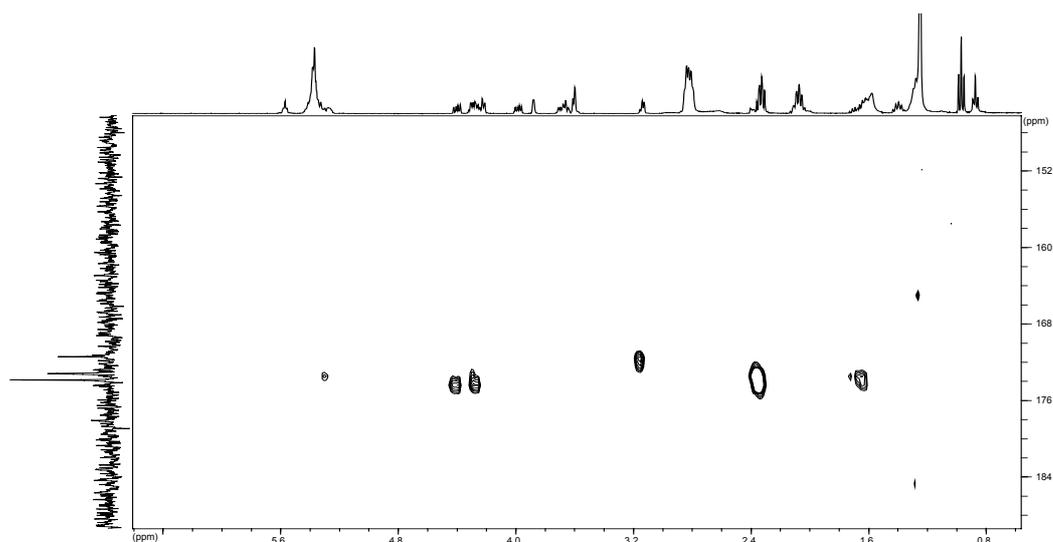
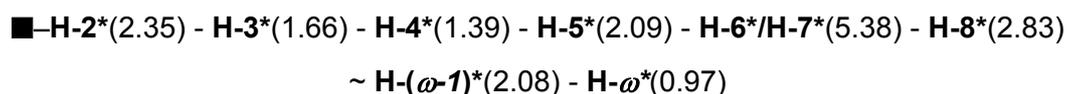


Figura 2.11.- Fragmento del experimento HMBC del monogalactosiltriacylglicerol (4)

El mismo proceso se repitió para el carbonilo centrado a δ_C 173.2 que pudo ser situado sobre el C-2' del glicerol gracias al HMBC. En este mismo experimento, ese carbonilo se correlaciona con una señal situada a δ_H 2.35 (H-2*) a partir de la cual en el experimento COSY se puede establecer la secuencia:

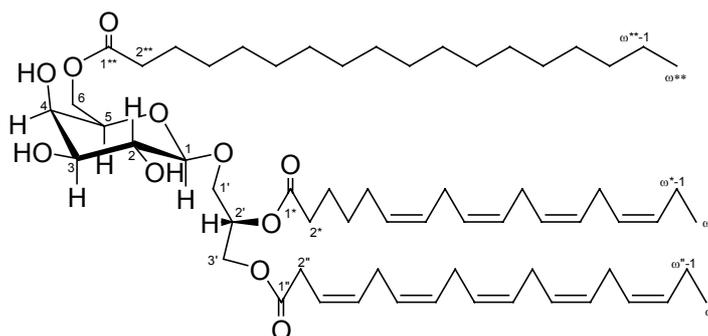


Considerando el número de carbonos de doble enlace que se observan en el ^{13}C RMN y los valores obtenidos en el ^1H RMN para la integral de los protones doblemente alílicos puede suponerse que los dos grupos acilo anteriores deben ser el 3,6,9,12,15-octadecapentaenoilo y el 6,9,12,15-octadecatetraenoilo respectivamente.

El carbonilo restante (δ_C 173.4) se correlaciona en el HMBC con los dos protones H-6 de la galactosa, quedando de esta manera perfectamente localizado. Este carbonilo también se correlaciona con las señales de protón centradas a δ_H 2.35 y

1.60, a partir de las cuales en el COSY sólo se llega hasta la señal situada a δ_H 1.26. De estos datos se deduce que se trata de una cadena totalmente saturada cuya longitud debe ser de 18 átomos de carbono atendiendo al valor de las integrales de las señales en el 1H RMN.

Para comprobar la naturaleza de los ácidos grasos que esterifican el galactosilglicerol realizamos una saponificación con metóxido sódico, obteniendo de esta manera los ésteres metílicos correspondientes. A continuación, la composición de la mezcla de ésteres de los ácidos grasos debía ser determinada usando cromatografía de gases por comparación con sustancias patrón, pero desafortunadamente el ácido 3,6,9,12,15-octadecapentaenoico no se encuentra disponible comercialmente. Por este motivo, como este ácido graso se encuentra en la molécula del Heterosigma-glicolípido III, cuyos datos habían sido comparados con los publicados, decidimos proceder a su saponificación y usar los ésteres metílicos resultantes como patrón. Efectivamente, este análisis confirmó nuestra propuesta anterior.



Monogalactosiltriacylglicerol (4)

n°C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	J (Hz)
1	103.6	4.22	d	7.4
2	71.6	3.60	dd	7.4; 9.5
3	73.1	3.58	dd	1.7; 9.5
4	67.9	3.87	d	1.7
5	72.4	3.68	dd	6.4; 6.4
6	62.2	4.29	dd	6.4; 11.3
		4.40	dd	6.4; 11.3
1'	68.2	3.69	dd	5.4; 10.8
		3.98	dd	5.9; 10.8
2'	70.0	5.25	dddd	3.5; 5.2; 5.4; 5.9
3'	62.7	4.26	dd	5.2; 11.6
		4.30	dd	3.5; 11.6
1*	173.9	-	-	-
2*	34.1	2.35	m	-
3*	24.5	1.60	m	-
4*	◆	1.26	m	-
ω^*-1	◆	1.26	m	-
ω^*	14.1	0.87	t	7.6
1**	173.2	-	-	-
2**	34.1	2.35	m	-
3**	24.9	1.66	m	-
4**	◆	1.39	m	-
5**	26.8	2.08	m	-
6**	◆◆	5.38	m	-
7**	◆◆	5.38	m	-
8**	◆◆◆	2.83	m	-
$\omega^{**}-1$	26.8	2.08	m	-
ω^{**}	14.3	0.97	t	7.6
1''	171.4	-	-	-
2''	32.8	3.14	m	-
3''	◆◆	5.56	m	-
4''	◆◆	5.56	m	-
5''		2.83	m	-
6''	◆◆	5.38	m	-
$\omega''-1$	26.8	2.07	m	-
ω''	14.3	0.97	t	7.6

◆ Señal localizada entre 29 y 30 ppm.

◆◆ Señal localizada entre 127 y 132 ppm.

◆◆◆ Señal localizada entre 25 y 26 ppm.

Tabla 2.4.- RMN 1H t 13C del Monogalctosiltriacilglicerol (4)

II. 3.- ESTUDIOS BIOSINTETICOS DEL ACIDO OKADAICO

II. 3A.- ANTECEDENTES

Durante los últimos años nuestro grupo de investigación ha venido desarrollando una línea de trabajo orientada hacia el estudio químico-estructural y biosintético de las toxinas marinas responsables del denominado síndrome diarréico (DSP). Disponer de una fuente continua de toxinas y no depender del fenómeno natural era fundamental a la hora de abordar su estudio. Con este motivo, se llevaron a cabo cultivos artificiales del dinoflagelado *Prorocentrum lima*, uno de los responsables de su producción.

Como **condiciones idóneas para el cultivo** a gran escala del dinoflagelado fueron elegidas las siguientes: Se utilizó el medio K descrito por Guillard,⁸⁰ puesto que es el medio más específico y mejor caracterizado para este dinoflagelado. La temperatura del cultivo se estableció en 23 °C, puesto que por debajo de los 17 °C el crecimiento era más lento en su primera fase y por encima de los 25 °C las células morían o se enquistaban con facilidad. Los cultivos se desarrollaron sin aireación ni fotoperiodo pues ambos se mostraron innecesarios. En lo referente a la iluminación los mejores resultados se obtuvieron utilizando la luz suministrada por tubos fluorescentes de neón, con una intensidad lumínica equivalente al 10% de la existente en la superficie del mar a pleno sol (unos 160 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-2}$). Cuando la intensidad aumentaba se producía una despigmentación paulatina de los microorganismos y aumentaba la turbidez del medio.

⁸⁰ Guillard, R.R.L.; Keller, M. "*Dinoflagellates*", 1984, Spector D.L. Ed., Academic Press, New York.

Las cepas son mantenidas en tubos de ensayo que contienen 10 mL de medio Guillard K y son renovados con una periodicidad mensual. La primera etapa del *ciclo de cultivo* para realizar cultivos a gran escala, consiste en preparar una batería de 50 erlenmeyers de 250 mL con 150 mL de medio. Transcurridos 30 días, tiempo en que el cultivo estabiliza su crecimiento, 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 tanques de vidrio de 60 L conteniendo 40 L de medio. Como norma general el paso de una etapa a otra se hace tomando como inóculo dos recipientes del nivel inferior e inoculando en un recipiente de volumen superior conteniendo aproximadamente 2/3 de medio de cultivo y dejando 1/3 de su volumen como cámara de aire.

Una vez completado el ciclo de crecimiento en las condiciones anteriores, se lleva a cabo la recolección de las células. A partir de esas células fueron aisladas e identificadas las toxinas ácido okadaico (AO, **1**), dinofisistoxina-1 (DTX-1, **2**) y dos nuevos ésteres del ácido okadaico (**3** y **4**). (**Figura 3.1**)

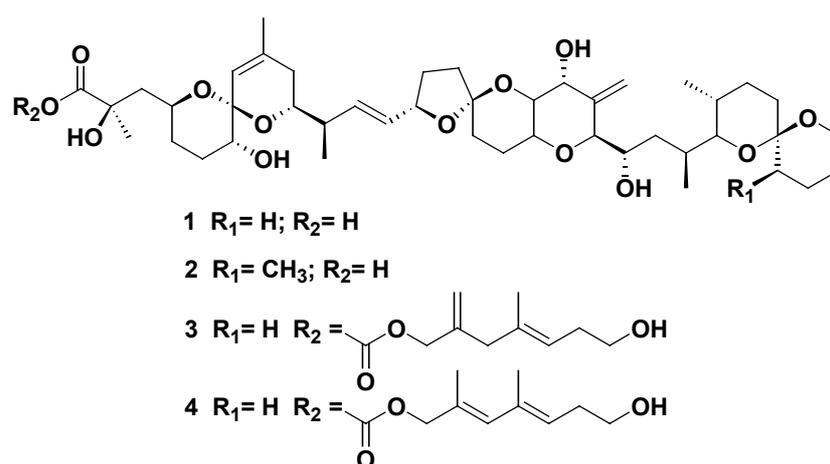


Figura 3.1

En cuanto a los **aspectos biosintéticos**, fueron realizados varios experimentos de adición de marcadores a cultivos artificiales del dinoflagelado. Estos experimentos pusieron de manifiesto la incorporación selectiva de los precursores, resumiéndose los resultados alcanzados a continuación:

- Para el esqueleto carbonado del AO, de la DTX-1 y de los ésteres **(3)** y **(4)**, después de la adición de $[1-^{13}\text{C}_1]$, $[2-^{13}\text{C}_1]$ y $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ acetato sódico, se observó el enriquecimiento de todos los carbonos de la molécula a excepción de C-37 y C-38, así como de C-1' y C-2' en las cadenas laterales de los ésteres.⁸¹⁻⁸² Estos resultados se resumen en la **figura 3.2**, en la que los carbonos identificados como **c** y **m** indican su procedencia a partir del carboxilo C-1 y del metilo C-2 del acetato respectivamente. Como puede verse, 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 2 del carboxilo, con dos unidades intactas de acetato.

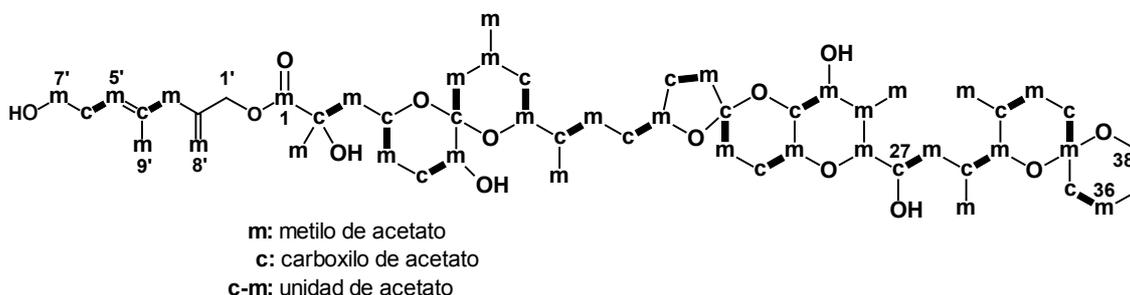


Figura 3.2.- Resumen de los resultados obtenidos por adición de acetatos enriquecidos en ^{13}C

⁸¹ Norte, M.; Padilla, A.; Fernández, J.J. *Tetrahedron Letters* **1994**, 35, 1441.

⁸² Norte, M.; Padilla, A.; Fernández, J.J.; Souto, M.L. *Tetrahedron* **1994**, 50, 9175.

- El origen de C-37 y C-38 fue establecido a partir del glicolato,⁸³ al igual que podría ocurrir en C-1' y C-2' si tenemos en cuenta la similitud entre las cadenas laterales aisladas en nuestro grupo y las presentes en los ésteres del AO en los que se llevaron a cabo estos experimentos.⁸⁴

Los resultados anteriores permiten afirmar que estas moléculas no son policétidos clásicos y por ello se propuso una hipótesis biogénica en la que estos metabolitos se biosintetizan a partir de la condensación de 5 fragmentos **A-E** de tres tipos diferentes en función de su origen (**Figura 3.3**)

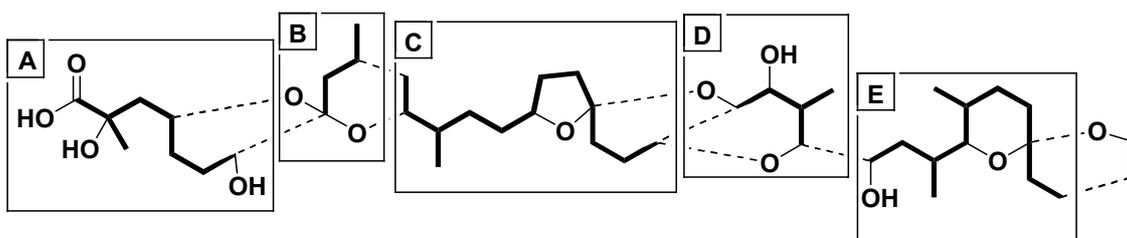


Figura 3.3

Tres de estos fragmentos (**A, C, E**) tendrían su origen en la condensación directa de unidades de acetato, mientras que en los otros dos (**B y D**) el acetato podría ser introducido en otras rutas previamente a su incorporación a la molécula, tal y como se propone que ocurre con otro grupo de toxinas polietéricas de origen marino, las brevetoxinas. En estas toxinas también se observan secuencias parecidas del tipo **c-m, c-m-m, c-m-m-m** e incluso **c-m-m-m-m** (**Figura 3.4**) para los que se propone que tienen su origen en el ciclo del ácido cítrico⁸⁵.

⁸³ Needham, J.; McLachlan, J.L.; Walter, J.A.; Wright, J.L.C. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 2599.

⁸⁴ Needham, J.; Hu, T.; McLachlan, J.L.; Walter, J.A.; Wright, J.L.C. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 1623.

⁸⁵ Lee, M.S.; Qin, G.; Nakanishi, K.; Zagorski, M.C. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 6234.

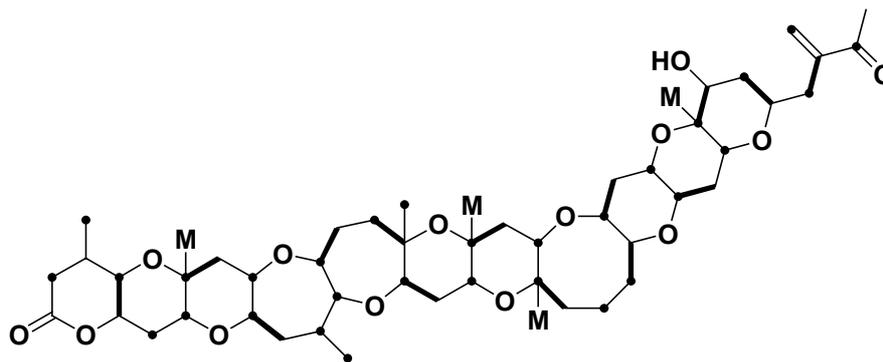
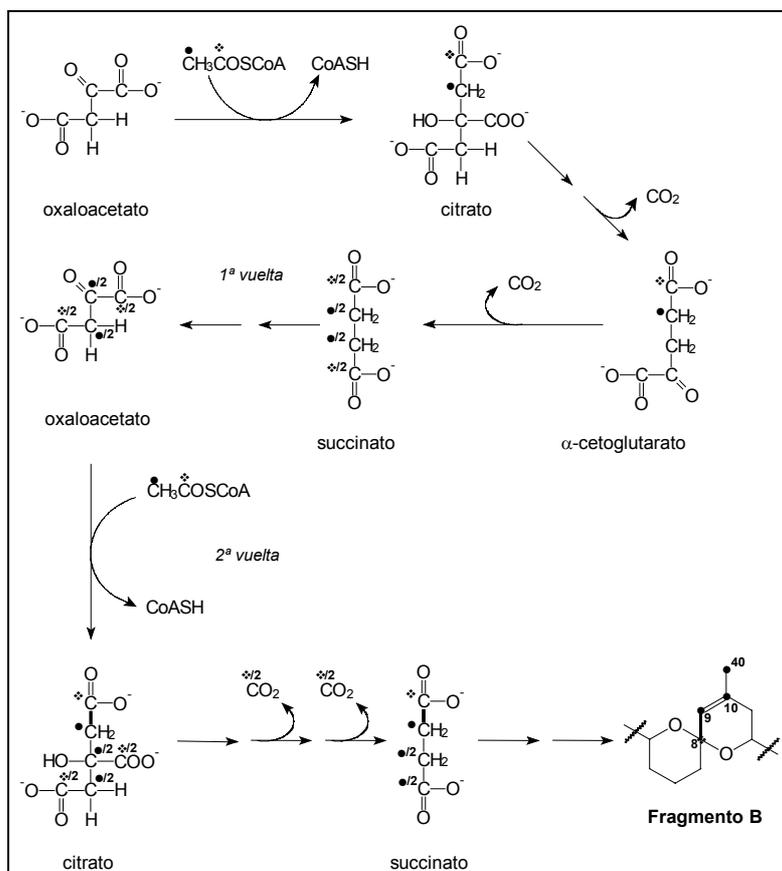


Figura 3.4.- Patrón de incorporación con acetatos enriquecidos en ^{13}C para la brevetoxina A. Con un punto se indican los carbonos que provienen del metilo de acetato. Con trazo grueso las unidades intactas de acetato. Con M los metilos que provienen de metionina

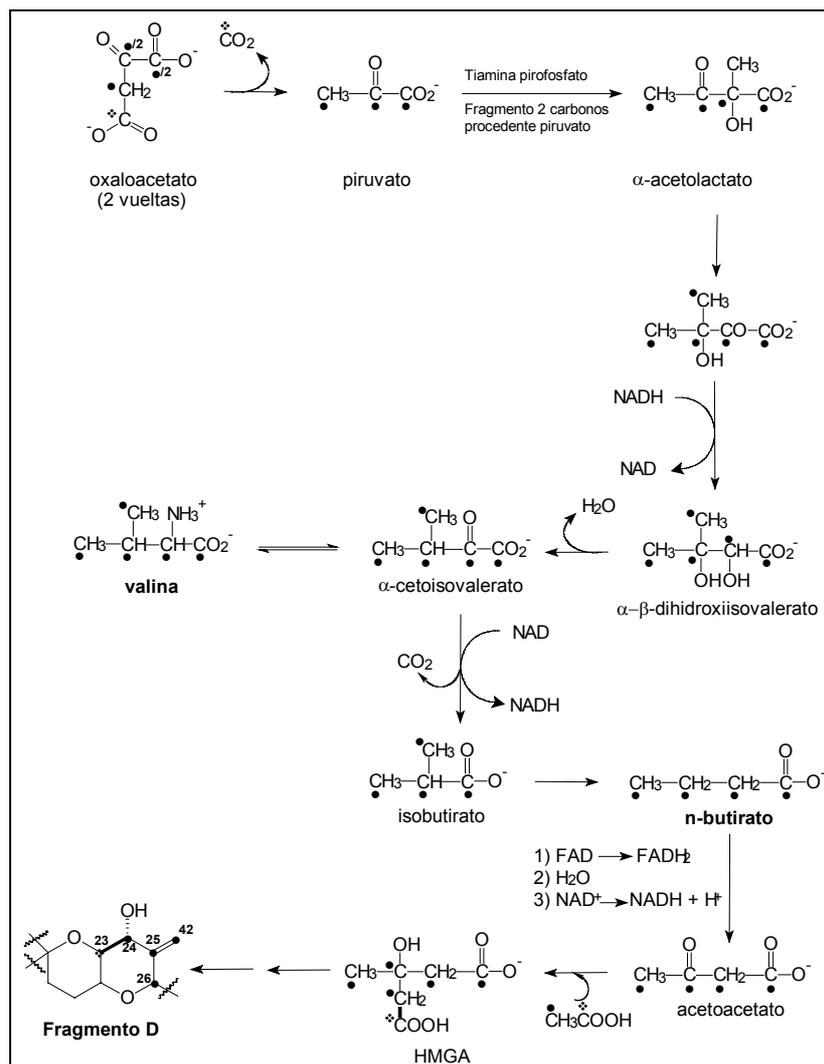
El fragmento **B** del AO, que se corresponde con C-8/C-9/C-10/C-40, es un policétido no clásico puesto que sus carbonos derivan de acetato según la secuencia **c-m-m-m**. El origen de este tipo de fragmentos podría estar en el ciclo del ácido cítrico y más concretamente en el succinato tal y como se expone en el **esquema 3.1**.



Esquema 3.1

Así, 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-m-m** idéntica a la observada.

El fragmento C-23/C-24/C-25[C-42]/C-26, presenta una secuencia **c-m-m[m]-m**. De acuerdo con la estructura del fragmento **D** el precursor metabólico que mejor se adaptaría sería el 3-hidroxi-3-metil-glutámico, que se incorporaría a la cadena carbonada a través del grupo carboxilo C-23 y vía descarboxilación por C-26. Todo esto con la particularidad de que para generar la secuencia observada sería necesaria una ruta metabólica alternativa.



Esquema 3.2

Para ello, se tuvo en cuenta el hecho de que los dinoflagelados involucran a los aminoácidos en la biosíntesis de sus toxinas.⁸⁶ En los estudios biosintéticos realizados sobre la monensina A, ha podido constatare la implicación de la L-valina en la biosíntesis de la misma por el hongo *Streptomyces cinnamomensis*.⁸⁷ 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 3.2**. En ella, se parte del oxaloacetato obtenido después de

⁸⁶ Shimizu, Y. Wrensford, G. *Toxin Phytoplankton Blooms in the Sea*, Smayda, T.J.; Shimizu, Y. Eds; Elsevier, Amsterdam, 1993, 907.

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 de acetato, generando una unidad de piruvato totalmente enriquecida por el metilo de 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-butirato enriquecido de la misma manera. El reagrupamiento de éste n-butirato observado en el *S. cinnamensis* junto con la β -oxidación de este último nos generaría el 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**.

Con posterioridad a la publicación de estos datos, Wright y col.⁸⁸ publicaron los resultados obtenidos en su laboratorio tras 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 3.5**

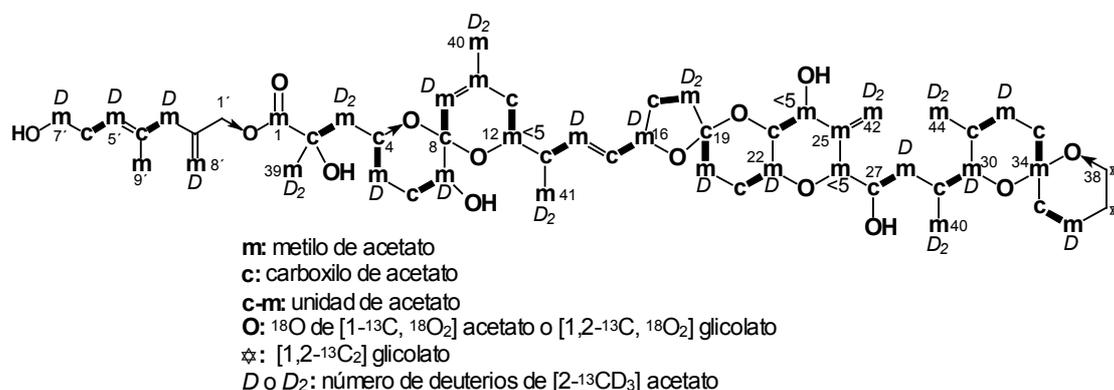


Figura 3.5

En efecto, en los experimentos con $[2-^{13}\text{CD}_3]$ acetato sódico, la mayoría de los carbonos derivados del metilo de las unidades de acetato, retienen un único átomo de

⁸⁷ Reynolds, K.A.; O'Hagan, D.; Gani, D.; Robinson, J.A. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, **1998**, 3195.

deuterio, dato extensible a la cadena de los ésteres. Excepción a este comportamiento son los C-3 y C-18 que retienen dos deuterios, indicando que en el proceso biosintético no ha tenido lugar deshidratación en los carbonos C-4 y 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 el experimento [$1\text{-}^{13}\text{C}_1, ^{18}\text{O}$] acetato sódico se observó retención de ^{18}O únicamente en C-4 y C-27 por lo que se plantea que en general el ^{18}O es reemplazado durante la formación del hemiacetal.

Muy recientemente, Murata y col. realizaron un estudio de incorporación de ^{18}O en el AO usando espectrometría de masas.⁸⁹ En ese estudio se comprobó que las posiciones que resultaban marcadas tras la adición de ^{18}O acetato sódico fueron los O(4), O(6), O(7), O(11) (los oxígenos están numerados empezando por los que pertenecen al ácido carboxílico como O(1)/O(2) y finalizando por el O(13) en el anillo G). Tras la adición de $^{18}\text{O}_2$ las posiciones marcadas fueron O(12), O(10), O(9), O(8), O(6), O(5), O(3) y sólo uno de los O(1)/O(2). A partir de este último hecho unido a que el C-1 proviene de un metilo de acetato los autores plantean la posibilidad de que el carboxilo se forme en una oxidación de tipo Baeyer-Villiger seguida de la incorporación de un átomo de oxígeno del H_2O catalizada por una deshidrogenasa. Por otro lado el patrón de incorporación de los oxígenos sugiere que la ciclación de los anillos C, D y E tienen lugar a través de un intermedio tipo epóxido en C-22/C23.

⁸⁸ Needham, J.; Hu, T.; McLachlan, J.L.; Walter, J.A.; Wright, J.L.C.J. *Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 8757.

⁸⁹ Murata, M.; Izumikawa, M.; Tachibana, K.; Fujita, T.; Naoki, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 147.

