

TRABAJO FIN DE GRADO

Biotecnología azul: bioprospección y desarrollo del potencial de microalgas marinas

Fátima María Pérez Páez

Tutores: María Luisa Souto Suárez y Manuel Norte Martín

Grado en Farmacia

Área de Química Orgánica

La Laguna, Julio 2022

AGRADECIMIENTOS

A mis tutores, gracias por permitirme formar parte de este gran proyecto, en el que nunca imaginé estar. Sin lugar a duda, ha sido el mejor final para mi Grado en Farmacia. En especial a la Dra. María Luisa Souto Suárez, por enseñarme y ayudarme desde el primer día. Gracias por tu inmensa dedicación, tiempo y constancia durante estos meses.

A Víctor Hernández, por recibirme y guiarme en mis primeros pasos en el laboratorio, así como instruirme en los cultivos. Pero, sobre todo, gracias por prestarme tu ayuda en todo momento y ante cualquier circunstancia.

A Nathalia Nocchi, por tu infinita ayuda en este trabajo y por tu colaboración en determinar la actividad inhibitoria acetilcolinesterasa, en el perfil químico y metabólico de los metabolitos y por la realización del Análisis de Componentes Principales (PCA).

A Adrián Morales, por tu cooperación y disposición para la realización de la espectrometría de masas que se encuentran en este trabajo.

También, a todos los miembros pertenecientes al grupo de investigación marinos, del Instituto de Bio-Orgánica Antonio González de la ULL. Por la ayuda desconsiderada durante todo el transcurso de este proyecto.

Gracias por compartir su tiempo y conocimientos conmigo.

Por último, a mi familia y en especial, a mi madre. Gracias por apoyarme siempre y animarme a seguir cada día en toda mi etapa universitaria. Por alegrarte en cada uno de mis logros y apoyarme en los fracasos. Nunca habrá suficientes palabras para agradecerte todo lo que has hecho por mí.

ÍNDICE

Resumen.....	8
Abstract.....	8
1. Introducción.....	9
1.1. Biotecnología azul.....	9
1.2. Productos naturales marinos.....	9
1.3. Microalgas marinas.....	10
1.3.1. Dinoflagelados.....	10
1.3.2. Género <i>Amphidinium</i>	12
2. Objetivos.....	13
3. Material y métodos.....	14
3.1. Material biológico.....	14
3.2. Cultivo y escalado.....	14
3.3. Preparación de extractos.....	15
3.4. Ensayos de actividad.....	15
3.4.1. Actividad antiproliferativa.....	15
3.4.2. Actividad antiparasitaria.....	15
3.4.3. Actividad inhibitoria acetilcolinesterasa.....	16
3.5. Técnicas cromatográficas.....	16
3.5.1. Cromatografía de exclusión molecular.....	16
3.5.2. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	17
3.6. Técnicas de elucidación estructural.....	17
3.6.1. Resonancia magnética nuclear (RMN).....	17
3.6.2. Espectrometría de masas (MS).....	18
3.7. Análisis de datos.....	18
4. Resultados y discusión.....	18
4.1. Aislamiento, cultivo e identificación de las cepas de <i>Amphidinium</i>	18

4.2.	Procesado de cultivos y obtención de extractos	20
4.2.1.	Extracción de células	22
4.2.2.	Extracción del medio de cultivo	23
4.3.	Cribado de actividades biológicas	24
4.3.1.	Actividad antiproliferativa	24
4.3.2.	Actividad antiparasitaria	26
4.3.3.	Actividad inhibitoria acetilcolinesterasa.....	26
5.	Perfil químico y metabolómico.....	28
5.1.	Aproximación al perfil metabólico de los extractos celulares por tratamiento estadístico de análisis HPLC-UV/DAD-PCA.....	28
5.2.	Aproximación al perfil metabólico de los extractos de medio de cultivo por análisis de RMN/MS y estrategia de redes moleculares (MN).....	31
6.	Conclusiones.....	41
7.	Bibliografía.....	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Marea roja en Baja California.....	11
Figura 2.	Micrografía electrónica de barrido de <i>Amphidinium carterae</i> . Fotografía obtenida del artículo de Aquino-Cruz Aldo et al (2016).....	12
Figura 3.	Estructura química del Amphidinol-3 producido por <i>A. carterae</i> , y uno de los metabolitos secundarios más activos de esta familia	13
Figura 4.	Localización de la recolección de muestras de <i>Amphidinium</i> en Punta de Hidalgo.	14
Figura 5.	Columna Sephadex LH-20	16
Figura 6.	Sistema HPLC Agilent Technologies Serie 1200.	17

Figura 7. Micrografías de células de <i>Amphidinium cf carterae</i> , cepa AmTf-1, tomadas al microscopio óptico, aisladas de Punta de Hidalgo (Tenerife, España). (A) Vista ventral, flecha que muestra el núcleo NU y el pequeño epicón EC. (B) Flechas de vista ventral que muestran cloroplastos CP y vesículas VC. (C) Flecha de la vista dorsal que muestra el pirenoide PY. (D) Flecha de la vista dorsal que muestra el flagelo transverso TF. (E-F) Células agregadas en mucílago. Barras de escala de 5 µm	19
Figura 8. Fotografías de la cámara de cultivo.	19
Figura 9. Esquema general del escalado.	20
Figura 10. Imágenes del sobrenadante con el precipitado tras el proceso de centrifugación.	22
Figura 11. Proceso de extracción de las células.	22
Figura 12. Imágenes del acondicionamiento y filtración por cartuchos SPE RP-C18 del medio de cultivo.	23
Figura 13. Ordenación de las puntuaciones PCA primera y segunda (PC1 y PC2) obtenidas a partir de extractos de <i>Amphidinium</i> . Colores de diagrama de dispersión: verde (extractos activos); rojo (extractos inactivos) frente a las actividades estudiadas.	29
Figura 14. Cromatograma obtenido para AmTF-1 a 254 nm y tiempos de retención de los componentes.....	31
Figura 17. Espectro de RMN ¹ H del Lingshuiol A donde se destacan las zonas de protones olefínicos (<i>recuadro rosa</i>), exo-metilenos (<i>recuadro azul</i>), protones germinales a heteroátomos (<i>recuadro verde</i>), metilenos y metinos (<i>recuadro rojo</i>) y metilos (<i>flechas amarillas</i>).	35
Figura 18. Vista general del experimento HSQC editado del producto Lingshuiol A.....	35
Figura 19. Detalle del experimento HSQC editado del producto Lingshuiol A.	36

Figura 20. Detalle del experimento HSQC editado del producto Lingshuiol A	36
Figura 21. Detalle del experimento HSQC editado del producto Lingshuiol A.	37
Figura 22. Espectro ESI-HRMS (ToF) y análisis composicional de Lingshuiol A.	39
Figura 23. Familia de AMs observada en el extracto AmTF-8 por MN. En rojo se rodean los compuestos desreplicados y la identificación del Lingshuiol A como ion 1273 [M+H] ⁺ en la red molecular.	40

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Ejemplos de medicamentos marinos aprobados según el Departamento de Farmacología de la Midwestern University.	10
Tabla 2. Identificación y código de las cepas aisladas de dinoflagelados del género <i>Amphidinium</i>	20
Tabla 3. Fechas correspondientes a la extracción de los cultivos de <i>Amphidinium</i>	21
Tabla 4. Extractos de células y medios de las cepas de <i>Amphidinium</i>	24
Tabla 5. Resultado de la evaluación de actividades antiproliferativas de las células de <i>Amphidinium</i>	25
Tabla 6. Resultados de la evaluación de actividades antiproliferativas de los medios de <i>Amphidinium</i>	25
Tabla 7. Resultados de la evaluación de actividades antiparasitarias de células de <i>Amphidinium</i>	26
Tabla 8. Cantidades de los componentes en los respectivos pocillos.	27
Tabla 9. Resultados de la actividad inhibitoria de la acetilcolinesterasa llevada a cabo por el método Ellman.....	27

Tabla 10. Gradiente de elución (H₂O:ACN)..... 28

Tabla 11. Datos de por RMN (600 MHz, CD₃OD) para Lingshuiol A..... 38

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Diagrama de obtención de extractos de la cepa AmTF-1. 21

Esquema 2. Cromatografía del extracto AmTF-8M. 33

Resumen

Las microalgas marinas juegan un papel importante como productores primarios debido a su actividad fotosintética. Dentro de dichas microalgas, los dinoflagelados son de especial relevancia debido a las sustancias bioactivas que producen, resultando de gran interés para la industria farmacéutica y la industria alimentaria del sector pesquero.

Asimismo, dentro de los distintos géneros de dinoflagelados juega un papel importante el género *Amphidinium*, objeto de creciente interés al tratarse de una gran fuente de metabolitos, con una gran diversidad funcional y elevada complejidad estereoquímica.

En esta Memoria de **Trabajo de Fin de Grado** se plantea la bioprospección de cepas del dinoflagelado *Amphidinium* en aguas de Tenerife para su potencial aplicación biotecnológica mediante el desarrollo de cultivos de distintas especies, obtención de extractos, preparación de muestras para pruebas de actividad biológica, y uso de técnicas cromatográficas y espectroscópicas.

Abstract

Marine microalgae play an important role as primary producers due to their photosynthetic activity. Within such microalgae, the dinoflagellates assumes particular significance due to the bioactive substances they produce, which are of great interest to the pharmaceutical industry and to the food industry in the fisheries sector.

Furthermore, among the different genera of dinoflagellates, the genus *Amphidinium* plays an important role as it is a genus of increasing interest as a major source of metabolites, with a great functional diversity and a high stereochemical complexity.

In this **dissertation**, it is prepossessed the bioprospecting of strains of the dinoflagellate *Amphidinium* in the waters of Tenerife for their potential biotechnological application by developing cultures of different species, obtaining extracts, preparing samples for biological activity tests, and by the use of chromatographic and spectroscopic techniques.

1. Introducción

1.1. Biotecnología azul

Los océanos contienen un volumen de 1.335 millones de km³ y representan el 71% del planeta (1) siendo el hogar de infinidad de especies. De los 35 filos identificados hasta el momento, 34 se encuentran en el medio marino y para muchos de éstos se trata del único hábitat donde se pueden encontrar (2).

Los recursos marinos vivos tienen un enorme potencial para el desarrollo de nuevos alimentos y para el desarrollo bioquímico, farmacéutico, cosmético y bioenergético. Así, para promover la actividad económica, aprovechando los recursos marinos y sin dañar la sostenibilidad ambiental de los océanos y costas, entra el concepto de **biotecnología azul** (también llamada biotecnología marina) (3,4). La Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OECD) define a la biotecnología azul como: *“aplicación de nuevas metodologías a los organismos marinos para aumentar la oferta de productos del mar, mejorar la seguridad y el control de la proliferación de microorganismos nocivos transmitidos por el agua, desarrollo de nuevos medicamentos y cuidados sanitarios, cosméticos y con aplicaciones en la agricultura y productos alimentarios”* (5).

1.2. Productos naturales marinos

Desde la antigüedad, los productos naturales, han sido el principal medio para curar enfermedades, y en los últimos 30 años, los productos naturales marinos (PMN) han tenido un gran protagonismo en este contexto (6).

Cerca de tres cuartas partes de la superficie terrestre están cubiertas por océanos. Además, la adaptación de los organismos a la variedad de condiciones de este medio ha favorecido la producción de números metabolitos secundarios con estructuras y funciones únicas que los convierte en una fuente potencial de moléculas bioactivas de gran relevancia para la industria farmacéutica (2).

