



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
Departamento de Química

Programa de doctorado de Oceanografía
Bienio 2003-2005

Título de la tesis:

Biodiversidad química del litoral canario

Tesis Doctoral presentada por D. Pere Ferriol Buñola para optar al grado de Doctor por la Universidad de las Palmas de Gran Canaria.

Dirigida por: Dr. D. Francisco Javier Toledo Marante

El Director

El Doctorando

Las Palmas de Gran Canaria, a 26 de octubre de 2015

DE RERUM NATURA

Quan un científic mira una pedra
no veu tan sols un objecte contundent,
hi veu tot un entramat de molècules,
l'estructura tridimensional dels silicats,
l'acumulació ofegada de foraminífers.
Quan mira un arbre coneix el perquè els seus colors,
la distribució espacial dels àtoms de la clorofil·la,
les cadenes de carbonis asimètrics que li han donat vida.
Quan era un infant es demanava el perquè
de la duresa de les roques,
el canvi del vi en vinagre,
per què la sobrassada torna blanca,
no sospitava la bellesa dels símbols,
el bell alenar del coneixement
i que la mirada seria un acte de creació.
De la natura de les coses
cal extreure el plaer de viure.

(Àngel Terrón, *Iniciació a la Química*)

*Als meus padrins,
per ensenyar-me a semblar
i a recollir.*

Agradecimientos

Quiero aprovechar estas líneas para expresar mi agradecimiento a aquellas personas e instituciones que de uno u otro modo me han apoyado en la realización de este trabajo.

Deseo expresar mi profundo sentimiento de gratitud y sincero reconocimiento al profesor Dr. Francisco Javier Toledo Marante por todas sus enseñanzas en química orgánica y la interpretación de los espectros, y sobre todo por su valioso apoyo, supervisión, orientación, comentarios y revisiones que han hecho posible esta Tesis.

Especialmente, quiero agradecer al Dr. Ignacio Brouard Martin, investigador científico del Instituto de Productos Naturales y Agrobiología del CSIC (IPNA, Tenerife) por su apoyo en el trabajo espectroscópico durante la realización de la presente Tesis.

Al Dr. Francisco Estévez Rosas, catedrático de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, por su colaboración en la realización de los ensayos de actividad farmacológica.

A los profesores y personal integrante del Departamento de Química de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria y del Instituto de Productos Naturales y Agrobiología del CSIC (IPNA, Tenerife) por su colaboración desinteresada.

A la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, al Instituto de Productos Naturales y Agrobiología del CSIC (IPNA, Tenerife) y a la Universitat de les Illes Balears, por ofrecerme los medios técnicos y materiales necesarios.

A la Comunidad Económica Europea -FEDER-, al Gobierno de España, al Gobierno de Canarias, a la propia Universidad de Las Palmas de Gran Canaria y a la Asociación Española Contra el Cáncer por la financiación de los sucesivos proyectos que han hecho posible esta Tesis.

A Nona, Biel y Toni, estoy profundamente en deuda por todo lo que he aprendido trabajando junto a ellos. Y al resto de compañeras y compañeros que están o han pasado por el área de ecología de la UIB, porque es un placer trabajar con buena gente.

A Mar, por haber tenido el privilegio de trabajar con ella, jugando a ser científicos con más de 5000 metros de agua bajo nuestros pies, y porque si es un honor ser amigo de una excelente oceanógrafa, todavía lo es más serlo de una excelente persona.

A todos aquellos amigos y compañeros con quienes he tenido la suerte de compartir buenos momentos, en Mallorca y en Las Palmas, en tierra y en la mar, en los laboratorios y en los bares, gracias por escuchar mis monólogos sobre las vicisitudes de las esponjas y otros bichos, y por animarme a continuar trabajando en lo que me apasiona.

Muy especialmente, a mi querida Xisca, sin su amor no habría podido acabar esta Tesis. No hay palabras para agradecer su paciencia y su apoyo, por animarme en mis peores momentos, por ayudarme a encontrar aquella palabra que me bloqueaba, iluminándome con su sonrisa cuando lo veía todo negro y tranquilizándome con sus cálidos abrazos. Gracias por estar cada día a mi lado. Y gracias también a mi gran familia política, estando con ellos me siento como en casa, gracias por darme ánimos, cariño y buena comida.

Finalmente, tengo que expresar mi inmensa gratitud hacia mi familia. A mi hermana, Maria, por su paciencia y generosidad y porque su fortaleza siempre será un referente en mi vida. A mis ahijados, Jaume y Caterina, porque una sonrisa suya vale más que todo el oro del mundo. A mis padres, Nofre y Catalina, por todo el esfuerzo que han hecho y toda la confianza que han depositado en mí y porque, sin llegar a entender del todo lo que estaba estudiando, me han apoyado incondicionalmente. Y sobre todo, porque los valores que ellos me han enseñado no se aprenden en ninguna Universidad.

Índice general

Introducción general	15
Objetivos	17
1. Productos naturales en <i>Verongia aerophoba</i>	19
1.1. Introducción	19
1.2. Aplisteroles	21
1.3. Ácidos grasos	26
1.4. Ácido verónico	28
1.5. Dienona	30
1.6. Aeroplysinina-1	32
1.7. Verongiolido	34
1.8. 11- <i>epi</i> -fistularina-3	38
1.9. Fistularina-1	49
1.10. Verongiamina	54
2. Cultivo de <i>Verongia aerophoba</i>	61
2.1. Introducción	61
2.2. Cultivo integrado de <i>Verongia aerophoba</i>	63
2.2.1. Material y métodos	63
2.2.2. Resultados y discusión	66
2.3. Cultivo <i>in situ</i> de <i>Verongia aerophoba</i>	69
2.3.1. Material y métodos	69
2.3.2. Resultados y discusión	72
3. Identificación de <i>Myxilla</i> sp.	83
3.1. Introducción	83
3.2. Material y métodos	84
3.2.1. Esponjas	84
3.2.2. Preparación de las espículas	84
3.2.3. Observación por microscopía	84
3.3. Resultados y discusión	84
4. Productos naturales en <i>Myxilla</i> sp.	93
4.1. Introducción	93
4.2. Esteroides	93
4.3. Ceramidas	97
4.4. Ceramidas-1-fosfato	98
4.4.1. Determinación por infusión directa (HPLC-MS)	99

4.4.2. Determinación cromatográfica (HPLC-MS)	99
4.5. Bases pirimidínicas	104
5. Productos naturales en <i>Ircinia variabilis</i>	107
5.1. Introducción	107
5.2. Resultados	107
6. Caracterización de un tapete microbiano	115
6.1. Introducción	115
6.2. Material y métodos	116
6.2.1. Tapetes microbianos	116
6.2.2. Análisis molecular	116
6.2.3. Observación de los tapetes por microscopía	119
6.3. Resultados y discusión	120
7. Aislamiento de escitonemina y dihidroescitonemina a partir de un tapete microbiano y de una cepa de <i>Nostoc</i> sp.	131
7.1. Introducción	131
7.2. Resultados	132
7.3. Experimental	136
8. Productos naturales de <i>Halopteris scoparia</i>	141
8.1. Antecedentes	141
8.2. Experimental	144
Conclusiones	149

Introducción general

La biodiversidad comprende toda la variedad de las diferentes especies que viven en nuestro planeta. Esta variedad se puede analizar en diferentes niveles de organización, por tanto podemos estudiar la diversidad a nivel de ecosistemas, de comunidades, de hábitats, de especies o también la diversidad genética. Incluso en un nivel inferior también podemos incluir la llamada quimiodiversidad, que se podría definir como la variedad de compuestos químicos producidos por los organismos y que tienen algún papel importante en las relaciones de los individuos que comparten un mismo hábitat, ya sea que tengan funciones de defensa, de ataque o de protección [La Barre, 2014].

Esta quimiodiversidad es uno de los aspectos que añaden valor al capital natural que representa la biodiversidad, ya que el conocimiento de estas sustancias puede ser aprovechado para mejorar el bienestar de la humanidad en sectores como la nutracéutica, la cosmética o la medicina.

Los océanos ocupan el 71 % de la superficie de nuestro planeta pero, aunque contienen una gran diversidad de hábitats, el número estimado de especies animales de los continentes es mucho mayor ya que ronda los 12 millones frente a las aproximadamente 212.000 especies animales marinas [Jaume and Duarte, 2006]. A pesar de ello, los océanos son un extraordinario filón de biodiversidad ya que hospedan 32 de los 34 phyla del (mal llamado) planeta Tierra y de ellos 13 son exclusiva o principalmente marinos. Esta diversidad biológica también se traduce en diversidad química, ya que hasta la fecha se han estudiado más de 20.000 moléculas marinas y muchas de ellas tienen un gran potencial como fármacos antibióticos, antiinflamatorios, anticáncer, etc... [La Barre, 2014].

Las Islas Canarias son un punto caliente de biodiversidad a nivel mundial y en las aguas que bañan sus, aproximadamente, 1.600 Km de costa se estima que habitan unas 5.200 especies, de las cuales 129 son esponjas [Cruz, 2002].

De todos los invertebrados marinos, las esponjas son las campeonas en cuanto a producción de nuevos compuestos. Entre 1985 y 2008 se estima que de las esponjas marinas se aislaron más de 3500 productos naturales nuevos, seguidas con diferencia por los corales con unos 1500 productos nuevos en el mismo periodo de tiempo [Hu et al., 2011].

Una de las esponjas más comunes y llamativas del litoral canario es *Verongia aerophoba*, perteneciente al orden Verongida. Es una característica común de las esponjas de este orden la presencia de un tipo especial de alcaloides bromados derivados de la tirosina, y muchos de ellos tienen importantes actividades biológicas como antimicrobianos, antivirales, anticáncer... [Peng et al., 2005]. Estos compuestos deben jugar un papel fundamental en la lucha química que se establece entre estas esponjas y otras especies con las que cohabitan, evitando que sean comidas, compitiendo por el espacio con otras esponjas o algas, e incluso

protegiéndolas de cualquier agente infeccioso.

De manera parecida deben actuar los sesterterpenos furánicos presentes en las esponjas de la familia Irciniidae, representadas en las costas canarias por cinco especies, quizá no tan llamativas como *V. aerophoba* pero algunas de ellas también muy abundantes.

Pero la diversidad química de los organismos que habitan en las aguas marinas de Canarias no se reduce únicamente a las esponjas ni, por extensión, al reino animal. También las algas, hongos, bacterias y cianobacterias contienen compuestos con estructuras químicas únicas e interesantes que pueden contribuir al desarrollo de nuevos productos que ayuden a mejorar la calidad de vida de las personas. Así, por ejemplo, las cianobacterias producen compuestos para protegerse de la radiación solar y podrían usarse para la producción de cremas solares basadas en productos naturales libres de alérgenos [Karlsson, 2011].

Las algas pardas también están en el punto de mira de las industrias cosméticas por la gran actividad antioxidante de los compuestos polifenólicos que contienen, pero también en el ámbito de la nutracéutica por los polialcoholes que producen.

Todo lo expuesto anteriormente nos lleva a querer profundizar en el conocimiento sobre los productos naturales que la biodiversidad del litoral canario nos brinda.