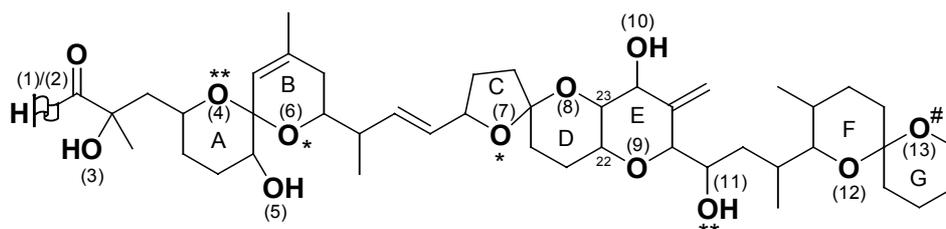


Figura 3.6.- Patrón de incorporación de ^{18}O en el ácido okadaico. (O^*) (menos del 30%) y (O^{**}) (más del 30%) son los oxígenos marcados a partir de $^{18}\text{O}_2$ acetato sódico. ($\text{O}^\#$) proviene de glicolato. Uno de los C-1/C-2 no incorpora ^{18}O ni a partir de $^{18}\text{O}_2$ ni de acetato. El resto de los oxígenos incorporan ^{18}O a partir de $^{18}\text{O}_2$.

Previamente a la publicación de los dos últimos experimentos y con el fin de confirmar nuestra propuesta biogénica para los fragmentos **B** y **D**, se realizaron en nuestro laboratorio nuevos experimentos de marcaje por adición de los precursores $[1,4\text{-}^{13}\text{C}_2]$ succinato sódico y $[2\text{-}^{13}\text{C}_1]$ butirato sódico a los cultivos de *P. Lima*.⁹⁰ Para el primer caso la razón es obvia puesto que su origen lo proponíamos en el metabolismo del succinato. Para el segundo, su origen los 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.

En el experimento con $[1,4\text{-}^{13}\text{C}_2]$ succinato sódico, a concentraciones 0.33 mM, idénticas a las empleadas con el acetato sódico, se produjo la muerte del dinoflagelado. Las concentraciones se fueron disminuyendo hasta 0.15 mM donde se consiguió un cultivo que mantuvo la vitalidad suficiente para realizar el experimento, observándose una incorporación al azar.

Por el contrario tras la adición de $[2\text{-}^{13}\text{C}_1]$ butirato sódico en primera instancia se observó el enriquecimiento de los mismos carbonos que lo hacen cuando se adiciona $[2\text{-}^{13}\text{C}_1]$ acetato sódico. Sin embargo, una comparación más detallada de los resultados obtenidos en ambos casos, nos permitió establecer que los carbonos C-3,

C-14, C-18, C-22, C-26, C-30 y C-34 muestran en el experimento con [2-¹³C₁] butirato sódico un incremento del grado de enriquecimiento.

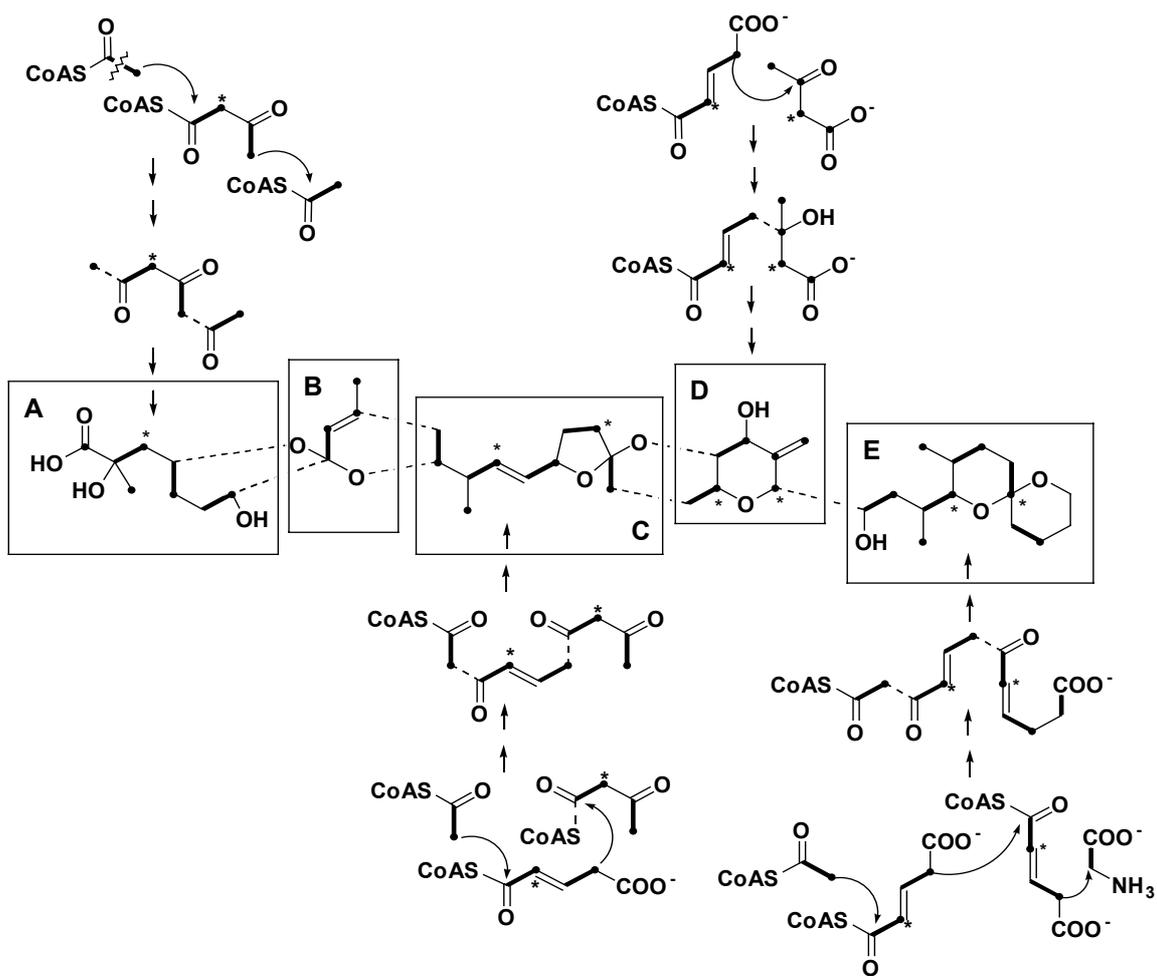
Para explicar estos resultados se propuso una ruta teniendo en cuenta las consideraciones anteriores, pero que implicara a seis precursores avanzados capaces de incorporarse a la molécula. Esta propuesta se resume en el **esquema 3.3**.

Llegados a este punto, decidimos realizar el experimento de adición de 2-¹³CD₃ acetato sódico que comentaremos en detalle a continuación, con el fin de verificar la hipótesis biogenética anterior.

II. 3B.- EXPERIMENTO DE ADICIÓN DE [2-¹³CD₃] ACETATO SODICO

A pesar de los inconvenientes que presenta la ²H RMN, el deuterio es el núcleo de elección en numerosos estudios biosintéticos debido a la valiosa información que brinda en determinadas ocasiones. Sus mayores limitaciones son consecuencia de su pequeña relación giromagnética ($\gamma_D/\gamma_H \cong 1/6.5$) y del hecho de que es un núcleo que presenta momento cuadrupolar (I=1). Como consecuencia de esto último el deuterio se relaja muy rápidamente, lo que produce un ensanchamiento de las señales (poca resolución y baja relación señal/ruido).

⁹⁰ Datos no publicados. Tesis doctoral Souto, M.L. 1996. Universidad de La Laguna.



Esquema 3.3

Por el contrario, debido a la pequeña relación giromagnética del deuterio, los núcleos unidos a él, ^{13}C , se relajan mucho más lentamente (las velocidades de relajación son proporcionales a $(\gamma_{\text{D}}/\gamma_{\text{H}})^2 \cong 0.02$). Como consecuencia, los tiempos de relajación de núcleos como ^{13}C se verán elevados, lo que conduce a un estrechamiento de las señales y a un aumento de la relación señal/ruido. Además, la distancia de enlace C- ^2H es menor que la del enlace C- ^1H , generando una mayor densidad electrónica en los ^{13}C unidos a un deuterio, lo que justifica el efecto apantallante del isótopo más pesado. Los acoplamientos spin-spin ($^1J_{\text{CD}}$) producirán multipletes característicos ($2nI+1$), así un $\text{R}_3\text{-CD}$ aparecerá como un triplete, mientras que $\text{R}_2\text{-CD}_2$ y R-CD_3 lo harán como quintuplete y heptuplete respectivamente. Por lo tanto, cuando un átomo de deuterio está directamente unido a un ^{13}C , en el experimento de ^{13}C RMN se observa un grupo de señales a campos más altos (normalmente 0.2-0.6 ppm).

Aún cuando de esta manera se mejora mucho en el análisis de los resultados, si el problema es medianamente complicado los solapamientos entre las señales hacen muy difícil su interpretación. Igualmente, cuando la cantidad de muestra no es grande es difícil observar correctamente los picos isotópicos con toda su multiplicidad. Una alternativa nos la brinda la utilización de espectroscopía de RMN ^{13}C en la que desacoplan los núcleos de ^1H y ^2H simultáneamente, $\{^1\text{H-}^2\text{H}\} ^{13}\text{C}$ RMN. En este experimento, asumiendo que no hay acoplamiento $^{13}\text{C-}^{13}\text{C}$, cada una de las especies sustituidas por ^1H y/o ^2H en un carbono particular dará un singlete, que puede diferenciarse debido a la aditividad que presentan los efectos isotópicos, lo que simplifica mucho el espectro.

II. 3B. 1.- Optimización del experimento $\{^1\text{H}-^2\text{H}\} ^{13}\text{C}$ RMN.

Los espectros de ^{13}C obtenidos en las condiciones habituales, desacoplamiento continuo de ^1H (aparición del efecto NOE) y tiempos de recuperación cortos (1s), no permiten realizar análisis cuantitativos de ^{13}C , ya que tanto el incremento de la intensidad de las señales de ^{13}C debido al efecto NOE como los tiempos de relajación spin-retículo (T_1) son característicos de cada carbono. Sin embargo, si el desacoplador de banda ancha se enciende sólo durante el tiempo de adquisición de la FID, se obtiene un ^{13}C RMN desacoplado en protón con supresión del NOE (inverse gated decoupling). Además, los efectos de la relajación en la intensidad de las señales pueden ser reducidos dejando el suficiente tiempo ($3T_{1\text{max}}$) entre dos pulsos con el fin de permitir la relajación completa del carbono "más lento" de la molécula. En estas condiciones sí es posible una evaluación cuantitativa del experimento de ^{13}C RMN.

Para poder cuantificar el grado de incorporación tanto del ^{13}C como el del ^2H monitorizado a través de dicho núcleo es necesario disponer de un patrón interno con un grado de enriquecimiento conocido. Con este fin generalmente se añade una cantidad conocida de un compuesto con abundancia natural de ^{13}C (1.108%). Consultada la bibliografía, vimos como generalmente se usan con este fin moléculas de pequeño tamaño como el diclorometano. Sin embargo, estas moléculas tienen un T_1 mucho mayor que los carbonos "más lentos" del AO por lo que se convertirían en el factor limitante que aumentaría el tiempo de espera necesario entre pulsos, esto a su vez implicaría que el experimento fuese aún más largo.

Por este motivo decidimos buscar otro patrón cuyos carbonos fueran equivalentes y que tuviese un T_1 lo suficientemente corto para que interfiriese lo

menos posible en las medidas. La sustancia elegida fue el éter corona 15/5 ($T_1=2.5s$) ya que su T_1 es bastante menor que el de moléculas como el diclorometano ($T_1=21s$) o el benceno ($T_1=20s$), como pudimos comprobar experimentalmente (**Figura 3.7**), mediante la realización de un experimento de inversión-recuperación de ^{13}C sobre estas tres sustancias.

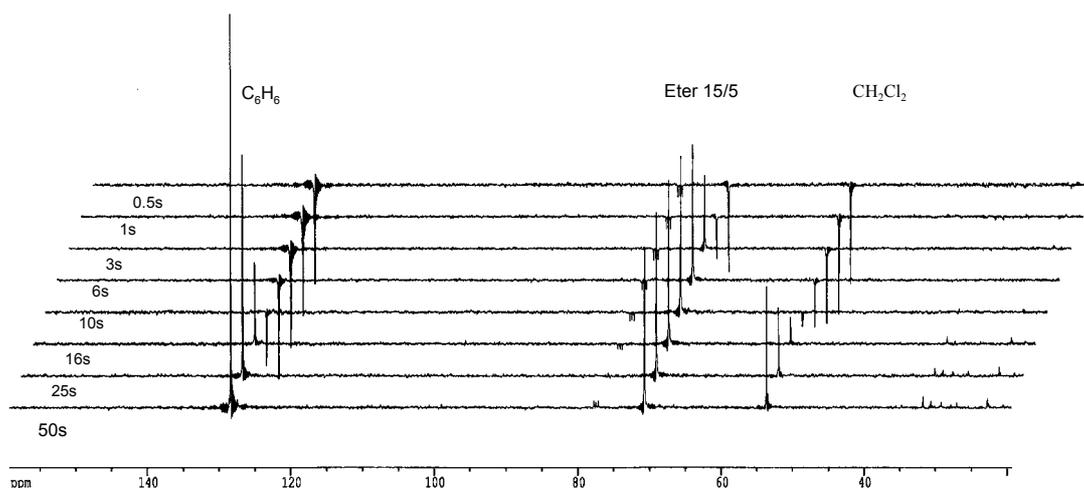


Figura 3.7.- Medida de los T_1 del benceno, diclorometano y éter corona 15/5.

En cuanto al AO, para establecer cual sería el tiempo de relajación necesario, decidimos realizar experimentos con una muestra enriquecida a partir de $[2-^{13}C_1]$ acetato sódico con diferentes tiempos de relajación. Así vemos en la **figura 3.8** que un tiempo de 1s resulta insuficiente si lo comparamos con los resultados obtenidos con 5s, mientras que tiempos superiores, p.ej. 15s no mejoran demasiado la situación. A la vista de estos resultados utilizamos un tiempo de relajación entre pulsos de 5s como valor óptimo para nuestro experimento.

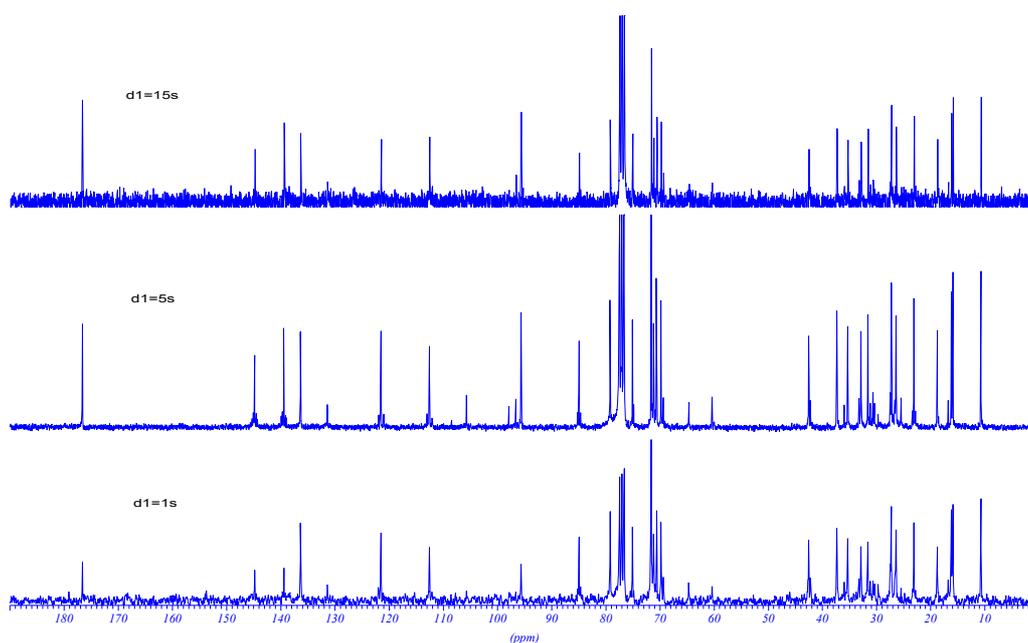


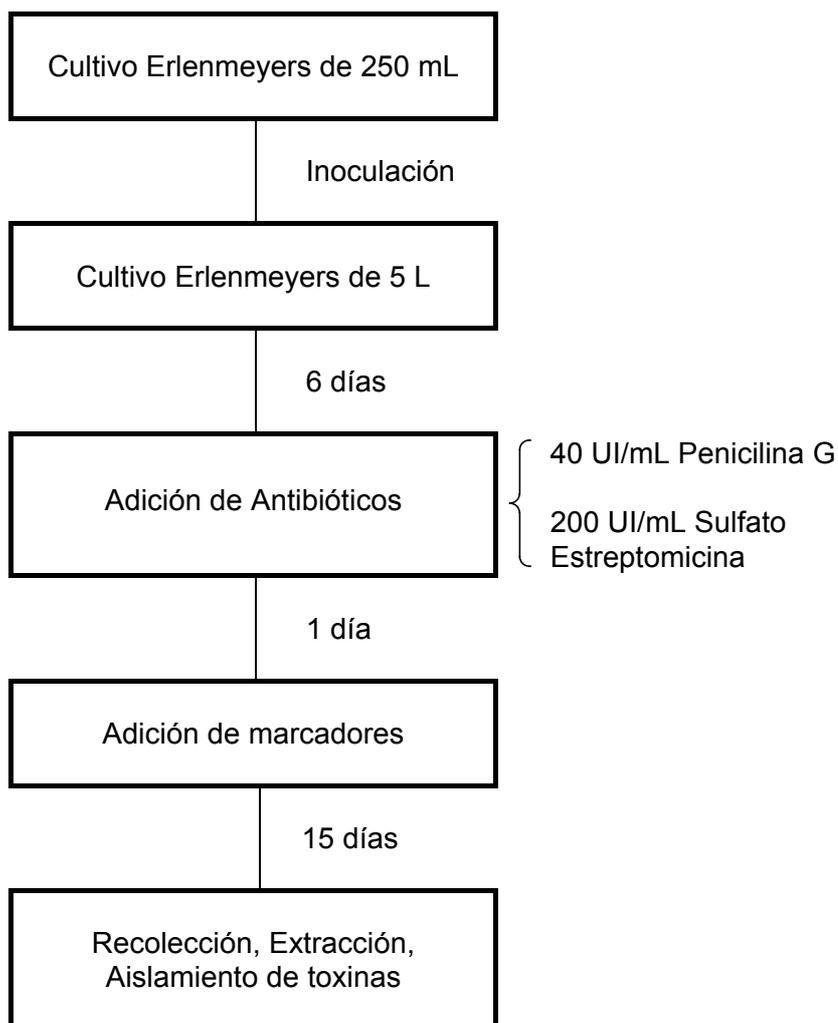
Figura 3.8.- RMN ^{13}C del AO usando distintos tiempos de recuperación.

II. 3B. 2.- Descripción 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 en relación a la cantidad de extracto obtenido

El experimento biosintético comenzó con la inoculación de ocho erlenmeyer de 5L conteniendo 3L de medio Guillard K, 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 del marcador.. La concentración de marcador utilizada fue de 0.33 mM. 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 3.3**).



Esquema 3.3

II. 3B. 3.- Análisis de los resultados del experimento biosintético con el AO.

El AO resultante del experimento biosintético con [2-¹³CD₃] acetato sódico, mostró enriquecimientos de ¹³C distintivos en las señales 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, C-44. Este patrón de incorporación es idéntico al observado durante los experimentos de adición de [2-¹³C] acetato sódico.

Los datos de los desplazamientos químicos de los espectros de ¹³C RMN necesarios para la evaluación de los resultados del experimento biosintético se recogen en la siguiente **tabla 3.1**:

n°C	δ ¹³ C	n°C	δ ¹³ C	n°C	δ ¹³ C
1	177.0	16	79.1	31	27.6
2	77.0	17	31.0	32	26.3
3	42.7	18	37.3	33	30.6
4	69.8	19	105.6	34	95.6
5	31.6	20	32.8	35	35.9
6	27.4	21	26.6	36	18.7
7	71.6	22	69.2	37	25.6
8	96.5	23	76.8	38	60.3
9	121.5	24	71.1	39	10.7
10	139.3	25	144.8	40	16.2
11	33.2	26	84.8	41	112.6
12	71.4	27	64.6	42	15.9
13	42.3	28	35.2	43	23.1
14	136.7	29	31.2	44	29.7
15	131.5	30	75.1		

Tabla 3.1.-Desplazamientos RMN ¹³C del ácido okadaico.

El análisis comparativo de los espectros de ¹³C RMN desacoplados en ¹H y en ¹H/²H simultáneamente (**figuras 3.9-3.11**), suministra información de gran valor ya que en algunos casos la intensidad de las señales de los carbonos sin enriquecer es similar a la de los picos isotópicos en la muestra enriquecida, con lo que se podrían confundir provocando una malinterpretación de los resultados.

A continuación, con el objeto de aclarar la discusión, se llevará a cabo el análisis de estas señales según los fragmentos anteriormente expuestos comenzando por el C-38 hasta llegar al otro extremo de la molécula (C-1).

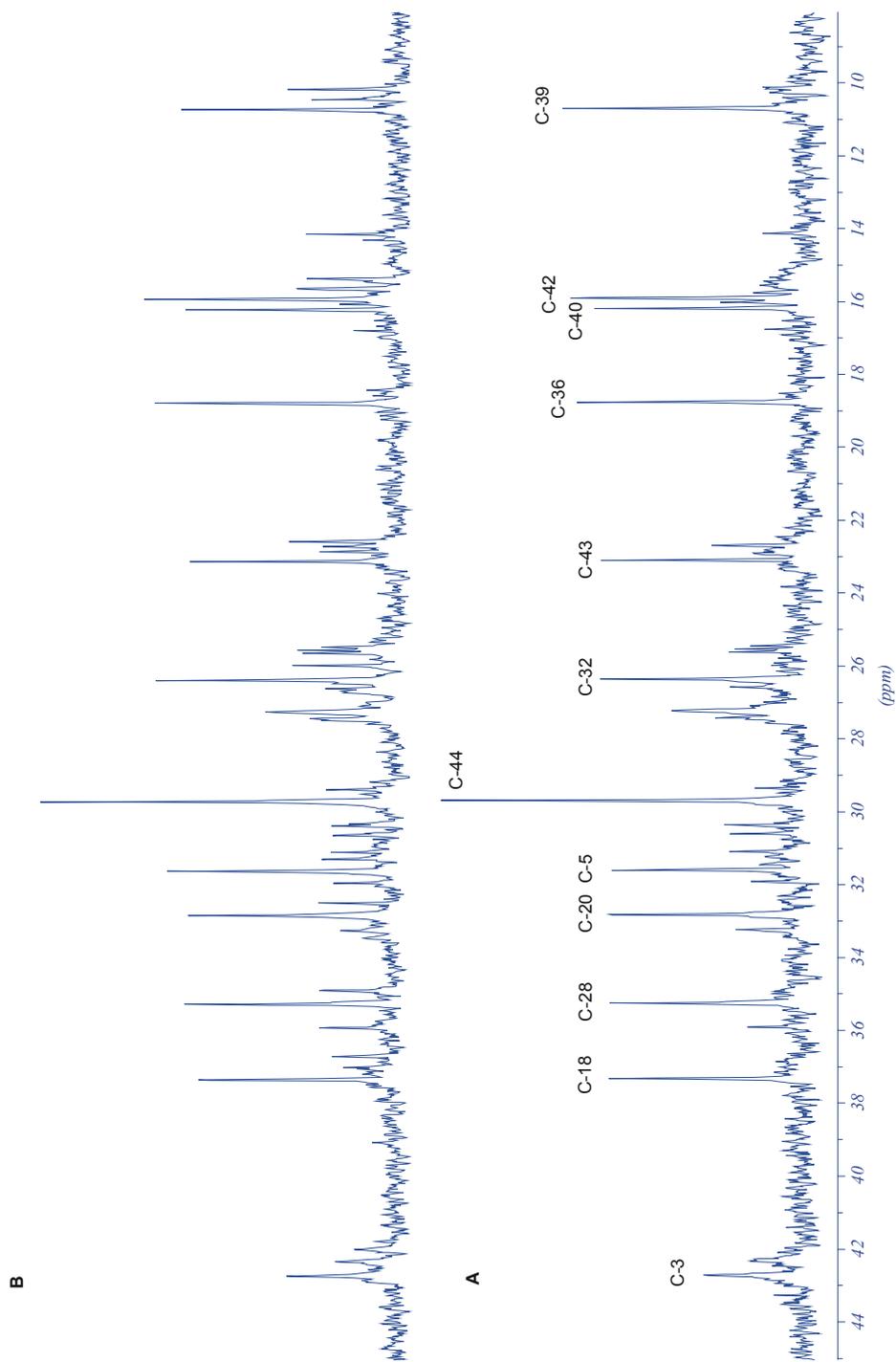


Figura 3.9.- Comparación de los experimentos (A) $\{^1\text{H}\}$ - ^{13}C RMN y (B) $\{^1\text{H}, ^2\text{H}\}$ - ^{13}C RMN del AO

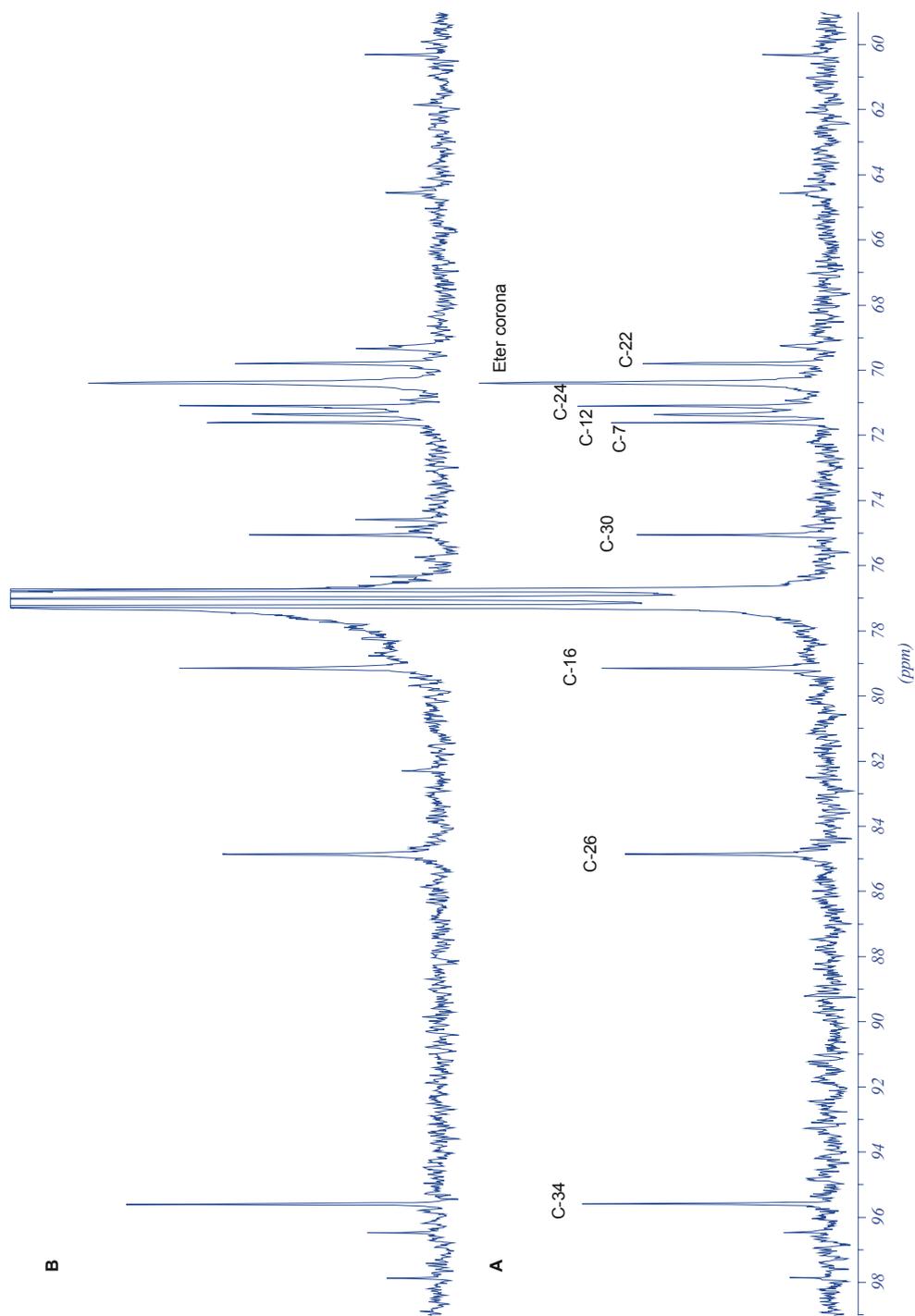


Figura 3.10.- Comparación de los experimentos (A) $\{^1\text{H}\}$ - ^{13}C RMN y (B) $\{^1\text{H}\}$ - ^{13}C RMN del AO