Sin embargo, el desarrollo de muchos PNM se ha visto obstaculizado, entre otros problemas, por su baja disponibilidad y elevada complejidad estructural y por ello, solo un pequeño grupo han sido aprobados como medicamentos.

Según el Departamento de Farmacología Marina de la Midwestern University, podemos encontrar 14 medicamentos marinos aprobados (**Tabla 1**). Además, existen diversos compuestos en ensayos clínicos: 4 en fase III, 12 en fase II y 7 en fase I (7).

Tabla 1. Ejemplos de medicamentos marinos aprobados según el Departamento de Farmacología de la Midwestern University.

Nombre del compuesto	Marca	Organismo marino	Clase química	Enfermedad
Citobarina	Cytosar-U [®] (1969)	España	Nucleósido	Cáncer: Leucemia
Mesilato de eribulina	Halaven [®] (2010)	España	Macrólido	Cáncer: Cáncer de mama metastásico
Trabectedina	Yondelis [®] (2015)	Tunicado	Alcaloide	Cáncer: Sarcoma de tejidos blandos y cáncer de ovarios
Lurbinectedina	Zepzelca [®] (2020)	Tunicado	Alcaloide	Cáncer: Cáncer de pulmón de células pequeñas metastásico
Belantamab mafodotin-blmf	Blenrep [®] (2020)	Molusco/ cianobacteria	ADC (MMAF)	Cáncer: Mieloma múltiple recidivante/refractario

1.3. Microalgas marinas

1.3.1. Dinoflagelados

Las algas son organismos fotosintéticos que pueden crecer en una gran variedad de hábitats acuáticos. Estas se pueden clasificar en dos grandes grupos: macroalgas (macroscópicas) y microalgas (microscópicas) (8).

De estas últimas se han estudiado cerca de 30000 especies (9) y los compuestos producidos por las mismas han tenido aplicación en la industria

farmacéutica, cosmética, alimentación y/o biotecnológica debido a sus distintas actividades biológicas (10).

Dentro de este grupo destacan los **dinoflagelados** con unas 2000 especies vivas, siendo la mitad de estas fotoautótrofas. Están distribuidos globalmente y se trata de uno de los mayores productores de moléculas bioactivas. Además, se estima que alrededor de 95 especies de dinoflagelados son capaces de producir toxinas.

De hecho, los dinoflagelados son comúnmente conocidos por ser responsables del 80% de las proliferaciones masivas, las llamadas “mareas rojas” (**Figura 1**), las cuales pueden suponer un problema económico y de salud.



Figura 1. Marea roja en Baja California (11).

Las altas concentraciones en estas mareas se han asociado a la muerte de especies marinas, ya sea por la producción de toxinas o por la insuficiencia de oxígeno que generan. La acumulación de estas toxinas en la fauna marina puede ascender a los niveles tróficos superiores a través de la cadena alimentaria, llegando a afectar a las actividades económicas (pesca, acuicultura y turismo) y a la salud humana (parálisis, síndrome diarreico y neurotóxico, entre otros).

Sin embargo, las estructuras y funciones únicas de estas biotoxinas las convierte en compuestos de alto valor biológico en distintos sectores (11–13).

1.3.2. Género *Amphidinium*

El género de *Amphidinium* es un grupo de dinoflagelados atecados, de gran diversidad. Se clasifican en dos *clados*, el *Clado Herdmanni* y el *Clado Operculatum*, perteneciendo a este último una de las especies de mayor interés, *A. carterae* (**Figura 2**) (14).

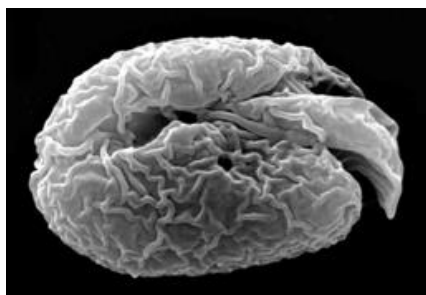


Figura 2. Micrografía electrónica de barrido de *Amphidinium carterae*. Fotografía obtenida del artículo de Aquino-Cruz Aldo et al (2016) (15).

Desde los años 80 (16) y hasta día de hoy, han sido numerosos los estudios y publicaciones que han reflejado la gran capacidad de esta clase de organismos de producir metabolitos secundarios, así como la importancia que presentan en la investigación científica.

Así, los metabolitos secundarios producidos por este género se pueden clasificar en tres grandes grupos: macrólidos, policétidos no polares y policétidos de cadena larga (12).

Dentro del tercer grupo destacan los **Amphidinoles (AMs)** que se caracterizan por poseer dos cadenas lineales, una poliólica y otra poliénica, unidas por una estructura común, el 2,3-tetrahidropirano (**Figura 3**) (17).

Estas sustancias han resultado de gran interés debido a sus potentes actividades antifúngicas, citotóxicas y hemolíticas, destacando también por su actividad frente a bacterias como las pertenecientes al género *Mycoplasma* (12,15).

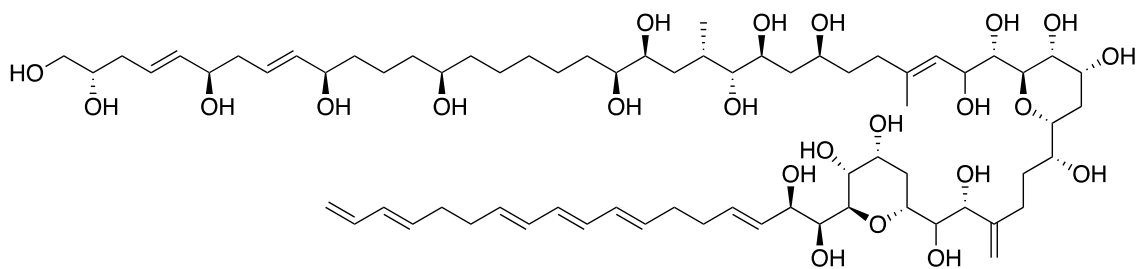


Figura 3. Estructura química del Amphidinol-3 producido por *A. carterae*, y uno de los metabolitos secundarios más activos de esta familia (15).

2. Objetivos

- Bioprospección de cepas de dinoflagelados del género *Amphidinium* en aguas de Tenerife para su aplicación biotecnológica en la producción de sustancias de gran interés.
- Obtención de extractos y evaluación de la actividad antiparasitaria, antiproliferativa y actividad inhibidora de la acetilcolinesterasa.
- Aproximación al perfil metabólico de los extractos.
- Uso de técnicas cromatográficas para la separación, aislamiento y purificación de moléculas de interés farmacológico/estructural.
- Aplicación de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y Espectrometría de Masas (MS) para la elucidación estructural.

3. Material y métodos

3.1. Material biológico

Las cepas del dinoflagelado *Amphidinium* objeto de estudio proceden de Punta de Hidalgo, ubicada al noreste de la isla de Tenerife (Islas Canarias), 28°34'41.7" N 16°19'16.4" W (Figura 4).



Figura 4. Localización de la recolección de muestras de *Amphidinium* en Punta de Hidalgo.

Las microalgas crecen sobre macrófitos superiores por lo que se recolectaron muestras de macroalgas de la zona intermareal donde se forman charcos, se manipularon con suavidad para que desprendiesen las microalgas epífitas en muestras de agua de mar y una vez en el laboratorio del Instituto Universitario de Bio-orgánica Antonio González (IUBO-AG ULL) se procedió al aislamiento y establecimiento de cultivos monoalgales. Con ayuda de micropipetas capilares y del microscopio invertido se siembran placas de 96 pocillos, que cada 72 horas se revisan, enjuagan y trasvasan a placas de 24 y luego de 6 pocillos.

Se aislaron doce cepas de este dinoflagelado a las que se le asignó un acrónimo que va desde AmTF-1 a AmTF-12.

3.2. Cultivo y escalado

Los cultivos de cada cepa fueron escalados gradualmente a recipientes de 50 mL, 250 mL, 1 L y 5 L conteniendo respectivamente 20 mL, 150 mL, 500 mL y 3 L de agua de mar enriquecida con medio de cultivo Guillard K modificado(18) cuya composición es: NaNO₃, 882 µM; NH₄Cl, 50 µM; NaH₂PO₄, 10 µM; TRIS, 1 mM; Na₂EDTA·2H₂O, 90 µM; Fe-Na-EDTA, 14,6 µM; MnCl₂·4H₂O, 0,9 µM;

ZnSO₄·7H₂O, 0,08 μM; CoSO₄·7H₂O, 0,05 μM; Na₂MoO₄·2H₂O, 0,03 μM; H₂SeO₃, 0,01 μM; Tiamina, 0,7 μM; Biotina, 2,1 nM; B12, 0,37 nM.

3.3. Preparación de extractos

Se llevó a cabo la separación de células y medio empleando centrifugación (5000 rpm, 15 min, 10-15 ° C, SORVALL RC 5B). La biomasa y el medio de cultivo libre de células se procesaron por separado de la siguiente manera:

La biomasa se extrajo con metanol bajo sonicación hasta agotamiento. Posteriormente, el extracto se filtró y el disolvente se eliminó al vacío (BÜCHI Rotavapor R-200).

El medio de cultivo libre de células se pasó a través de un cartucho SPE RP-C18, acoplado al colector de vacío VISIPREPTM SPE (Supelco®). Posteriormente, se lavó con agua destilada y los compuestos orgánicos se desorbieron con metanol. El extracto se filtró y el disolvente se eliminó al vacío.

Los extractos crudos se transfirieron a viales para evaluación biológica.

3.4. Ensayos de actividad

3.4.1. Actividad antiproliferativa

Los ensayos de actividad antiproliferativa se realizaron en colaboración con el grupo de investigación BioLab del IUBO-AG de la ULL (19). La actividad se evaluó frente a seis líneas celulares tumorales: A549 (células epiteliales basales alveolares de adenocarcinoma humano), HBL-100 (células de cáncer de mama), HeLa (células de cáncer de cuello uterino) SW1573 (células de cáncer de pulmón), T-47D (células contra cáncer de mama) y WiDr (línea celular contra carcinoma de colon).

3.4.2. Actividad antiparasitaria

Por su parte, los ensayos de actividad antiparasitaria se llevaron a cabo en colaboración con el Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Salud Pública (IUETSPC) de la ULL.

La actividad antiparasitaria fue evaluada frente a las amebas de vida libre *Acanthamoeba castellanii* y *Naewgleria fowleri* y frente a los cinetoplastos de *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania amazonensis* y *Leishmania donovani* (20, 21).

3.4.3. Actividad inhibitoria acetilcolinesterasa

En comparación con los dos ensayos anteriores, la evaluación de la actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa sí se realizó en el laboratorio de Productos Marinos IUBO-AG y para ello se empleó el **método Ellman** (22).

El **método Ellman** detecta la aparición de tiocolina tras la hidrólisis del sustrato acetilcolina (ATCh) por la enzima acetilcolinesterasa. La tiocolina reacciona con el cromóforo, el ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB), produciendo el ácido 5-tio-2-nitrobenzoico, compuesto de color amarillo que puede ser medido en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 412 nm (23).

El dispositivo utilizado para medir la absorbancia fue el lector de microplacas multimodo Vasrioskan LUX de Thermo Fisher Scientific.

3.5. Técnicas cromatográficas

3.5.1. Cromatografía de exclusión molecular

Este método cromatográfico se realizó en una columna Sephadex LH-20 (145 x 20 mm) (**Figura 5**). Se utilizó metanol como fase móvil a un flujo de 1 mL/min con una bomba FLUID METERING®.



Figura 5. Columna Sephadex LH-20.