Bibliografía

- Cruz, T. *Esponjas marinas de Canarias*. Banco de datos de Biodiversidad de Canarias. Gobierno de Canarias, 2002.
- Hu, G.-P., Yuan, J., Sun, L., She, Z.-G., Wu, J.-H., Lan, X.-J., Zhu, X., Lin, Y.-C., and Chen, S.-P. Statistical research on marine natural products based on data obtained between 1985 and 2008. *Marine drugs*, 9(4):514–525, 2011.
- Jaume, D. and Duarte, C. M. *La exploración de la biodiversidad marina: desafíos científicos y tecnológicos*, chapter Aspectos generales de la biodiversidad en los ecosistemas marinos y terrestres, pages 17–30. Fundación BBVA, 2006.
- Karlsson, I. *Chemical and dermatological aspects of UV absorbing compounds*. PhD thesis, University of Gothenburg, 2011.
- La Barre, S. Marine biodiversity and chemodiversity-the treasure troves of the future. *Biodiversity-The Dynamic Balance of the Planet*, pages 1–26, 2014.
- Peng, J., Li, J., and Hamann, M. T. The marine bromotyrosine derivatives. In Cordell, G., editor, *The Alkaloids: Chemistry and Biology*, volume 61, pages 59 – 262. Academic Press, 2005.

Objetivos

Esta tesis tiene como objetivo general contribuir al conocimiento de la diversidad química de los productos naturales marinos de organismos recogidos en el litoral canario, aportando nuevos datos espectroscópicos de los metabolitos aislados. En algunos casos será necesario realizar aproximaciones taxonómicas utilizando diferentes técnicas para tratar de identificar los organismos implicados. También se pretende evaluar la producción de algunos de estos metabolitos mediante acuicultura.

En este sentido, se han propuesto los siguientes objetivos específicos:

1. Aislar e identificar metabolitos secundarios de la esponja marina *Verongia aerophoba*.
2. Evaluar el crecimiento de *Verongia aerophoba* y estudiar la producción de metabolitos citotóxicos en diferentes condiciones de cultivo.
3. Aislar e identificar metabolitos secundarios de una esponja marina del género *Myxilla*.
4. Aislar e identificar metabolitos secundarios de la esponja marina *Ircinia variabilis*.
5. Identificar las cianobacterias de un tapete microbiano productor de compuestos anti-UV.
6. Aislar e identificar compuestos anti-UV de un tapete microbiano y de una cepa cianobacteriana.
7. Aislar e identificar metabolitos secundarios del alga marina *Halopteris scoparia*.

Los resultados obtenidos a partir de estos objetivos se presentan en los siguientes capítulos.

Capítulo 1

Productos naturales en *Verongia aerophoba*

1.1. Introducción

Las esponjas (Phylum Porifera) son un grupo de organismos bentónicos sésiles que tienen un papel importante como filtradores en casi todos los ecosistemas acuáticos. Las 8659 especies de esponjas marinas conocidas [van Soest et al., 2015] se dividen en cuatro clases diferentes (Hexactinellida, Calcarea, Demospongiae, Homoscleromorpha) basándose en la naturaleza de su esqueleto [van Soest et al., 2012]. Las Demosponjas forman la clase más grande, comprendiendo aproximadamente el 83 % de todas las especies de esponjas.

Históricamente, las esponjas córneas o queratosas se asignaron a los órdenes Dictyoceratida y Dendroceratida, comprendiendo aquellas que carecen de un esqueleto mineral pero que poseen complejas estructuras esqueléticas compuestas por fibras orgánicas de colágeno. En una reciente revisión de las relaciones filogenéticas de las esponjas córneas utilizando técnicas moleculares, se ha establecido la nueva subclase Verongiomorpha que combina los órdenes Chondrillida, Chondrosiida y Verongiida, en este último es en el que está incluida la esponja objeto de estudio [Erpenbeck et al., 2012; Boury-Esnault and van Soest, 2015]. En cuanto a la quimiotaxonomía, las esponjas del orden Verongiida se caracterizan porque prácticamente todas las especies de este orden contienen metabolitos secundarios basados en bromoderivados del aminoácido tirosina, muchos de los cuales presentan importantes actividades biológicas.

Verongia aerophoba (Nardo, 1833) es una esponja marina muy común en las Islas Canarias que suele presentarse en las concavidades de los charcos intermareales, en la zona submareal somera y hasta 50 m de profundidad (Figura 1.1). Siempre se encuentra en zonas de mucha corriente, sobre sustratos rocosos formando recubrimientos extensos (de más de un m²) [Espino et al., 2006]. Se pueden presentar de dos formas: 1) generalmente en placas basales que emiten prolongaciones en forma de chimenea o tubo con un orificio terminal (ósculo), que pueden estar aisladas o anastomosadas, de varios centímetros de longitud y hasta 3 cm de diámetro máximo, o 2) en ocasiones son pequeñas masas o incrustaciones que pueden emitir prolongaciones muy delgadas [Cruz, 2002]. En vida, el color es amarillo brillante, en ocasiones con tonalidades pardas, pero cambia

a marrón púrpura cuando se conserva en alcohol y hasta negro al secarse. Esto es debido a que contiene un pigmento amarillo, uranidina, que es muy inestable y se oxida rápidamente cuando se expone al aire, dando lugar a un polímero negro [Cimino et al., 1984]. Por esta razón recibe el nombre de *aerophoba* que significa “miedo al aire”.



Figura 1.1: Esponja marina *Verongia aerophoba*.

Esta especie fue descrita originalmente por Nardo [1833] como *Aplysia aerophoba* (nótese la ortografía incorrecta del original, ya que el género *Aplysia* corresponde a un género de moluscos opistobranquios) y más tarde, tanto Schmidt [1866] como Bowerbank [1845] consideraron como sinónimos los géneros *Aplysina* y *Verongia*, aunque normalmente se usaba el género *Aplysina* (por ejemplo, Schulze [1878] redescibió la familia Aplysinidae, utilizando el nombre *Aplysina aerophoba*). Esto fue así hasta que De Laubenfels en 1930 empezó a usar preferentemente *Verongia* y Vacelet [1959] la describió como *Verongia aerophoba* (Schmidt) [Wiedenmayer, 2013]. Una revisión más reciente esta especie ha considerado transferirla al género *Aplysina* (Nardo, 1834) como nombre aceptado [Bergquist and de Cook, 2002]. Sin embargo, en esta tesis se opta por mantener el nombre citado por el tiempo transcurrido y las numerosas citas y descripciones posteriores [Cruz, 2002].

En el reino animal, las esponjas contienen la mayor variedad de esteroides. Desde los trabajos de Bergman en esteroides de invertebrados marinos a finales de la década 1940 [Bergmann et al., 1945; Bergmann, 1949], se han aislado muchos nuevos tipos de esteroides en esponjas marinas. Si llamamos esteroides “convencionales” a aquellos que tienen un núcleo tetracíclico C_{19} y una cadena lateral normal C_8 (incluso si está modificada por la adición de uno o dos átomos de carbono en C-24), entonces podemos llamar “no convencionales” a aquellos esteroides que tengan el núcleo de colesterol y cadenas laterales con patrones de alquilación diferentes [Minale et al., 1976]. De estos esteroides “no convencionales”,

los primeros ejemplos de alquilación en C-26 se aislaron de *Verongia aerophoba* [De Luca et al., 1972]. En un trabajo posterior con 25 especies de esponjas diferentes, De Rosa et al. [1973a] encontraron que estos esteroides con un grupo metilo extra en C-26 sólo aparecían en las esponjas de la familia Verongiidae, lo cual significó una prueba quimiotaxonómica más para separar las familias Verongiidae y Spongiidae que entonces estaban clasificadas como pertenecientes al mismo orden, a pesar de que se habían encontrado grandes diferencias en el perfil de aminoácidos de ambas familias [Bergquist and Hartman, 1969; Minale and Sodano, 1977]. Para investigar el origen biogénico de estos esteroides se realizaron experimentos de incorporación de sustratos marcados con ^{14}C , sin embargo no se observaron 26-metilesteroides radiactivos y por tanto se comprobó que estas esponjas son incapaces de biosintetizar estos esteroides. Esto hizo suponer que la esponja convierte esteroides exógenos tomados en la dieta mediante alguna ruta que, partiendo de algún precursor C_{29} como el fucosterol, incluya una transmetilación interna [De Rosa et al., 1973b].

La composición lipídica de la esponja *Verongia aerophoba* de las Islas Canarias fue estudiada mediante GC-MS y con esta técnica identificaron ácidos grasos, esteroides y compuestos volátiles [Nechev et al., 2002]. Sin embargo, en nuestro estudio se ha querido profundizar en el conocimiento de los esteroides de *V. aerophoba* de las Islas Canarias mediante su estudio por espectrometría de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN (tanto en una como en dos dimensiones), así como por espectrometría de masas de alta resolución (HRMS).

Como se ha dicho antes, un carácter quimiotaxonómico distintivo del orden Verongiida es que todas las especies de este orden poseen metabolitos secundarios derivados de la bromotirosina. La primera vez que se aislaron este tipo de compuestos se remonta a 1913, cuando Morner aisló dibromotirosina a partir de la hidrólisis de una proteína de dos especies de coral [Mörner, 1913]. No se describieron más compuestos derivados de la bromotirosina hasta que Sharma y Burkholder, en 1967, aislaron dos compuestos con propiedades antibacterianas aislados de las esponjas *Verongia fistularis* y *V. cauliformis* [Sharma and Burkholder, 1967]. Desde entonces y motivados por sus interesantes actividades biológicas, se han publicado muchos más productos naturales marinos derivados de la bromotirosina. Hasta la fecha, se han descrito alrededor de 300 alcaloides derivados de la bromotirosina aislados de invertebrados marinos que muestran una amplia gama de actividades biológicas, en las que se incluyen: antimicrobiana, anticáncer, antiincrustante (*antifouling*), antiviral, reguladora de ATPasa, moduladora del canal de calcio, etc. . .

Por todo ello, con el trabajo que se describe en el presente capítulo, se ha pretendido profundizar en el conocimiento de los productos naturales de *Verongia aerophoba* de las Islas Canarias, aportando nuevos datos espectroscópicos.

1.2. Aplisteroles

Aislamiento, purificación e identificación de los esteroides.

Las fracciones que contuvieron los compuestos mayoritarios se eluyeron con una mezcla de Hexano/AcOEt 80:20, se recromatografiaron repetidamente hasta conseguir la purificación e identificación de los esteroides aplisterol (**1**, 63.96 %), 24(28)-didehidroaplisterol (**2**, 17.39 %) y 23(24)-didehidroaplisterol (**3**, 19.57 %),

así como sus derivados acetilados (**4**, **5** y **6**) (Figura 1.2). Este último ha sido aislado aquí por primera vez como producto natural. Tanto la mezcla de aplisteroles como la de sus acetatos tienen el aspecto de un sólido blanco homogéneo por CCF. Tras cristalización a partir de MeOH se determinaron sus puntos de fusión, resultando 135-136°C para la mezcla de aplisteroles y 119-120°C para la mezcla de sus acetatos.