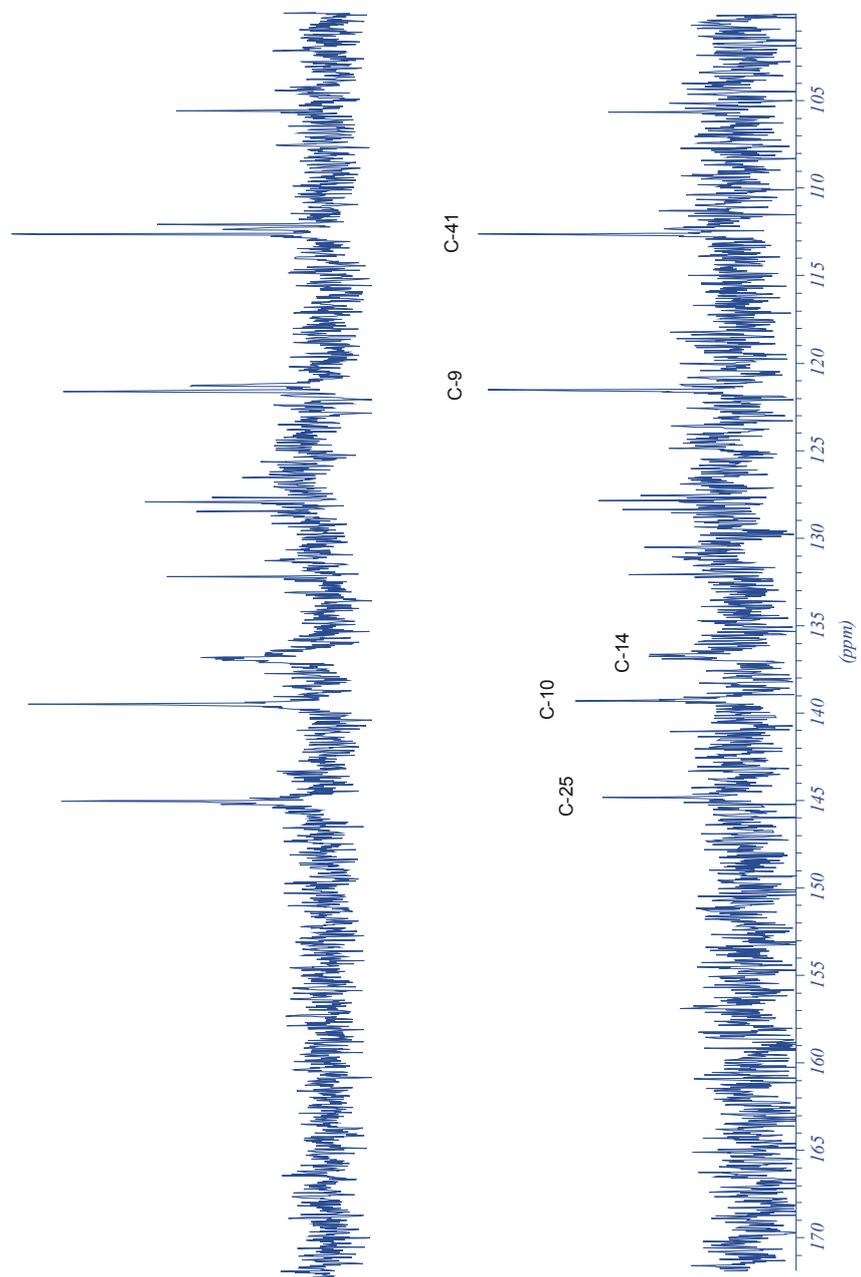
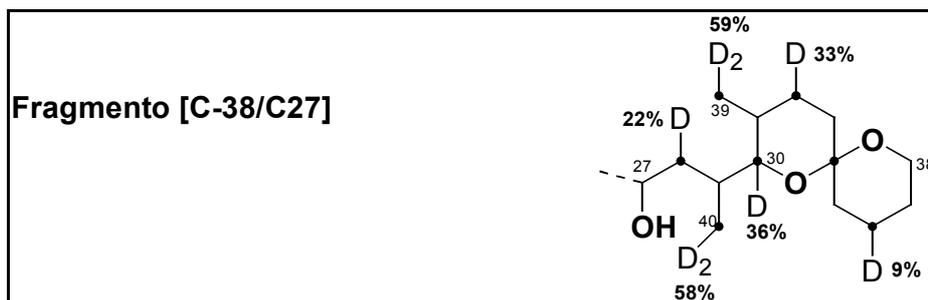


Figura 3.10.- Comparación de los experimentos (A) $\{^1\text{H}\}$ - ^{13}C RMN y (B) $\{^1\text{H}\}$ - ^{13}C RMN del AO



Las señales correspondientes a los carbonos C-28, C-30 y C-32 presentan cada una de ellas en el espectro de la muestra enriquecida con $[2\text{-}^{13}\text{CD}_3]$ acetato sódico un único pico isotópico a campos más bajos. En los tres casos los porcentajes de retención de deuterio se encuentran dentro de los valores medios ($R=26\pm 8.4\%$ SD) estimados para los metilenos. Por el contrario el metileno C-36 que retiene también un solo átomo de deuterio, presenta una retención muy por debajo de la media, aproximadamente un 9%.

En los dos metilos presentes en este fragmento (C-39, C-40), se observan dos picos isotópicos que indican la presencia simultánea de moléculas que retienen uno y dos átomos de deuterio. De nuevo la incorporación de deuterio se encuentra dentro de los valores medios para el caso de los metilos ($R=52.3\pm 8.0\%$ SD).

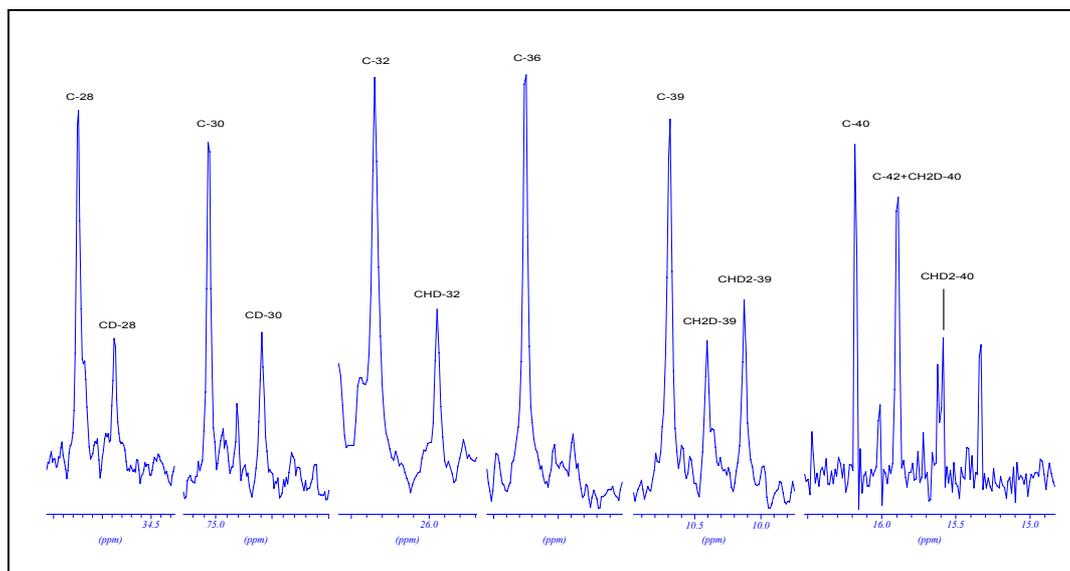
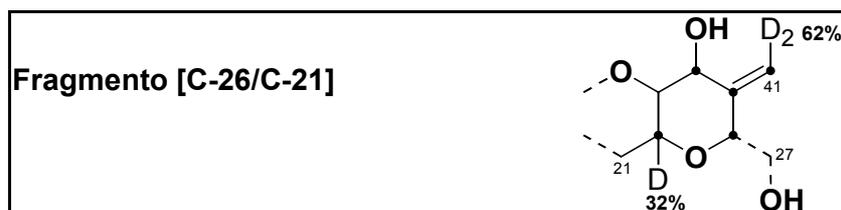


Figura 3.12.- Señales de ^{13}C pertenecientes al fragmento [C-38/C-27]



En este fragmento, el único metileno que muestra incorporación de deuterio es el C-22 (32%) ya que las señales correspondientes a los carbonos C-24 y C-26 no presentan pico isotópico alguno.

El carbono C-41 presenta un porcentaje elevado de retención (62%) si tenemos en cuenta que se trata de un metileno, con picos isotópicos correspondientes a las especies mono y bideuteradas.

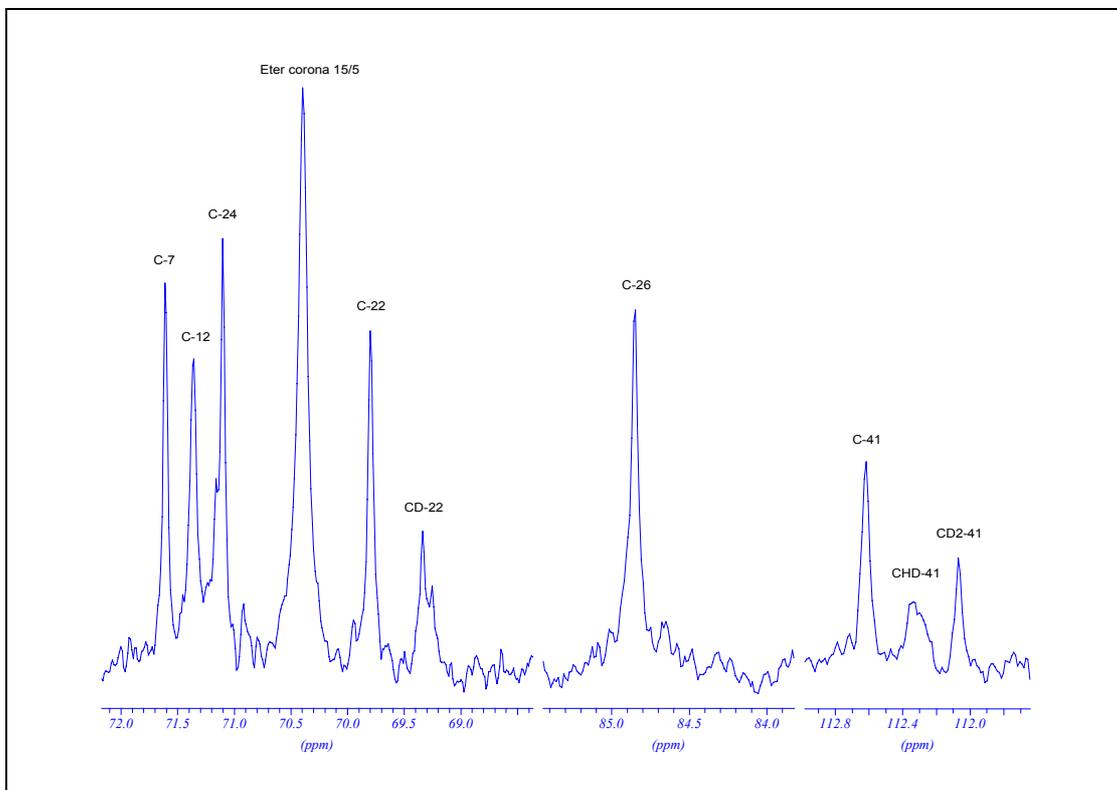
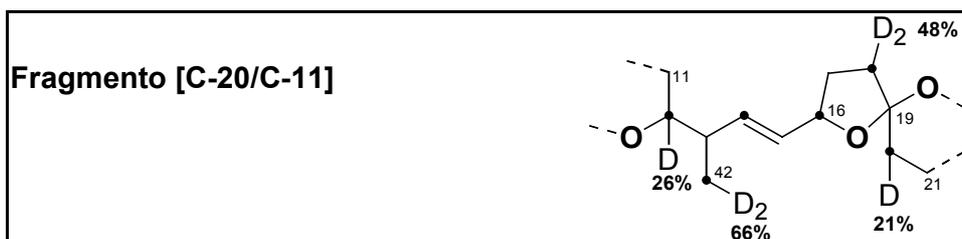


Figura 3.13.- Señales de ^{13}C pertenecientes al fragmento [C-26/C-21]



Para la señal correspondiente al carbono C-20 se observa un solo pico isotópico, lo que nos indica que en este metileno se retiene un átomo de deuterio. Por el contrario en el otro metileno presente en este fragmento (C-18) se presenta una situación nueva, la retención de dos átomos de deuterio con un porcentaje de casi el 50%.

En lo referente a los dos metinos unidos a oxígeno, decir que la interpretación del espectro resultó bastante compleja, pues en el caso del C-16 la señal de ^{13}C está bastante próxima a la del CDCl_3 , dificultando la visualización de los posibles picos isotópicos, que no parecen estar presentes. En el caso de C-12, esta señal se encuentra muy próxima a las señales de los C-7 y C-24, lo que dificultó no sólo su identificación sino el análisis del experimento de biosíntesis. La asignación de las tres señales requirió de la utilización de un experimento HSQC, pues mientras que normalmente los C-7 y C-12 salen superpuestos, no ocurría lo mismo en este caso. Resuelto este problema, fue necesario un procesamiento del experimento de ^{13}C RMN utilizando una función de ventana gaussiana para poder separar el pico isotópico del C-12 de la señal de C-24. De esta forma establecimos la retención de deuterio en C-12 en un 25% aproximadamente. Otra señal problemática es la del C-14 que muestra un ensanchamiento importante que no nos permite asegurar la presencia o no de picos isotópicos. Finalmente el metilo C-42 muestra la coexistencia de especies mono y bideuteradas con los porcentajes habituales

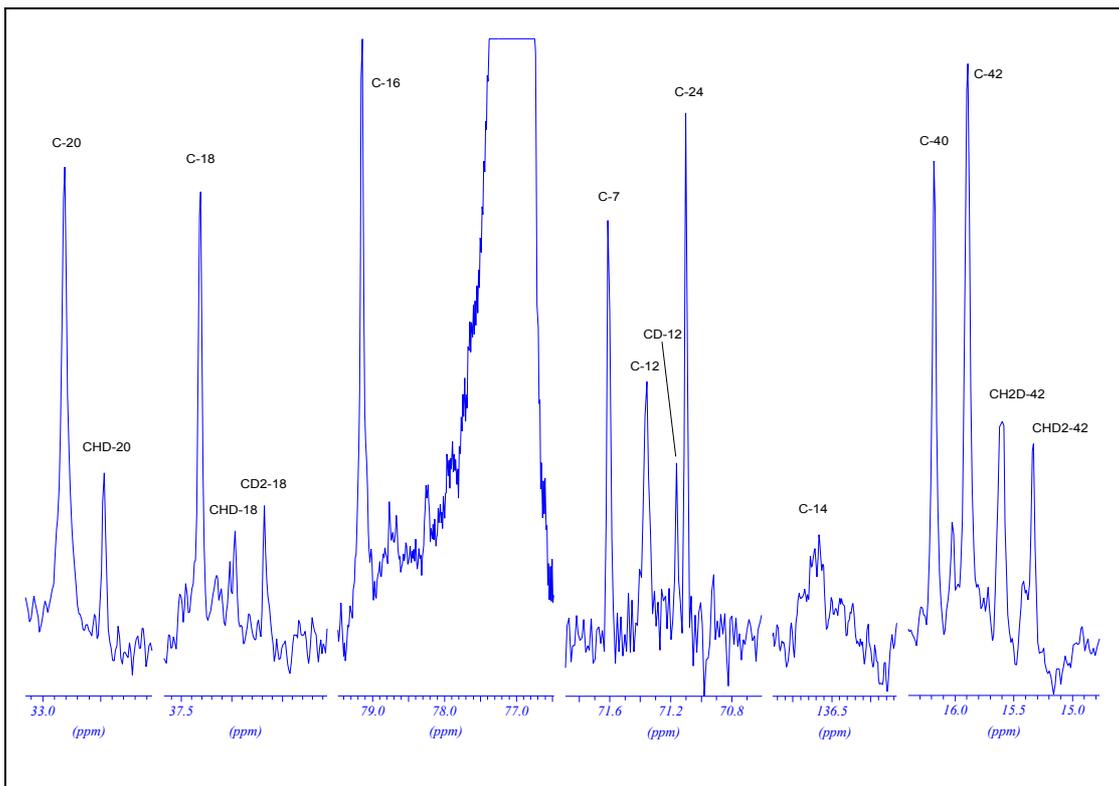
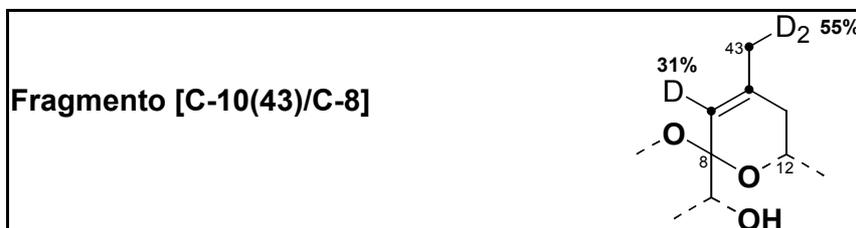


Figura 3.14.- Señales de ^{13}C pertenecientes al fragmento [C-20/C-11]



Los dos carbonos que podrían retener deuterio dentro de este fragmento lo hacen dentro de los niveles generales de esta molécula. Así el carbono vinílico C-9 incorpora un 31% mientras que el metilo C-43 retiene hasta dos átomos de deuterio con un 55% de retención.

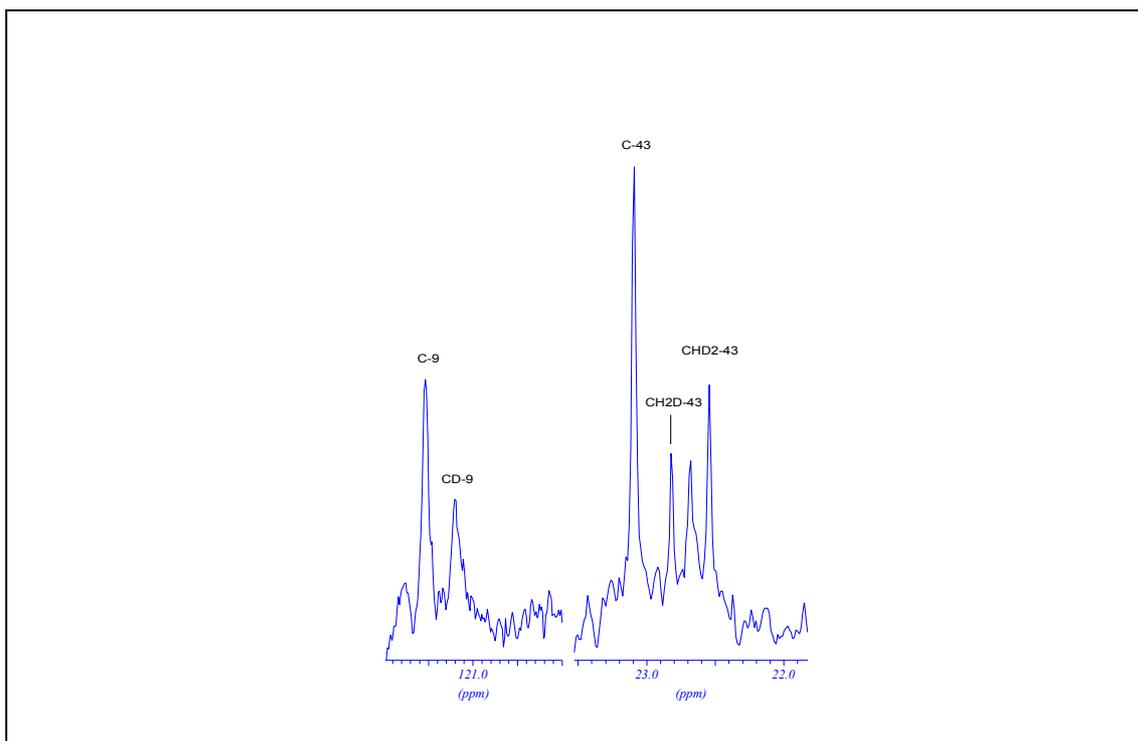


Figura 3.15.- Señales de ^{13}C pertenecientes al fragmento [C-10(43)/C-8]



El comportamiento de C-3 es anómalo en el sentido de que junto con C-18 es el único metileno que retiene dos átomos de deuterio pero en este caso con un porcentaje de retención que es el más alto de toda la molécula (70%). Por el contrario el metilo C-44 es el único que retiene un único deuterio, haciendolo además con una eficiencia muy baja (13%). Además, el metileno C-5 retiene un deuterio mientras que el metino C-7 no retiene deuterio al menos en cantidades apreciables.

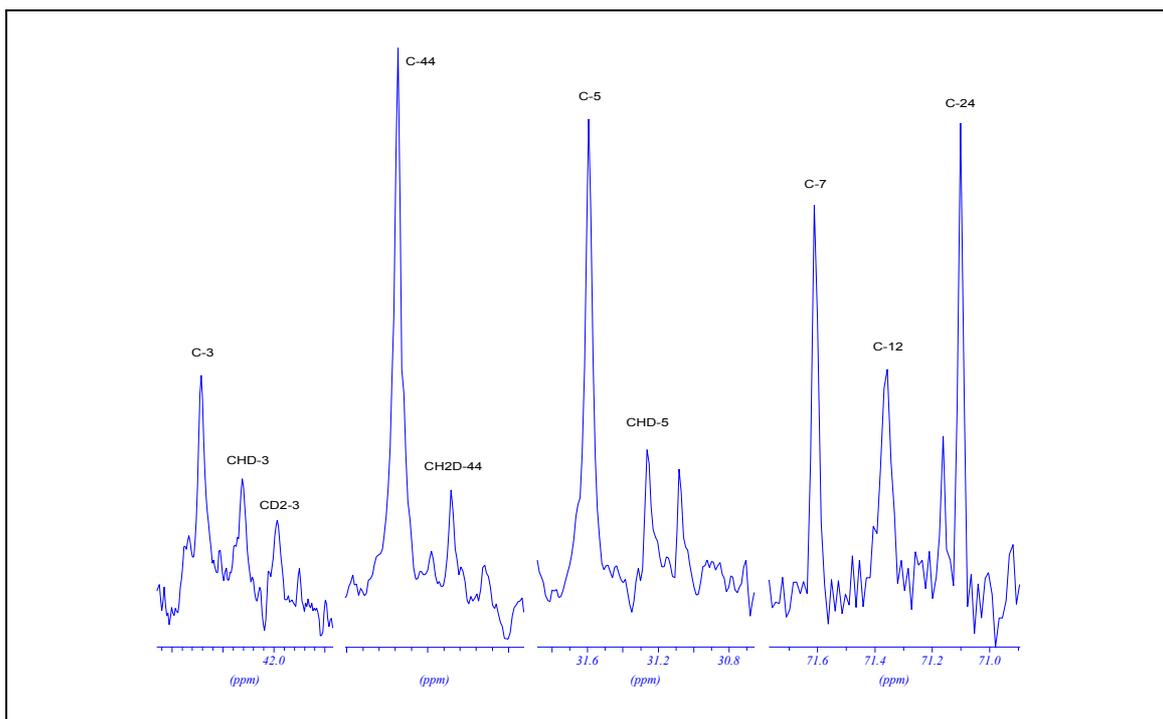


Figura 3.16.- Señales de ^{13}C pertenecientes al fragmento [C-7/C-1]

nº C	δ (ppm)	$^{-1}\Delta\delta_{D1}$ (ppb)	$^{-1}\Delta\delta_{D2}$ (ppb)
1	177.14	-	-
3	42.71	403	337
5	31.59	331	-
7	71.61	-	-
9	121.54	340	-
10	139.29	-	-
12	71.36	200	-
14	136.66	-	-
16	79.14	-	-
18	37.31	341	295
20	32.81	341	-
22	69.80	461	-
24	71.10	-	-
25	144.81	-	-
26	84.85	-	-
28	35.25	373	-
30	75.06	470	-
32	26.35	402	-
34	95.59	-	-
36	18.75	368	-
39	10.68	282	280
40	16.18	284	308
41	112.62	280	271
42	15.89	274	285
43	23.09	274	276
44	29.68	331	-

Tabla 3.2.- Resumen de los desplazamientos isotópicos producidos por la incorporación de ^2H .

II. 3B. 4.- Discusión de los resultados

Mientras llevábamos a cabo nuestro experimento biosintético, Wright y col. publicaron los resultados obtenidos después de la de adición de $[2-^{13}\text{CD}_3]$ acetato sódico y $[1-^{13}\text{C}, ^{18}\text{O}_2]$ sobre cultivos de *P.lima* y que analizaron sobre la DTX-4.⁸⁷ Sin embargo, creímos que las condiciones experimentales en las que realizaron las medidas no eran las más idóneas por lo que decidimos finalizar nuestro estudio. En el trabajo anterior se cuantifican las incorporaciones por comparación con la señal del CH_2Cl_2 lo cual provoca errores importantes como ya hemos dicho anteriormente. Más concretamente en el caso del CH_2Cl_2 con las condiciones empleadas por Wright y col. (tiempo de relajación de 5s) el error cometido es superior al 50% según pudimos estimar.