3.5.2. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La cromatografía líquida de alta resolución se realizó con un sistema HPLC Agilent Technologies Serie 1200 (**Figura 6**), equipado por una bomba cuaternaria (G1311C), un colector de fracciones automático (G1364C) y un detector UV, cuyo rango de longitud utilizado fue de 190 a 800 nm. Los perfiles metabólicos se hicieron con una columna Luna C-18 Phenomenex® (250 x 4,6 mm, 5 μ m), mientras que las separaciones cromatográficas sobre una columna μ -Bondapak RP-18 Waters® (150 x 19 mm, 10 μ m). Todos los disolventes usados fueron de grado-HPLC Scharlau®.



Figura 6. Sistema HPLC Agilent Technologies Serie 1200.

3.6. Técnicas de elucidación estructural

3.6.1. Resonancia magnética nuclear (RMN)

Los espectros de resonancia magnética nuclear 1D y 2D fueron obtenidos usando el equipo modelo BRUKER® AVANCE 600 MHz y metanol deuterado (CD₃OD) como disolvente. Los desplazamientos químicos fueron calibrados usando la señal de CD₃OD residual (δ_H 3,31 ppm y δ_C 49,00 ppm). Los datos fueron analizados y procesados usando TopSpin 4.0.6.

3.6.2. Espectrometría de masas (MS)

Espectros de masas de baja y alta resolución se midieron empleando un espectrómetro LCT Premier XE Micromass (Waters®) en modo electrospray.

3.7. Análisis de datos

Como método estadístico para analizar la variabilidad química de las fracciones obtenidas por HPLC se empleó el Análisis de Componentes Principales (PCA), algoritmo (COW).

4. Resultados y discusión

4.1. Aislamiento, cultivo e identificación de las cepas de *Amphidinium*

El proceso llevado a cabo es referido a continuación para la cepa AmTF-1. De igual modo se procedió con el resto de las cepas, variando un poco el tiempo de escalado según la cepa cultivada.

En el laboratorio a partir de las muestras de agua recolectadas en Punta del Hidalgo, haciendo uso de una micropipeta capilar y el microscopio electrónico invertido (**Figura 7**), se transfirieron células individuales de dinoflagelados a una placa de 96 pocillos con medio Guillard K (125 μ L) que se mantuvieron a una temperatura de $24 \pm 2^\circ$, bajo un fotoperiodo luz-oscuridad de 16:8 y con una irradiancia de $20 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{S}^{-1}$.

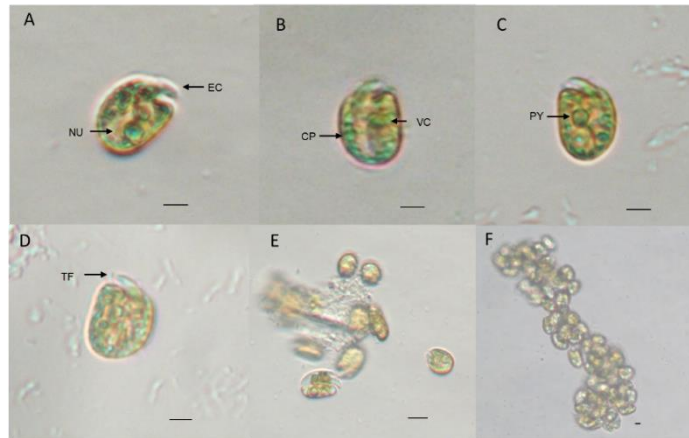


Figura 7. Micrografías de células de *Amphidinium cf. carterae*, cepa AmTf-1, tomadas al microscopio óptico, aisladas de Punta de Hidalgo (Tenerife, España). (A) Vista ventral, flecha que muestra el núcleo NU y el pequeño epicón EC. (B) Flechas de vista ventral que muestran cloroplastos CP y vesículas VC. (C) Flecha de la vista dorsal que muestra el pirenoide PY. (D) Flecha de la vista dorsal que muestra el flagelo transversal TF. (E-F) Células agregadas en mucílago. Barras de escala de 5 μ m.

Una vez que dichos pocillos tuvieron un determinado volumen de células (72 horas), se inocularon en las mismas condiciones de cultivo en otra placa de 24 pocillos con 1 mL de medio y seguidamente a una placa de 6 pocillos y 2 mL de medio, gradualmente de mayor superficie, permitiendo así un mayor crecimiento de las cepas.

Finalmente, los cultivos monoalgales se transfirieron a matraces de 50 mL con 20 mL de medio de cultivo (**Figura 8**).



Figura 8. Fotografías de la cámara de cultivo.

A partir de éstos, cada dos semanas se realizó el escalado (**Figura 9**) hasta llegar a los 3 L de volumen de cultivo final (matraces de 5 L).

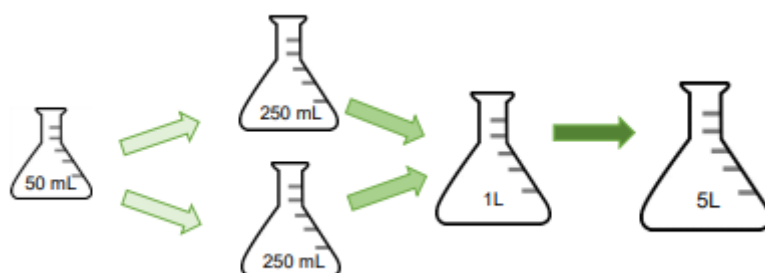


Figura 9. Esquema general del escalado.

La identificación de las cepas se basó principalmente en características morfológicas (**Figura 7**) aunque está en proceso su identificación por análisis genómico (**Tabla 2**).

Tabla 2. Identificación y código de las cepas aisladas de dinoflagelados del género *Amphidinium*.

Clave de Cepa	Vecino más similar
AmTF-1	<i>Amphidinium cf carterae</i>
AmTF-2	<i>Uncultured cf eukaryote</i>
AmTF-3	<i>Amphidinium sp.</i>
AmTF-4	<i>Amphidinium cf massartii</i>
AmTF-5	<i>Amphidinium cf carterae</i>
AmTF-6	<i>Amphidinium cf massartii</i>
AmTF-7	<i>Amphidinium cf operculatum</i>
AmTF-8	<i>Amphidinium cf operculatum</i>
AmTF-9	<i>Amphidinium cf massartii</i>
AmTF-10	<i>Amphidinium sp.</i>
AmTF-11	<i>Amphidinium sp.</i>
AmTF-12	<i>Amphidinium sp.</i>

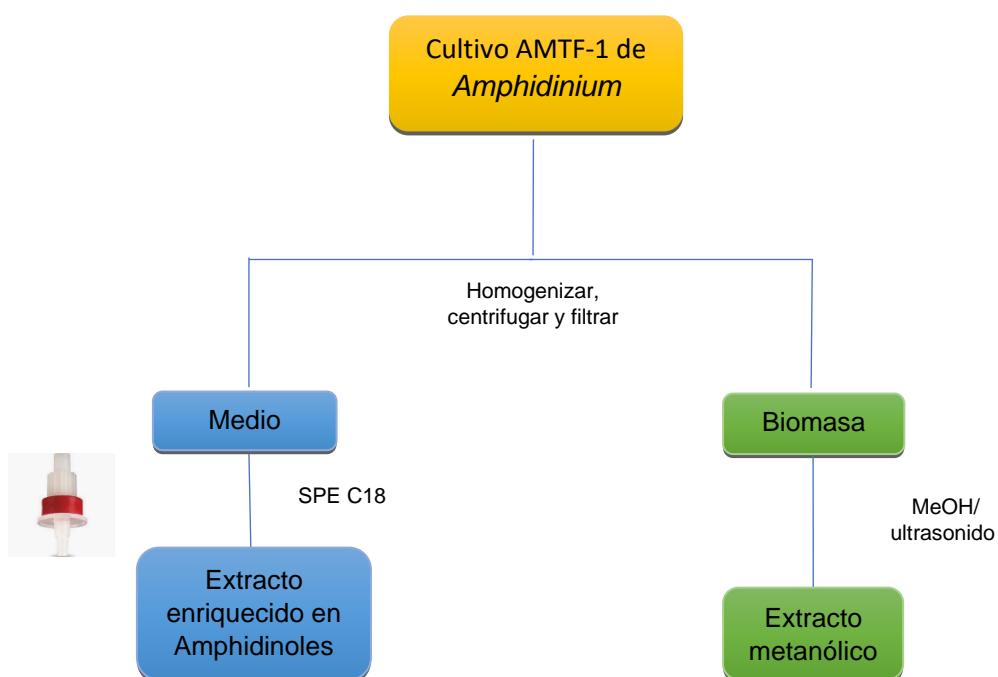
4.2. Procesado de cultivos y obtención de extractos

El día 31.01.22 se establecieron los cultivos iniciales de las cepas y el proceso de extracción de cada una comenzó en distintas fechas, reflejadas en la **Tabla 3** algunas de ellas a modo de ejemplo.

Tabla 3. Fechas correspondientes a la extracción de los cultivos de *Amphidinium*.

Cultivos	Fechas de extracción
AMTF 1	09.03.22
AMTF 3	14.03.22
AMTF 4	21.03.22
AMTF 5	23.03.22
AMTF 8	11.04.22
AMTF 2	25.04.22

La bioprospección se comenzó con 12 cepas. No obstante, la extracción se realizaría de 11 puesto que el cultivo de la cepa número 9 no prosperó. El proceso queda explicado a continuación con la cepa AmTF-1 (**Esquema 1**).



Esquema 1. Diagrama de obtención de extractos de la cepa AmTF-1.

Para poder comenzar con la extracción, se tuvo que resuspender de manera manual los cultivos contenidos en los Erlenmeyer de 5 L, puesto que las células

se habían adherido al mismo y separar las células y el sobrenadante por centrifugación.

Se centrifugó en volúmenes de 150-200 mL hasta su totalidad (**Figura 10**).

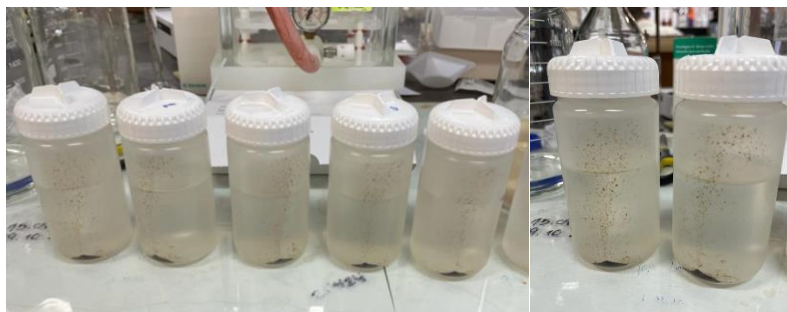


Figura 10. Imágenes del sobrenadante con el precipitado tras el proceso de centrifugación.

4.2.1. Extracción de células

Una vez separadas las células, la extracción de éstas se llevó a cabo mediante maceración empleando como disolvente metanol. El contenido de células y disolvente se traspasó a un recipiente y éste se sometió a sonicación (Selecta®) durante 10 minutos, asegurando una mayor interacción entre el disolvente y la biomasa celular. Este disolvente orgánico produce la rotura de la membrana celular y nos permite extraer el mayor contenido celular posible.

Posteriormente, se filtró y se concentró en un rotavapor (**Figura 11, Tabla 4**). Este paso se repitió unas tres veces.



Figura 11. Proceso de extracción de las células.

4.2.2. Extracción del medio de cultivo

Para obtener los componentes excretados a los medios de cultivo, los sobrenadantes se sometieron a una extracción en fase sólida con cartuchos SPE RP-C18 acondicionados con 5 mL de MeOH y estabilizados con otros 5 mL de MeOH:H₂O (1:1) (**Figura 12**).