El espectro de masas de alta resolución muestra la señal del pico del ión molecular en m/z 414.383263 que corresponde a la fórmula molecular $C_{29}H_{50}O$, así como el pico base en m/z 396.372177 ($C_{29}H_{48}$) que resulta de la pérdida de una molécula de agua – delata un grupo hidroxilo –. La fórmula molecular indica que nuestro producto tiene dos carbonos más que el colesterol (éste es C27). Un estudio detallado del espectro de masas indica que los dos carbonos adicionales se encuentran en la cadena lateral, que estaría formada por diez carbonos. Así por ejemplo, picos a m/z 273.2133 (pérdida de la cadena lateral de diez carbonos) y 255.2041 (pérdida de la cadena lateral de diez carbonos y agua) nos llevan a proponer un núcleo tetracíclico idéntico al del colesterol. La presencia de productos secundarios con una insaturación en la cadena lateral queda evidenciada por la observación del ión molecular de los mismos a m/z 412.364784 ($C_{29}H_{48}O$) y la pérdida de agua a m/z 394.353569 ($C_{29}H_{46}$). Un importante pico a m/z 314.2478, característico [De Luca et al., 1972] de insaturación en C-24 se asigna al reagrupamiento de McLafferty (ruptura del enlace C22-C23 con transferencia de hidrógeno desde C-20, Figura 1.3).

Según el espectro IR, este producto presenta el mencionado grupo alcohólico ya que se observa una banda de absorción a 3608 cm^{-1} (tensión de O–H libre). Las bandas de absorción a 3027 y 3006 cm^{-1} son debidas a la tensión del =C–H, delatando al menos un doble enlace, la banda ancha con varios picos entre 2961 y 2870 cm^{-1} corresponde a la tensión de los enlaces C–H de los metilos, metilenos y metinos. Los dos picos agudos que aparecen en 1464 y 1379 cm^{-1} pertenecen a la denominada "huella dactilar" dentro de la cual se observa una intensa banda de absorción a 1209 cm^{-1} correspondiente a la vibración de tensión del enlace C–O del grupo alcohólico.

El espectro de ^1H -RMN (Figura 1.4) desplaza una señal a δ 5.35 (1H, dobles dobles superpuestos) que es característica de un doble enlace entre los carbonos C5 y C6 de los tres esteroides con el mismo esqueleto del aplisterol. Una señal a δ 5.16 en forma de un triplete con $J = 5.45\text{ Hz}$ delata la presencia minoritaria del regioisómero 23(24)-didehidroaplistero (**3**). Un singlete ancho a $\delta = 4.70$ y un multiplete a δ 4.68, ambas en relación 1:1 delatan el metileno olefínico del carbono 28 del 24(28)-didehidroaplistero (**2**). La señal del H geminal al grupo alcohol (δ 3.51; 1H; m) delata a un hidroxilo 3β típico de los esteroides. También se observaron los singletes de los hidrógenos sobre los carbonos angulares C18 y C19 (δ 0.68 y 1.00 respectivamente), que se corresponden con los encontrados en la bibliografía para el esqueleto del aplisterol.

Las conectividades ^1H – ^1H observadas en experimentos bidimensionales de correlación (COSY, TOCSY y NOESY) son también consistentes con las estructuras asignadas. Así, la señal a δ 2.24 (2H, m) está correlacionada con el protón olefínico a δ 5.35 (1H, m) y, por tanto, corresponde al segundo anillo del esqueleto carbonado (hidrógenos alílicos en C-7). También se observaron correlaciones entre las señales a δ 2.28 (m), δ 1.84 (m) y δ 1.51 (m) con la señal a δ 3.51, del mencionado hidrógeno geminal al grupo hidroxilo en C3, con lo cual estas señales deben pertenecer a hidrógenos del primer anillo, más concretamente, los

hidrógenos sobre C2 y C4.

El espectro de ^{13}C -RMN muestra la presencia de picos asignables a los 6 grupos metilo de la estructura mayoritaria propuesta, el aplisterol, además de 11 metilenos, 9 metinos y 3 carbonos cuaternarios que se observan en el espectro DEPT. Estos datos se resumen en la Tabla 1.1. Son características las señales de los carbonos C5 y C6 que conforman el doble enlace (δ 140.7 y 121.7, respectivamente), así como las señales asignadas a C24 y C28 (δ 39.8 y 16.5, respectivamente).

Tabla 1.1: Desplazamientos de carbono del esteroide mayoritario, aplisterol (**1**), y su acetato (**4**) en Cl_3CD y a 75 MHz. Las asignaciones son consistentes con la bibliografía [Kelecom et al., 1979] y los datos del espectro DEPT.

Nº Carbono	Aplisterol (1) (δ , ppm)	Acetato de aplisterilo (4) (δ , ppm)
1 (CH_2)	37.2	37.0
2 (CH_2)	31.7	27.7
3 (CH)	71.8	74.0
4 (CH_2)	42.3	38.1
5 (C)	140.7	139.6
6 (CH)	121.7	122.6
7 (CH_2)	31.9	31.9
8 (CH)	32.0	31.9
9 (CH)	50.1	50.0
10 (C)	36.5	37.0
11 (CH_2)	21.1	21.0
12 (CH_2)	39.8	39.8
13 (C)	39.7	39.7
14 (CH)	56.8	56.7
15 (CH_2)	24.3	24.3
16 (CH_2)	28.2	28.2
17 (CH)	56.1	56.1
18 (CH_3)	11.8	11.8
19 (CH_3)	19.4	19.3
20 (CH)	35.9	35.8
21 (CH_3)	18.8	18.7
22 (CH_2)	33.9	33.8
23 (CH_2)	29.0	29.0
24 (CH)	39.8	39.8
25 (CH)	37.5	38.1
26 (CH_2)	25.8	25.7
27 (CH_3)	15.9	15.9
28 (CH_3)	16.5	16.5
29 (CH_3)	12.2	12.0
CH_3COO		170.5
CH_3COO		21.4

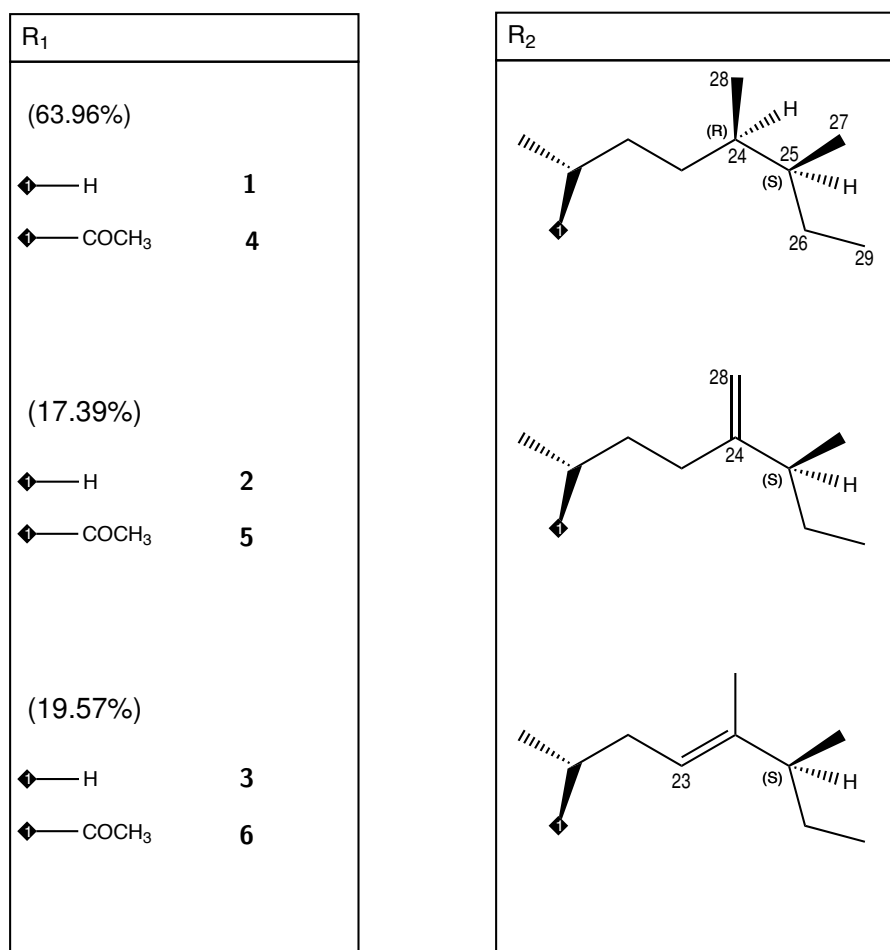
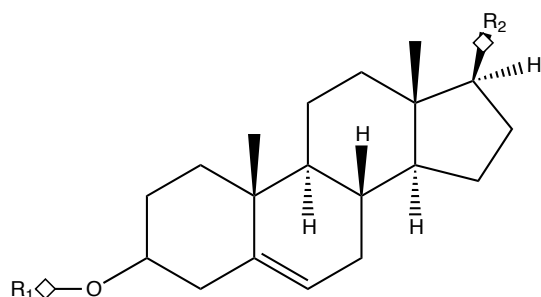


Figura 1.2: Esteroides identificados en *Verongia aerophoba*

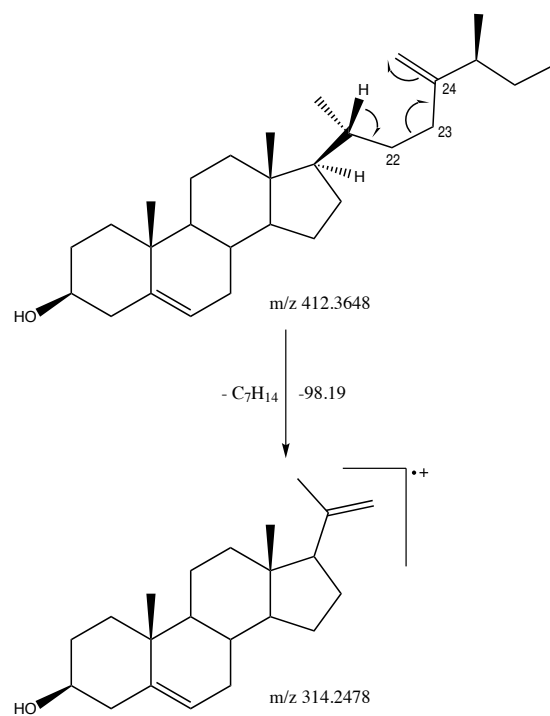


Figura 1.3: Transposición de McLafferty para el 24(28)-didehidroaplisteroles (**2**).