De los resultados anteriormente expuestos se observa que la mayoría de los metilenos presentes en el AO retienen un único átomo de deuterio. En algunos casos esto puede explicarse por la intervención del crotonilo como precursor avanzado en la biosíntesis del AO (C-36, C-32, C-30, C-22). En otros casos esto ocurriría por la reducción y posterior deshidratación de los carbonilos presentes en lo precursores metabólicos (C-28, C-20, C-5). Excepciones a este comportamiento general son los C-3 y C-18, que retienen hasta dos deuterios, lo que sugiere que no tiene lugar deshidratación en las posiciones C-4 y C-19, pues ambos carbonos provendrían según nuestra hipótesis de sendas unidades de acetoacetato. La retención de oxígeno proveniente de acetato en esas posiciones, como demuestra el experimento de Murata y col.⁸⁸, refuerza esta observación.

En relación con el experimento de Murata y col., en el mismo se establece que el oxígeno presente en el anillo B tiene su origen tanto en el acetato como en el

oxígeno atmosférico, por lo que proponen la posibilidad de que dicho anillo se forme a través de un intermedio con sendos grupos cetona en C-8 y C-12, seguido de una reducción en C-12 en la que el oxígeno podría intercambiar durante la conversión ceto-cetal. Esta hipótesis queda anulada por la observación de un deuterio sobre el C-12 en nuestro experimento.

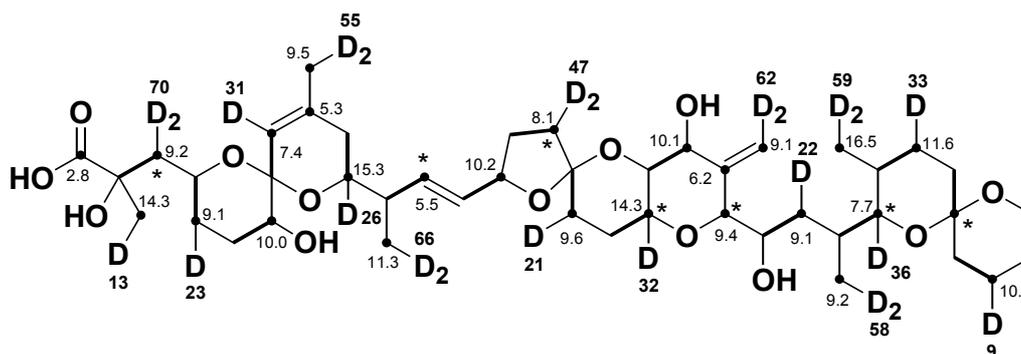


Figura 3.17.- Distribución de ^{13}C y ^2H (negrita) en el AO después de la adición de $[2\text{-}^{13}\text{CD}_3]$ acetato.

En lo referente a los metilos, todos salvo el Me-44 retienen cantidades aproximadamente iguales de CH_2D y CHD_2 pero en ningún caso se observa la presencia de CD_3 . Este hecho unido a que los porcentajes de retención medios son del 52%, sugieren que el acetato (o malonato) precursor es incorporado en estas posiciones directamente, sin muchas oportunidades para un intercambio de deuterio previo. En el caso del Me-44 este sólo retiene un deuterio con un porcentaje que también es el más bajo de todos los metilos, por lo que pensamos este proviene de la condensación de un malonato sobre el C-2.

Con respecto al fragmento **B** del AO, creemos que los resultados obtenidos en nuestro experimento refuerzan la hipótesis propuesta por nuestro grupo en contra de la propuesta por Wright y col. Así, si comparamos detenidamente los porcentajes de incorporación de deuterio en este fragmento vemos como el C-9, retiene algo más de

un 30%, valor que se encuentra por encima de la media para los metilenos. Este creemos que es un dato en contra del mecanismo propuesto por Wright y col para la aparición de los carbonos que derivan de metilo de acetato y que aparecen sin su carbonilo correspondiente (C-10, C-25 y C-26), a través de un reagrupamiento de tipo Favorski, catalizado por una monooxigenasa.

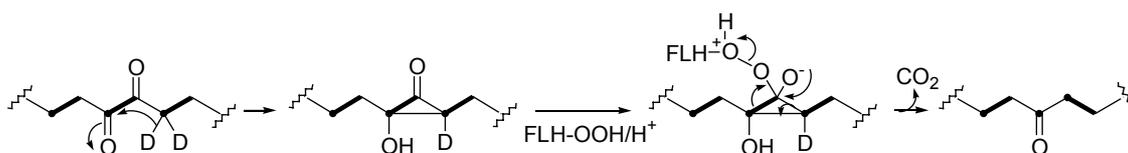
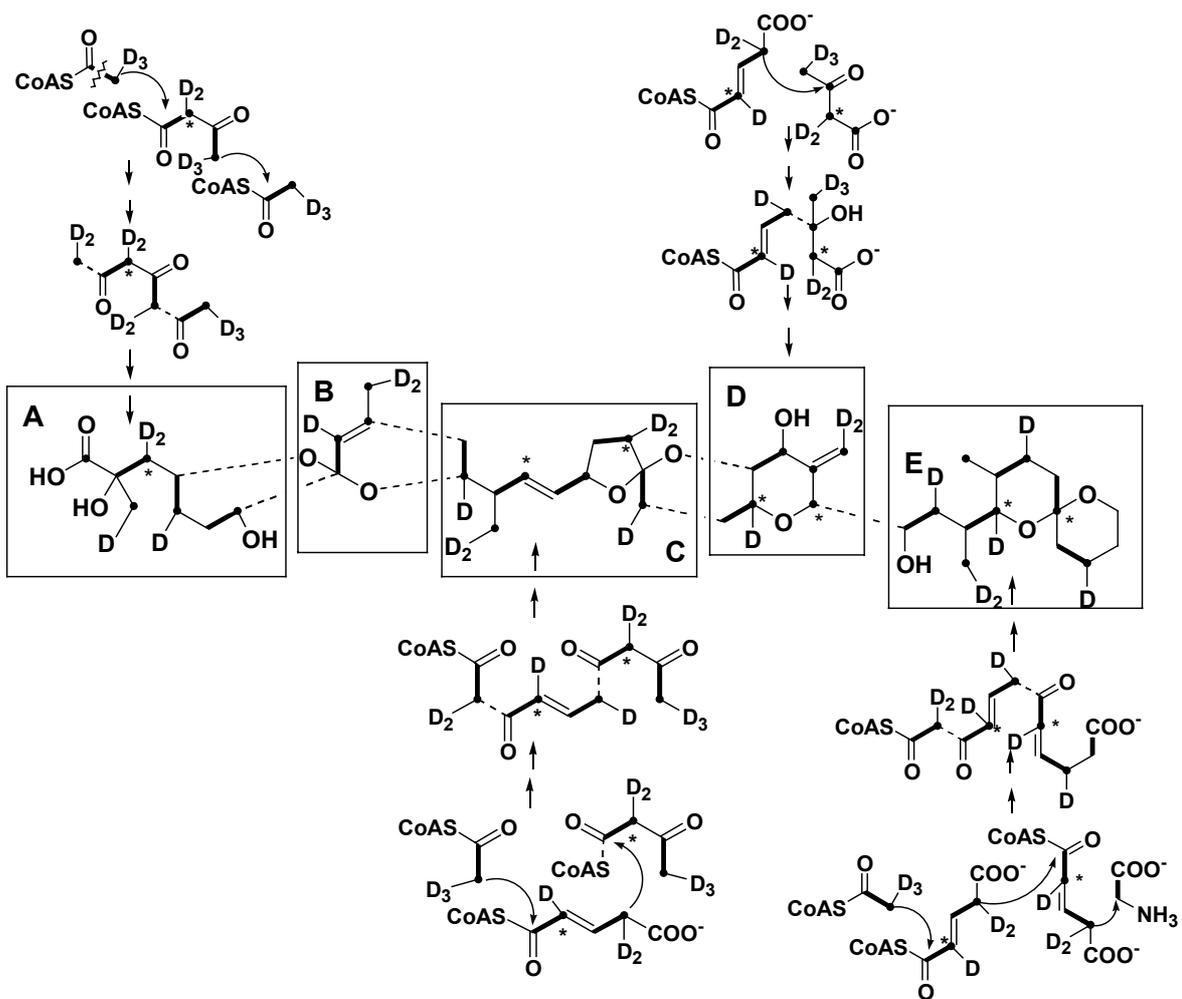


Figura 3.18.- Propuesta de Wright y col. para explicar el origen de C-10, C-25 y C-26.

Si esto ocurriese así, la retención en esta posición debería ser aproximadamente la mitad de la media, cosa que no ocurre pues al contrario se encuentra incluso ligeramente por encima de la media. Esto encaja perfectamente con nuestra propuesta de origen de este fragmento a partir de succinato. Además, como ya vimos en el **esquema 3.1**, el C-10 debería tener según nuestra hipótesis un enriquecimiento en ^{13}C de la mitad del habitual, cosa que también observamos en nuestro experimento.



Esquema 3.5.- Patrón de incorporación de ^2H en el AO según nuestra hipótesis.

II. 4.- ESTUDIOS ESTRUCTURALES DEL ACIDO OKADAICO

II. 4A.- INTRODUCCION

La fosforilación reversible de proteínas que contienen residuos de serina, treonina y/o tirosina es un mecanismo que regula numerosos procesos celulares. La fosforilación de los grupos hidroxilo de estos aminoácidos está catalizada por las proteínas quinasas (PKs) usando ATP como donante de grupos fosfato, mientras que la defosforilación está catalizada por las proteínas fosfatasas (PPs). Este simple ciclo actúa como un interruptor que modula la acción de numerosas proteínas. La fosforilación-defosforilación de estas proteínas producirá cambios en la conformación de las proteínas, en las interacciones proteína-proteína, interacciones proteína-ligando, permeabilidad a la membrana, etc. entre otros efectos. Estos cambios están implicados en la regulación de procesos celulares tan diversos como la síntesis de glucógeno, la división celular, expresión de genes, contracción muscular, neurotransmisión, etc.

Mientras que la familia de las proteínas-quinasas ha estado sujeta a una intensiva investigación durante las pasadas décadas, el papel concreto de las proteínas-fosfatasas en la fisiología celular es menos conocido. Hasta finales de los 80, eran conocidos cuatro grupos de serina/treonina proteína fosfatasas en células eucarióticas: PP1, PP2A, PP2B y PP2C. Más recientemente esta lista se ha visto ampliada para incluir nuevos "parientes" de la PP1 (PPZ1, PPZ2, PPQ), PP2A (PP4, PPV, PPG) y PP2B (rdgC) así como una subfamilia llamada PP5.^{91,92}

⁹¹ Cohen, P. *Annu. Rev. Biochem.* **1989**, 58, 453.

Sin lugar a dudas, gran parte del actual conocimiento acerca de las serina/treonina PPs es debido a los estudios que implican su inhibición. En este sentido existe un grupo de productos naturales de diversa estructura, que incluye al ácido okadaico, la microcistina, la tautomicina y otros, que ejercen sus efectos citotóxicos inhibiendo las PP1 y/o PP2A.⁹³

El AO es un inhibidor selectivo de la PP1 y PP2A (IC_{50} = 20 nM y 0.5 nM, respectivamente), mientras que la PP2B es sólo ligeramente inhibida y la PP2C no se ve afectada.⁹⁴ Debido a este hecho, el AO se ha convertido en una poderosa herramienta para el estudio de los procesos biológicos regulados por la acción de estas proteínas.

Con el fin de conocer mejor las relaciones estructura-actividad del AO, Yasumoto y col. prepararon una serie de derivados del mismo evaluándose a continuación su actividad.⁹⁵ Los resultados indican que el grupo carboxilo al igual que los hidroxilos localizados en C-2, C-24 y C-27 son vitales para el desarrollo de su actividad, de hecho la falta del grupo hidroxilo en C-2 hace que el AO disminuya su actividad más de 200 veces. Por el contrario, la presencia del hidroxilo en C-7 no parece tener tanta importancia, pues el 7-deoxiAO sólo ve reducida su actividad por un factor de dos. Lo mismo ocurre con el doble enlace C-9/C-10 y el metilo sobre C-35 cuya ausencia no afecta para nada a la actividad del AO.

⁹² Wera, S.; Hemmings, B.A. *Biochem. J.* **1995**, 311, 17.

⁹³ Sheppeck, J.E.; Gauss, C.; Chamberlin, R. *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, 5, 1739.

⁹⁴ Takai, A.; Murata, M.; Torigoe, K.; Isobe, M.; Mieskes, G.; Yasumoto, T. *Biochem. J.* **1992**, 284, 539.

⁹⁵ Nishiwaki, S.; Fujiki, H.; Suganuma, M.; Furaya-Suguri, H.; Matsushima, R.; Lida, Y.; Ojika, M.; Yamada, K.; Uemura, D.; Yasumoto, T.; Schmitz, F.; Sugimura, T. *Carcinogenesis*, **1990**, 11, 1837.

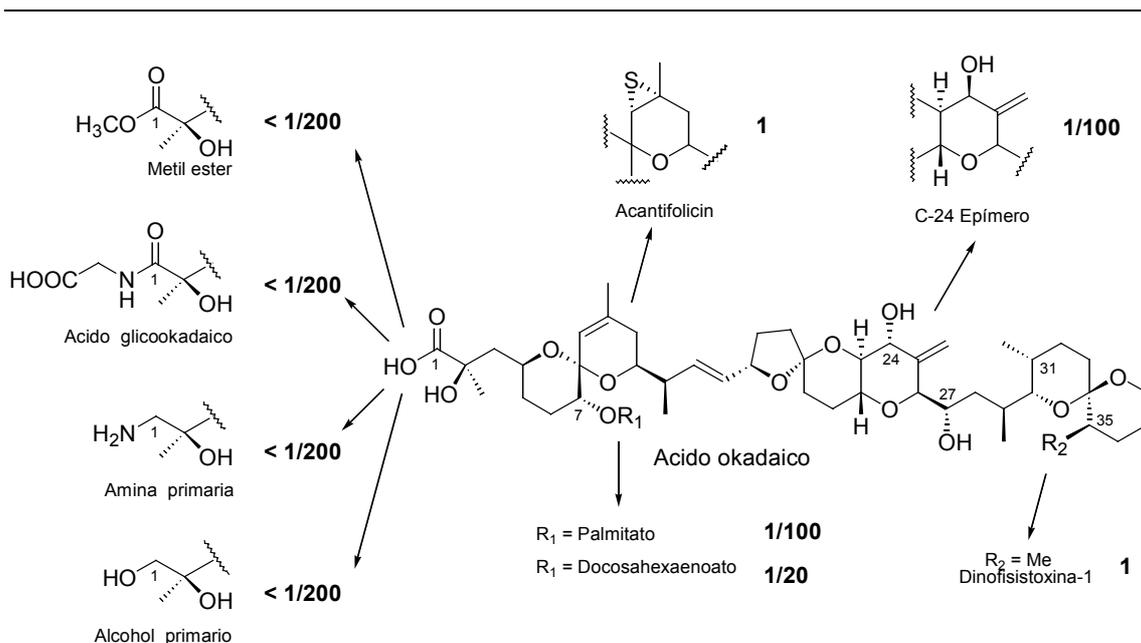


Figura 4.1.- Relaciones estructura-actividad de algunos derivados del AO (La actividad del AO está normalizada como 1)

Las interrelaciones existentes entre la estructura del AO y su actividad también fueron estudiadas por RMN, resultado de lo cual se propuso la formación de una cavidad flexible entre el grupo carboxilo C-1 y el grupo hidroxilo C-24.⁹⁶, de hecho el fragmento C-15 - C-38 presenta una actividad muy reducida ($\ll 1/200$).

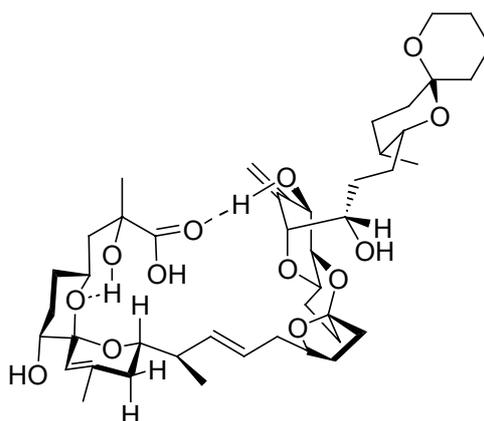


Figura 4.2.- Cavidad flexible propuesta para el ácido okadaico

⁹⁶ Matsumori, N.; Murata, M.; Tachibana, K. *Tetrahedron*, **1995**, 51, 12229.

Basados en esta propuesta se preparó un derivado, donde el hidroxilo C-24 fue epimerizado, que mostró una citotoxicidad 100 veces menor que la del AO.

El AO también se ha revelado como un potente inductor tumoral perteneciente a una nueva clase, diferente de aquella que incluye a los ésteres de forbol. Mientras que los ésteres de forbol actúan activando la protein kinasa C, el AO inhibe la defosforilación de proteínas. Sin embargo, ambos tipos de inductores tumorales producen la acumulación de esencialmente el mismo tipo de proteínas, implicadas en la producción de tumores.

II. 4B.-Estudios sobre la complejación del ácido okadaico

II. 4B. 1.- Antecedentes

Cuando aislamos en nuestro laboratorio el ácido okadaico a partir de los cultivos del dinoflagelado marino *Prorocentrum lima*, éste aparece complejado con un catión metálico.⁹⁶ Las muestras de dicho complejo (AOC) no pueden ser diferenciadas de las muestras libres (OA) durante la cromatografía, debido a que los comportamientos cromatográficos de ambas en las condiciones habituales son idénticos. Por el contrario no ocurre lo mismo con la espectroscopía de RMN en donde puede observarse que los espectros del complejo metálico muestran ligeras diferencias en los desplazamientos químicos y peor resolución cuando se comparan con la muestra libre (**Figura 4.3**).

⁹⁶ Norte, M.; González, R.; Fernández, J.J.; Rico, M.; *Tetrahedron*, **1991**, *47*, 7437.

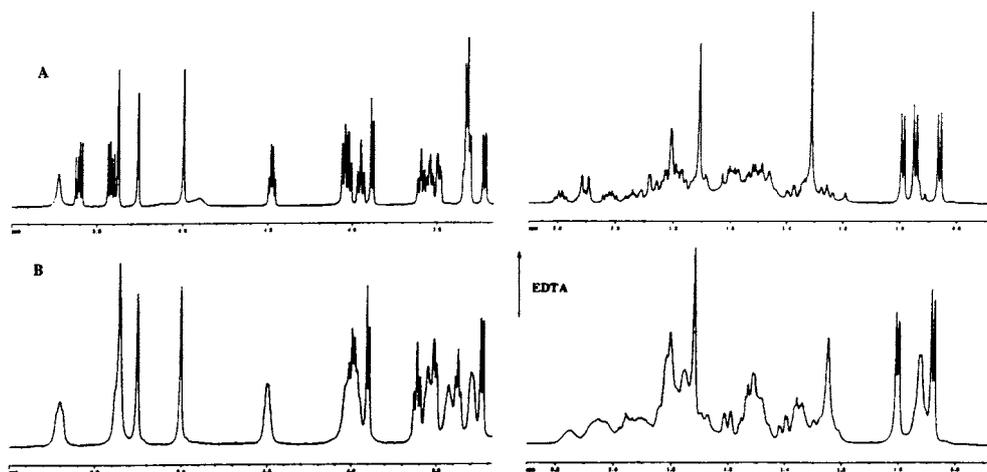


Figura 4.3.- Espectros $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz) del OA (A) y de la forma complejada OAC (B) en CDCl_3

Inicialmente, la presencia del catión metálico fue confirmada por el hecho de que el tratamiento de las muestras con EDTA disódico permitía obtener ácido okadaico libre. Con el fin de determinar la naturaleza del catión se realizó un estudio sobre la capacidad de complejación del ácido okadaico, intentando preparar complejos del ácido okadaico con metales alcalinos y alcalinotérreos. En este estudio se comprobó que el espectro de ^1H RMN del ácido okadaico complejado con K^+ era superponible al del complejo obtenido de fuente natural.⁹⁷ Simultáneamente, muestras de AOC obtenido de cultivos de *P. lima* fueron tratadas con distintos éteres corona de entre los cuales sólo el éter 18/6, que posee una elevada preferencia para iones potasio, produjo la total descomplejación del AOC.

Estos resultados se completaron con ensayos farmacológicos en los que se medía la contracción muscular que produce este tipo de toxinas en fibras de músculo liso obtenido de útero de rata. Así cuando se eliminan del medio extracelular los iones Ca^{2+} o Na^+ las muestras de AO y del AOC son igualmente activos. Sin embargo,

⁹⁷ Norte, M.; Fernández, J.J.; Souto, M.L.; Gavín, J.A.; Cadenas, M.L.; Ausina, P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 1007.

cuando el K^+ es eliminado del medio extracelular, se observa inactividad con el AO mientras que el AOC mantiene su efecto contractil.

II. 4B. 2.- NOESY y ROESY del complejo del ácido okadaico (OAC)

Una vez identificada la naturaleza del ion complejado con el ácido okadaico y debido a la importancia que parece poseer en su actividad, nos propusimos realizar un análisis estructural del AOC que nos permitiese, por un lado explicar los cambios observados en los espectros de 1H y ^{13}C RMN y por otro lado avanzar en el modo de acción de este tipo de toxinas. Para ello realizamos un experimento NOESY sobre el AOC en $CDCl_3$,⁹⁸ en el que como se observa en la **figura 4.4** apenas aparecen correlaciones espaciales. Después de repetir el experimento y observar los mismos resultados, decidimos hacer un experimento ROESY,⁹⁷ en el que sí era posible observar señales de correlación (**Figura 4.5**). Este hecho nos sorprendió pues el NOESY del AO en $CDCl_3$ adquirido en las mismas condiciones, no muestra este comportamiento. (**Figura 4.6**).

⁹⁸ NOESY realizado en un espectrómetro Bruker AVANCE 400 MHz a 25°C. El experimento fue adquirido con 32 scans y 256 experimentos en modo sensible a la fase TPPI. Usando tiempos de mezcla de 500 ms. El procesado se realizó sobre una matriz de 1024 x 512 previa multiplicación por una función de tipo seno desplazada $\pi/2$ (SB=2).

⁹⁷ ROESY realizado en un espectrómetro Bruker AVANCE 400 MHz a 25°C. El experimento fue adquirido y procesado usando los mismos parámetros generales que se usaron para el NOESY. El spin-lock utilizado fue de 500 ms y pl 11=27 dB.

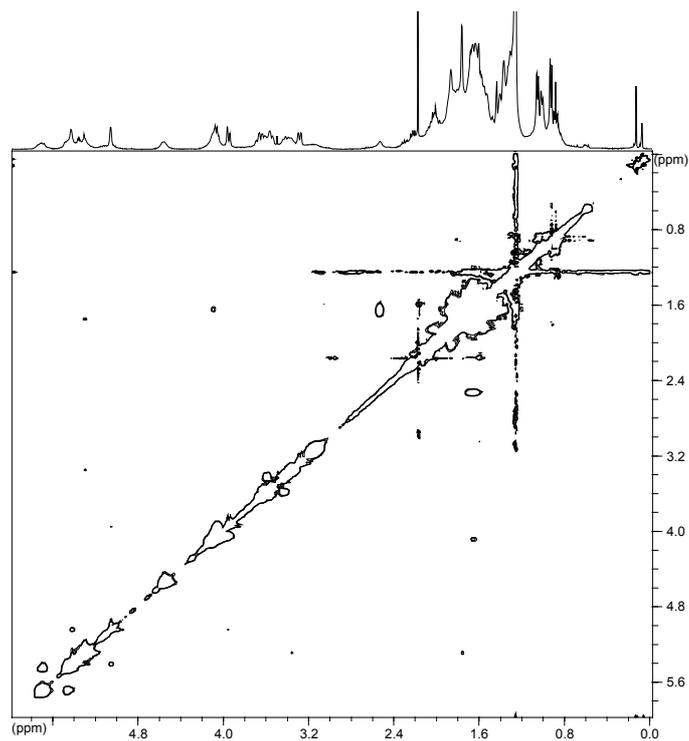


Figura 4.4.- NOESY (400 MHz) del AOC en CDCl_3 a 25°C

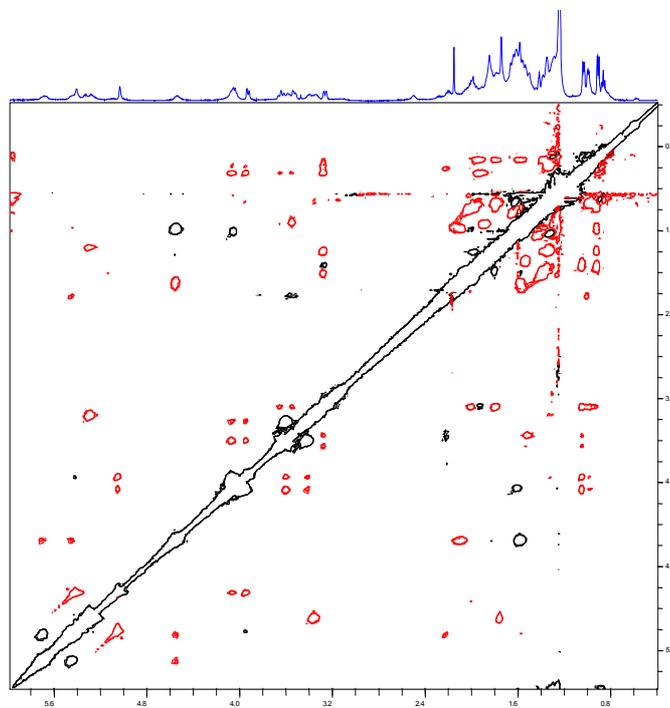


Figura 4.5.- ROESY (400 MHz) del AOC en CDCl_3 a 25°C

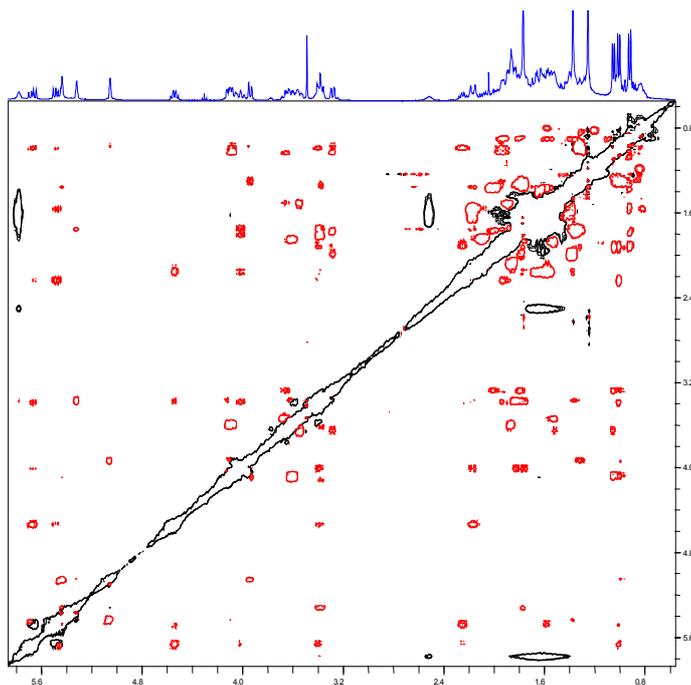


Figura 4.6.- NOESY (400 MHz) del AO en CDCl_3 a 25°C

Para poder explicar los resultados anteriores, hemos de recurrir a una de las diferencias existentes entre ambos experimentos. La intensidad y el signo de las señales de correlación dipolar en el experimento NOESY dependen de las distancias internucleares (r), del campo magnético aplicado (ω) y del tiempo de correlación (τ_c), de manera distinta a como lo hacen en el ROESY. La diferencia esencial entre el NOESY y el ROESY radica en las diferentes velocidades de relajación de ambos experimentos.¹⁰⁰

¹⁰⁰ Las expresiones para la relajación de la magnetización longitudinal, en el caso del NOESY, suponiendo el caso de una molécula moviéndose isotrópicamente con un tiempo de correlación τ_c , entendiendo como tal el periodo de tiempo necesario para que una molécula gire sobre un eje que la atraviese un radián, siendo \hbar la constante de Planck, γ la constante giromagnética y asumiendo que la relajación es esencialmente producida por la interacción dipolar entre dos espines son:

$$R_{II}^N = R_{SS}^N = \frac{\hbar^2 \gamma^4}{10r^6} \left(\tau_c + \frac{3\tau_c}{1 + \omega_0^2 \tau_c^2} + \frac{6\tau_c}{1 + 4\omega_0^2 \tau_c^2} \right) \quad R_{IS}^N = R_{SI}^N = \frac{\hbar^2 \gamma^4}{10r^6} \left(\frac{6\tau_c}{1 + 4\omega_0^2 \tau_c^2} - \tau_c \right)$$

Asumiendo un movimiento isotrópico y relajación dipolar, las expresiones para el ROESY son:

$$R_{II}^R = R_{SS}^R = \frac{\hbar^2 \gamma^4}{20r^6} \left(5\tau_c + \frac{9\tau_c}{1 + \omega_0^2 \tau_c^2} + \frac{6\tau_c}{1 + 4\omega_0^2 \tau_c^2} \right) \quad R_{IS}^R = R_{SI}^R = \frac{\hbar^2 \gamma^4}{10r^6} \left(2\tau_c + \frac{3\tau_c}{1 + \omega_0^2 \tau_c^2} \right)$$

De esta forma para valores de $\omega\tau_c \ll 1$ tanto en el ROESY como en el NOESY los picos de correlación cruzada (en adelante llamaremos a estos picos NOEs o ROEs) son de signo positivo.¹⁰¹ Por el contrario, si $\omega\tau_c \gg 1$ los NOEs alcanzan un valor negativo de intensidad máxima en el NOESY mientras en el ROESY mantienen el signo positivo.¹⁰² Por lo tanto para moléculas pequeñas ($\omega\tau_c \ll 1$) los NOEs en el experimento NOESY son de signo contrario a la diagonal mientras en macromoléculas ($\omega\tau_c \gg 1$) tienen el mismo signo que la diagonal. Ahora, para valores de $\omega_0\tau_c \approx 1.12$ el valor de la velocidad de relajación cruzada es igual a cero,¹⁰⁰ por lo que no es posible medir los NOEs. Esta condición la cumplen aquellas moléculas cuyo peso molecular está comprendido 1KDa y 2 KDa (**Figura 4.7**).