Aproximadamente se filtraron 3 L de medio de cultivo de cada cepa. Los cartuchos se sobrecargaban debido a que se quedaban retenidas sustancias polares y sales. Por ello, cada 200 mL, los cartuchos se limpiaron con 5 mL de agua desionizada, seguido de la extracción con 10 mL de metanol y eliminación del disolvente en el rotavapor.

Dado que este proceso es laborioso y muy lento, se concluyó solo para 6 cepas (**Tabla 4**).



Figura 12. Imágenes del acondicionamiento y filtración por cartuchos SPE RP-C18 del medio de cultivo.

Tabla 4. Extractos de células y medios de las cepas de *Amphidinium*.

CÉLULAS		MEDIOS	
Cepa	Peso (mg)	Cepa	Peso (mg)
AmTF-1	465,96	AmTF-1M	58,1
AmTF-2	516,7	AmTF-2M	14,5
AmTF-3	344,2	AmTF-3M	48
AmTF-4	621,2	AmTF-4M	70,5
AmTF-5	494,6	AmTF-5M	42,4
AmTF-6	163,8	AmTF-8M	36,5
AmTF-7	68,4		
AmTF-8	381,5		
AmTF-10	95,2		
AmTF-11	201,8		
AmTF-12	196		

4.3. Cribado de actividades biológicas

Los distintos extractos obtenidos, 11 extractos de células y 6 extractos de medios de cultivos, se sometieron a evaluación biológica, ensayando las siguientes actividades:

- ✓ Actividad antiproliferativa
- ✓ Actividad antiparasitaria
- ✓ Actividad inhibitoria de la acetilcolinesterasa

4.3.1. Actividad antiproliferativa

Como se puede observar en la **Tabla 5**, la cepa AmTF-1 fue la única que presentó actividad frente a cuatro de las seis líneas celulares, con un valor de GI_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$), de 31 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para A549 y de 58 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para HBL-100, HeLa, y WiDr. El resto de las cepas fueron inactivas frente a las líneas celulares (62,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Tabla 5. Resultado de la evaluación de actividades antiproliferativas de las células de *Amphidinium*.

CEPAS	Actividad antiproliferativa ($\mu\text{g/mL}$)					
	GI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)					
	A549	HBL-100	HeLa	SW1573	T-47D	WiDr
AmTF-1	31	58	58	> 62,5	> 62,5	58
AmTF-2	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5
AmTF-3	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5
AmTF-4	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5
AmTF-5	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5
AmTF-6	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5
AmTF-7	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5
AmTF-8	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5
AmTF-10	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5
AmTF-11	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5
AmTF-12	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5

En cuanto a los medios (**Tabla 6**), la cepa AmTF-8M presentó actividad en cuatro de las seis líneas celulares: 13 $\mu\text{g/mL}$ en A549, 29 $\mu\text{g/mL}$ en SW1573, 34 $\mu\text{g/mL}$ en T-47D y 37 $\mu\text{g/mL}$ en WiDr. El resto de las cepas no presentaron actividad.

Tabla 6. Resultados de la evaluación de actividades antiproliferativas de los medios de *Amphidinium*.

CEPAS	Actividad antiproliferativa ($\mu\text{g/mL}$)					
	GI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)					
	A549	HBL-100	HeLa	SW1573	T-47D	WiDr
AmTF-1M	>62,5	>62,5	>62,5	>62,5	>62,5	>62,5
AmTF-2M	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5
AmTF-3M	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5
AmTF-4M	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5
AmTF-5M	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5
AmTF-8M	13	> 62,5	> 62,5	29	34	37

4.3.2. Actividad antiparasitaria

A pesar de que se prepararon las muestras de *Amphidinium* tanto de las células como de los medios, los resultados de estos últimos no fueron recibidos antes de la fecha de entrega de la memoria.

Así, los extractos celulares que presentaron actividad antiparasitaria fueron AmTF-1 y AmTF-3 frente a la ameba *A. castellani* con un actividad de 39.33 ± 2.86 $\mu\text{g/mL}$ y de 42.16 ± 0.97 , respectivamente (**Tabla 7**).

Tabla 7. Resultados de la evaluación de actividades antiparasitarias de células de *Amphidinium*.

CEPAS	Actividad antiparasitaria ($\mu\text{g/mL}$)				
	<i>A. castellanii</i>	<i>N. fowleri</i>	<i>T. cruzi</i>	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. donovani</i>
AmTF-1	$39,33 \pm 2,86$	> 100	> 100	> 100	> 100
AmTF-2	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
AmTF-3	$42,16 \pm 0,97$	> 100	> 100	> 100	> 100
AmTF-4	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
AmTF-5	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
AmTF-6	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
AmTF-7	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
AmTF-8	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
AmTF-10	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
AmTF-11	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
AmTF-12	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100

4.3.3. Actividad inhibitoria acetilcolinesterasa

Se utilizó el reactivo DTNB a una concentración 3 mM y se preparó una disolución tampón-reactivo con tampón fosfato 0,1 M, pH 8,0 y como sustrato, se utilizó yoduro de acetiltiocolina a una concentración de 75 mM. Cada una de las disoluciones anteriores se prepararon con agua destilada como disolvente.

En una placa de 96 pocillos, se prepararon dos blancos, un control, el vehículo y las distintas muestras, por triplicado con las cantidades y componentes que se reflejan en la **Tabla 8**, teniendo en cuenta que la acetiltiocolina se añadió tras la incubación.

Tabla 8. Cantidades de los componentes en los respectivos pocillos.

Pocillos	Cantidades
Blanco 1	5 µL DTNB + 242,5 µL tampón fosfato + 2,5 µL acetilcolinesterasa
Blanco 2	5 µL DTNB + 240 µL tampón fosfato + 5 µL acetiltiocolina
Control	5 µL DTNB + 237,5 µL tampón fosfato + 2,5 µL acetilcolinesterasa + 5 µL acetiltiocolina
DMSO	0,5 µL DMSO + 5 µL DTNB + 237 µL tampón fosfato + 2,5 µL acetilcolinesterasa + 5 µL acetiltiocolina
Muestras	0,5 muestra + 5 µL DTNB + 237,5 µL tampón + 2,5 µL acetilcolinesterasa + 5 µL acetiltiocolina

El volumen final de cada pocillo fue, aproximadamente, de 250 µL y la concentración final de las muestras de 50 µg/mL. Después del periodo de incubación de 30 minutos, en ausencia de luz y con agitación constante, se pipeteó los 5 µL de acetiltiocolina, se colocó la placa en el dispositivo de absorbancia y se leyó a una longitud de onda de 412 nm durante 10 minutos, con lecturas a intervalos de 1 minuto.

Los resultados obtenidos fueron expresados en porcentaje de inhibición (**Tabla 9**) y se puede observar como la muestra AmTF-1 presenta mayor actividad frente a la acetilcolinesterasa, con un 56,02%, mientras que el resto de las muestras expusieron un porcentaje de inhibición inferior.

Tabla 9. Resultados de la actividad inhibitoria de la acetilcolinesterasa llevada a cabo por el método Ellman.

MUESTRAS	% INHIBICIÓN
AMTF-1	56,02
AMTF-2	0,41
AMTF-3	20,45
AMTF-4	10,00
AMTF-5	18,71
AMTF-6	9,41
AMTF-7	24,65
AMTF-8	31,09
AMTF-10	28,13
AMTF-11	15,46
AMTF-12	9,04
AMTF-1M	15,11
AMTF-3M	7,81
AMTF-4M	7,36
AMTF-8M	11,08

5. Perfil químico y metabolómico

A fin de dar un paso más en la caracterización cualitativa de la composición de los distintos extractos se planteó la aproximación al perfil químico de los mismos utilizando distintas estrategias según se tratase de extractos celulares o del medio extraído.

5.1. Aproximación al perfil metabólico de los extractos celulares por tratamiento estadístico de análisis HPLC-UV/DAD-PCA

Los extractos celulares de *Amphidinium* se caracterizan por contener mezclas muy complejas de sustancias por lo que para realizar una primera evaluación comparada con el perfil químico de las distintas cepas en estudio se planteó la utilización de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con técnicas de detección de diodos (UV/DAD) y análisis estadístico de los cromatogramas resultantes (PCA).

Antes de comenzar, los once extractos celulares se disolvieron en metanol y se pasaron por filtros de jeringa de 0,45 μm (Chromafil®) para la eliminación de cualquier partícula sólida. Una vez concentrados se disolvieron en metanol a una concentración de 10 mg/mL.

La cromatografía fue realizada en el equipo y columna indicada en el apartado de material y métodos, utilizándose como fase móvil un gradiente de elución bifásico (**Tabla 10**) con agua y acetonitrilo ($\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$), inyecciones de 20 μL y un flujo de 1 mL/min.

Tabla 10. Gradiente de elución ($\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$).

Minuto	% H_2O	% ACN
0	100	0
10	70	30
20	30	70
40	0	100
60	0	100

Los cromatogramas obtenidos con un rango de longitud de 190 a 800 nm fueron sometidos a un análisis estadístico **PCA**, identificándose una serie de componentes principales entre los cuales se seleccionaron los dos con mayor aportación, PC1 y PC2.

El componente principal PC1 explica el 44,6% de variabilidad química, convirtiéndole en el principal aporte para comprender las variaciones de los metabolitos.

Además, el componente principal PC2 comprende otro 25,8% de variabilidad lo que, junto con el PC1, hace un total de 60,1%. En la **Figura 13** se observa el resultado de analizar las muestras en función de ambos componentes.

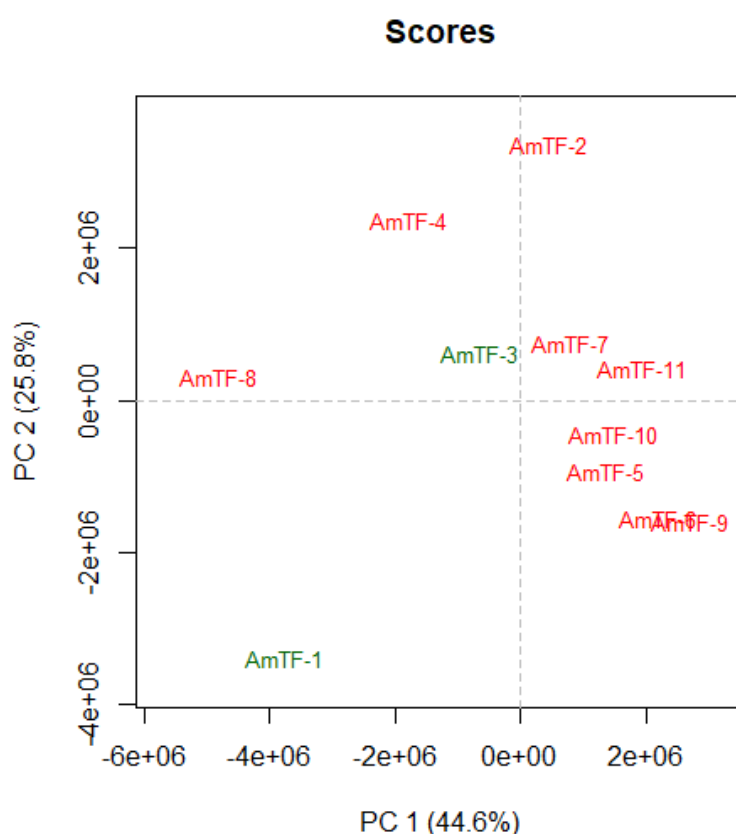


Figura 13. Ordenación de las puntuaciones PCA primera y segunda (PC1 y PC2) obtenidas a partir de extractos de *Amphidinium*. Colores de diagrama de dispersión: verde (extractos activos); rojo (extractos inactivos) frente a las actividades estudiadas.