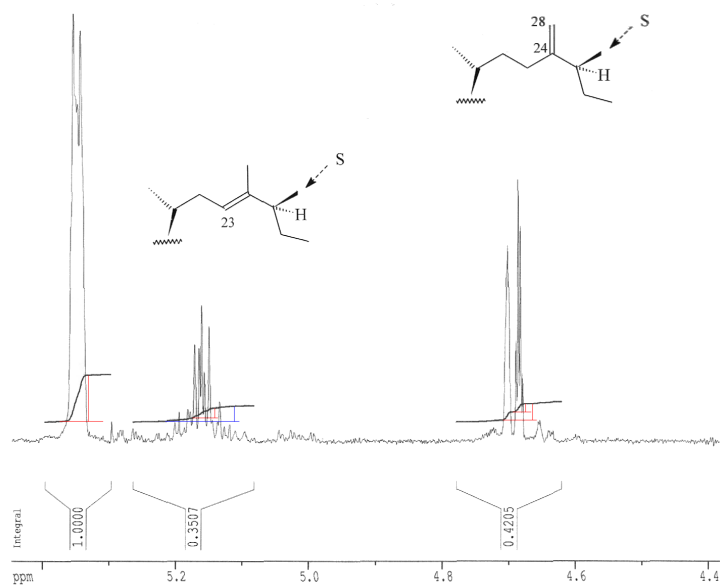


Figura 1.4: Protones olefínicos de la mezcla de aplisteroles (**1**), 24(28)-didehidroaplisteroles (**2**) y 23(24)-didehidroaplisteroles (**3**)

Estudio de los acetatos de aplisterilo (4), 24(28)-didehidroaplisterilo (5) y 23(24)-didehidroaplisterilo (6)

Los estudios espectroscópicos que se realizaron a la segunda mezcla de esteroles aislada confirman que se trata de los acetatos de aplisterilo (4), 24(28)-didehidroaplisterilo (5) y 23(24)-didehidroaplisterilo (6).

En primer lugar, destaca una intensa banda de absorción en IR a 1724.24 cm^{-1} que corresponde a la vibración de tensión del grupo C=O de ésteres que, junto al pico intenso a 1255.57 cm^{-1} correspondiente a la vibración de tensión del enlace C-O, delata la presencia de un grupo acetoxi en C-3.

El espectro de ^1H -RMN también muestra la señal típica del protón olefínico en C6 a δ 5.37, además de la señal del hidrógeno geminal al grupo acetoxi a δ 4.62 (1H, m) y la señal del metilo del acetato en δ 2.03 (3H, s). El resto de las señales desplazadas en el espectro son consistentes con el esqueleto esteroide del aplisterol, su esteroles mayoritario. Un triplete centrado a δ 5.16 delata el esqueleto del 23(24)-didehidroaplisterol y dos señales a δ 4.70 y δ 4.68 delata el metileno del 24(28)-didehidroaplisterol. Las curvas integrales de estas señales son consistentes con la proporción asignada a los mismos en la figura 1.

En el espectro ^{13}C -RMN se observa la señal del carbono carbonílico del acetato a δ 170.5 y también las señales de los carbonos olefínicos C5 y C6 del esqueleto del aplisterol (δ 139.6 y 122.6, respectivamente), así como el resto de señales esperadas según la bibliografía. Señales minoritarias en la zona olefínica del espectro se deben al 23(24)-didehidroaplisterol (δ 136.0 y 132.5) y al 24(28)-didehidroaplisterol (δ 156.5; 106.0).

En el espectro de masas no se observa el pico del ión molecular a m/z 456 (M^+ , $\text{C}_{31}\text{H}_{52}\text{O}_2$) por la fácil pérdida de ceteno ($\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$) dando los picos a m/z 414.3866 ($\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$) (pico base) y 412.3690 ($\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$), así como la pérdida de una molécula de ácido acético, fenómeno este último que justifica el pico a m/z 396.3708 ($M^+ - \text{CH}_3\text{COOH}$; $\text{C}_{29}\text{H}_{48}$).

Los espectros COSY, TOCSY y NOESY son consistentes con las estructuras dadas, observándose, entre otras, la correlación del protón olefínico sobre C-6 (δ 5.37) y el metileno alílico en C-7 (δ 2.31) ó la del metileno olefínico en C-28 (δ 4.69) y el metileno alílico en C-23 (δ 2.00).

Para confirmar nuestra hipótesis de que el compuesto aislado de la esponja era el derivado acetilado de la mezcla de aplisteroles descrita anteriormente, se acetiló una muestra de estos con piridina y anhídrido acético (una hora a 80 $^\circ\text{C}$), se extrajo de la forma usual y se purificó cromatografiando en columna de Si-gel con disolventes de polaridad creciente desde Hexano hasta una mezcla de Hexano-AcOEt 1:1. La comparación por CCF de la mezcla natural con la sintética de reveló que, efectivamente, se trataba de los mismos compuestos, 4, 5 y 6.

1.3. Aislamiento y elucidación estructural de tres ácidos grasos (7, 8, 9).

Una fracción que se aisló de la cromatografía general con n-hexano/AcOEt resultó homogénea por CCF pero fue identificada como una mezcla de los ácidos heneicosanoico (7, 31.12%), oleico (8, 30.59%) y linoleico (9, 38.30%) (Figura 1.5). Los porcentajes se dedujeron de las intensidades de los iones moleculares

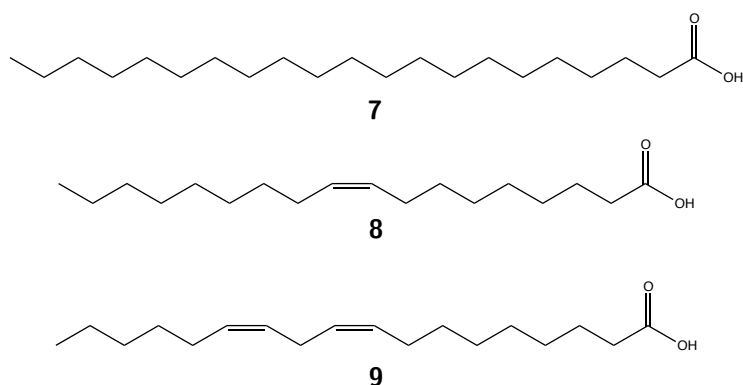


Figura 1.5: Ácidos grasos de *Verongia aerophoba*: ácidos heneicosanoico (**7**), oleico (**8**) y linoleico (**9**)

en el espectro de masas, según se especifica en la Tabla 1.2 y fueron confirmadas por la curva integral en el espectro de ^1H -RMN. También en el espectro de ^{13}C -RMN se observan seis carbonos olefinicos –los cuatro del ácido linoleico y los dos del oleico– a δ 128.6; 128.9; 129.7; 130.0; 130.5 y 130.6 además del resto de señales esperadas (C=O a δ 180.5, y también los metilenos y metilos a δ 14-39).

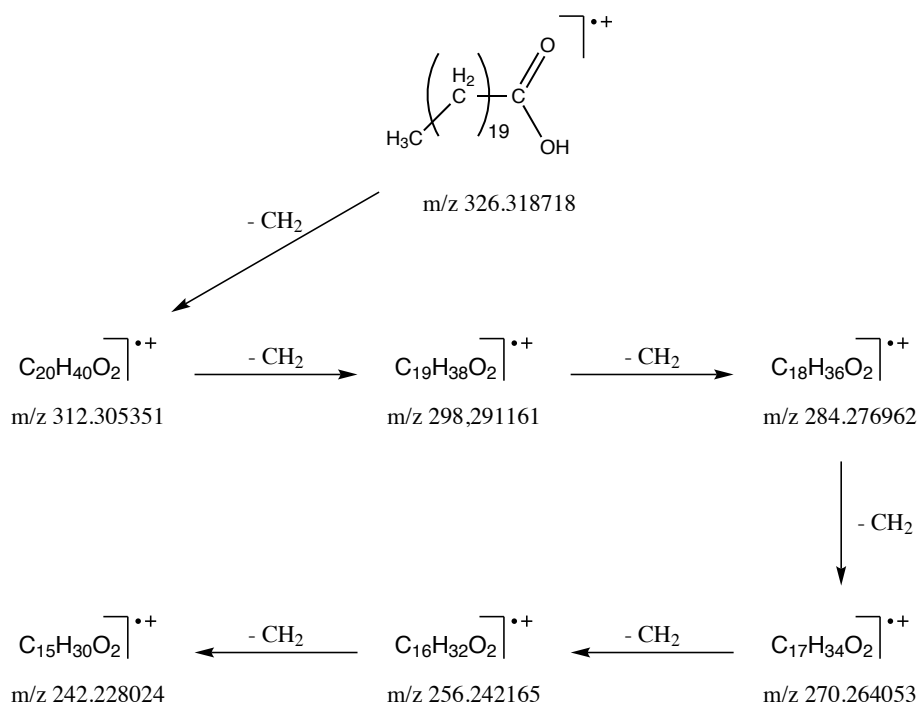


Figura 1.6: Esquema de fragmentaciones observadas en el espectro de masas que confirman el ácido heneicosanoico (**7**).

También la RMN de protón bidimensional (COSY, TOCSY y NOESY) infor-

man de correlaciones entre los protones olefinicos (δ 5.34) y los protones alílicos (δ 2.00) ó entre los metilenos en α al grupo carbonilo (δ 2.34) y los metilenos en β al carbonilo (δ 1.62).

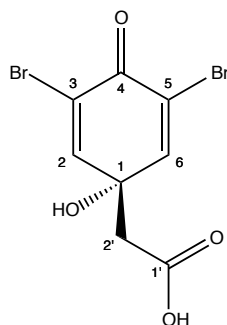
Tabla 1.2: Composición de la mezcla de ácidos grasos.

Componente	m/z (M^+)	Intensidad (%)	w/w (%)
Acido heneicosanoico (7) $C_{21}H_{42}O_2$	326.318718 (Calc: 326.318481)	1.17	31.12
Acido oleico (8) $C_{18}H_{34}O_2$	282.262131 (Calc:282.255881)	1.15	30.59
Acido linoleico (9) $C_{18}H_{32}O_2$	280.246429 (Calc:280.240230)	1.44	38.30
Total:		3.76	100

1.4. Ácido veróngico en *Verongia aerophoba*

Aislamiento y elucidación estructural del ácido 3,5-dibromo-1-hidroxi-4-oxociclohexa-2,5-dienil acético (**10**).

De la fracción eluida con Hexano/AcOEt 50:50 se aisló un sólido pardo cuyo punto de fusión resultó ser 185-186°C. Tras repetidas cromatografías en columna se pudo llegar a una muestra homogénea por CCF y se procedió a su elucidación estructural mediante métodos espectroscópicos.



10

Figura 1.7: Ácido veróngico

Un pico de absorción en el espectro IR que se encuentra a 3690 cm^{-1} así como una banda ancha en el intervalo $3602\text{-}3569\text{ cm}^{-1}$ indican un grupo hidroxílico y/o un grupo carboxílico, respectivamente. Además, una señal a 3026 cm^{-1} correspondiente a la vibración de tensión entre un hidrógeno y un carbono olefínico delata dobles enlaces, mientras que la señal en 2929 cm^{-1} correspondería a la vibración de tensión de enlaces C-H de cadenas saturadas. Dos señales, a

1719 y 1690 cm^{-1} , respectivamente, son típicas de la vibración de tensión de los grupos carbonilos (el del grupo carboxílico y el de las cetonas α,β insaturadas, respectivamente). La existencia de insaturaciones se corrobora por un pico a 1603 cm^{-1} correspondiente a la vibración de tensión de dobles enlaces C=C. Una banda de absorción aguda a 1226 cm^{-1} se debe a la vibración de tensión del enlace C–O del grupo hidroxilo del ácido carboxílico y, finalmente, una banda de absorción a 669 cm^{-1} sugiere la presencia de enlaces C–Br.