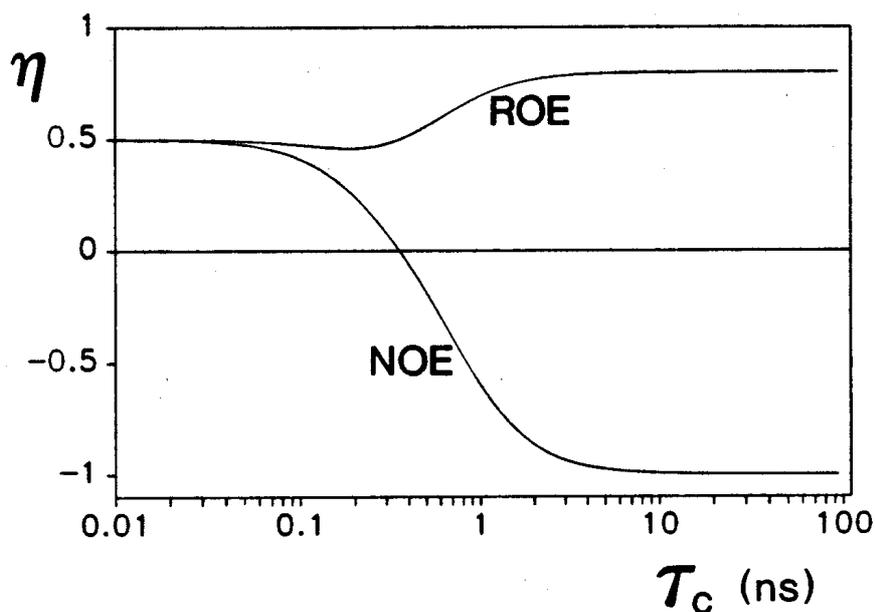


Figura 4.7.- Incremento del NOE (η) en función del tiempo de correlación (τ_c) para el NOESY y el ROESY. Ambas curvas están calculadas para una frecuencia del espectrómetro de 500 MHz y una distancia interprotónica de 2.0 Å.

¹⁰¹ $\omega\tau_c \ll 1$: $R_{II}^N = R_{II}^R \approx \frac{\hbar^2 \gamma^4}{r^6} \tau_c$

$$R_{IS}^N = R_{IS}^R \approx \frac{\hbar^2 \gamma^4}{2r^6} \tau_c$$

¹⁰² $\omega\tau_c \gg 1$: $R_{II}^N \approx \frac{\hbar^2 \gamma^4}{10r^6} \tau_c$; $R_{II}^R \approx \frac{\hbar^2 \gamma^4}{4r^6} \tau_c$

$$R_{IS}^N \approx -\frac{\hbar^2 \gamma^4}{10r^6} \tau_c$$
; $R_{IS}^R \approx \frac{\hbar^2 \gamma^4}{5r^6} \tau_c$

Con el fin de evitar que el NOE alcance valores próximos a cero pueden introducirse variaciones en las condiciones experimentales. Obviamente, ω_0 puede ser alterado cambiando el campo magnético aplicado. Así por ejemplo, un valor de cero para η_{\max} a 400 MHz se convierte en un valor de $\eta_{\max} = -12\%$ a 500 MHz. Sin embargo, hay mayores posibilidades de variación modificando τ_c . Este parámetro depende de la viscosidad del disolvente y del tamaño de la molécula según la ecuación de Debye, donde η en esta expresión representa a la viscosidad del disolvente, k es la constante de Boltzmann y a es el radio de la molécula:

$$\tau_c = 4\pi\eta a^3/3kT \quad (\text{Ec. de Debye})$$

Por lo tanto tenemos dos variables interdependientes que pueden ser modificadas, como son la viscosidad y la temperatura. La manera más sencilla de cambiar la viscosidad es variando la temperatura,⁹⁸ si bien otra posibilidad consiste en cambiar de disolvente.

Según las consideraciones anteriores, se realizaron dos experimentos NOESY: el primero utilizando el mismo campo magnético (400 MHz) y variando la temperatura (**Figura 4.8**), y el segundo trabajando a más alto campo (500 MHz) (**Figura 4.9**). Como era de esperar, en ambos casos abandonamos la zona de NOEs nulos observándose un mayor número de correlaciones.

De todo lo dicho anteriormente, se deduce que el hecho de que el experimento NOESY no muestre correlaciones en determinadas moléculas no es sorprendente por si mismo. En las condiciones experimentales que se usaron inicialmente para los experimentos NOESY del OAC,⁹⁸ las intensidades de las señales tenderían a anularse

con moléculas de $P_m = 1500-1700$. Moléculas de $P_m \approx 1100$ muestran NOEs positivos en nuestro espectrómetro a 400 MHz, según habíamos comprobado previamente, por lo tanto en el caso del AOC y teniendo en cuenta su peso molecular ($P_{m_{OA}}=804 + P_{m_{K^+}}=39$), la casi inexistencia de correlaciones espaciales nos indicaba que debíamos estar en presencia de una especie asociada, posiblemente un dímero.

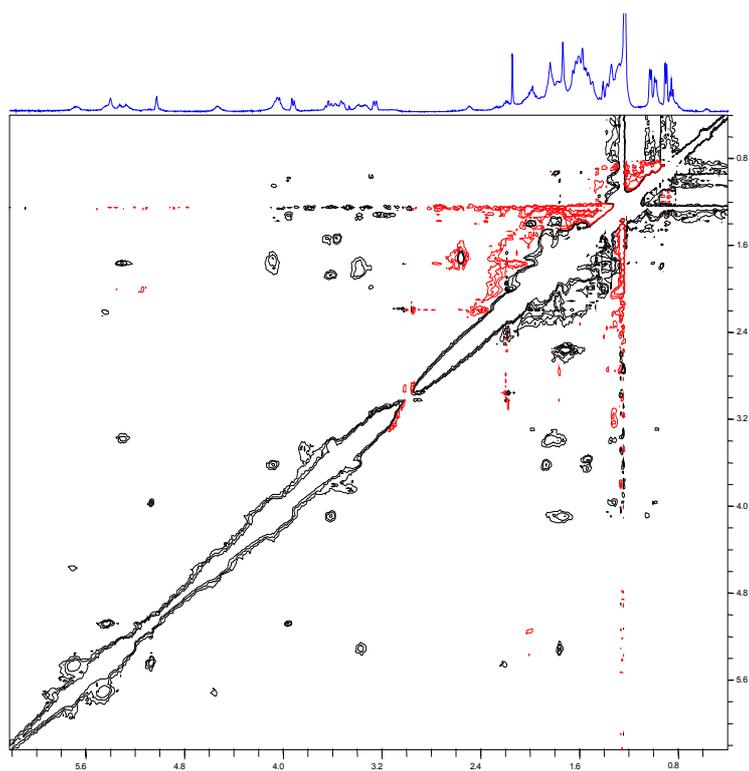


Figura 4.8.- NOESY del AOC a 10°C (400 MHz)

⁹⁸ La viscosidad del agua disminuye por un factor de 6 entre los 0 °C y los 100 °C, aunque disolventes de menor polaridad tienden a cambiar menos.

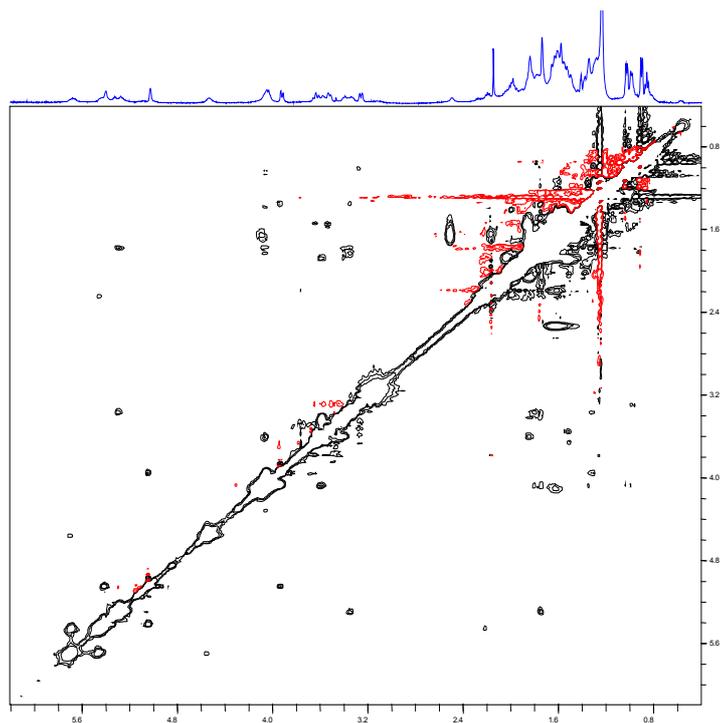


Figura 4.9.- NOESY del AOC a 500 MHz (T=25 °C)

II. 4C.- Estudios de difusión mediante gradientes de campo magnético.

Con el fin de confirmar la hipótesis anterior, decidimos realizar experimentos de RMN aprovechando para ello los gradientes de campo magnético. Estos ofrecen la posibilidad de diseñar nuevos experimentos de RMN que permiten la obtención de información molecular de una manera diferente a la convencionalmente utilizada para estudios estructurales o dinámicos. En nuestro caso, se trata de la medida de los llamados *Coefficientes de Difusión* (D),¹⁰⁴ los cuales pueden ser aplicados a estudios

¹⁰⁴ Esta metodología se basa en la medida de la *autodifusión* que es el movimiento translacional aleatorio de las moléculas (o iones) debido a su propia energía cinética interna. La *difusión translacional* es el mecanismo fundamental de transporte y el responsable de todas las reacciones químicas, ya que las especies reaccionantes deben colisionar antes de reaccionar. La difusión está directamente relacionada con el tamaño de las moléculas, tal y como puede deducirse a partir de la ecuación de Stokes-Einstein,

de movimiento molecular, estados de agregación o separación espectral en función del tamaño molecular tanto en sistemas químicos como biológicos.

Los *Coefficientes de Difusión* se obtienen comparando la intensidad de una señal de interés en función de la intensidad de los gradientes aplicados en los experimentos de RMN. En el caso de utilizar gradientes rectangulares aplicaremos la ecuación siguiente:

$$\ln (A / A_0) = - \gamma^2 g^2 \delta^2 (\Delta - \delta / 3) D$$

y en caso de gradientes con forma sinusoidal:

$$\ln (A / A_0) = - [\gamma^2 g^2 \delta^2 (4\Delta - \delta) / \pi^2] D$$

En ambos casos γ es la relación giromagnética (para el caso de $^1\text{H} = 26751$ rad s g^{-1}), g es la fuerza de los gradientes de difusión (por ejemplo, en nuestro caso alcanzan un valor máximo de 53.5 G cm^{-1}), D es el coeficiente de difusión de los espines observados ($\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$), δ es la duración total de los gradientes que actúan como desfase (s) y Δ es la separación (s) entre los inicios de los procesos de desfase y de reenfoque provocado por los gradientes. A y A_0 son las intensidades de la señal de

$$D = kT / f \quad (\text{Ec. de Stokes-Einstein})$$

donde k es la constante de Boltzmann, T es la temperatura y f es el coeficiente de fricción. Para el caso más simple de una partícula esférica con un radio hidrodinámico r_s en una disolución con una viscosidad η , el coeficiente de fricción viene dado por la siguiente expresión:

$$f = 6\pi\eta r_s$$

Como generalmente, la forma de las moléculas es más complicada y puede incluir contribuciones de factores tales como la hidratación, la difusión también nos dará información acerca de las interacciones y de la forma de la molécula.

interés para los diferentes intensidades de gradiente aplicados y para una intensidad igual a cero, respectivamente.

II. 4C. 1.- Secuencias de RMN utilizadas

El experimento estándar para realizar estas mediciones es un eco de espín convencional, que fue propuesto por Stejskal y Tanner⁹⁹, cuya secuencia se muestra a continuación:

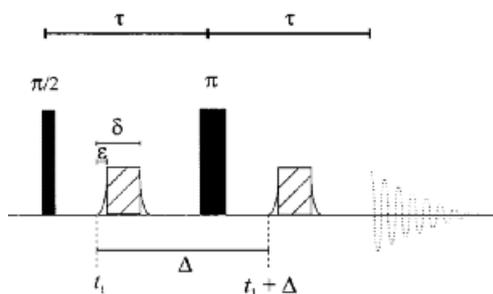


Figura 4.10.-Secuencia de pulsos propuesta por Stejskal y Tanner para un experimento eco de spin

En primer lugar, se aplica un pulso de radiofrecuencia de 90° a lo largo del eje x , cuyo efecto es el de rotar la magnetización macroscópica desde el eje z al plano x - y (perpendicular al campo). Durante el primer periodo τ a un tiempo t_1 , se aplica un gradiente de duración δ y de magnitud g . Al final de este periodo de tiempo τ , se aplica un segundo pulso de 180° a lo largo del eje y . Al cabo de un tiempo $t_1 + \Delta$, es aplicado un segundo pulso de gradiente de igual magnitud y duración que el primero. Si los espines no han experimentado ningún movimiento translacional con respecto al eje z , los efectos de los dos gradientes aplicados se cancelan y todos los espines se reenfocan. Sin embargo, si los espines se han movido, el grado de desfase que experimentarán debido al efecto de los gradientes aplicados será proporcional al

⁹⁹ Stejskal, E.O.; Tanner. J.E. *J. Chem.Phys.* **1965**, *42*, 288.

desplazamiento realizado en la dirección de los gradientes (eje z) durante el periodo de tiempo transcurrido entre los dos pulsos de gradiente (Δ). (Figura 4.10).

Recientemente se han descrito nuevas secuencias que permiten el análisis más preciso de biomoléculas como es el experimento utilizado por nosotros, el STE (Stimulated Echo Experiment). Este experimento fue diseñado para evitar los efectos de relajación T_2 , ya que mantiene la magnetización a lo largo del eje z durante el periodo τ_2 , de manera que la relajación depende de T_1 que suele ser mucho mayor que T_2 para macromoléculas (Figura 4.11).

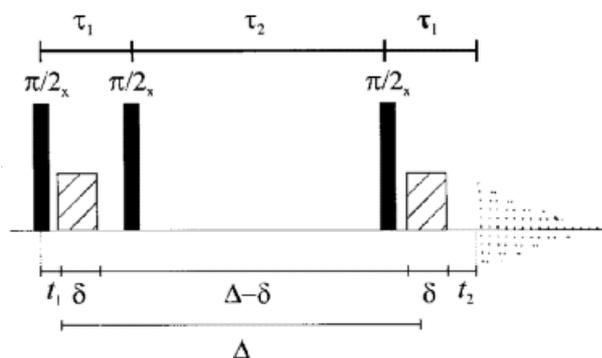


Figura 4.11.- Secuencia de pulsos para el experimento STE

II. 4C. 2.- Fenómenos de convección

Cuando realizamos los primeros experimentos de difusión sobre el AO y AOC, nos sorprendió que las medidas obtenidas eran muy poco reproducibles, y oscilaban constantemente. Esta variabilidad nos hizo pensar en la posibilidad de que los fenómenos de convección térmica jugaran un importante papel en las condiciones experimentales en las que estábamos efectuando las medidas.¹⁰⁰

¹⁰⁰ El control de la temperatura en las sondas de RMN se consigue haciendo pasar una corriente de aire desde la base de la sonda. Es posible por tanto que se generen gradientes de temperatura a lo largo del eje longitudinal de la muestra. Si el gradiente de temperatura en dicho eje es lo suficientemente grande, la

En efecto, la presencia de convección¹⁰⁷ es observable si durante el procesado de las FID nos cuidamos de ajustar la fase con los mismos valores para todos los experimentos. Al aumentar la intensidad de los gradientes aplicados se alcanza un punto en el que las señales se invierten para volver a recuperar la situación habitual justo antes de desaparecer definitivamente (**Figura 4.12**). Este fenómeno podría falsear las medidas de los coeficientes de difusión.

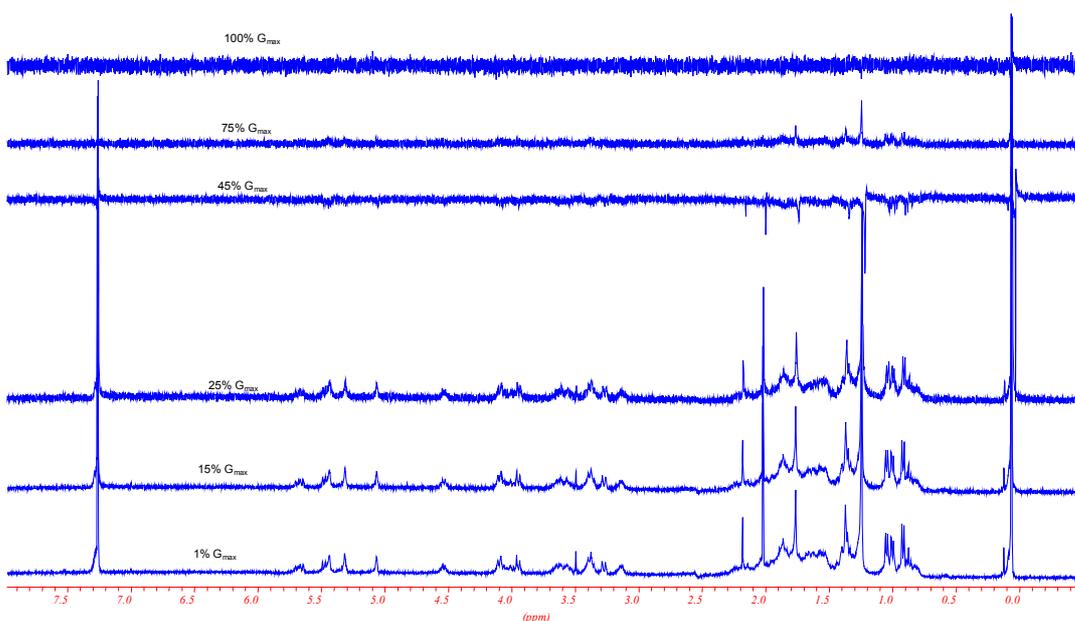


Figura 4.12.- Espectros RMN del AO en CDCl_3 a 25°C aplicando diferentes intensidades de gradientes. Se pueden apreciar los efectos de la convección al aplicar un 45% de la intensidad máxima de los gradientes ($G_{\text{max}} = 53.5 \text{ G cm}^{-1}$).

Generalmente los disolventes con baja viscosidad (p.ej. CDCl_3) suelen presentar problemas de convección en este tipo de mediciones. Con el fin de solucionarlos, decidimos disminuir la temperatura a la que realizábamos las medidas, al tiempo que girábamos la muestra para promediar los efectos de la convección.

convección térmica provocará el movimiento de las moléculas a lo largo del eje z, falseando los resultados. La intensidad del gradiente de temperatura dependerá de la eficiencia de la transferencia de calor y de la viscosidad de la muestra.

¹⁰⁷ Lounila, J.; Oikarinen, K.; Ingman, P.; Jokisaari, J. *J. Mag. Reson. A*, **1996**, 118, 50.

Efectivamente disminuyendo la temperatura hasta 10°C y girando la muestra, desaparecerían estos efectos. (Figura 4.13).

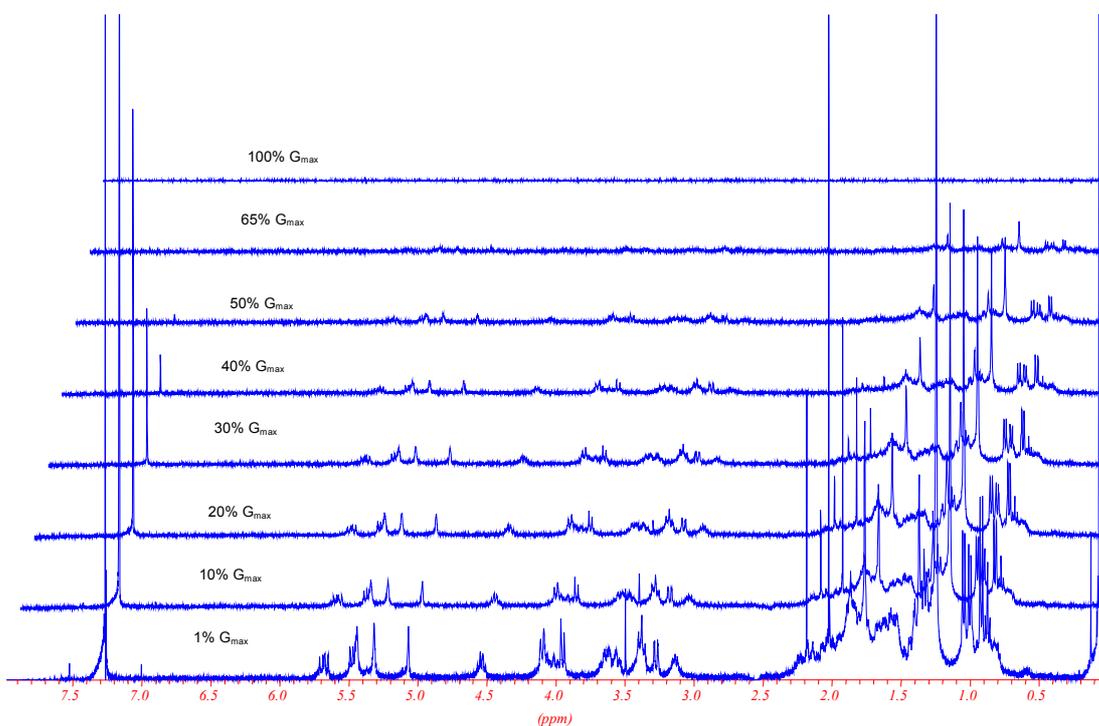


Figura 4.13.- Representación en cascada de espectros del AO en CDCl_3 realizados a 10°C y girando la muestra. ($G_{\text{max}} = 53.5 \text{ G cm}^{-1}$).

II. 4C. 3.- Medida de los coeficientes de difusión

Resueltos los problemas anteriores, sólo restaba realizar todas las mediciones. En estas, se varía la potencia de los gradientes aplicados y se mide la intensidad de una de las señales de la molécula en función de los mismos. Al haber usado gradientes rectangulares, la intensidad de las señales **A** está relacionada con el *Coefficiente de Difusión D*, según la ecuación:

$$\ln (A_g / A_o) = - \gamma^2 g^2 \delta^2 (\Delta - \delta / 3) D$$

En la **figura 4.14** se resumen los resultados de las mediciones hechas. La pendiente de cada una de las rectas de regresión calculadas nos da el valor de D , el *Coefficiente de Difusión* de la molécula. Para el AO este valor fue de $5.77 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$, mientras que para el AOC el valor obtenido fue de $4.47 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$.

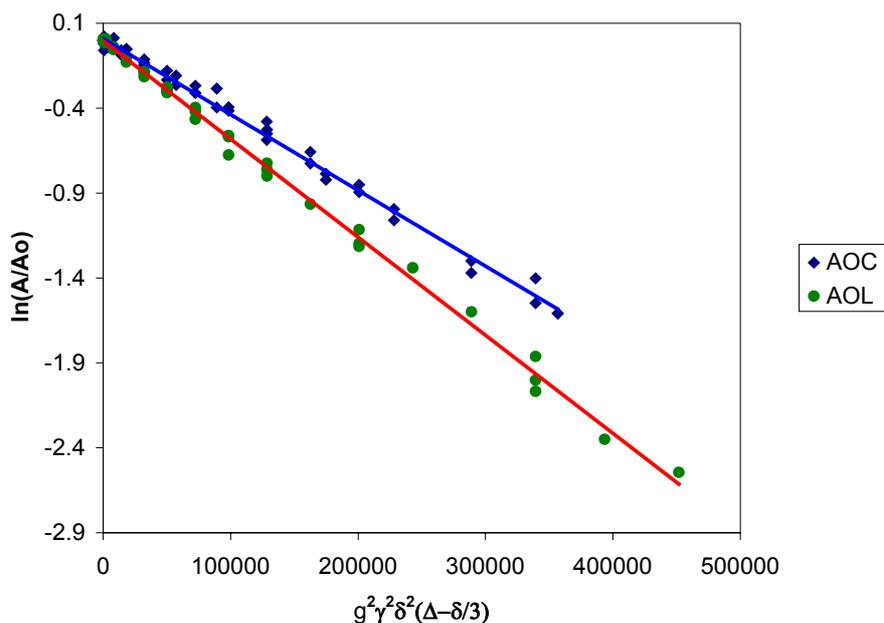


Figura 4.14.- Representación de las medidas tomadas en los experimentos de difusión del AO y el AOC en CDCl_3

II. 4C. 4.- Determinación del estado de asociación

La ecuación de Stokes-Einstein,¹⁰¹ puede ser usada para relacionar el valor de D con el radio molecular R , que a su vez se considera proporcional a la masa molecular aparente M_{ap} . Considerando una molécula esférica, R es proporcional a $M_{\text{ap}}^{1/3}$. Así, si comparamos el *Coefficiente de Difusión* para dos moléculas con una forma esférica similar en las mismas condiciones experimentales:

¹⁰¹ Cantor, C.R.; Schimmel, P.R. *Biophysical Chemistry, Part II: Techniques for the Study of Biological Structure and Function*. 1980. W.H.Freeman, NY, p 539.

$$D_1 / D_2 = (M_{2ap} / M_{1ap})^{1/3} \text{ (Ec. de Stokes-Einstein)}$$

Por lo tanto, el coeficiente de difusión de una molécula de peso molecular conocido puede ser utilizado como un estándar para evaluar el peso molecular aparente de otra molécula, posibles estados de agregación, etc.