En la **Figura 13** se puede observar que la mayoría de las muestras que resultaron inactivas en los estudios de bioactividad se agrupan en los cuadrantes positivos de PC1 y PC2.

Por otro lado, existen dos muestras (AmTF-1 y AmTF-8) que presentan un patrón más disperso y no se agrupan con las muestras mencionadas anteriormente. La muestra activa AmTF-1 se encuentra en el cuadrante negativo de la PC1 y negativo de la PC2 mientras que la muestra inactiva AmTF-8 se encuentra en el cuadrante negativo de la PC1 y en el cuadrante positivo de la PC2.

Por tanto, se puede concluir que las muestras AmTF-1 y AmTF-8 presentan un perfil químico diferente con respecto al resto de muestras. Además, en el caso de la muestra AmTF-1, estos resultados permiten proponer la hipótesis de que las sustancias responsables de su actividad y que la diferencian de las demás muestras pueden corresponder a los tiempos de retención que se muestran en la **Figura 14**, hipótesis que se pretende abordar en el futuro con cultivos de esta cepa a gran escala.

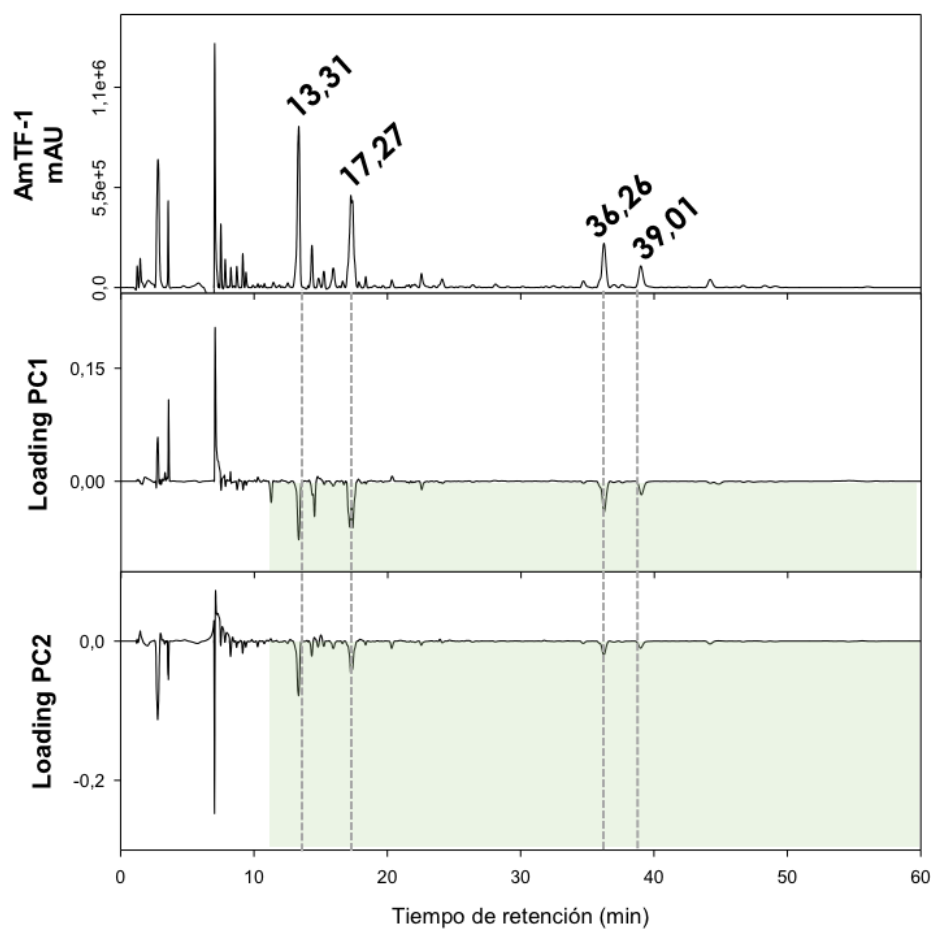
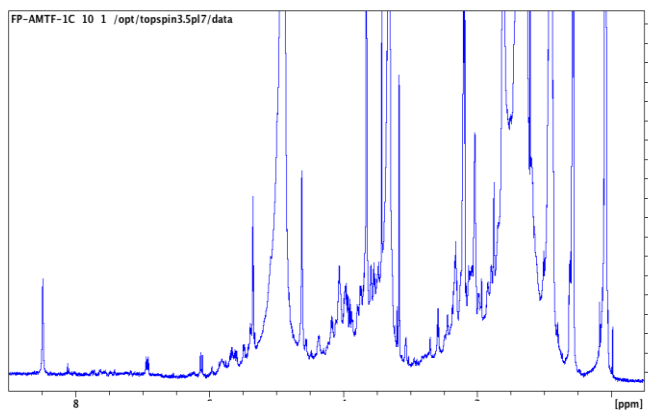


Figura 14. Cromatograma obtenido para AmTF-1 a 254 nm y tiempos de retención de los componentes.

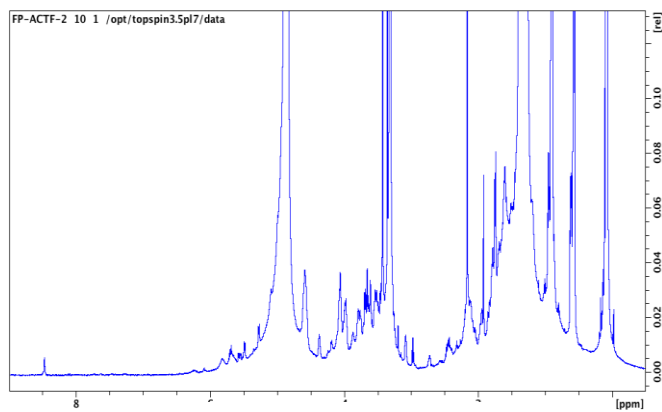
5.2. Aproximación al perfil metabólico de los extractos de medio de cultivo por análisis de RMN/MS y estrategia de redes moleculares (MN)

Los extractos obtenidos de los sobrenadantes por extracción en fase sólida y que contienen los metabolitos excretados en el medio de cultivo tienen la ventaja, con respecto a los extractos celulares, de que poseen poca interferencia de otros compuestos mayoritarios como lípidos y ácidos grasos. Eso permite una primera aproximación a su perfil metabólico por RMN de protón en metanol deuterado.

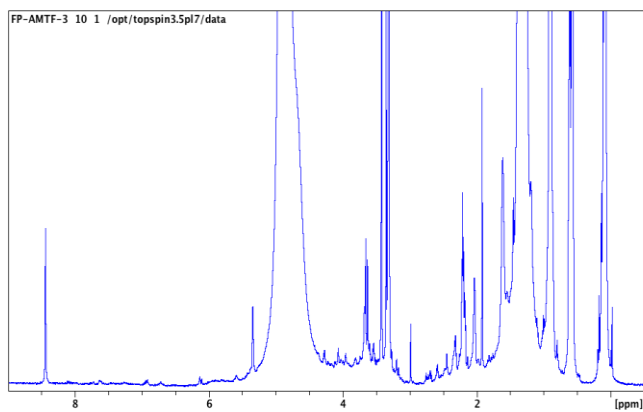
En la **Figura 15** se muestran los espectros de los 6 extractos obtenidos concluyéndose que se trata de extractos enriquecidos en compuesto tipo amphidinol siendo AmTF-1M, AmTF-5M y AmTF-8M los que presentan mayor contenido en este tipo de metabolitos.



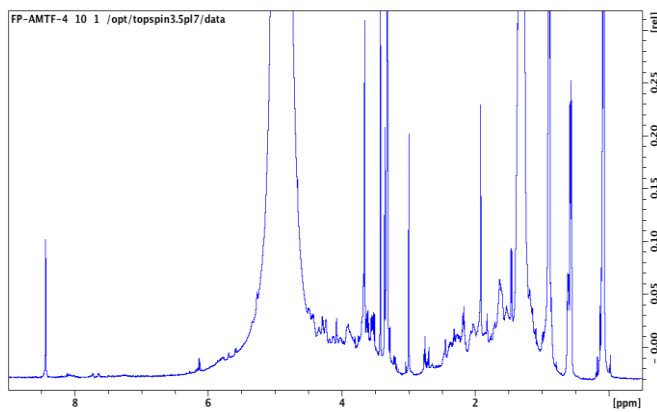
Espectro RMN-H¹ de AmTF-1



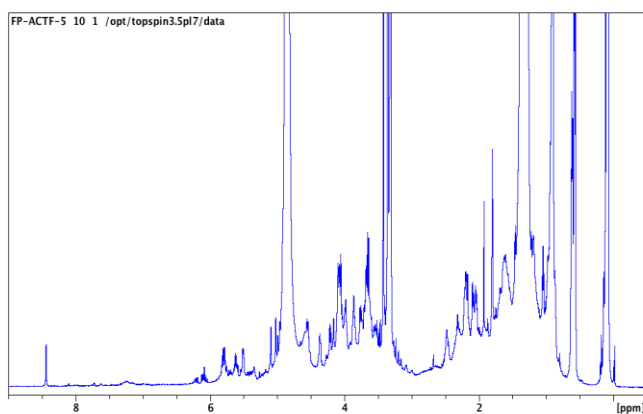
Espectro RMN-H¹ de AmTF-2



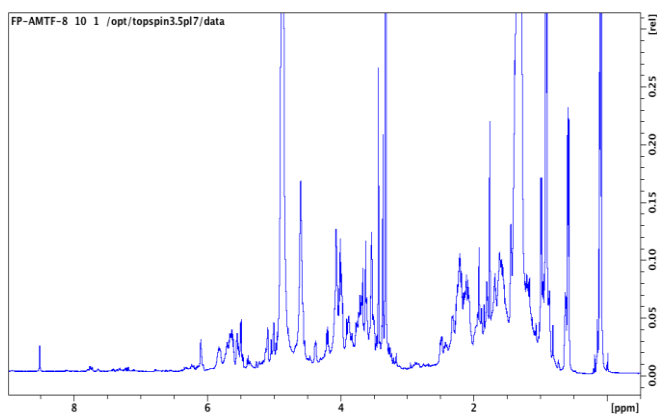
Espectro RMN-H¹ de AmTF-3



Espectro RMN-H¹ de AmTF-4



Espectro RMN-H¹ de AmTF-5

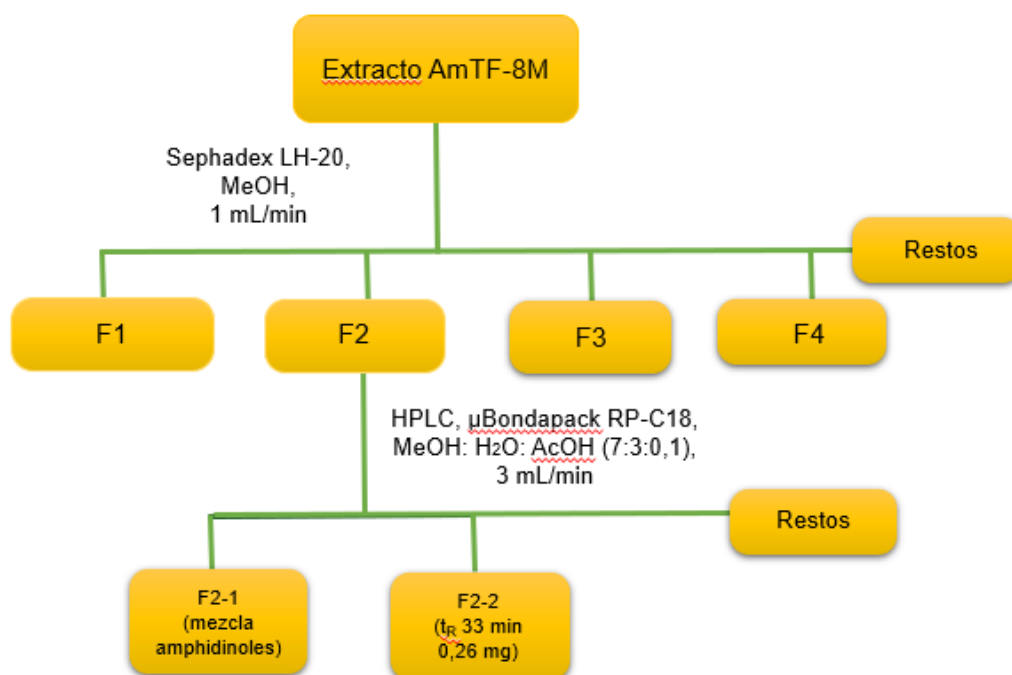


Espectro RMN-H¹ de AmTF-8

Figura 15. Espectros RMN-H¹ de los medios de *Amphidinium*.