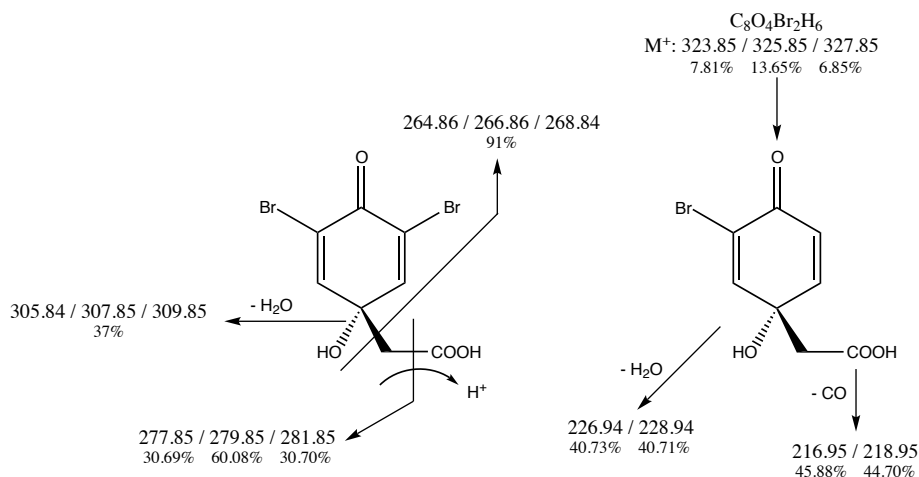


Figura 1.8: Principales fragmentaciones del ácido verónico (**10**) en el espectrómetro de masas.

En espectrometría de masas se observa un pico base correspondiente al ión molecular según la fórmula $\text{C}_8\text{H}_6\text{O}_4\text{Br}_2$ (M^+ , 323.85/325.85/327.85) y dado que se observa la señal como una tríada con intensidades relativas de aproximadamente 1/2/1 (7.81 %/ 13.65 %/ 6.85 %) se puede afirmar que esta molécula contiene dos átomos de bromo. Las fragmentaciones observadas para esta molécula, que se muestran en la Figura 1.8, son consistentes con una estructura relacionada con la dibromotirosina, por lo que, encaja en la ruta biogénica de los aminoácidos y, habiéndole asignado la estructura del ácido 3,5-dibromo-1-hidroxi-4-oxociclohexa-2,5-dienil acético (**10**), la hemos denominado con el nombre de ácido verónico.

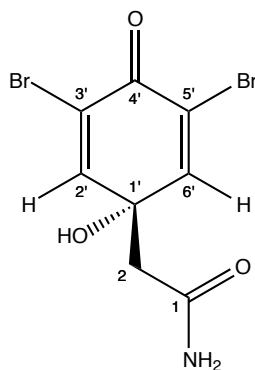
En el espectro de ^1H -RMN (Tabla 1.3) se observa la señal de los dos protones de la ciclohexadienona (δ 7.65; 2H; s) y la del protón ácido como un singlete ancho a δ 12.51. También destaca la presencia del protón hidroxílico sobre C1 como un singlete ancho a δ 6.41 y un singlete agudo a δ 2.78 (2H) que corresponde a los hidrógenos metilénicos en α al grupo carbonilo (hidrógenos sobre C2'). Estos datos muestran concordancia con los de la bibliografía [Sharma et al., 1970]. El espectro de ^{13}C -RMN confirma que la molécula contiene un metileno, dos metinos y cinco carbonos cuaternarios. Los desplazamientos químicos asignados a cada carbono se muestran en la Tabla 1.3 y, siendo confirmados por el experimento DEPT, se describen aquí por primera vez. Esta molécula fue descrita como derivado sintético del dimetoxicetal de la amida correspondiente [Sharma et al., 1970] y, por otra parte, como metabolito de la esponja *Verongia thiona* [Cruz et al., 1990]. Esta es la primera vez que se aísla de *Verongia aerophoba*.

Tabla 1.3: Desplazamientos químicos (δ , ppm) observados en los espectros de RMN del ácido verónico (10) en DMSO-d₆.

Posición	¹ H-RMN (δ , 300 MHz)	¹³ C-RMN (δ , 75 MHz)
1		71.5 (C)
2	7.65 (s, 1H)	153.2 (CH)
3		120.0 (C)
4		172.6 (C)
5		119.7 (C)
6	7.65 (s, 1H)	153.2 (CH)
2'	2.78 (s ancho, 2H)	43.5 (CH ₂)
1'	12.51 (s ancho, 1H)	170.1 (C)
OH	6.41 (s ancho, 1H)	

1.5. Aislamiento y elucidación estructural de la dienona (11).

La dienona (11) es un derivado de la dibromotirosina que se aisló de las fracciones más polares del extracto de *Verongia aerophoba*. Su aspecto es el de un sólido blanco con un punto de fusión de 191-192°C (en la literatura: [Tymiak and Rinehart, 1981]: 190-191°C; [Fattorusso et al., 1972]: 192-194°C). Tiene propiedades antibióticas [Sharma and Burkholder, 1967], incrementa el ritmo cardíaco y la fuerza de contracción del corazón [Hernández, 2005] y presenta una $IC_{50} = 10 \mu\text{M}$ frente a células de leucemia humana (HL-60), afectando al ciclo celular en la fase G2M, fragmentando el enzima pro-caspasa-3 (enzima que participa en la apoptosis).



11

Figura 1.9: Dienona de *Verongia aerophoba*

La fórmula molecular, C₈H₇Br₂NO₃, se dedujo del espectro de masas por la observación del ion molecular como una tríada de señales cuyas intensidades están en relación 1:2:1 según se indica en la (Tabla 1.4). Las fórmulas de estos tres picos fueron establecidas por espectrometría de masas de alta resolución.

Así, el pico a m/z 326.8743 corresponde a la fórmula $C_8H_7NO_{381}Br_2$, cuyo valor calculado es 326.8752 o el pico m/z de 324.8785 corresponde a la fórmula $C_8H_7NO_{379}Br_{81}Br$, cuyo valor calculado es 324.8772 o un pico a m/z 322.8800 corresponde a la fórmula $C_8H_7NO_{379}Br_2$, cuyo valor calculado es 322.8793.

Tabla 1.4: El ion molecular de la dienona (**11**) en el espectrómetro de masas.

Ion observado (m/z)	Intensidad (%)	Fórmula
326.87	4.28	$C_8H_7^{81}Br_2NO_3$
324.87	8.49	$C_8H_7^{79}Br^{81}BrNO_3$
322.87	4.43	$C_8H_7^{79}Br_2NO_3$

Otro pico que destaca en el espectro de masas de esta molécula es el pico base (el enol de la acetamida) que aparece a m/z 59.03 y que resulta del reagrupamiento de McLafferty (Figura 1.10). Obsérvese que este esquema de fragmentaciones viene corroborado por la espectrometría de masas de alta resolución. Así, un pico a m/z 307.8758 corresponde a la fórmula $C_8H_6NO_{279}Br_{81}Br$, que es el ion molecular menos un hidroxilo o también un pico a m/z 281.8763 corresponde a la fórmula $C_7H_6NO_{81}Br_2$, que es el ion molecular menos un hidroxilo y menos monóxido de carbono o también un ion a m/z 226.9593 corresponde a la fórmula $C_8H_6NO_{279}Br$, que es el ion molecular menos un hidroxilo y menos un átomo de bromo.

Por otra parte, los espectros de 1H -RMN y de ^{13}C -RMN (Tabla 1.5) resultaron concordantes con los descritos en la bibliografía [Tymiak and Rinehart, 1981] [Sharma and Burkholder, 1967], así como también los datos IR. Esta última espectroscopía presenta bandas a 3689.57 (OH libre); 3521.78 (NH); 3404.13 (NH); 3020.32 (=C-H), 1712.00 (C=O), 1681.81 (C=O), 1600.81 (C=C), 1222.79 (C-O) y 786.00 (C-Br) cm^{-1} .

Tabla 1.5: Datos de RMN de la dienona (**11**).

Posición	1H -RMN (CD_3OD)	1H -RMN ($DMSO-d_6$)	^{13}C -RMN ($DMSO-d_6$)
1			170.0
2	2.65 (2H, s)	2.62 (2H, s)	44.9
1'			71.8
2',6'	7.53 (2H, s)	7.54 (2H, s)	152.5
3',5'			119.8
4'			172.2
NH ₂ , OH	7.26 (0.5H, s)	6.86 (1H, s) 7.29 (0.5H, s) 7.45 (1H, s)	

Por otro lado, comentar que la espectroscopía de RMN bidimensional apoya la estructura asignada. Así, el espectro NOESY muestra correlación entre los metinos C-2' y C-6' y el metileno C-2, y los espectros HSQC y HMBC presentan las correlaciones indicadas en de la Tabla 1.6.

Finalmente, la dienona se acetiló con anhídrido acético y piridina dando un acetato (**12**) cuyos datos espectroscópicos y correlaciones HSQC y HMBC se presentan en la Tabla 1.7.

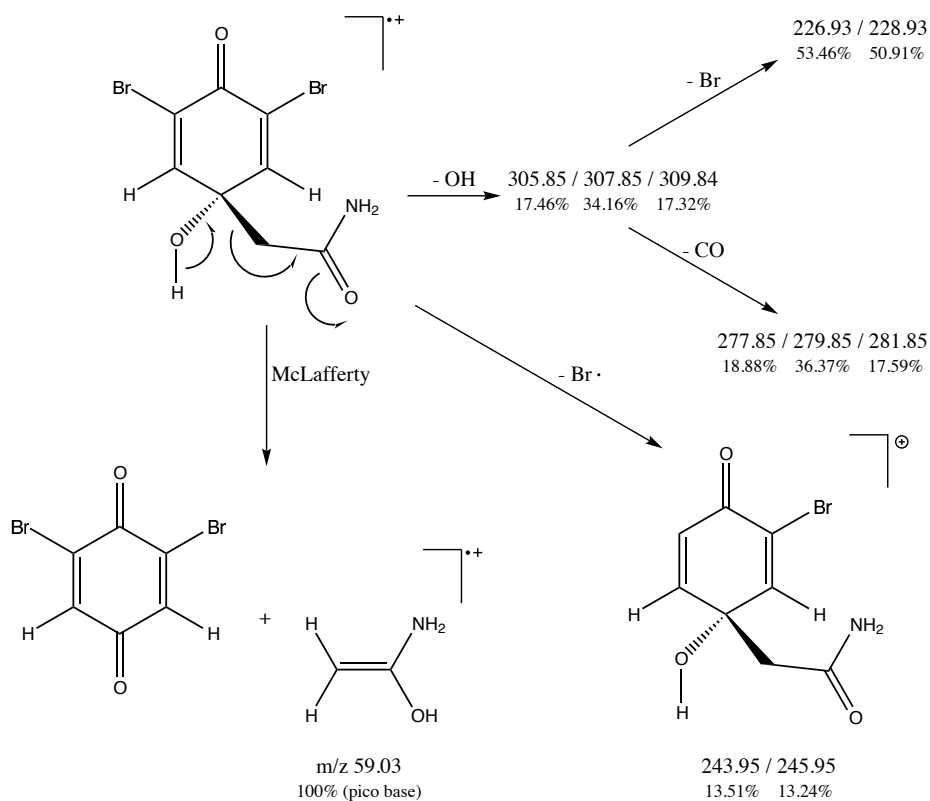


Figura 1.10: Principales fragmentaciones de la dienona (**11**) observadas en el espectrómetro de masas.