En nuestro caso particular:

$$(D_{AO} / D_{AOC})^3 = M_{AOC} / M_{AO} = 2.14$$

Esta relación se ajusta con bastante fidelidad a lo que sería la dimerización del Ácido Okadaico cuando se compleja con el ion potasio.

IV. C. 5.- Espectrometría de masas del complejo del AO

La dimerización del Ácido Okadaico con potasio fue confirmada además mediante la realización de un espectro de masas ESI donde se pueden observar picos a m/z 1665 atribuibles a $[AO]_2 + K^+ + H_2O$ y a m/z 1647 para $[AO]_2 + K^+$ (**Figura 4.15**),¹⁰⁹ además se observa un pico a m/z 1630 característico de la especie $[AO]_2 + Na^+$ que nos indica la posible intervención de este catión en el fenómeno de auto-asociación del AO.

¹⁰⁹ Espectro realizado con un espectrómetro JEOL LC en la Universidad de Columbia, NY. por el Dr. Y. Itagaki y la Dra. M.L. Souto a quienes agradecemos la valiosa ayuda prestada.

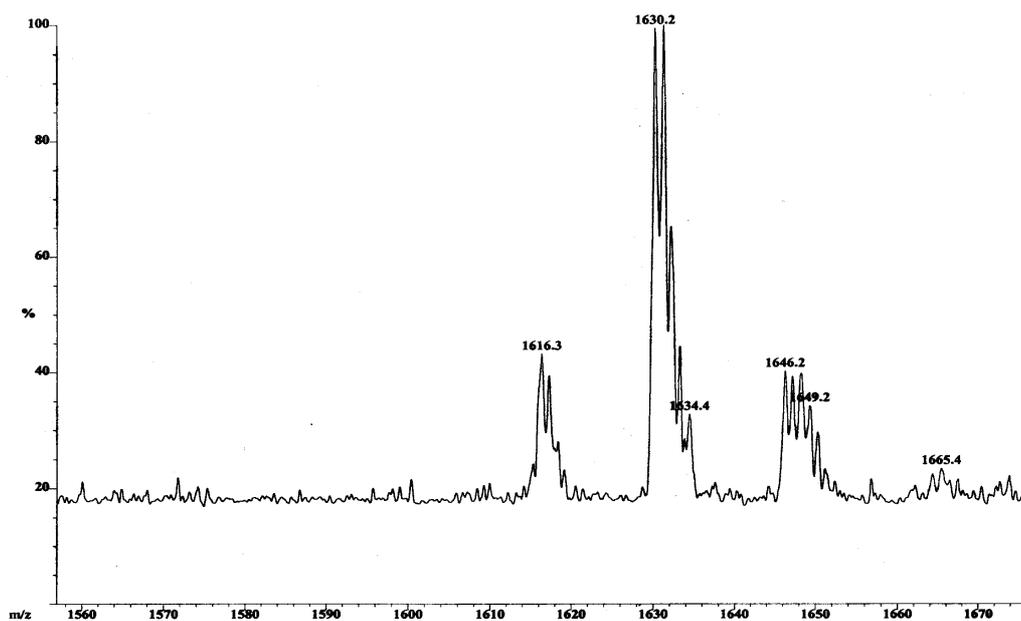


Figura 4.15.- Fragmento del espectro de masas del AOC

II. 4C. 6.- Medida de los coeficientes de difusión en medio acuoso

Una vez confirmada la formación de un dímero en el proceso de complejación del AO, nos dispusimos a estudiar el comportamiento del AO y del OAC en un medio con mayor implicación biológica, el agua.

El primer experimento consistió en realizar los espectros ^1H RMN tanto para el AO como para el AOC utilizando como disolvente D_2O . A diferencia de lo que ocurría en CDCl_3 donde se observaban ligeras diferencias, en D_2O los espectros obtenidos para el AO y AOC eran idénticos (**Figura 4.16**).

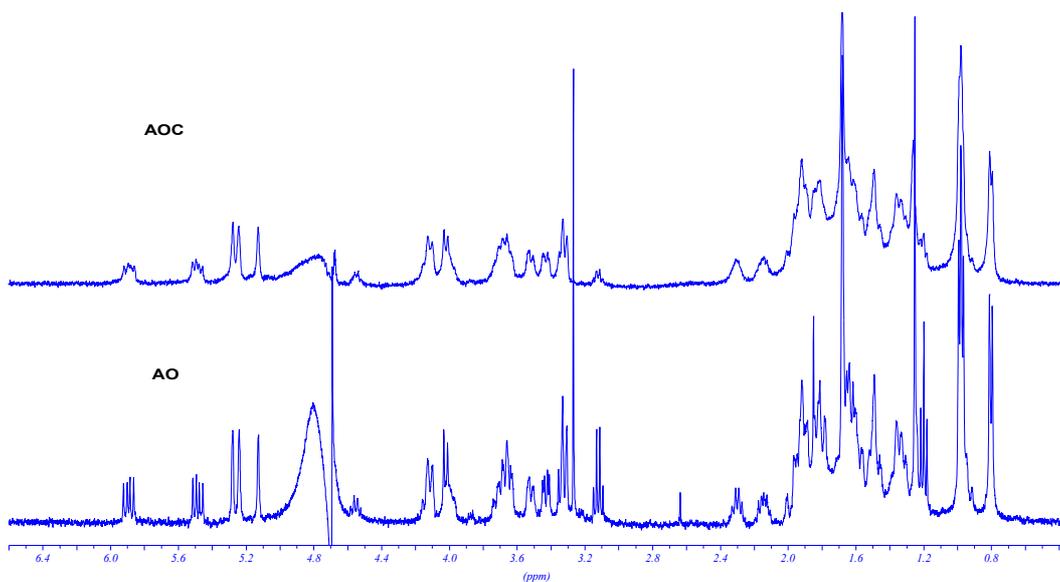


Figura 4.16.- Comparación de los espectros ^1H RMN del AO y del AOC en D_2O

La realización de los experimentos de difusión (STE) nos permitió calcular los valores de los coeficientes de difusión para las dos muestras, $D_{\text{AO}}=2.70 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ y $D_{\text{AOC}}=2.55 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$. Los resultados obtenidos, que se representan en la figura 4.17, nos muestran que tanto el AO como el AOC presentan el mismo grado de asociación

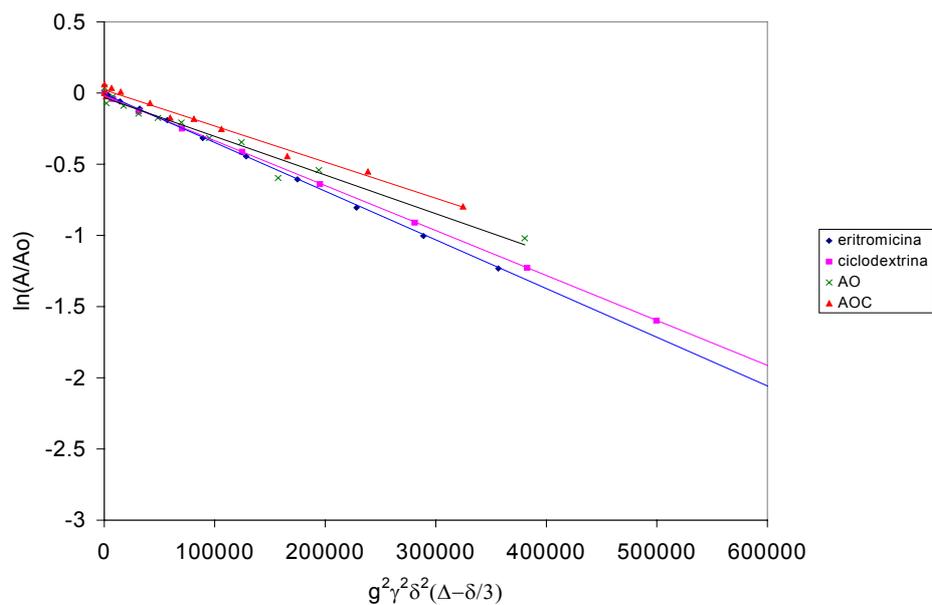


Figura 4.17.- Representación de las medidas de difusión para el OA y el OAC en D_2O

La falta de una referencia externa hace imposible valorar cuantitativamente los resultados, pues los valores obtenidos en D₂O no son comparables con los obtenidos previamente en CDCl₃, ya que la viscosidad del medio es aproximadamente el doble (a 25°C, $\eta_{\text{cloroformo}} = 0.54$ y $\eta_{\text{agua}} = 0.89$ cP). Por ello decidimos realizar medidas de difusión con la eritromicina ($P_m = 734$) y con la β -ciclodextrina ($P_m = 1135$) y tomarlos como referencia. Para la eritromicina se obtuvo un valor de $D = 3.42 \times 10^{-6}$ cm²/s y para β -ciclodextrina un valor de $D = 3.2 \times 10^{-6}$ cm²/s. Si los comparamos con los obtenidos tanto para el OA ($D = 2.70 \times 10^{-6}$ cm²/s) como para el OAC ($D = 2.55 \times 10^{-6}$ cm²/s), podemos concluir que ambos forman una asociación cuyo peso molecular en D₂O es superior al de la β -ciclodextrina, posiblemente en la forma dimérica.

Para confirmar estos resultados realizamos experimentos de correlación espacial NOESY⁹⁸ y ROESY⁹⁹ como hicimos anteriormente en CDCl₃. El AO en D₂O apenas muestra correlaciones en el NOESY realizado a 25°C en un aparato de 400 MHz (**Figura 4.19**), mientras que en el ROESY aparecen con toda claridad (**Figura 4.20**), de lo que se deduce que de nuevo estamos en la zona de NOEs nulo. Para verificar el rango de pesos moleculares en los que éste fenómeno se produce, usando nuevamente D₂O como disolvente, observamos que tanto en la eritromicina como en la β -ciclodextrina, se observa la presencia de correlaciones NOE positivas.

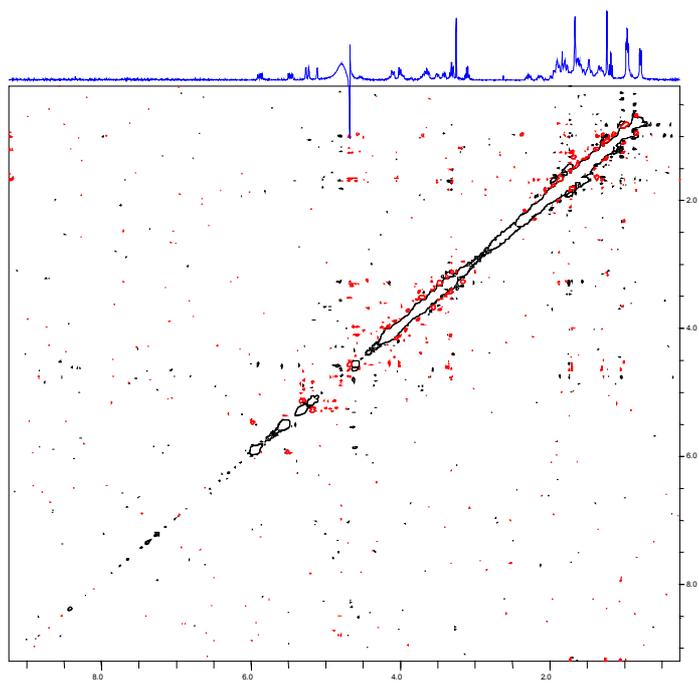


Figura 4.19.- NOESY del AO en D₂O a 25°C a 400MHz

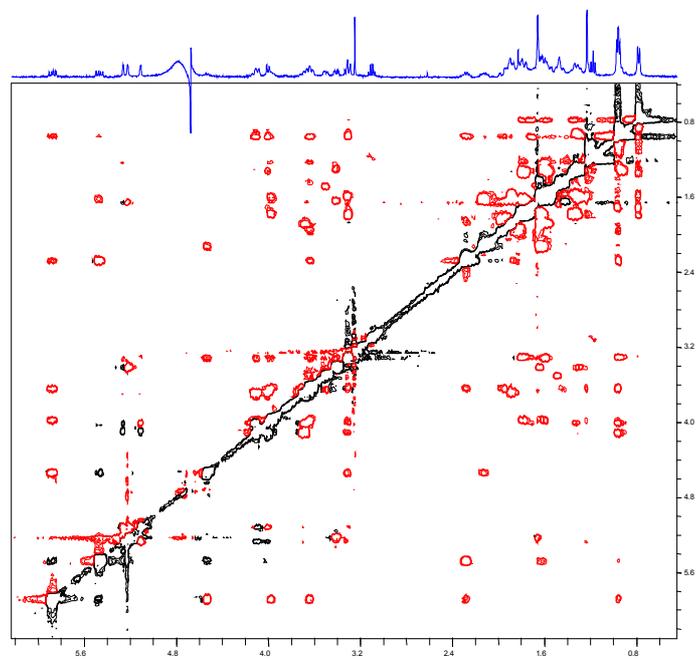


Figura 4.20.- ROESY del AO en D₂O a 25°C a 400MHz

II. 4C. 7.- Aproximación a la estructura del dímero

A la vista de los resultados obtenidos, AO en CDCl_3 en forma de monómero y AO en D_2O como dímero, decidimos estudiar la naturaleza de esta asociación. Para ello se realizó un estudio comparativo de las correlaciones espaciales mediante experimentos ROESY. Teniendo en cuenta que en ningún momento se observan duplicidad en las señales de ^1H NMR del OA en D_2O , deben existir elementos de simetría que hagan que ambas unidades sean totalmente equivalentes. Todas las señales de los espectros ROESY fueron integradas y comparadas, destacando sobre todo el importante incremento en las correspondientes a la correlación entre H-4 y H-14. Si suponemos además un plegamiento en forma de *bastón* propuesto para el OA, un aumento tan considerable en los ROEs de éstas señales, junto con el resto de los incrementos observados, nos sugiere que en el dímero ambas cavidades deben disponerse enfrentadas y las cadenas carbonadas entre C-26 y C-38, deben encontrarse en el mismo eje y extendidas en sentido contrario (**Figura 4.20**).

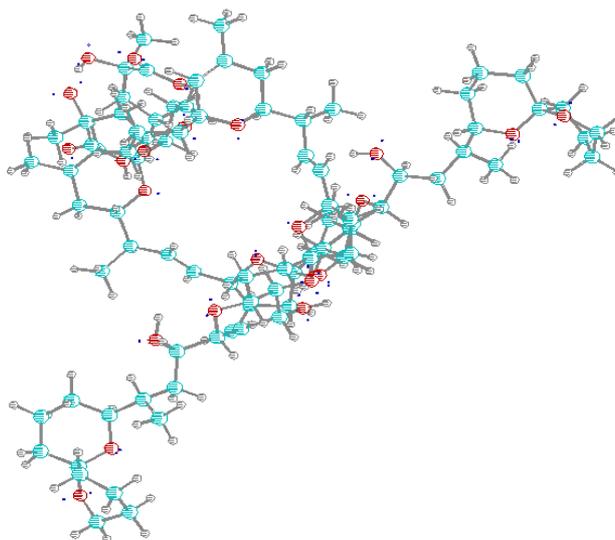


Figura 4.20.- Representación tridimensional del dímero del AO

II. 4D.- Estudios de RMN del AO en presencia de análogos de membrana

Con el fin de estudiar las posibles implicaciones biológicas del hecho anterior, decidimos llevar a cabo una serie de experimentos encaminados al estudio de las posibles interacciones de la molécula de AO con micelas de un detergente. El uso de estas micelas nos permite disponer de un modelo razonablemente bueno de cómo diferentes moléculas pueden comportarse en un ambiente lipídico.¹⁰²

La utilización de la dodecilmfosfocolina (DPC) constituye uno de los modelos de membrana mejor caracterizados para el estudio de péptidos y proteínas que se unen a lípidos de membrana. Sus características son tales que le permiten formar una micela bastante estable que gira libremente en disolución, haciendo de ella una excelente herramienta para mimetizar el ambiente lipídico de una membrana al tiempo que mantiene las propiedades dinámicas que son necesarias para llevar a cabo estudios de RMN en disolución.¹⁰³ Además, otro hecho muy importante es su disponibilidad en forma perdeuterada, lo que permite observar las señales de la muestra de interés (AO) a pesar de su menor concentración (hasta 50 veces menor).

Para llevar a cabo este estudio, añadimos cantidades crecientes de detergente sobre la muestra de AO, empezando por una concentración 0.5 mM en el medio, hasta alcanzar concentraciones muy superiores a la concentración micelar crítica (48 mM).¹⁰⁴

¹⁰² Henry, G.D.; Sykes, B.D. *Methods in Enzymology*, vol 239, 515.

¹⁰³ Lauterwein, J. *Biochim. Biophys. Acta.* **1979**, 556, 244.

¹⁰⁴ La concentración micelar crítica (cmc) es la concentración de detergente a la cual las micelas comienzan a formarse, aunque esto no es un concepto del todo exacto pues la formación de la micela no es un cambio de estado del todo real ya que la micela está en rápido equilibrio con los monómeros. En el caso de la DPC la cmc es 1 mM.

La observación de los espectros ^1H RMN muestra como paulatinamente se produce un ensanchamiento de las señales, si las comparamos con las del AO en agua, lo que constituye una indicación a favor de la existencia de interacciones entre las micelas y el AO. Sin embargo, no se observan cambios especialmente significativos en los desplazamientos químicos de las señales.

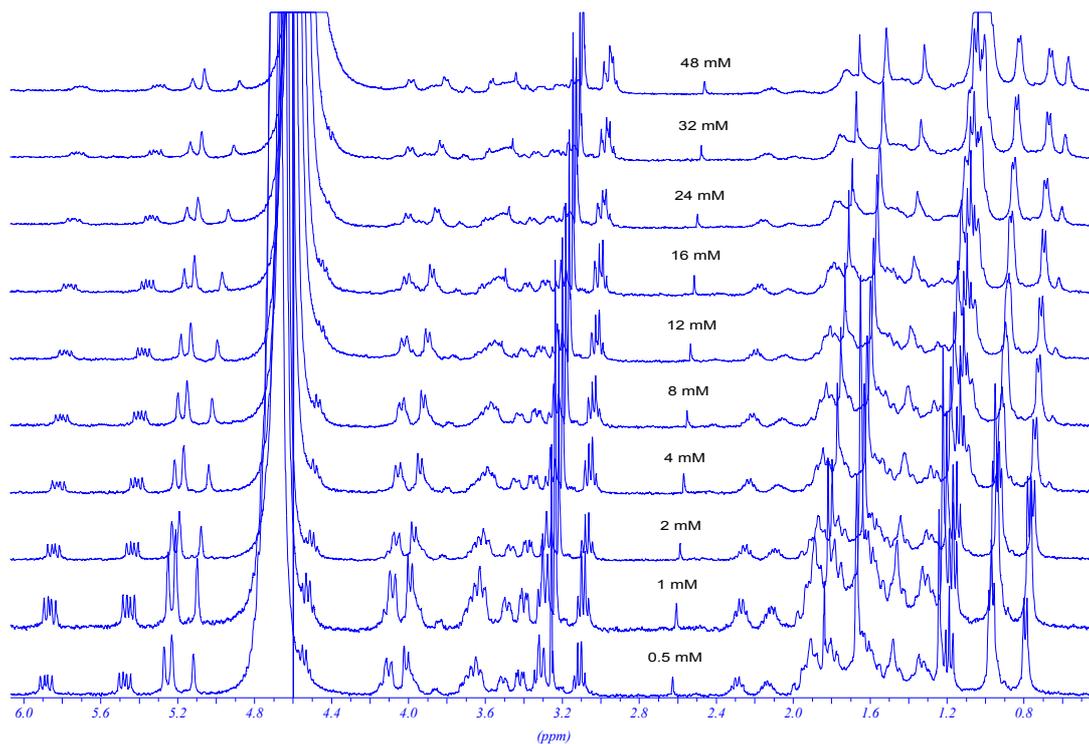


Figura 4.22.- Representación en cascada de espectros del AO en presencia de concentraciones crecientes de DPC.

Para verificar las observaciones anteriores, decidimos recurrir de nuevo al cálculo de los coeficientes de difusión del AO en estas condiciones, tomando medidas de los *coeficientes de difusión* cada vez que aumentamos la concentración de DPC en el medio. Los resultados obtenidos muestran que conforme aumentamos la concentración de DPC en el medio, el coeficiente de difusión del AO es cada vez menor (esto se corresponde con moléculas de mayor tamaño).

[DPC] mM	D (G cm ⁻¹)
0.5	2.75x10 ⁻⁶
1	2.79x10 ⁻⁶
2	2.70x10 ⁻⁶
4	2.73x10 ⁻⁶
8	2.43x10 ⁻⁶
12	2.28x10 ⁻⁶
16	2.03x10 ⁻⁶
24	1.92x10 ⁻⁶
32	1.81x10 ⁻⁶
48	1.71x10 ⁻⁶

Tabla 4.1. Coeficientes de difusión del AO en presencia de concentraciones crecientes de DPC

Para analizar los datos de la difusión del AO en presencia de las micelas debemos realizar la presunción de que el intercambio entre la forma libre del AO y el AO solubilizado en las micelas es rápido en la escala de tiempos de la RMN. De esta forma, el coeficiente de difusión que medimos, D_{obs} , vendrá determinado por la siguiente ecuación:¹⁰⁵

$$D_{obs} = f_U D_U + (1-f_U) D_L$$

donde D_L y D_U son los coeficientes de difusión del AO en su forma libre y unida a las micelas respectivamente (asumimos que D_U es igual al de la micela) y f_U es la fracción de AO unido. Usando la expresión anterior, calculamos la fracción de AO que interacciona con las micelas de DPC a cada concentración.

¹⁰⁵ Stilbs, P. *Prog.NMR Spectrosc.* **1987**, 19, 1.

[DPC] / [AO]	AOU / AOL
0.5	0
1	0.03
2	0.02
4	0.01
8	0.23
12	0.34
16	0.53
24	0.61
32	0.68
48	0.76

Tabla 4.2. Proporción de AO que unido a las micelas en función de la relación molar de concentraciones de DPC y AO.

En esta representación puede observarse que a concentraciones inferiores e incluso ligeramente superiores a la cmc (1mM)¹⁰⁶ no hay cambios en la difusión del AO. Sin embargo, conforme la concentración de DPC en el medio supera los 4 mM empezamos a ver como la fracción de AO que interacciona con las micelas es cada vez mayor.

¹⁰⁶ Lauterwein, J.; Bösch, C.; Brown, L.R.; Wüthrich, K. *Biochim. Biophys. Acta*, **1979**, 556, 244.

II. 5.- PARTE EXPERIMENTAL

II. 5A.- TECNICAS EXPERIMENTALES GENERALES

II. 5A. 1.- Resonancia Magnética Nuclear

Para la realización de los experimentos de RMN, los productos fueron disueltos en CDCl_3 , o D_2O , usando TMS como referencia interna. Dichos espectros, tanto de ^1H como de ^{13}C , fueron realizados en espectrómetros BRUKER® AMX 400, AVANCE 300 y 400 MHz según las necesidades. Se utilizaron los programas COSY, COSY DQF, NOESY, ROESY, DEPT, HMBC, HSQC que fueron suministrados por la casa BRUKER®. Los datos de adquisición obtenidos en el espectrómetro fueron procesados en un PC usando el programa WIN-NMR.

II. 5A. 2.- Masas

Los espectros de masas de baja y alta resolución fueron realizados en los espectrómetros MICROMASS y JEOL LC instrument de la Universidad de Columbia, Nueva York.

II. 5A. 3.- Cromatografía en columna

En los últimos estadios del aislamiento la cromatografía se realizó en columnas preempaquetadas LOBAR® GRÖBE B (310-25) LICHROPREP RP 18 (40-63 μm) de la casa MERCK® y bombas de media presión de la casa FLUID METERING®, modelo RP-SY.

II. 5A. 4.- Cromatografía HPLC

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

Las cromatografías en gradiente fueron realizadas en un HPLC SHIMADZU[®], compuesto por dos bombas LC-7A con mezclador de alta presión, un controlador de gradientes SCL-6B, un detector de fotodiodos modelo SPD-M6A y una columna μ -Bondapak C-18 (D.I. 1.9 cm, longitud 15 cm).

II. 5A. 5.- 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)

II. 5A. 6.- 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:

- e) Pulverización sobre la placa de una disolución de $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}:\text{AcOH}$ (1:4:20) y posterior calentamiento a 140°C.
- f) Pulverización sobre la placa de una disolución al 10% de ácido fosfomolibdico en etanol y posterior calentamiento a 140°C.

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

II. 5A. 7.- Cromatografía de gases

Se utilizó un cromatógrafo HEWLETT-PACKARD, modelo 5790A, equipado con una columna capilar SP-2300 (Supelco Inc.) de 50 m de longitud x 0.3 mm de diámetro interno y un detector de tipo FID (detector de ionización en llama).

II. 5A. 8.- Filtración y esterilización de material y medios de cultivo

Para la esterilización de agua de mar diluida al 5%, ésta se bombea, utilizando una bomba peristáltica MASTERFLEX[®] modelo 7521-25, a través de un sistema de filtros de 1 μm , 0.45 μm y 0.22 μm de la marca GELMANS[®]. Cuando los volúmenes de agua son muy grandes, la filtración esterilizante (0.22 μm) no se lleva a cabo y en su lugar se añade lejía comercial al agua de mar.

La esterilización de pequeños volúmenes de agua, de las disoluciones stock de nutrientes y de precursores enriquecidos fueron realizadas con filtros COSTAR[®] de membrana de nylon (0.22 μm) y almacenadas en botellas de poliestireno de 0.5 L COSTAR[®].

Para la realización de los cultivos se intenta usar en la medida de lo posible material desechable. Cuando esto no es posible se somete a esterilización en un autoclave a 120 °C durante 30 minutos.

II. 5A. 9.- Recolección por centrifugación

En la recolección de las células se utilizó una centrifuga SORVAL[®] RC-5B, con un sistema de alimentación en continuo. Todo el proceso se realiza entre 5°C y 10°C.

II. 5B.- ESTUDIO DEL DINOFLAGELADO *AMPHIDINIUM SP.*

II. 5B. 1.- Condiciones de cultivo

La cepa del dinoflagelado *Amphidinium sp* objeto de estudio fue recogida en diversos lugares de las Rías Gallegas aisladas e identificadas en el Instituto de Oceanografía Centro Costero de Vigo por la Dra. Isabel Bravo. Unas pocas células (3 mL de cultivo) nos fueron cedidas y a partir de ellas se realizaron los experimentos para producir un cultivo de las mismas a gran escala y estudiar los metabolitos secundarios producidos.