Dado que el extracto del medio de cultivo de la cepa AmTF-8M resultó activo en los ensayos de bioactividad se decidió realizar una primera aproximación de su perfil químico.

Este estudio preliminar se realizó con un extracto de masa muy reducida (36,5 mg) y consistió en dos pasos de separación. En primer lugar, se realizó una separación de filtración molecular con Sephadex-LH-20 en metanol de la que se obtuvieron 5 fracciones. Los espectros de RMN-¹H que exhibieron señales más interesantes fueron de las dos primeras, continuándose el proceso de purificación en HPLC fase reversa con la segunda fracción. El método seleccionado fue isocrático empleando como fase móvil MeOH:H₂O:AcOH (7:3:0,1) y un flujo de 3 mL/min. De esta separación se obtuvo un metabolito puro con un tiempo de retención de 33 min (**Esquema 2**).



Esquema 2. Cromatografía del extracto AmTF-8M.

El análisis espectroscópico de la sustancia aislada permitió establecer que se trataba del compuesto conocido **Lingshuiol A** (**Figura 16**) (24). Este compuesto fue identificado por análisis detallado de resonancia magnética molecular y espectrometría de masas y comparación con los datos publicados.

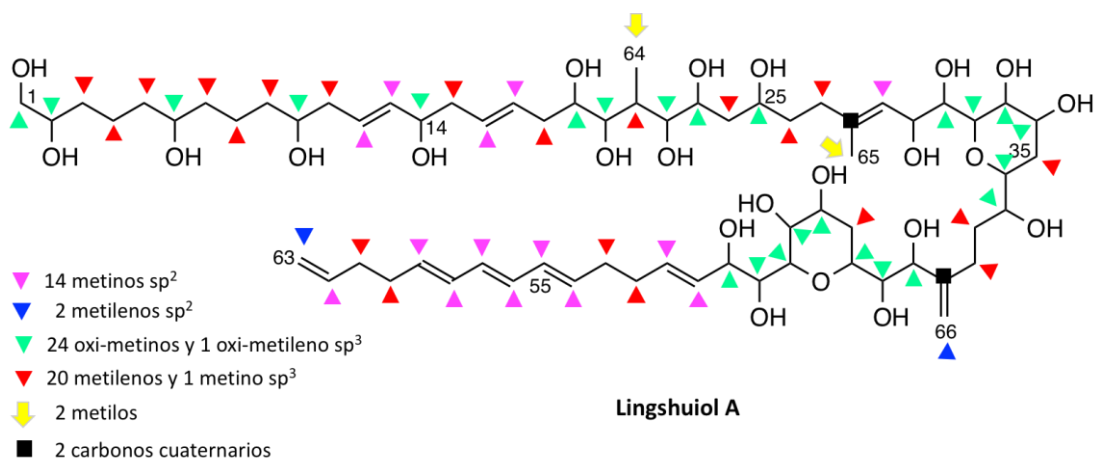


Figura 16. Estructura química del Lingshuiol A aislado en este estudio y especificación del tipo de carbonos presentes.

Es de destacar que en nuestro caso los datos de desplazamientos químicos de RMN se dan en CD_3OD (**Tabla 11**), mientras que los publicados están en CD_3OD/C_5D_5N (2:1) por lo que a continuación se detalla la asignación llevada a cabo de los experimentos RMN 1H y HSQC editado (**Figuras 17-21**), así como el espectro de masas de alta resolución ESI-HRMS en que aparece un ion pseudomolecular con sodio a m/z de 1295,7473 (**Figura 22**) y que se corresponde a la fórmula molecular $C_{66}H_{112}O_{23}$.

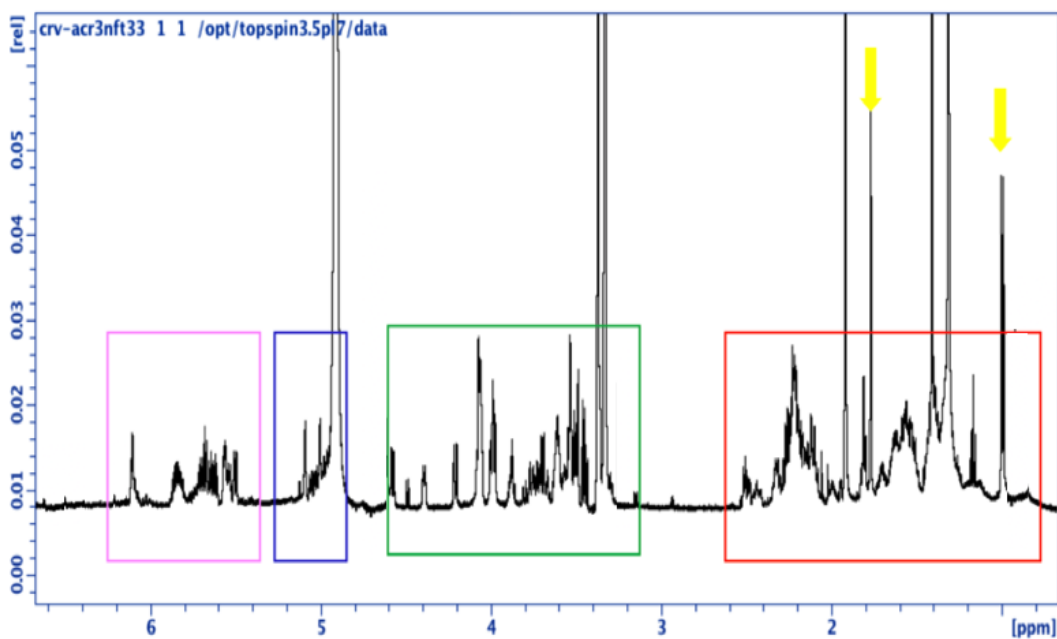


Figura 17. Espectro de RMN ^1H del Lingshuiol A donde se destacan las zonas de protones olefinicos (*recuadro rosa*), exo-metilenos (*recuadro azul*), protones germinales a heteroátomos (*recuadro verde*), metilenos y metinos (*recuadro rojo*) y metilos (*flechas amarillas*).

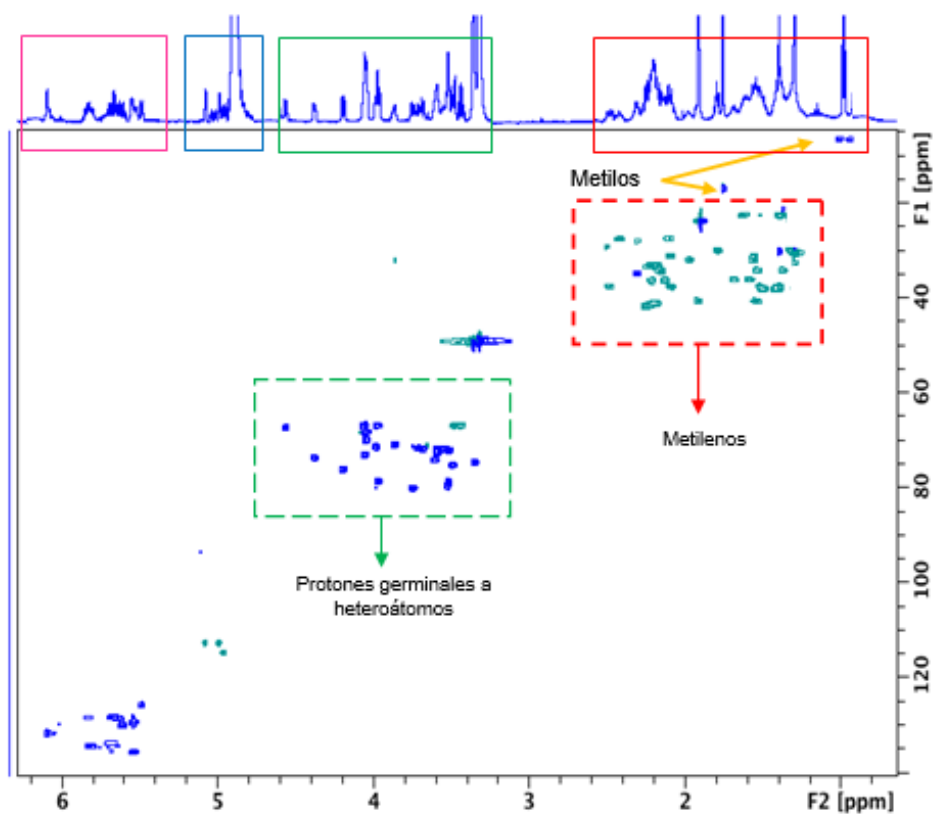


Figura 18. Vista general del experimento HSQC editado del producto Lingshuiol A.

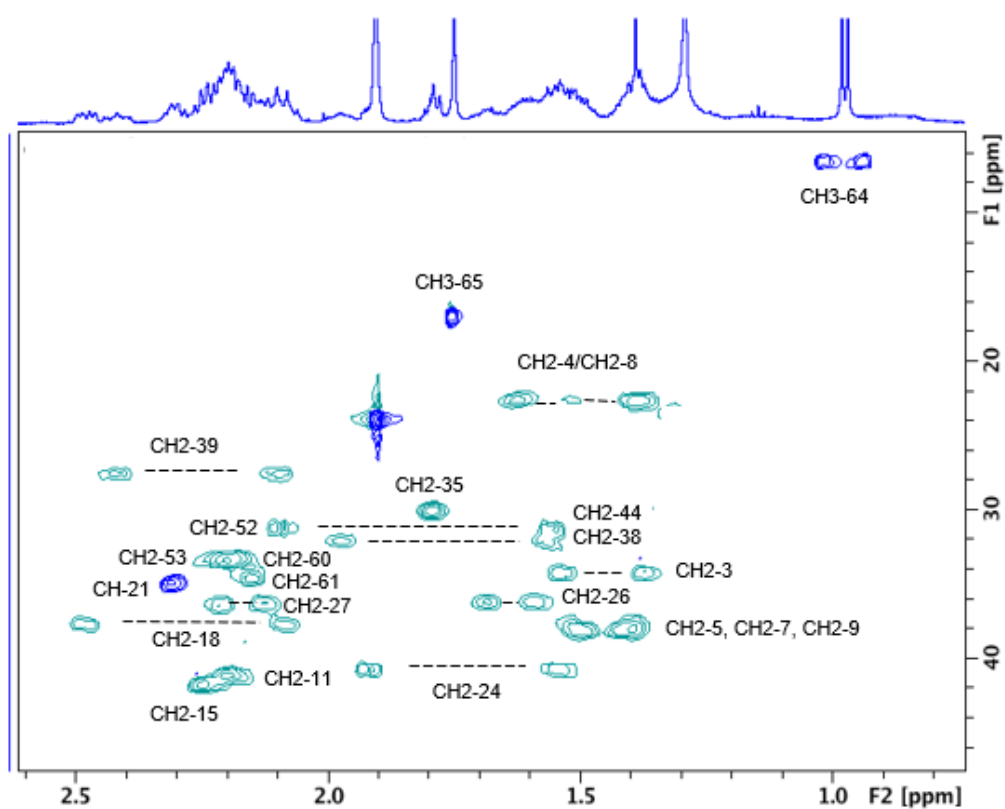


Figura 19. Detalle del experimento HSQC editado del producto Lingshuiol A.