Tabla 1.6: Correlaciones observadas en los espectros HSQC y HMBC de la dienona (**11**).

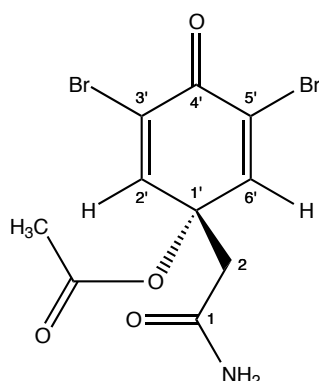
Posición	$^1\text{H-RMN}$ (δ DMSO- d_6)	HSQC	HMBC
2	2,59 (2H, s)	C2	C1, C1', C2', C6'
2'	7,55 (1H, s)	C2'	C2, C1', C3', C4', C6'
6'	7,55 (1H, s)	C6'	C2, C1', C2', C4', C5'

1.6. Aislamiento y elucidación estructural de la aeroplysinina-1 (**13**).

Aeroplysinina-1 (**13**) es un derivado de la dibromotirosina que se aisló de las fracciones intermedias en polaridad del extracto de *Verongia aerophoba*.

Los espectros de RMN-1H y de RMN-13C (Tabla 1.8) resultaron concordantes con los descritos en la bibliografía [Fattorusso et al., 1972; Ogamino and Nishiyama, 2003] y con los espectros teóricos publicados en la base de datos de Scifinder.

Esta sustancia presenta actividad antibacteriana [Fattorusso et al., 1972] frente a *Staphylococcus albus*, *Bacillus cereus* y *B. subtilis*. También actividad



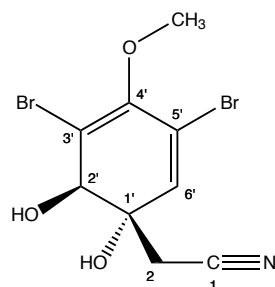
12

Figura 1.11: Acetato de la dienona

Tabla 1.7: Espectros de RMN y correlaciones observadas en los espectros HSQC y HMBC del monoacetato de la dienona (12).

Posición	^1H -RMN (δ , DMSO- d_6)	^{13}C -RMN (δ , DMSO- d_6)	HSQC	HMBC
1		168.0		
2	2.77 (2H, s)	43.1	C2	C1, C1', C2', C6'
1'		77.1		
2'	7.81 (1H, s)	150.0	C2'	C2, C1', C3', C4', C6'
3'		120.0		
4'		172.2		
5'		120.0		
6'	7.81 (1H, s)	150.0	C6'	C2, C1', C2', C4', C5'
$\underline{\text{CH}_3\text{CO}}$	2.03 (3H, s)	20.1	$\underline{\text{CH}_3}$	
$\underline{\text{CH}_3\text{CO}}$		168.9		
NH ₂ , OH	7.10 (1H, s)			
	7.54 (1H, s)			

citostática [Kreuter et al., 1989], citotóxica [Teeyapant et al., 1993]), inhibidora de la actividad tirosina quinasa intrínseca del receptor del EGF (factor de crecimiento epidérmico) de células de cáncer de mama [Kreuter et al., 1990] y antiangiogénica [Rodríguez-Nieto et al., 2002]. Ha sido propuesta como una alomona que se libera enzimáticamente en cuanto la esponja es perturbada por los depredadores [Teeyapant and Proksch, 1993] y también se la ha producido tanto por cultivo *in vitro* de *Verongia aerophoba* [Kreuter et al., 1992] como por síntesis [Ogamino and Nishiyama, 2003].



13

Aeroplysinina-1

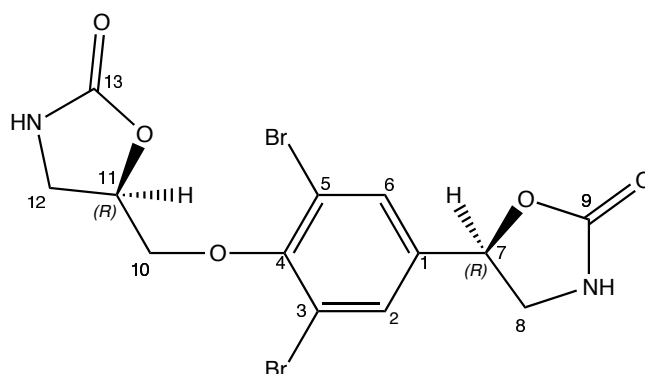
Tabla 1.8: Espectros de RMN de la aeroplysinina-1 (**13**).

Posición	¹ H-RMN (CDCl ₃)	¹³ C-RMN (CDCl ₃)
1		112.9
2	Sistema AB: δ _A = 2.82; δ _B = 2.94 J _{AB} = 17.7 Hz	25.4
1'		72.0
2'	4.40 (1H, s)	75.5
3'		117.1
4'		149.1
5'		119.3
6'	6.38 (1H, s)	131.8
OH	5.22 (0.5H, s)	
OCH ₃	3.80 (3H, s)	60.4

1.7. Aislamiento y elucidación estructural de verongiolido (**14**)

Verongiolido es un derivado de la oxazolidinona que se aisló de las fracciones eluidas con acetato de etilo (100%) y cristalizó en forma de agujas blancas dando un punto de fusión de 216-217°C, una rotación óptica de $[\alpha]_D^{20} = -20.18^\circ$ (c 0.75, MeOH) y un Rf = 0.29 en cromatografía de capa fina de sílica eluyendo con AcOEt/MeOH (9:1). Se purificó tras repetidas cromatografías en columna de SiO₂ con fase móvil de Hexano/AcOEt con proporción creciente en este último.

En el espectro IR se observa un pico muy intenso a 1213.03 cm⁻¹ (que atribuimos a la vibración de tensión de enlaces C–O) la cual, junto con la banda de tensión del carbonilo, centrada en 1770.00 cm⁻¹ informan de la presencia de un sistema carbamato (–NH–CO–O–) cíclico. También se encontraron señales menos intensas en 3696.41, 3563.00 y 3470.00 (estas dos últimas atribuibles a la vibración de tensión de los enlaces N–H), 3026.22 (tensión =C–H de anillos aromáticos), 1223.53, 788.07, 730.36 y 672.65 (tensión de enlaces C–Br).



14

Figura 1.13: Verongiolido

La fórmula molecular de la oxazolidinona (**14**), $C_{13}H_{12}Br_2N_2O_5$ se elucidó por medio de su espectro de masas de alta resolución que dio un pico atribuible al ion molecular a m/z 433.896149 (calc. 433.911294). La presencia de dos bromos quedó manifiesta por la forma de triplete de las señales, originada por sus isótopos 79 y 81. Las fragmentaciones lógicas del compuesto se muestran en la Figura 1.14, las cuales se confirman por alta resolución. Así, por ejemplo, un pico a m/z 290.872223 corresponde a la fórmula $C_8H_5ON_79Br_{81}Br$, para el que la masa teórica sería 290.871740. Sobresale en el esquema de fragmentaciones el pico base a m/z 278.87/280.87/282.87 que asignamos al lógico y estable catión bencílico $[Br_2C_6H_2(OH)CHOH]^+$.

El espectro de ^{13}C -RMN (Tabla 1.9), por medio del experimento DEPT, informa de la presencia tres metilenos (δ 41,5; 47,3; 73,3), tres metinos (δ 73,9; 74,7; 130,7) y seis carbonos cuaternarios (δ 117,9; 130,7; 139,2; 152,0; 158,5; 158,8). La señal a δ 117,9 ppm informa de dos carbonos aromáticos equivalentes, sustituidos con bromo, y la señal a δ 130,7 de otros dos carbonos aromáticos equivalentes, ahora sustituidos por hidrógeno. El resto de las señales concuerdan totalmente con los descritos en la bibliografía [Kossuga et al., 2004].

De nuevo, una señal del espectro 1H -RMN en δ 7,70 ppm informa de dos protones aromáticos sobre un anillo simétrico. Para observar la señal de las aminas se realizaron los espectros 1H -RMN con dos disolventes diferentes (DMSO- d_6 , 500 MHz; y CD_3OD , 300 MHz) que, efectivamente, aparecen en el espectro de protón en DMSO- d_6 como dos singletes a δ 7,59 y 7,74 ppm. En la Figura 1.15 se comparan ambos espectros y en la Tabla 1.9 se resumen los datos de RMN, tanto de 1H como ^{13}C . Obsérvese que las asignaciones vienen corroboradas por la espectroscopía de RMN en dos dimensiones (*ver anexos*). Así, el espectro COSY-90 informa de que hay correlación entre los dos hidrógenos en el C-8, y entre éstos y el protón en C-7, así como correlación del protón sobre C-11 y los protones sobre C-10 por un lado y sobre C-12 por otro; también entre los protones aromáticos, sobre C-2 y C-6 y el protón bencílico sobre C-7. En el espectro TOCSY se observan las mismas correlaciones que en el COSY y, además, una correlación entre los metilenos sobre C-10 y C-12. En el espectro NOESY se ven las mismas correlaciones que en el TOCSY y, además, una correlación entre los

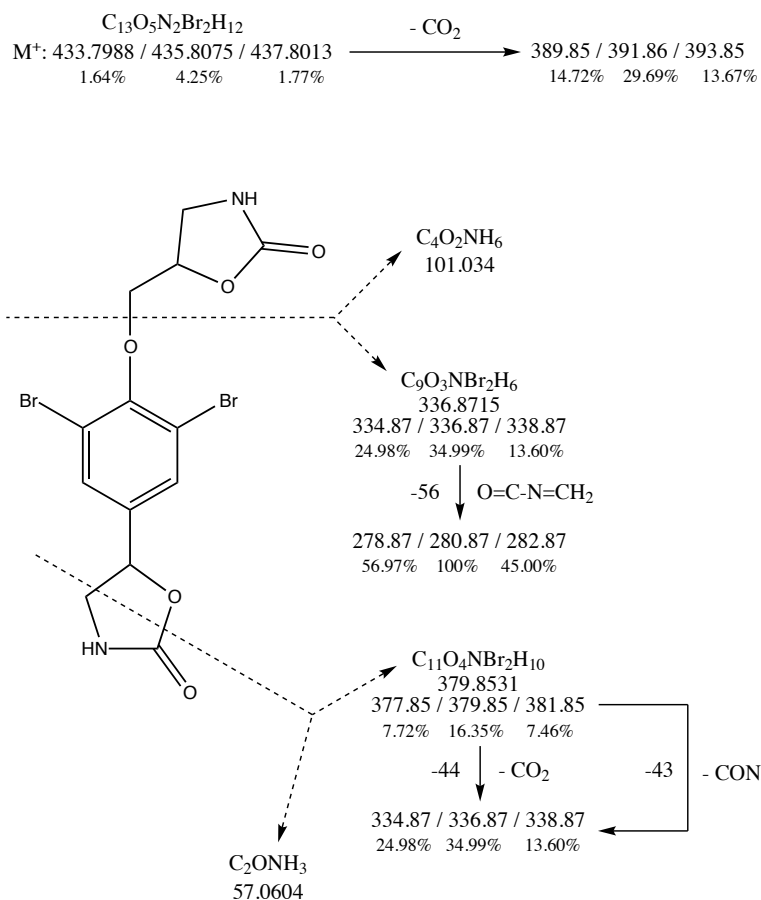


Figura 1.14: Fragmentaciones de verongiolido (14) en el espectrómetro de masas.

protones aromáticos sobre C-2 y C-6 y el protón sobre C-8, lo que demuestra que éstos están próximos en el espacio.