Los primeros pasos consistían en la elección del medios de cultivo apropiado y con este fin se hicieron ensayos a pequeña escala con los medios ES¹⁰⁷ (**Tabla 5.1**) y K¹⁰⁸, (**Tabla 5.2**) que usan como soporte agua de mar diluida un 5% con agua destilada y posteriormente sometida a filtración esterilizante (0.22µm).

MEDIO "ES"

H ₂ O destilada	100 mL
1.- NaNO ₃	350 mg
2.- Glicerofosfato sódico	50 mg
3.- Fe (como EDTA 1:1 mol)	2.5 mg
4.- TRIS	500 mg
5.- pH	7.8
6.- Solución de metales	25 mL
7.- Biotina	10 µg
8.- Tiamina	0.5 mg
9.- Vitamina B ₁₂	5 µg

¹⁰⁷ Provasoli, L. *Culture and Collection of Algae*; Watanabe, A.; Hattori, A.; Eds.; Jpanese Society of Plant Physiology, Tokio, **1968**, 63.

¹⁰⁸ Guillard, R.R.L.; Keller, M. *"Dinoflagellates"*, Spector, D.L. Ed.; Academic Press, New York, **1984**.

Solución de metales		
H ₂ O destilada		100 mL
FeCl ₃		1 mg
B H ₃ BO ₃		20 mg
MnCl ₂ ·4H ₂ O		4 mg
ZnCl ₂		500 µg
CoCl ₂ ·6H ₂ O		100 µg
Na ₂ -EDTA		100 mg

Tabla 5.1

MEDIO Guillard K

Compuestos	Concentración (M)	g/L agua destilada
1.- NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	1×10^{-5}	1.38
2.- Tris (pH=7.3)	1×10^{-3}	121.14
3.- Minerales		
NO ₃ Na	8.83×10^{-4}	75.05
CINH ₄	5×10^{-5}	2.68
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	9×10^{-5}	33.6
FeEDTA	1.46×10^{-5}	4.3
MnCl ₂ ·4H ₂ O	9×10^{-7}	0.18
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8×10^{-8}	0.02
CoCl ₂ ·6H ₂ O	5×10^{-8}	0.01
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	3×10^{-8}	7×10^{-3}
CuSO ₄ ·5H ₂ O	1×10^{-8}	2.5×10^{-3}
H ₂ SeO ₃	1×10^{-8}	1.3×10^{-3}
4.- Vitaminas		
Tiamina ClH	3×10^{-7}	0.1
Biotina	2.1×10^{-9}	5.1305×10^{-4}
Vitamina B ₁₂	3.7×10^{-10}	5.0149×10^{-4}

Tabla 5. 2

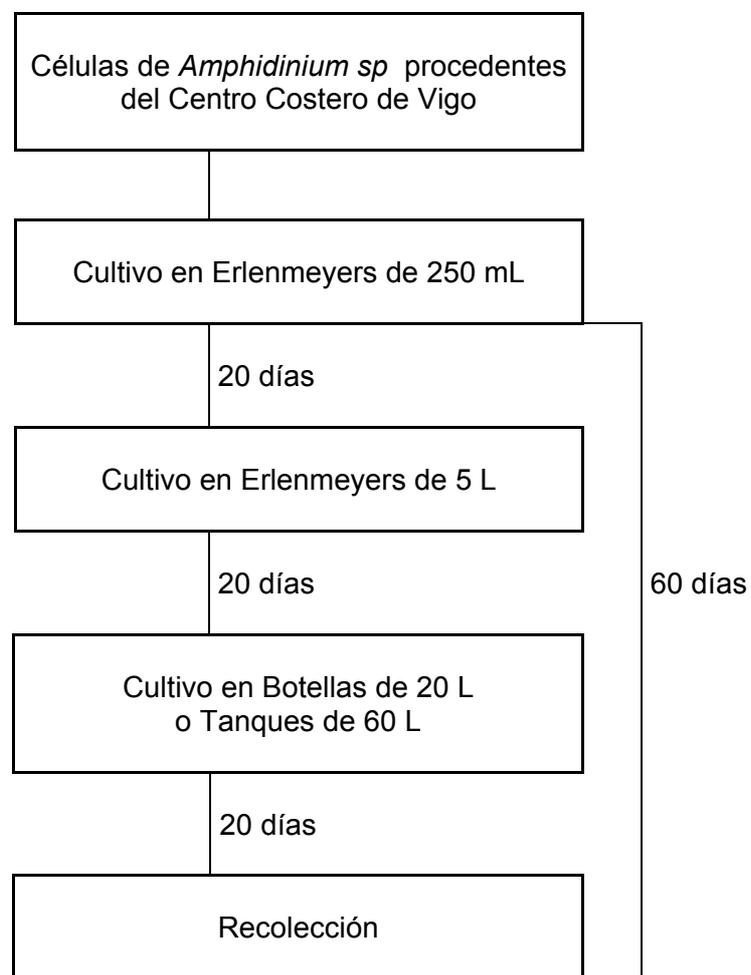
Las disoluciones *stock* de *nutrientes*, fueron preparadas disolviendo la cantidad requerida de la sal correspondiente en el 80-90% del volumen requerido de agua destilada. A continuación fueron sometidos a agitación o calentamiento en los casos necesarios hasta conseguir la disolución total, para finalmente añadir agua hasta

ajustar el volumen final. Las disoluciones *stock* fueron siempre esterilizadas por filtración (0.22 μ m) y posteriormente almacenadas en el refrigerador.

El agua de mar utilizada fue recogida lejos de la orilla, disminuyendo de esta forma la presencia de contaminantes y partículas en suspensión. Posteriormente fue transportada y almacenada en tanques de plástico durante algunas semanas antes de su uso (el uso de agua envejecida suele estar recomendado). Previamente a su utilización, el agua fue bombeada en todos los casos a través de un sistema de filtros de 1 μ m y de 0.45 μ m eliminando así todas las partículas que pudieran existir. Cuando fueron necesarios pequeños volúmenes de agua (cultivo en ernlenmeyer de 250 mL o 5 L) se sometía a filtración esterilizante a través de filtros de 0.22 μ m. Cuando los volúmenes son mayores se recurre al uso de lejía que se añade hasta conseguir una concentración de 30 ppm de Cl₂ por litro (0.6 mL por litro de agua) y se deja en reposo durante 24 horas. La lejía comercial contiene normalmente un 5.25% de NaClO que es equivalente a un 5% de Cl₂. A continuación se neutraliza con Na₂S₂O₃ (0.144 mL de una disolución 1M por litro de agua) que se añade en un pequeño exceso para asegurarnos la neutralización total, dejando transcurrir de nuevo otras 24 horas antes de hacer la inoculación.

Todo el material que se pone en contacto con los cultivos es previamente esterilizado en un autoclave a 120 °C durante 30 minutos. La manipulación de todos los cultivos se realizó bajo campana de flujo laminar cuando el tamaño del recipiente lo permitía. En los casos en los que esto no era posible (botellas de 20 L o tanques de 60 L) la manipulación se hacía al lado de la llama de un mechero de gas, flameando siempre la boca de los recipientes.

En lo referente al mantenimiento del cultivo, este se realiza en erlenmeyers de 250 mL conteniendo 150 mL de medio. Cuando se pretende amplificar el cultivo, en primer lugar se trasvasa a erlenmeyers de 5 L conteniendo 3 L de medio y estos posteriormente a botellas de 20 L o tanques de 60 L. En cada caso la cantidad inoculada fue de un 10%-15% del volumen final. Este ciclo de cultivo se resume en el siguiente esquema:



Esquema 5.1.- Ciclo de cultivo de *Amphidinium sp.*

II. 5B. 2.- Recuento de células

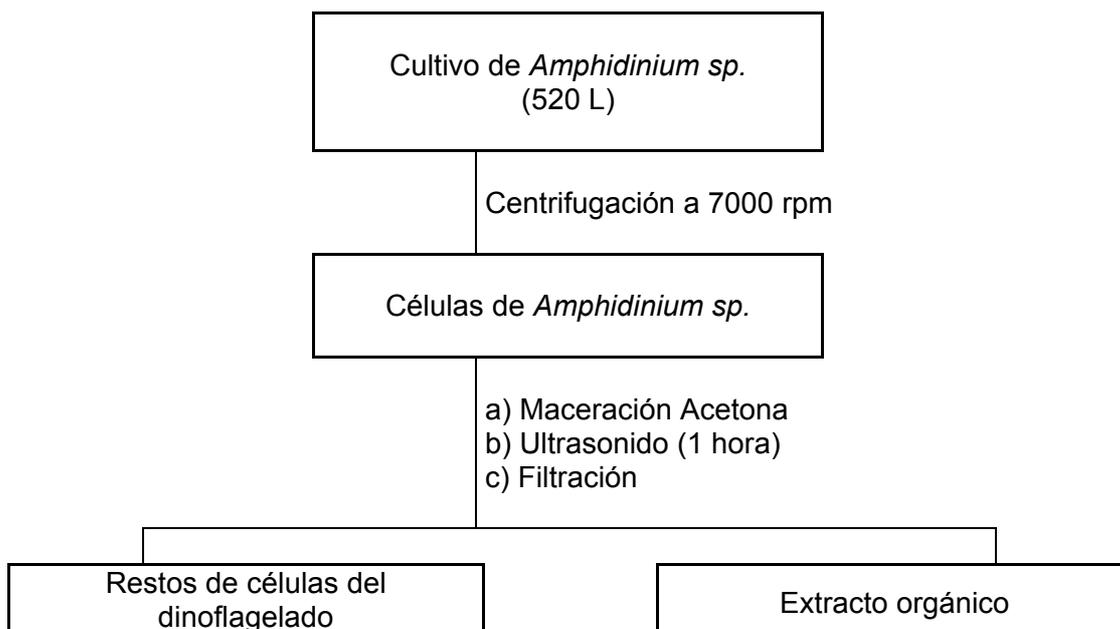
Para realizar el recuento de células se toma un erlenmeyer y se agita suavemente hasta conseguir homogeneizar el medio. A continuación se separa una alícuota de 1 mL a la que se añaden 20 μ L de una disolución saturada de NiSO₄, con el fin de fijar las células, pues aunque las células se ven perfectamente al microscopio, debido a su movilidad es imposible realizar un conteo fiable sobre una muestra "fresca".

Finalmente se procede al recuento en el microscopio, utilizando un hematocitómetro de Neubauer. Las medidas se hicieron por cuadruplicado, contando entre 150 y 250 células cada vez.

II. 5B. 3.- Recolección y extracción de las células

Pasados 20 días desde la inoculación se procede a la recolección de las células. Dado que el dinoflagelado muestra una gran movilidad, esta se lleva a cabo por centrifugación continua a 10000 r.p.m. y a 0°C. Cuando los volúmenes de agua son muy grandes se puede optar por inducir la floculación de las células añadiendo al medio AlK(SO₄)₂ hasta conseguir una concentración final de 200-300 ppm y llevando el cultivo a la oscuridad; transcurrido un tiempo se decanta el sobrenadante y se centrifuga un volumen menor.

Las células recolectadas se maceran hasta agotamiento en acetona en un baño de ultrasonidos para romper la pared celular. Después de filtrar a través de una placa de vidrio y proceder a la evaporación del disolvente, se obtuvo un extracto de color verde oscuro (9.2 g). Este proceso se esquematiza de la forma siguiente (**Esquema 5.2**):



Esquema 5.2.- Procedimiento de extracción de los cultivos de *Amphidinium sp.*

II. 5B. 4.- Marcha cromatográfica del extracto

El extracto fue cromatografiado en dos porciones en una columna de Sephadex LH-20 (D.I. 7cm x 60cm longitud) usando como eluyente una mezcla de n-Hexano:CHCl₃:MeOH (2:1:1), aquellas fracciones que mostraron un comportamiento parecido en cromatografía de capa fina fueron reunidas dando lugar a 8 fracciones.

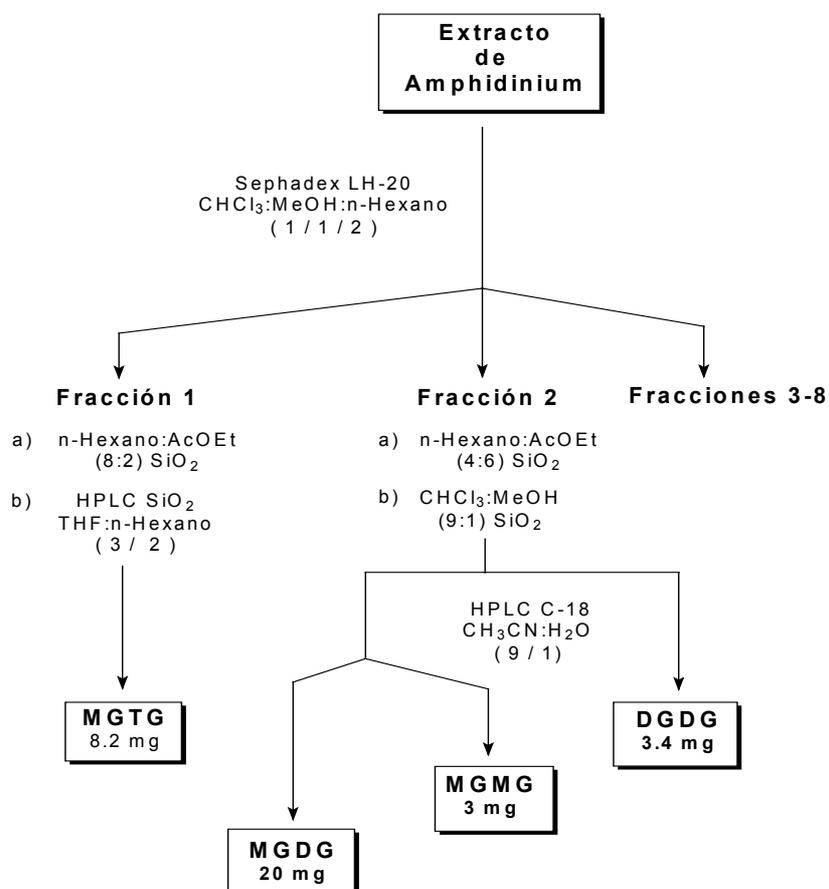
Estudio de la fracción 1

Esta fracción fue sometida a una segunda cromatografía en una columna de gel de sílice en la que se usó como eluyente una mezcla n-Hexano:AcOEt (4:1), en la

que se separó el MGTG (4), cuya purificación final se llevo a cabo en una columna de HPLC semipreparativa μ -Porasil de gel de sílice (D.I. 1.9 cm x longitud 15 cm), usando una mezcla de THF:n-Hexano (3:2) como fase movil.

Estudio de la fracción 2

Esta fracción fue recromatografiada empleando en primer lugar una columna de gel de sílice y una mezcla de n-Hexano:AcOEt (2:3) y a continuación en una columna pre-empaquetada Lobar[®] de gel de sílice usando ahora una mezcla CHCl_3 :MeOH (9:1). De esta manera pudo ser separado el DGDG (3) de una mezcla de MGDG (1) y MGMG (2), que finalmente fue resuelta usando una columna semipreparativa μ -Bondapak C-18 (D.I. 1.9 cm x longitud 15 cm) con una mezcla de acetonitrilo:H₂O (9:1) como eluyente.



Esquema 5.3.- Marcha cromatográfica del extracto de *Amphidinium sp.***II. 5B. 5.- Transformaciones químicas****Acetilación de los glicolípidos**

La acetilación se realizó disolviendo el producto en el mínimo volumen posible de piridina y adicionando 2.5 veces ese volumen de anhídrido acético. La mezcla de reacción se mantuvo durante 6 horas a 0°C con agitación, después de lo cual se detiene la reacción adicionando hielo. La extracción se realizó con éter etílico, lavando la fase orgánica repetidas veces con disolución saturada de sulfato de cobre y bicarbonato sódico. Finalmente la fase etérea se seca sobre sulfato magnésico y se concentra a vacío.

Tratamiento alcalino del Heterosigma-glicolípido III

A una disolución del diacilglicerolgalactolípido (1) (5 mg) en metanol (5 mL), se le añadió 1 mL de una disolución de NaOMe-MeOH al 5% y se agitó durante 30 min a temperatura ambiente. La mezcla de reacción fue neutralizada usando Dowex 50W x 8 (forma ácida) y posteriormente fue sometida a un reparto de n-Hexano/Metanol. La porción de n-hexano que contenía la mezcla de los ésteres metílicos de los ácidos grasos 6,9,12,15-octadecatetraenoico y 3,6,9,12,15-octapentaenoico, fue utilizada para realizar la cromatografía de gases.

Tratamiento alcalino del triacilglicerolgalactolípido

A una disolución del triacilglicerolgalactolípido (4) (5 mg) en metanol (5mL), se le añadió 1 mL de una disolución de NaMeO-MeOH al 5% y se agitó durante 30 min a temperatura ambiente. La mezcla de reacción fue neutralizada usando Dowex 50W x 8 (forma ácida) y posteriormente fue sometida a un reparto de n-Hexano/Metanol. La porción de n-hexano que contenía la mezcla de los ésteres metílicos de los ácidos

grasos, 6,9,12,15-octadecatetraenoico, 3,6,9,12,15-octadecapentaenoico y esteárico, fue utilizada para realizar la cromatografía de gases.

Cromatografía de gases

La cromatografía se desarrolló isotérmicamente a una temperatura de 190°C. Las temperaturas del detector y del inyector fueron de 250°C en ambos casos. Se utilizó como gas inerte el helio a una presión de 25 psig.

DATOS FÍSICOS DE HETEROSIGMA-GLICOLIPIDO II

Aceite.

$$[\alpha]_D^{25} = -4^\circ \text{ (c 1.3, CHCl}_3\text{)}$$

IR ν_{\max} (CHCl₃): 3420, 2998, 2905, 2845, 1720 cm⁻¹RMN ¹H y ¹³C (CDCl₃):

n°C	δ C	δ H	Multiplicidad	J (Hz)
1	101.6	4.47	d	7.9
2	68.6	5.18	dd	7.9; 10.4
3	70.7	5.00	dd	10.4; 3.4
4	66.9	5.37	d	3.4
5	70.8	3.89	dd	6.6; 6.6
6	61.2	4.14	m	-
1'	67.6	3.67	dd	5.7; 11
		3.95	dd	4.8; 11
2'	69.6	5.20	dddd	3.6, 4.8, 5.7, 6.6
3'	62.7	4.15	dd	6.6; 11.9
		4.32	dd	3.6; 11.9
1''	173.2	-	-	-
2''	34.1	2.31	-	-
3''	24.5	1.66	-	-
4''	29.1	1.39	-	-
5''	26.8	2.09	-	-
6''	-	5.38	-	-
7''	-	5.38	-	-
8''	-	2.82	-	-
1'''	171.6	-	-	-
2'''	32.7	3.12	-	-
3'''	-	5.56	-	-
4'''	-	5.38	-	-
5'''	-	2.82	-	-

HRMS: 819.5023 (calc. 819.5027, C₃₀H₄₁NO₆)

DATOS FÍSICOS DE HETEROSIGMA-GLICOLIPIDO IV

Aceite incoloro.

$[\alpha]_D^{25} = +21^\circ$ (c 0.4, Piridina)

IR ν_{\max} (CHCl₃): 3404, 2924, 2850, 1727 cm⁻¹

RMN ¹H y ¹³C (CDCl₃):

n° C	δ C (ppm)	δ H (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	101.7	4.48	d	7.8
2	68.6	5.18	dd	7.8; 10.3
3	79.9	5.00	dd	3.4; 10.3
4	67.1	5.38	d	3.4
5	71.5	3.84	dd	6.4; 6.4
6	65.5	3.44	dd	6.9; 9.3
		3.77	dd	6.4; 9.8
1'	96.8	4.95	d	3.44
2'	67.5	5.11	dd	3.4; 10.8
3'	67.4	5.29	dd	10.8; 3.4
4'	67.9	5.42	d	3.4
5'	66.6	4.2	dd	6.1; 6.1
6'	61.5	4.13	dd	6.1
			dd	6.1
1''	67.6	3.65	dd	10.8; 5.4
		3.99	dd	10.8; 4.9
2''	69.7	5.18	dddd	3.4, 4.9, 5.4, 6.4
3''	62.4	4.14	dd	12.2; 6.4
		4.31	dd	12.2; 3.44
1*	-	-	-	-
2*	33.4	2.3	-	-
3*	24.4	1.7	-	-
4*	-	2.1	-	-
ω*-1	-	2.1	-	-
ω*	14.2	0.97	-	-
1**	-	-	-	-
2**	33.0	2.3	-	-
3**	24.7	1.6	-	-
4**	29.1	1.4	-	-
5**	-	2.1	-	-
6**	-	5.4	-	-
7**	-	5.4	-	-
8**	-	2.8	-	-
ω**-1	-	2.1	-	-
ω**	14.2	0.97	-	-

HRMS: 981.5522 (calc. 981.5549, C₅₃H₈₂NaO₁₅)

DATOS FÍSICOS DE HEMOLISINA-I

Aceite.

$$[\alpha]_D^{25} = -4^\circ \text{ (c 1.3, CHCl}_3\text{)}$$

IR ν_{max} (CHCl₃): 3420, 2998, 2905, 2845, 1720 cm⁻¹RMN ¹H y ¹³C (CDCl₃):

n°C	δ C	δ H	Multiplicidad	J (Hz)
1	103.6	4.23	d	7.9
2	71.4	3.59	dd	7.9; 10.4
3	74.7	3.55	dd	10.4; 3.4
4	73.3	3.95	d	3.4
5	69.2	3.51	dd	6.6; 6.6
6	62.3	3.79	m	-
		3.90		
1'	68.1	3.69	dd	5.7; 11
		3.92	dd	4.8; 11
2'	70.2	5.30	dddd	3.6, 4.8, 5.7, 6.6
3'	62.7	4.19	dd	6.6; 11.9
		4.34	dd	3.6; 11.9
1''	173.2	-	-	-
2''	34.1	2.28	-	-
3''	24.5	1.65	-	-
4''	29.1	1.30	-	-
5''	26.8	2.05	-	-
6''	-	5.37	-	-
7''	-	5.37	-	-
8''	-	2.80	-	-

HRMS: 819.5023 (calc. 819.5027, C₃₀H₄₁NO₆)

II. 5C.- ESTUDIO DEL DINOFLAGELADO *PROROCENTRUM LIMA*

II. 5C. 1.- Cultivo de *Prorocentrum lima*.

II. 5C. 1. 1.- Condiciones de cultivo

Dentro de la continua colaboración que mantenemos con grupos del Instituto Español de Oceanografía de Vigo, nos fueron cedidas unas pocas células de diferentes cepas del dinoflagelado *P. lima*. Estas fueron localizadas en diversos lugares de las Rías Gallegas donde se encuentran depositadas sobre algas, fijadas sobre las cuerdas de las bateas o en los lodos del fondo 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 desarrollar su cultivo a gran escala. Una vez garantizada una fuente continua de toxinas y realizados sus estudios espectroscópicos estábamos en disposición de realizar los ensayos biosintéticos.

Las condiciones idóneas para el cultivo a gran escala del *Prorocentrum lima* fueron establecidas de la forma siguiente:

a) Medio de cultivo

El medio de cultivo empleado ha sido el *Medio K* descrito por Guillard,¹⁰⁹ puesto que resultó el más específico y mejor caracterizado para este dinoflagelado. Como soporte para el medio de cultivo se utiliza agua de mar con un 5% de agua destilada, para evitar que la concentración osmótica aumente demasiado cuando son añadidas las sales minerales y vitaminas que constituyen los *nutrientes*. Esta es bombeada a

través de un sistema de filtros ($1\mu\text{m}$, $0.45\mu\text{m}$) con una bomba peristáltica con el fin de eliminar toda la materia en suspensión. Como método de esterilización, el medio de cultivo se somete a filtración a través de filtros de $0.22\mu\text{m}$ cuando se trata de pequeños volúmenes (erlenmeyer de 250 mL o 5 L) pero cuando los volúmenes son mayores se recurre al uso de la lejía comercial. Esta se añade hasta conseguir una concentración de 30 ppm de Cl_2 por litro (si tenemos en cuenta que la lejía comercial contiene normalmente un 5.25% de NaClO , que es equivalente a una 5% de Cl_2 , hacen falta 0.6 ml de lejía por litro) y se deja durante 24 horas. A continuación se neutraliza con $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, añadiendo 0.144 mL de una disolución 1M por litro de agua de mar, de forma que exista un pequeño exceso para asegurarnos la neutralización total, dejando transcurrir de nuevo otras 24 horas antes de hacer la inoculación.

Las *disoluciones stock* de *nutrientes*, fueron preparadas disolviendo la cantidad de producto requerida en el 80-90% del volumen final de agua destilada. A continuación fueron sometidos a agitación o calentamiento en los casos necesarios hasta conseguir la disolución total, para finalmente añadir agua hasta ajustar al volumen final. Las disoluciones *stock* fueron siempre esterilizadas por filtración a $0.22\mu\text{m}$ y posteriormente almacenadas en el refrigerador. Las vitaminas deben prepararse antes de cada uso, si bien su almacenamiento en el congelador a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ da buenos resultados.

La naturaleza y concentraciones molares de las soluciones *stock de nutrientes* para la preparación del medio Guillard K se dan en la **tabla 5.2** y se preparan de tal forma, que tomando 1 mL de solución de nutrientes por litro de medio de cultivo, resulte la concentración deseada.

¹⁰⁹Guillard, R.R.L.; Keller, M. *Dinoflagellates*, Spector, D.L. Ed., Academic Press, New York, **1984**.

b) Temperatura óptima de crecimiento

La temperatura idónea de la cámara de 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 o se enquistan rápidamente. Además el crecimiento del cultivo es ligeramente más rápido en una primera fase a 23° C, aunque cuando son mantenidos durante periodos de tiempo grandes se alcanza una fase estacionaria, manteniéndose constante la cantidad de células por mililitro. Esto es lógico porque cuantas más células hay, más se favorece la reproducción sexual del dinoflagelado, disminuyendo la reproducción vegetativa por escisión, que es la más frecuente cuando el número de células por mililitro es muy pequeño.

c) Aireación

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

d) Fotoperíodo

Fotoperíodos de 18:6 o 12:12 horas de luz/oscuridad no fueron necesarios para conseguir un crecimiento óptimo del cultivo, y por razones de comodidad y con el fin de acortar el tiempo de los ciclos de cultivo se mantuvo 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 $160 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-2}$). En los casos en los que la intensidad de luz fue superior se observó una despigmentación progresiva de los microorganismos.