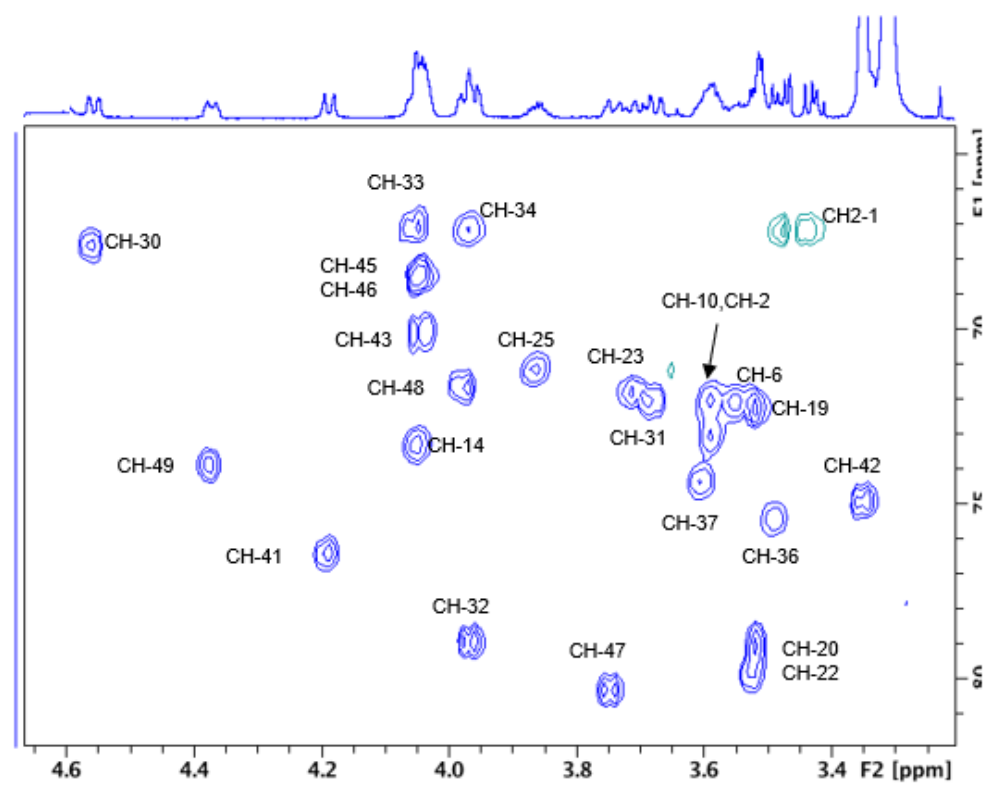


Figura 20. Detalle del experimento HSQC editado del producto Lingshuiol A.

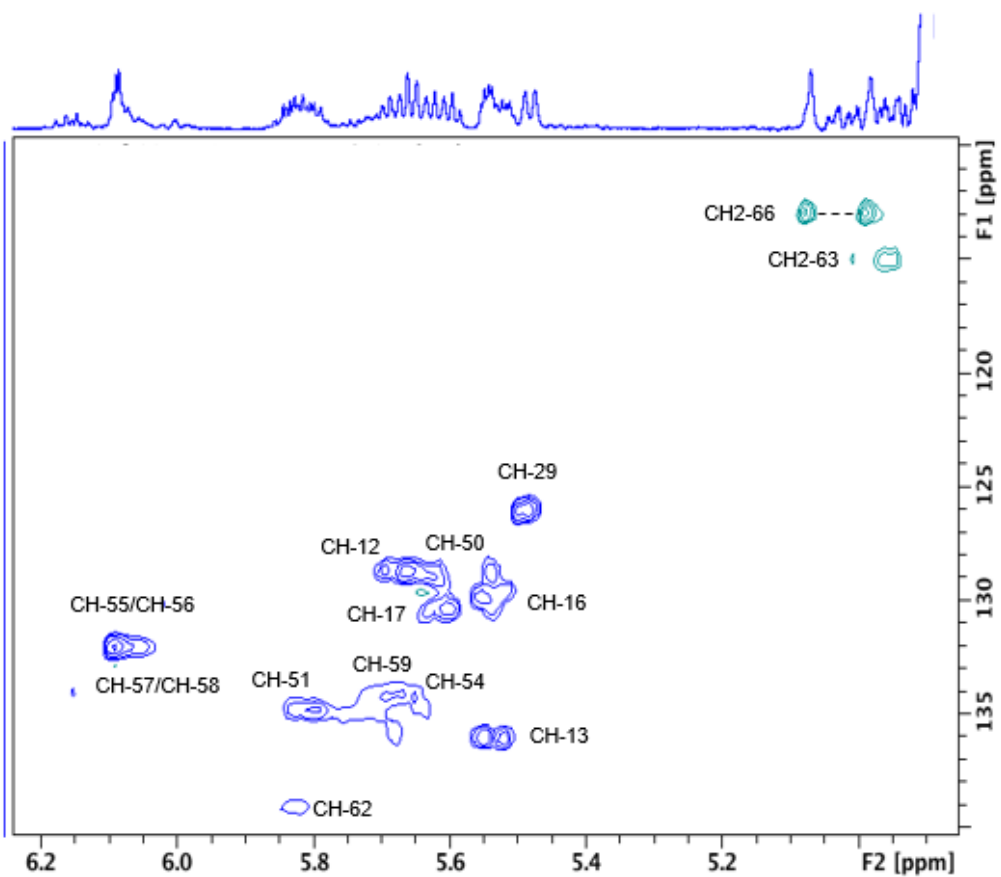


Figura 21. Detalle del experimento HSQC editado del producto Lingshuiol A.

Tabla 11. Datos de por RMN (600 MHz, CD₃OD) para Lingshuiol A.

Lingshuiol A					
Posición	δ_c, tipo	δ_H	Posición	δ_c, tipo	δ_H
1	67.1, CH ₂	3.43	32	78.9, CH	3.97
		3.47	33	67.0, CH	4.05
2	73.0, CH	3.59	34	67.2, CH	3.98
3	34.2, CH ₂	1.38	35	29.9, CH ₂	1.79 (2H)
		1.52	36	75.4, CH	3.48
4	22.6, CH ₂	1.38	37	74.2, CH	3.60
		1.61	38	32.1, CH ₂	1.56
5	38.0, CH ₂	1.39			1.98
		1.49	39	27.6, CH ₂	2.10
6	72.1, CH	3.54			2.42
7	38.0, CH ₂	1.39	40	151.3, C	-
		1.49	41	76.4, CH	4.19
8	22.6, CH ₂	1.38	42	74.9, CH	3.34
		1.61	43	70.1, CH	4.06
9	38.4, CH ₂	1.40	44	31.2, CH ₂	1.55
		1.51			2.09
10	72.4, CH	3.59	45	68.4, CH	4.04
11	41.2, CH ₂	2.19 (2H)	46	68.8, CH	4.06
12	128.6, CH	5.66	47	80.5, CH	3.74
13	136.1, CH	5.52	48	71.6, CH	3.98
14	73.1, CH	4.04	49	73.8, CH	4.37
15	41.7, CH ₂	2.24 (2H)	50	128.8, CH	5.64
16	129.9, CH	5.55	51	134.8, CH	5.81
17	130.4, CH	5.60	52	33.5, CH ₂	2.19 (2H)
18	37.8, CH ₂	2.08	53	33.5, CH ₂	2.19 (2H)
		2.48	54	133.9, CH	5.66
19	72.3, CH	3.52	55	131.8, CH	6.09
20	78.9, CH	3.51	56	131.8, CH	6.09
21	35.0, CH	2.30	57	131.8, CH	6.09
22	79.9, CH	3.52	58	131.8, CH	6.09
23	71.7, CH	3.71	59	134.3, CH	5.70
24	40.8, CH ₂	1.54	60	34.8, CH ₂	2.19 (2H)
		1.91	61	33.6, CH ₂	2.15 (2H)
25	71.2, CH	3.86	62	139.1, CH	5.83
26	36.2, CH ₂	1.59	63	115.0, CH ₂	4.95
		1.69			5.02
27	36.5, CH ₂	2.12	64	6.7, CH ₃	0.98
		2.21	65	17.0, CH ₃	1.75
28	139.1, C	-	66	112.9, CH ₂	4.98
29	126.0, CH	5.49			5.07
30	67.6, CH	4.56			
31	72.0, CH	3.68			

Multiple Mass Analysis: 3 mass(es) processed
 Tolerance = 5.0 PPM / DBE: min = -10.0, max = 1000.0
 Element prediction: Off
 Number of isotope peaks used for i-FIT = 2

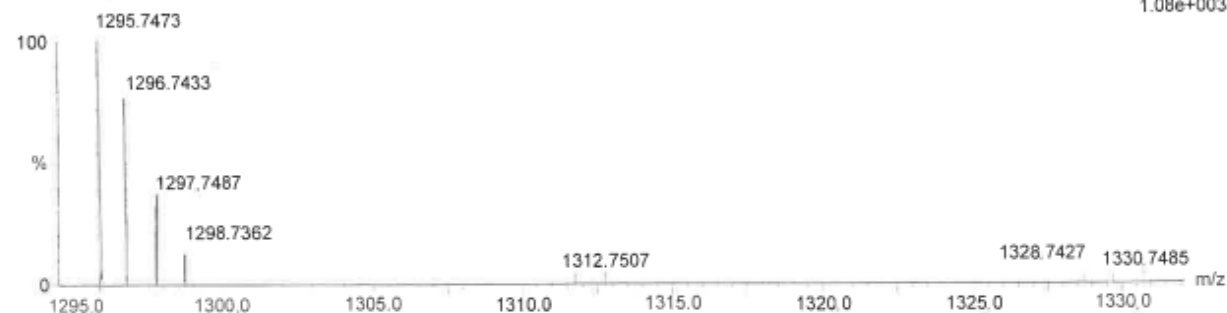
Monoisotopic Mass, Even Electron Ions
 1201 formula(e) evaluated with 9 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

Elements Used:

C: 0-80 H: 0-150 O: 0-30 Na: 0-1

ESI (16-039) Caterina (CRV AC 3 t 33) 71 (3.092)

1: TOF MS ES+
 1.08e+003



Mass	RA	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Formula
1295.7473	100.00	1295.7457	1.6	1.2	22.5	4.9	C75 H107 O18
		1295.7492	-1.9	-1.5	10.5	0.3	C66 H112 O23 Na -
		1295.7433	4.0	3.1	19.5	3.3	C73 H108 O18 Na
		1295.7516	-4.3	-3.3	13.5	0.9	C68 H111 O23
1296.7433	74.18	---					
1297.7487	32.93	1297.7496	-0.9	-0.7	5.5	23.9	C62 H114 O26 Na
		1297.7461	2.6	2.0	17.5	33.6	C71 H109 O21
		1297.7520	-3.3	-2.5	8.5	26.1	C64 H113 O26
		1297.7531	-4.4	-3.4	27.5	43.0	C80 H106 O13 Na
		1297.7437	5.0	3.9	14.5	31.4	C69 H110 O21 Na

Figura 22. Espectro ESI-HRMS (ToF) y análisis composicional de Lingshuiol A.