La comparación de estos datos con los aportados por la bibliografía [Norte et al., 1988] para el denominado (*R,R*)-5-[3,5-dibromo-4-(2-oxo-5-oxazolidinil) metoxifenil]-2-oxazolidinona de *Verongia aerophoba* confirma que dicho producto y nuestro verongiolido son la misma sustancia. Los datos obtenidos aquí son consistentes también con los publicados por diferentes autores [Borders et al., 1974],[Makarieva et al., 1981],[Aydogmus et al., 1999],[Kossuga et al., 2004] para hipotéticos estereoisómeros obtenidos de la ascidia *Clavelina oblonga* y de las esponjas *Verongia lacunosa*, *Aplysina cauliformis*, *Aplysina fistularis*, *Aplysina fulva*, *Aplysina archeri* y *Verongula rigida*.

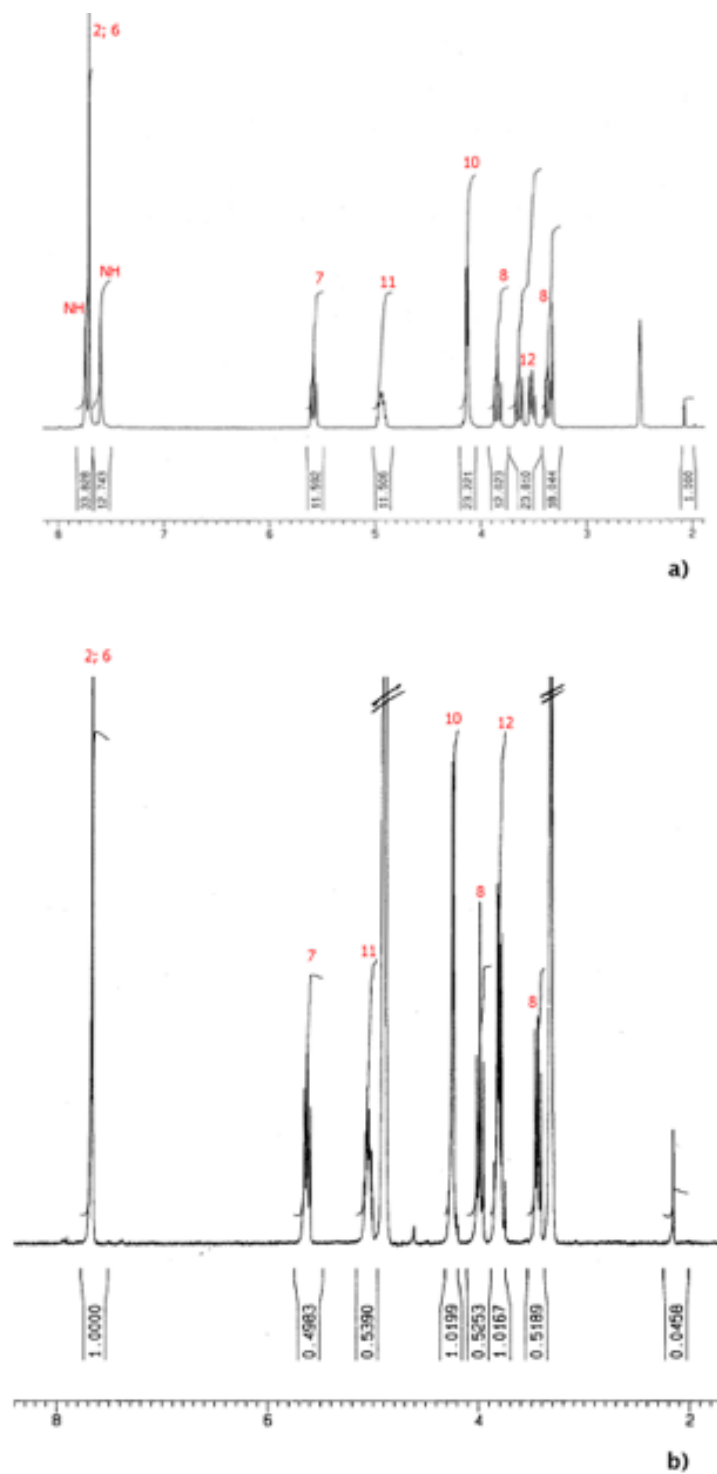


Figura 1.15: Comparación de los espectros ^1H -RMN de verongiolido (**14**) en dos disolventes diferentes: a) $\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz; b) CD_3OD , 300 MHz.

Tabla 1.9: Desplazamientos químicos (δ en ppm, J en Hz) observados en los espectros RMN de verongiolido (**14**).

Posición	^1H -RMN (300 MHz)		^{13}C -RMN (75 MHz)
	δ_H (DMSO- d_6)	δ_H (CD $_3$ OD)	δ_C (DMSO- d_6)
1			139.2 (C)
2	7.70 (2H, s)	7.66 (1H, s)	130.7 (CH)
3			117.9 (C)
4			152.0 (C)
5			117.9 (C)
6	7.70 (2H, s)	7.66 (1H, s)	130.7 (CH)
7	5.58 (1H, dd, $J = 9.0, J = 8.0$)	5.62 (1H, dd, $J = 8.7, J = 7.1$)	74.7 ^a (CH)
8	3.36 (1H, dd, $J = 8.5, J = 8.0$) 3.84 (1H, dd, $J = 9.0, J = 8.5$)	3.43 (1H, dd, $J = 9.3, J = 7.1$) 3.98 (1H, dd, $J = 9.3, J = 8.7$)	41.5 (CH $_2$)
9			158.8 ^b (C)
10	4.12 (2H, d, $J = 4.4$)	4.23 (2H, m)	73.3 (CH $_2$)
11	4.94 (1H, dddd, $J = 9.0, J = 6.7,$ $J = 4.4, J = 4.4$)	5.04 (1H, m)	73.9 ^a (CH)
12	3.51 (1H, dd, $J = 8.8, J = 6.7$) 3.64 (1H, dd, $J = 9.0, J = 8.8$)	3.80 (2H, m) 3.80 (2H, m)	47.3 (CH $_2$)
13			158.5 ^b (C)
NH	7.59 (1H, s) 7.74 (1H, s)		

^{a,b} Intercambiable

1.8. Aislamiento y elucidación estructural de la 11-*epi*-fistularina-3 (**15**).

La 11-*epi*-fistularina-3 (**15**) se aisló de la fracción eluida con Hexano/AcOEt 30:70 como un sólido amorfo amarillento soluble en metanol y fue purificada tras repetidas cromatografías en columna de SiO $_2$ usando como fase móvil Hexano/AcOEt con polaridad creciente. Su punto de fusión fue de 125.9°C y su rotación óptica de $[\alpha]_D^{20} = +60^\circ$ (c 1.1, MeOH), datos que lo identifican con el producto aislado por König y Wright de *Agelas oroides* [König and Wright, 1993] y con el aislado por Aydogmus y col. de *Verongia aerophoba* [Aydogmus et al., 1999].

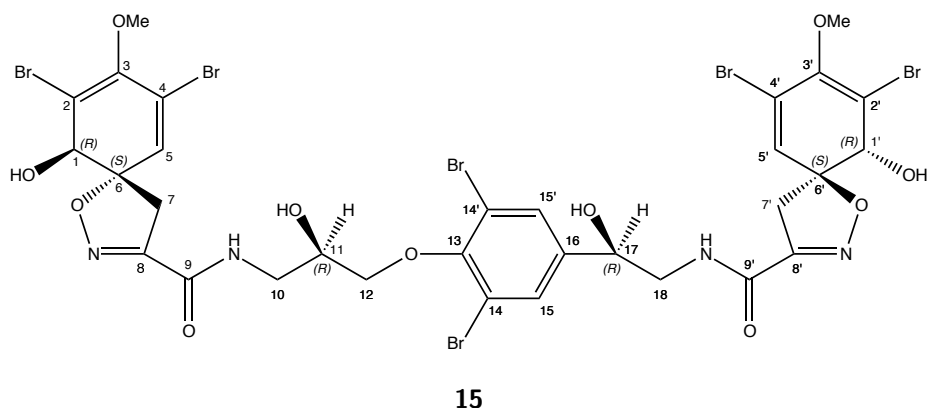


Figura 1.16: Estructura de la (11*R*, 17*R*)-11-*epi*-fistularina-3

A pesar de que en el espectro de masas no se observó el pico del ion molecular, se estableció la fórmula molecular $C_{31}H_{30}Br_6N_4O_{11}$ por suma de los fragmentos que sí se observan según se indica en la Figura 1.17. Obsérvese que esta fórmula supone dieciséis insaturaciones. Obsérvese también que a cada uno de los fragmentos se le han asignado dos átomos de bromo debido a que en el espectro de masas se detectaron las señales adicionales originadas por los isótopos de bromo con intensidades relativas que indican la presencia de dos bromos, es decir, tres señales separadas las unas de las otras por dos unidades de masa con unas intensidades relativas de aproximadamente 1/2/1. Así, por ejemplo, se observa una tríada a m/z 331.85 (0.68 %), 333.85 (1.17 %) y 335.85 (0.48 %), además de las especificadas en la Figura 1.17. Obsérvese que este esquema de fragmentación viene apoyado por los datos obtenidos por alta resolución. Así, por ejemplo, un pico a m/z 348.875923 sólo puede corresponder a la fórmula $C_{10}O_3NH_{779}Br_{81}Br$, y otro a m/z 320.874931 a la fórmula $C_9O_2NH_{779}Br_{81}Br$, lo que demuestra que ambos están relacionados por la pérdida de monóxido de carbono (Figura 1.18).

El espectro de IR mostró bandas características de los grupos OH y NH (3597.21 y 3422.00 cm^{-1} , respectivamente), cadenas alifáticas a 2968.00, 2937.72 y 2865.89 cm^{-1} , carbonilos de amidas (1717.37 cm^{-1}), dobles enlaces (C=C y C=N) a 3030.00 y 1604.32 cm^{-1} y tensiones C–O y C–N a 1224.06, 1285.72 y 1537.52 cm^{-1} . Otras señales de la 'huella dactilar' de la molécula en CD_3OD aparecen a 1126.42; 1069.90; 1013.37; 910.60; 797.54; 730.00; 669.08 (C–Br) y 598.00 cm^{-1} .