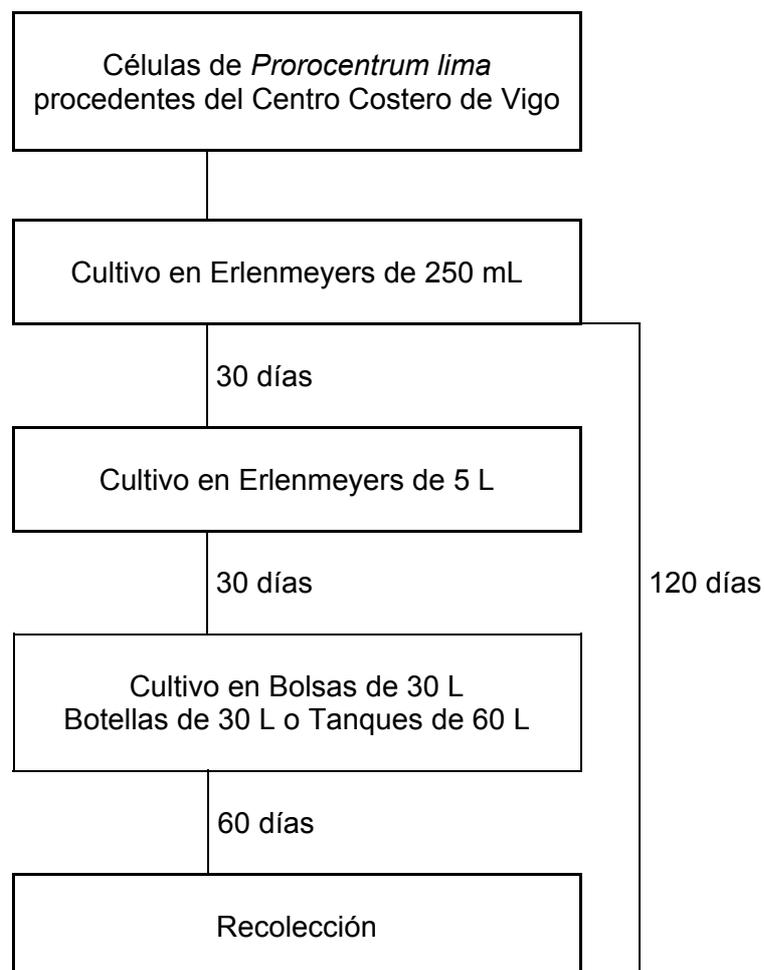
e) Ciclo de cultivo

Las cepas son mantenidas en tubos de ensayo que contienen 10 mL de medio Guillard K y son renovados con una periodicidad mensual. La primera etapa del *ciclo de cultivo* para realizar los cultivos a gran escala consiste en poder disponer de una batería de 50 erlenmeyers de 250 mL con 150 mL de medio de cultivo. Transcurridos 30 días desde la inoculación, 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 tanques de vidrio de 60 L conteniendo 40 L de medio. Como norma general el paso de una etapa a otra se hacía tomando como inóculo dos recipientes del nivel inferior e inoculando en un recipiente de volumen superior conteniendo aproximadamente $2/3$ de medio de cultivo y dejando $1/3$ de su volumen como cámara de aireación.

A la vista de los datos anteriores, se establece el tiempo aproximado de un *ciclo de cultivo* completo en 4 meses (**Esquema 5.5**).

Para prevenir la contaminación bacteriana se utilizó en todo momento materiales desechables a la hora de transferir las soluciones *stock* 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 cuando el tamaño del recipiente lo permitía. En los casos en los que esto no era posible (Botellas de 20 L o tanques de 60 L) la manipulación se hacía en todo momento al lado de la llama de un mechero de gas. Cuando se usaron bolsas plásticas de 30 L se esterilizaron mediante microondas.



Esquema 5.5.- Ciclo de cultivo.

II. 5C. 1. 2.- Recolección de las células

Dado el carácter bentónico del dinoflagelado, éste se adosa al fondo del recipiente que lo contiene. Debemos inicialmente proceder a suspender las células en

el medio de forma manual 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.

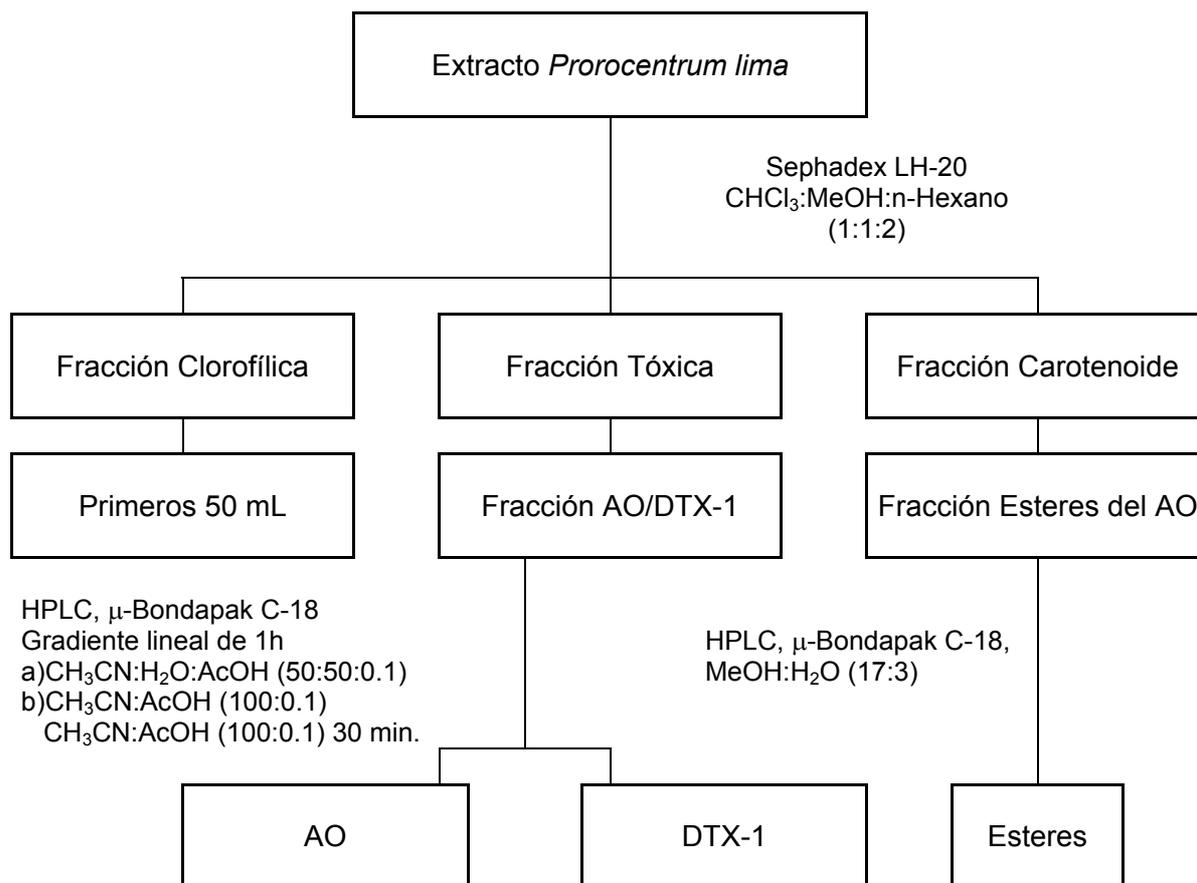
II. 5C. 1. 3.- Método de separación y purificación

El aislamiento se lleva a cabo mediante cromatografía de filtración en gel usando como soporte Sephadex LH-20 (60cm de longitud x diámetro interno de 7 cm) y como eluyente la mezcla: n-Hexano:CHCl₃:MeOH (2:1:1). Las cantidades de extracto obtenidas durante los experimentos biosintéticos oscilan entre 1 y 1.5 g, cantidades óptimas para esta columna. 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 (17:3). Esta cromatografía nos permite separar los ésteres del ácido okadaico de la mezcla AO/DTX-1, eluyendo en primer lugar la mezcla de las dos toxinas AO/DTX-1 y en segundo lugar los ésteres del AO.

La separación y purificación final del AO y DTX-1 se realiza en HPLC usando una columna semipreparativa μ -Bondapak C-18, eluyendo con 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 Rf de 0.7 y los ésteres un Rf de 0.8.



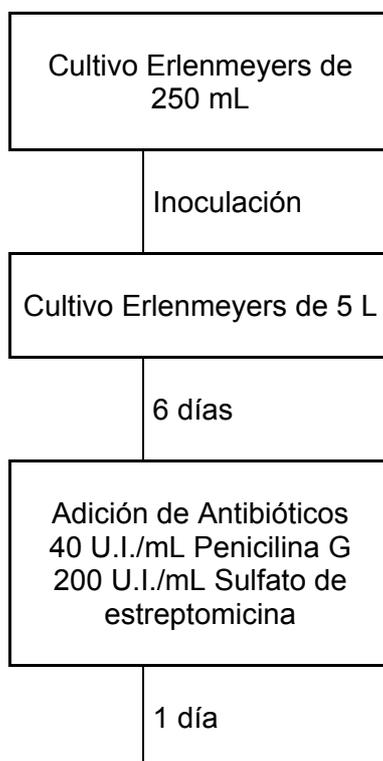
Esquema 5.6.- Diagrama del proceso cromatográfico para la separación de las toxinas producidas por el dinoflagelado *Prorocentrum lima*

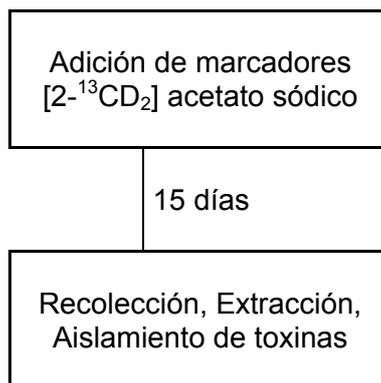
II. 5C. 2. Experimentos biosintéticos

II. 5C. 2. 1.- Adición de precursores enriquecidos en isótopos estables.

El proceso general seguido en los experimentos biosintéticos es el siguiente:

-
- 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 y se mantienen durante 6 o 7 días.
 - Un día antes de la adición de los precursores enriquecidos, se añadieron a los cultivos 40 UI/ml de penicilina G y 200 UI/mL de sulfato de estreptomicina.
 - El precursor añadido fue [2-¹³CD₂] acetato sódico disuelto en 20 mL de agua destilada que se adiciona hasta alcanzar una concentración final en el medio de 0.67 mM.
 - Al cabo de 15 días se procedió a la recolección de las células, extracción y aislamiento de las toxinas. La cantidad de toxina aislada fue de 1 mg.





Esquema 5.7.- Diagrama del experimento biosintético.

II. 5C. 2. 2.- Análisis de los resultados mediante RMN

Los experimentos de ^1H RMN fueron realizados en un espectrómetro Bruker Avance a 400 MHz para ^1H equipado con una sonda BBI, mientras que los experimentos de ^{13}C RMN fueron realizados en un espectrómetro Bruker Avance a 125.76 MHz para ^{13}C , equipado con una sonda BBO-Z de 5 mm.

Los espectros de ^1H RMN fueron adquiridos sobre una muestra de 1 mg disuelto en 0.5 ml de CDCl_3 en un tubo de 5 mm a una temperatura de 25 °C. Los desplazamientos químicos están expresados en ppm y referidos a la señal del CHCl_3 residual a 7.26 ppm. El procesamiento fue realizado sin ninguna multiplicación previa a la transformación de Fourier.

Los espectros $\{^1\text{H}\}\text{-}^{13}\text{C}$ RMN y $\{^1\text{H}, ^2\text{H}\}\text{-}^{13}\text{C}$ RMN con desacoplamiento sólo durante la adquisición, fueron adquiridos con un anchura espectral de 200 ppm con un pulso de 5 μs (que se corresponde a un ángulo de 75°). La secuencia de desacoplamiento en los dos casos fue la WALTZ 16 (tanto para ^1H como para ^2H). Para el ^1H , $p_{90}=100\mu\text{s}$, $p_{12}=16$ dB mientras para el ^2H $p_{90}=400\mu\text{s}$, $p_{14}=8\text{dB}$. El número de scans fue de 15000 con un tiempo de recuperación entre pulsos de 5s. El

procesado fue realizado aplicando una función de ventana de tipo exponencial, con un coeficiente LB (line-broadening)= 3 Hz previamente a la transformación de Fourier. En los casos en que el procesado anterior no fue capaz de separar las señales de interés, se aplicó una función de tipo gaussiana con unos coeficientes LB=-2Hz y GB=1.

Para el cálculo de los T₁ del diclorometano, benceno y éter corona 15/5 se usó un experimento de inversión-recuperación con un tiempo de espera entre cada pulso de 60s.

II. 5C. 2. 3.- Medida del enriquecimiento isotópico en el AO.

El porcentaje de ¹³C presente en cada una de las posiciones del AO fue medido por comparación de las intensidades (integrales) de cada una de las señales de ¹³C (incluyendo los picos isotópicos) con la intensidad de la señal de ¹³C de 0.5 μL de éter corona 15/5 (cuya abundancia natural de ¹³C, asumimos que es del 1.108%) como patrón interno.

$$\%^{13}\text{C} = 1.108 I_{\text{C}}(\text{AO}) / R_{\text{M}} I_{\text{C}}(15/5)$$

La relación molar del AO con respecto al éter corona 15/5 fue determinada previamente por integración del espectro de ¹H RMN de la muestra.

$$R_{\text{M}} = I_{\text{H}}(\text{AO}) / I_{\text{H}}(15/5)$$

Donde I_H(AO) y I_H(15/5) son los valores de las integrales correspondientes a un solo protón de cada sustancia. Así I_H(15/5) es 1/20 el valor de la integral de la señal del éter corona (15/5) mientras que I_H(AO) es el valor de la integral de un protón promediado de la integración de varias señales distintas del AO.

La medida del %¹³C en cada posición del AO permite el cálculo de la fracción molar x de carbonos que provienen del precursor marcado (>99.8% ¹³C y >99.5% ²H en C-2)

$$\%^{13}\text{C (para una posición en el AO)} = 100 [x+0.0108(1-x)]$$

Por lo tanto

$$x = (\%^{13}\text{C} / 100 - 0.0108) / (1 - 0.0108)$$

La *retención de deuterio (R%)* en cada una de las posiciones que provienen del C-2 de acetato, fue calculada a partir de las integrales I_0 , I_1 , I_2 (calibradas en unidades de ¹³C) de los picos isotópicos de ¹³C correspondientes a los carbonos no portadores, y portadores de uno o dos átomos de deuterio respectivamente, después de sustraer la contribución $1.108(1-x)\%^{13}\text{C}$ de la integral de la señal de ¹³C que deriva del precursor endógeno con una abundancia natural de ¹³C (I'_0):

$$R\% = 100 (I_1 + 2I_2) / (I'_0 + I_1 + 2I_2)$$

II. 5C. 2. 4.- Precursores enriquecidos en ¹³C.

El [2-¹³CD₃]acetato sódico usado fue suministrado por la casa Aldrich®.

n° Carbono	S ₀	S ₁	S ₂	I ₀	I ₁	I ₂	% ¹³ C total	x	[1.108(1-x)]	I'₀	R%
1*	10,16	0,00	0,00	2,78	0,00	0,00	2,8	0,017	1,089	1,69	0,0
3	15,28	9,55	8,89	4,18	2,61	2,43	9,2	0,082	1,017	3,16	70,3
5	26,48	6,74	0,00	7,24	1,84	0,00	9,1	0,081	1,019	6,22	22,8
9	19,81	7,21	0,00	5,42	1,97	0,00	7,4	0,064	1,038	4,38	31,1
7	36,43	0,00	0,00	9,97	0,00	0,00	10,0	0,090	1,009	8,96	0,0
10	19,35	0,00	0,00	5,29	0,00	0,00	5,3	0,042	1,061	4,23	0,0
12	42,29	13,76	0,00	11,57	3,76	0,00	15,3	0,144	0,949	10,62	26,2
14*	20,19	0,00	0,00	5,52	0,00	0,00	5,5	0,045	1,059	4,47	0,0
16*	37,25	0,00	0,00	10,19	0,00	0,00	10,2	0,092	1,006	9,18	0,0
18	19,70	5,46	4,55	5,39	1,49	1,24	8,1	0,071	1,029	4,36	47,7
20	28,43	6,53	0,00	7,78	1,79	0,00	9,6	0,086	1,013	6,77	20,9
22	36,57	15,84	0,00	10,00	4,33	0,00	14,3	0,134	0,960	9,05	32,4
24	36,90	0,00	0,00	10,10	0,00	0,00	10,1	0,091	1,007	9,09	0,0
25**	22,75	0,00	0,00	6,22	0,00	0,00	6,2	0,052	1,051	5,17	0,0
26	34,28	0,00	0,00	9,38	0,00	0,00	9,4	0,084	1,015	8,36	0,0
28	26,77	6,50	0,00	7,32	1,78	0,00	9,1	0,081	1,018	6,30	22,0
30	19,26	8,88	0,00	5,27	2,43	0,00	7,7	0,067	1,034	4,24	36,4
32	29,64	12,97	0,00	8,11	3,55	0,00	11,7	0,107	0,990	7,12	33,3
36	33,72	2,94	0,00	9,22	0,81	0,00	10,0	0,090	1,008	8,22	8,9
39	32,93	12,35	15,15	9,01	3,38	4,15	16,5	0,156	0,935	8,07	59,1
40	19,54	6,32	7,91	5,35	1,73	2,16	9,2	0,082	1,017	4,33	58,3
41	17,84	8,18	7,30	4,88	2,24	2,00	9,1	0,081	1,018	3,86	61,7
42	20,30	9,41	11,77	5,55	2,57	3,22	11,3	0,104	0,993	4,56	66,4
43	21,31	5,06	8,38	5,83	1,38	2,29	9,5	0,085	1,014	4,82	55,3
44	46,02	6,34	0,00	12,59	1,74	0,00	14,3	0,134	0,960	11,63	13,0

Tabla 5.3- Resumen de los calculos realizados para cuantificar el enriquecimiento en ¹³C y ²H en el AO

II. 5C. 3.- Estudios de difusión

II. 5C. 3. 1.- Calibración de la fuerza de los gradientes

Para calibrar la unidad de gradientes, con una potencia máxima de catálogo de 50 G cm^{-1} , usamos una muestra 100% de D_2O en la que medimos la velocidad de difusión de la señal de HDO residual ($\mathbf{D}_{\text{HDO}} = 1.9 \times 10^{-5} \text{ G cm}^{-1}$) y a partir del valor así obtenido recalculamos el valor de g .

Después de realizar las medidas por duplicado, obtuvimos dos rectas de donde se calcularon los siguientes valores del coeficiente de difusión del HDO:

$$\text{\#1 } \mathbf{D}_{\text{HDO}} = 2.16 \times 10^{-5} \text{ G cm}^{-1} (r = 0.999).$$

$$\text{\#2 } \mathbf{D}_{\text{HDO}} = 2.20 \times 10^{-5} \text{ G cm}^{-1} (r = 0.999).$$

El valor de G_{max} de la unidad de gradientes calculado de esta manera queda como 53.5 G cm^{-1} .

II. 5C. 3. 2.- Adquisición de datos

En nuestro estudio hemos utilizado la secuencia STE con gradientes rectangulares.

Los parametros estandar de adquisición han sido:

$$D1 = 2\text{s}$$

2 gradientes de forma rectangular de 2 ms de duración (p16) cada uno con un tiempo de recuperación de $100 \mu\text{s}$ (d16).

$$T = 200\text{ms}$$

Cada serie se realizó tomando por término medio 14 puntos. Para determinar los coeficientes de difusión, se hicieron 5 series.

II. 5C. 3. 3.- Procesado de los datos

Se mide, para una resonancia en concreto, la intensidad de la señal en valor absoluto en función de la fuerza de los gradientes. Tomando como ejemplo al AO en CDCl_3 y considerando que la máxima potencia de nuestra unidad de gradientes es 53.5 G cm^{-1} , creamos una tabla de la siguiente manera (**Tabla 5.4**) especificando el valor experimental *cnst21* (porcentaje de la potencia máxima de la unidad de gradientes), la fuerza del gradiente *g*, las variables g^2 y *B*, la intensidad de la señal y el valor de $\ln(A/A_0)$:

$$\ln(A/A_0) = -\gamma^2 g^2 \delta^2 (\Delta - \delta / 3) D$$

CNST21	g	g ²	B	A	ln(A/A ₀)
1	0.57	0.33	105.7	5233632	0
2	1.15	1.32	422.6	5268154	0.007
5	2.87	8.22	2641.3	5272300	0.007
10	5.74	32.89	10565.1	5040800	-0.038
15	8.60	74.00	23771.4	4747300	-0.098
20	11.47	131.56	42260.3	4353700	-0.184
25	14.34	205.56	66031.7	3911800	-0.291
30	17.21	296.01	95085.6	3444600	-0.418
35	20.07	402.91	129422.1	2978800	-0.564
40	22.94	526.24	169041.1	2445800	-0.761
50	28.68	822.26	264126.7	1552700	-1.215
65	37.28	1389.61	446374.1	706857	-2.002
70	40.15	1611.62	517688.3	512232	-2.350
80	45.88	2104.97	676164.4	0	0

Tabla 5.4

La dependencia de la intensidad de la señal en función de la intensidad de los gradientes tiene que dar una función exponencial, tal como se muestra en la **figura 5.1**

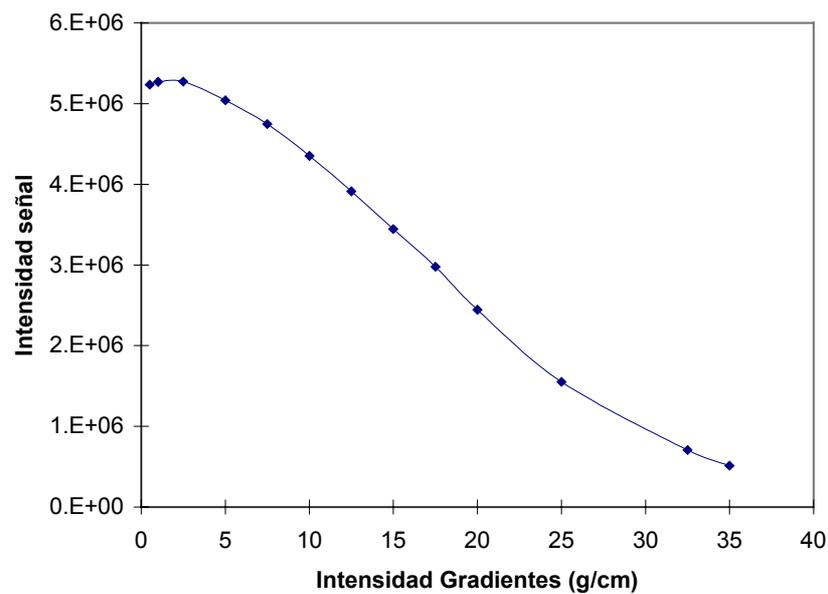


Figura 5.1

Por otro lado, y de acuerdo con las ecuaciones ya comentadas, la dependencia de $\ln(A/A_0)$ en función de las variables g^2 o B , da como resultado una dependencia lineal de la cual se puede extraer fácilmente el valor del coeficiente de difusión D . Para minimizar errores, se suele hacer una regresión lineal sobre los valores experimentales obtenidos tal como se muestra en la **figura 5.2**:

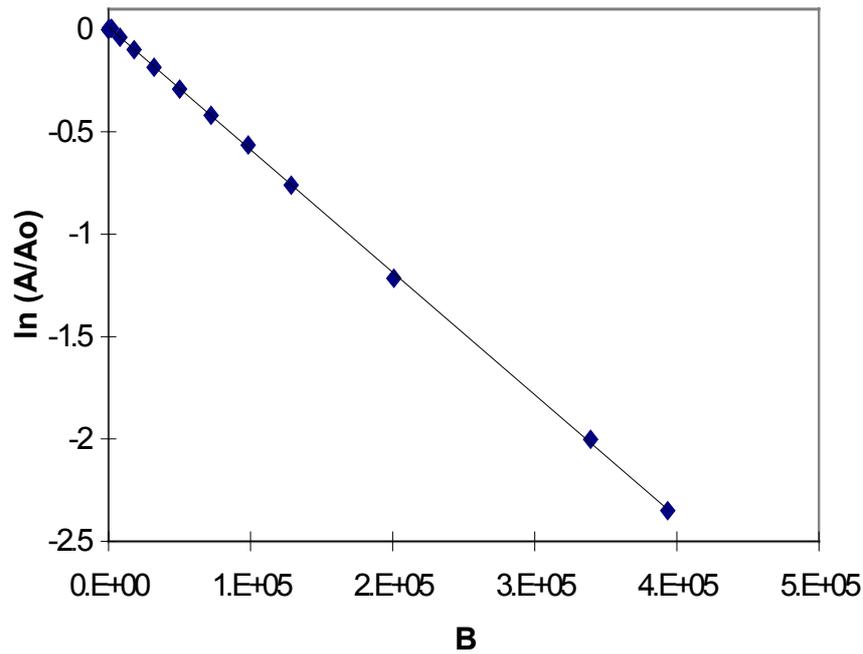


Figura 5.2

II. 5C. 3. 4.- Valoración del AO con DPC en D₂O

Las medidas fueron realizadas sobre una muestra que contenía 0.8 mg de AO en 0.5 mL de D₂O. Con el fin de evitar que la adición del detergente produzca cambios drásticos en el volumen de la muestra, y por lo tanto en la concentración de AO, se preparó una disolución **A** con una concentración de 0.39 mg de DPC por μ l de D₂O. A partir de esta disolución concentrada se preparó una segunda disolución **B** añadiendo 3 partes de D₂O por cada parte de disolución **A**, alcanzándose una concentración final de aproximadamente 0.1 mg/ μ L de DPC.

En la siguiente tabla se indican las cantidades añadidas a la muestra, así como las concentraciones finales de DPC alcanzadas.

[DPC] _{final}	μl disolución A	μl disolución B
1 mM	2 μL	-
2 mM	2 μL	-
4 mM	4 μL	-
8 mM	8 μL	-
12 mM	8 μL	-
16 mM	8 μL	-
24 mM	-	4 μL
32 mM	-	4 μL
48 mM	-	8 μL

Tabla 5.5

La DPC perdeuterada [$^2\text{H}_{38}$] (98% ^2H) de la casa EURISOTOPE, fue generosamente cedida por el Dr. Christian Roumestand, al que agradecemos su ayuda.

Conclusiones

CONCLUSIONES

- 1.- Se estudia el celéntereo *Zoanthus sp.* a partir del cual se aislan e identifican mediante métodos espectroscópicos una serie de metabolitos, con esqueleto de tipo zoantamina, nuevos en la literatura: 3-hidroxinorzoantamina, 30-hidroxinorzoantamina, 11-hidroxizoantamina, 11-hidroxizoantamina, zoantenol y epioxizoantamina.
- 2.- Se observa en estos metabolitos, a través del intercambio de los hidrógenos del C-11 por deuterio, la existencia de un equilibrio lactona-enamina.
- 3.- Se establecen las condiciones idóneas para el cultivo a gran escala del dinoflagelado *Amphidinium sp.*
- 4.- Se estudia el dinoflagelado *Amphidinium sp.* con el fin de encontrar nuevos metabolitos bioactivos. De dichos estudios se aislan cuatro glicoglicerolípidos, uno de los cuales es nuevo en la bibliografía, constituyendo el único ejemplo presente en la literatura con tres grupos acilo.
- 5.- Se optimizan las condiciones experimentales para medir la incorporación de isótopos estables en metabolitos secundarios por RMN.
- 6.- Los resultados del experimento biosintético de adición de [2-¹³CD₃] acetato sódico apoyan el hecho de que la biogénesis del ácido okadaico debe producirse por el ensamblamiento de precursores cetogénicos de origen

diverso, hipótesis propuesta por nuestro grupo con anterioridad.

- 7.- Estudios NOESY y ROESY, así como la medida de los *coeficientes de difusión* (D) ponen de manifiesto como el ácido okadaico complejoado disuelto en CDCl_3 forma un dímero. En medio acuoso, tanto el ácido okadaico libre como complejoado se encuentran dimerizados.

- 8.- Se comprueba que existe interacción entre el ácido okadaico y micelas de DPC a partir de la medida de los *coeficientes de difusión* (D).