Finalmente, para completar el estudio de perfil químico de este extracto y aprovechando que se había determinado la presencia del Lingshuiol A, se aplicó un ensayo establecido en nuestro laboratorio para la determinación de compuestos tipo amphidinol en extractos que utiliza una estrategia de redes moleculares para la visualización de datos de espectrometría de masas en tándem (25).

En la **Figura 23** se muestra la red molecular obtenida donde se representan los iones moleculares de la familia de amphidinoles presente en esa muestra y en los que se pudo detectar 8 compuestos conocidos donde resaltamos el nodo 1273 [M+H]⁺ que corresponde al Lingshuiol A, utilizado como molécula de referencia.

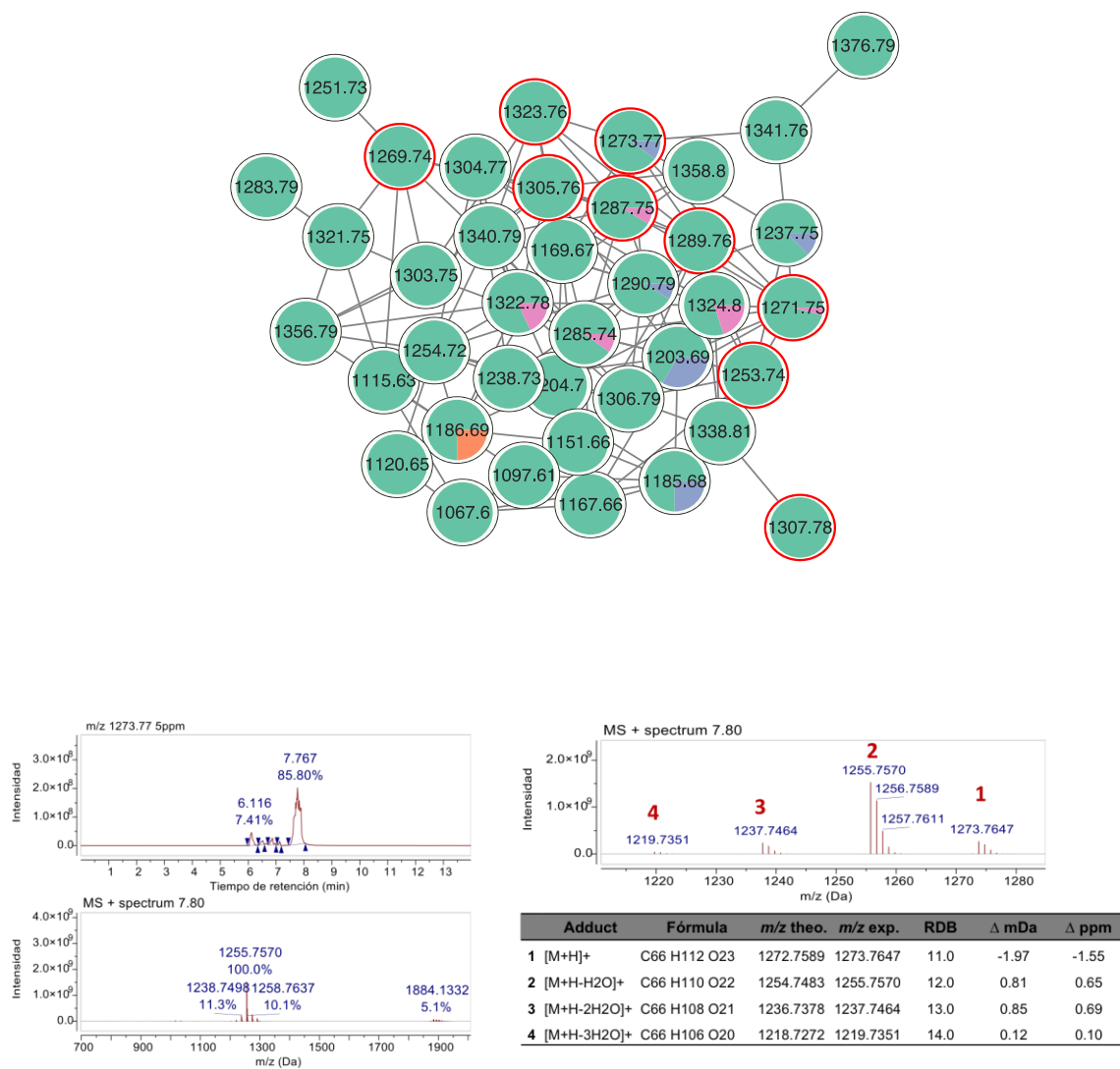


Figura 23. Familia de AMs observada en el extracto AmTF-8 por MN. En rojo se rodean los compuestos desreplicados y la identificación del Lingshuiol A como ion 1273 [M+H]⁺ en la red molecular.

6. Conclusiones

- Se logran aislar y cultivar con éxito 11 cepas de dinoflagelados del género *Amphidinium* procedentes de Punta Hidalgo (Tenerife).
- Se generan extractos separados de biomasa y del medio de cultivo de las distintas cepas, 11 y 6 respectivamente, evaluándose su potencial en ensayos de actividad antiproliferativa, antiparasitaria y de inhibición de acetilcolinesterasa.
- 2 de los extractos celulares (AmTF-1 y AmTF-3) y uno de los de medio de cultivo (AmTF-8M) presentaron actividades biológicas siendo la cepa AmTF-1 la cepa con mayor potencial para su desarrollo a gran escala.
- Se lleva a cabo una aproximación preliminar a los perfiles químicos de los extractos celulares a través de un análisis HPLC-UV/DVD-PCA estableciéndose una hipótesis en las condiciones ensayadas sobre los posibles tiempos de retención de las sustancias activas de la muestra AmTF-1.
- Utilizando una estrategia de RMN/MS se confirma el contenido predominante de amphidinoles en los extractos de los medios de cultivo lográndose aislar e identificar Lingshuiol A del extracto AmTF-8M.
- Aplicando un nuevo método en base a redes moleculares (MN, *molecular networking*) y el Lingshuiol A como compuesto de referencia se consigue visualizar de forma gráfica el contenido en amphidinoles del extracto AmTF-8M.

7. Bibliografía

1. Volumes of the World's Oceans from ETOPO1 | NCEI [Internet]. [cited 2022 Jun 21]. Available from: https://www.ngdc.noaa.gov/mgg/global/etopo1_ocean_volumes.html
2. Jiménez C. Marine Natural Products in Medicinal Chemistry. *ACS Medicinal Chemistry Letters*. 2018 Oct 11;9(10):959–61.
3. Unctad. The Oceans Economy: Opportunities and Challenges for Small Island Developing States.
4. BLUE BIOECONOMY REPORT Maritime Affairs and Fisheries Cover image i.
5. MARINE BIOTECHNOLOGY DEFINITIONS, INFRASTRUCTURES AND DIRECTIONS FOR INNOVATION. 2017.
6. Dias DA, Urban S, Roessner U. A Historical overview of natural products in drug discovery. Vol. 2, *Metabolites*. MDPI AG; 2012. p. 303–36.
7. Pipeline Clínico [Internet]. [cited 2022 Jun 21]. Available from: <https://www.midwestern.edu/departments/marinepharmacology/clinical-pipeline>
8. Khan MI, Shin JH, Kim JD. The promising future of microalgae: Current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. Vol. 17, *Microbial Cell Factories*. BioMed Central Ltd.; 2018.
9. De C, Litopenaeus B. EVALUACIÓN NUTRICIA DE MICROALGAS MARINAS EN CULTIVOS.
10. Falaise C, François C, Travers MA, Morga B, Haure J, Tremblay R, et al. Antimicrobial compounds from eukaryotic microalgae against human pathogens and diseases in aquaculture. Vol. 14, *Marine Drugs*. MDPI AG; 2016.
11. Frida De Lima-Mar D. MAREA ROJA RED TIDE.
12. Assunção J, Catarina Guedes A, Xavier Malcata F. Biotechnological and pharmacological applications of biotoxins and other bioactive molecules from dinoflagellates. Vol. 15, *Marine Drugs*. MDPI AG; 2017.
13. Hackett JD, Anderson DM, Erdner DL, Bhattacharya D. DINOFLAGELLATES: A REMARKABLE EVOLUTIONARY EXPERIMENT 1. *American Journal of Botany*. 91(10).

14. Karafas S, Teng ST, Leaw CP, Alves-de-Souza C. An evaluation of the genus *Amphidinium* (Dinophyceae) combining evidence from morphology, phylogenetics, and toxin production, with the introduction of six novel species. *Harmful Algae*. 2017 Sep 1;68:128–51.
15. Aquino-Cruz A, Okolodkov YB. Impact of increasing water temperature on growth, photosynthetic efficiency, nutrient consumption, and potential toxicity of *Amphidinium* cf. *carterae* and *Coolia monotis* (Dinoflagellata). *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. 2016 Dec 1;51(3):565–80.
16. Kobayashi J, Kubota T. Bioactive macrolides and polyketides from marine dinoflagellates of the genus *Amphidinium*. Vol. 70, *Journal of Natural Products*. 2007. p. 451–60.
17. Molina-Miras A, Morales-Amador A, de Vera CR, López-Rosales L, Sánchez-Mirón A, Souto ML, et al. A pilot-scale bioprocess to produce amphidinols from the marine microalga *Amphidinium carterae*: Isolation of a novel analogue. *Algal Research*. 2018 Apr 1;31:87–98.
18. Keller MD, Selvin RC, Claus W, Guillard RRL. Media for the culture of oceanic ultraplankton. *J Phycol*. 1987;23:633–8.
19. Miranda PO, Padrón JM, Padrón JI, Villar J, Martín VS. *ChemMedChem*. 2006;1:323–9.
20. R. Rodríguez-Expósito; N. Nocchi; M. Reyes-Batlle; I.S ifaoui; B. Suárez-Gómez; A.R. Díaz-Marrero; M.L. Souto; J.E. Piñero; J.J. Fernández; J. Lorenzo-Morales. Antiamoebic effects of sesquiterpene lactones isolated from the zoanthid *Palythoa* aff. *clavata*. *Bioorganic Chemistry*. 2021;108:104682.
21. Bethencourt-Estrella CJ; NN; LAA; SNHD; SML; SGB; DMAR; FJJ; LMJ; PJE. Antikinetoplastid Activity of Sesquiterpenes Isolated from the Zoanthid *Palythoa* aff. *clavata*. *Pharmaceuticals*. 2021;14:1095.
22. Ellman GL, Courtney KD, Andres V Jr, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*. 1961;7:88–90.

23. Tecles F, Martínez Subiela S, Cerón JJ. Influence of several analytical conditions on whole blood cholinesterase activity determination by Ellman method. Vol. 17, AN. VET. (MURCIA). 2001.
24. Huang Xiao Chun, Zhao Di, Guo Yue-Wei, Wu Hou-Ming, Trivellone Enrico and, Cimino Guido. Lingshuiols A and B, two new polyhydroxy compounds from the Chinese marine dinoflagellate *Amphidinium* sp. *Tetrahedron Letters*. 2004;5501–4.
25. Morales-Amador A.; Souto ML.; Hertweck C.; Fernández JJ.; García-Altare M. A Rapid Screen for Polyol Polyketides from Marine Dinoflagellates,. *Analytical Chemistry*.