Las señales que aparecen en el espectro de 1H -RMN a δ 7.60 corresponden a los protones del anillo aromático central bromado, mientras que la señal a δ 6.50 corresponde al protón del C-5 y también es característica de los grupos *1-hidroxi-2,4-dibromo-3-metoxi-8-carbamoil-espiro-ciclohexadienilisoaxazol* presentes en los metabolitos de la ruta de la dibromotirosina. El hecho de que tanto en el espectro de 1H -RMN en $DMSO-d_6$ como en CD_3OD aparezcan dos singletes duplicados (δ 6.56/6.58 en $DMSO-d_6$ y δ 6.41/6.42 en CD_3OD) nos informa de que se trata de un compuesto con dos sistemas espiránicos del tipo mencionado, ya que uno de los singletes correspondería al C-5 y el otro al C-5'. Un singlete que aparece a δ 3.64 en $DMSO-d_6$ y a δ 3.72 en CD_3OD que integra para 6

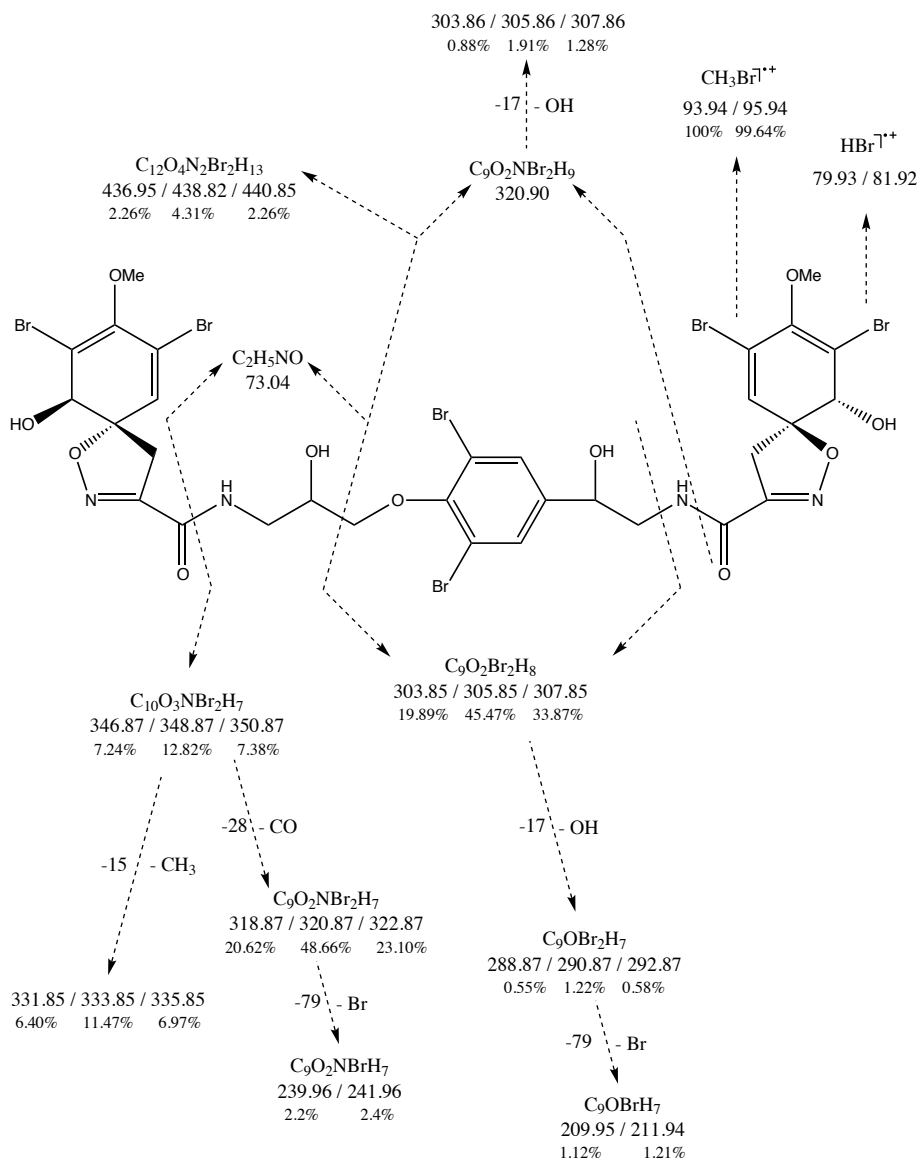


Figura 1.17: Fragmentaciones en espectrómetro de masas de la 11-*epi*-fistularina-3.

protones indica la presencia de dos grupos metoxilo. La razón de que los espectros de 1H -RMN se hayan realizado con dos disolventes diferentes (DMSO- d_6 y CD_3OD) se encuentra en el hecho de que el DMSO- d_6 permite observar la señal del protón de las amidas (NH) y los grupos hidroxilos por una parte y el CD_3OD permite ver parte del sistema AB de los metilenos correspondientes a las posiciones 7 y 7'. Obsérvese que las asignaciones realizadas en CD_3OD vienen corroboradas por los espectros COSY, TOCSY y NOESY. Así, por ejemplo, en el espectro TOCSY se observa correlación entre los protones de los dos sistema AB sobre C-7, entre el metileno sobre C-18 y el metino sobre C-17 y el metileno

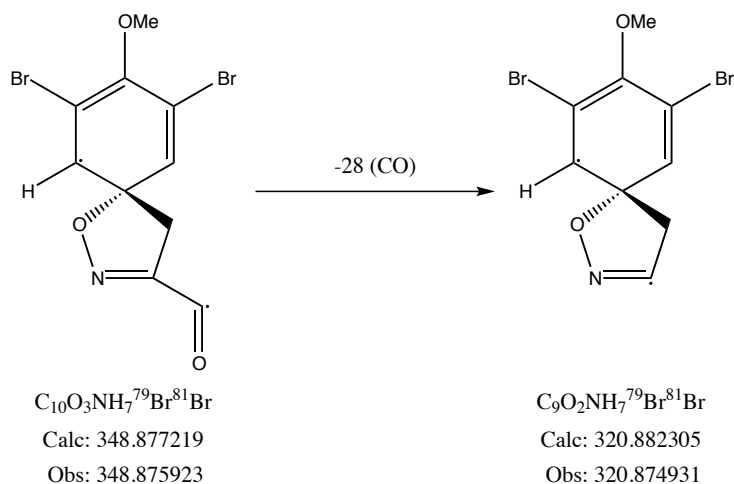


Figura 1.18: Espectrometría de masas de alta resolución de la 11-*epi*-fistularina-3.

sobre C-12 y el metino sobre C-11 por un lado y el metileno sobre C-10 por otro. En el espectro COSY se observan las mismas correlaciones excepto la del metileno sobre C-10 con el metileno C-12. En el espectro NOESY se observa correlación entre los protones sobre C-7 entre sí, al igual que entre los que están sobre C-7', entre los dos protones sobre C-10 entre sí y entre los dos protones sobre C-18 entre sí. También entre los protones aromáticos sobre C-15 y C-15' y el metino sobre C-17; también entre los protones olefínicos sobre C-5 y C-5' y los protones orientados hacia el mismo lado de los metilenos sobre C-7 y C-7' ($\delta_A = 3.06$ y $\delta_{A'} = 3.12$ en CD_3OD).

Algunos detalles como las constantes de acoplamiento de los diferentes sistemas de spin se pudieron medir en el espectro en Cl_3CD a 300 MHz. Así, en dicho espectro se observan cuatro señales a δ 3.91651; 3.85488; 3.04100; 2.97937 que en conjunto conforman un sistema AB. Tratadas matemáticamente como procede nos lleva a los siguientes datos para el metileno C-7:

$$\delta_A = 3.01; \delta_B = 3.88; J_{AB} = 18.5 \text{ Hz}$$

Análogamente, otras cuatro señales a δ 3.89054; 3.82917; 3.02510; 2.96351 conforman un sistema A'B' que tratadas de la misma forma nos dan los siguientes datos sobre el metileno C-7':

$$\delta_{A'} = 2.99; \delta_{B'} = 3.86; J_{A'B'} = 18.5 \text{ Hz}$$

Similarmente, el metino C-17 y el metileno C-18 conforman un sistema ABX típico cuyo análisis nos deja los siguientes datos:

$$\delta_X = 4.75; \delta_A = 3.53; \delta_B = 3.65;$$

$$J_{AX} = 8.07 \text{ Hz}, J_{BX} = 3.36 \text{ Hz}, J_{AB} = 13.93 \text{ Hz}$$

Por otro lado, el espectro de ^{13}C -RMN nos confirmó la presencia de dos metoxilos (δ 58.84) y, además, nos informó de la presencia de cuatro metilenos (δ

38.5, 42.2, 46.1 y 74.2), seis metinos (δ 68.4, 70.0, 73.8, 130.2, 130.5 y 130.6) y doce carbonos cuaternarios (δ 90.7; 90.9; 112.5; 117.3; 121.2; 141.5; 147.7; 148.1; 151.6; 153.5; 153.6 y 160.2) en el esqueleto carbonado. Cabe destacar que las señales que aparecen con desplazamientos químicos muy próximos en el espectro de ^{13}C -RMN en $\text{DMSO}-d_6$ (δ 90.7/90.9; 147.7/148.1; 130.5/130.6 y 153.5/153.6) corresponden a carbonos del sistema *espiro-ciclohexadienilisoaxolina*, lo que nos confirma que la molécula contiene dos grupos espiránicos de ese tipo. Por otra parte, es característica la señal de los carbonos bromados del anillo aromático (δ 117.3), que nos confirma que estamos ante un metabolito derivado de la dibromotirosina.

La comparación (Tabla 1.10) de los desplazamientos químicos observados en los espectros de ^{13}C -RMN de la 11-*epi*-fistularina-3 descrita en la bibliografía [König and Wright, 1993] y nuestro producto nos confirma que ambos son el mismo. La observación de dos únicas señales para los carbonos estereogénicos, C-11 y C-17, tanto en CD_3COCD_3 como en $\text{DMSO}-d_6$ y en CD_3OD (Tabla 1.10, Tabla 1.11 y Tabla 1.12, respectivamente) revelan que nuestro producto es de alta pureza enantiomérica.

Por otra parte, la 11-*epi*-fistularina-3 (**15**) se acetiló por tratamiento con piridina y anhídrido acético (1:2) para dar un tetraacetato, el cual también se purificó por cromatografía en columna de SiO_2 eluyendo con mezclas de *n*-Hexano y acetato de etilo con proporción creciente del último. También se realizaron estudios espectroscópicos para el derivado acetilado de Fistularina-3. El espectro de ^1H -RMN muestra la presencia de cuatro grupos acetilo a través de un intenso singlete centrado en δ 2.15 ppm –la curva integral para esta señal es el doble de la del singlete producido por los dos grupos metoxilo–.

Las moléculas de alto peso molecular, como la 11-*epi*-fistularina-3 (**15**) se forman por oxidación del grupo α -amino de la dibromotirosina hasta a cetooxima seguido de la oxidación del anillo aromático implicando un arenoepóxido que sufre apertura intramolecular dando el sistema *espiroisoxazolínico* (Figura 1.19).

El primer producto aislado de este tipo fue la fistularina-3, encontrada en 1979 en *Aplysina fulva* [Gopichand and Schmitz, 1979]. Posteriormente se describe el aislamiento de la 11-*epi*-fistularina-3 (**15**) de una esponja no-verongida, *Agelas oroides* [König and Wright, 1993]. La configuración absoluta de los dos alcoholes secundarios, los centros estereogénicos C11 y C17 no se había abordado hasta que Rogers y col [Rogers et al., 2005] elucidaron la esteoquímica del C-11 por un análisis denominado LCMS-Marfey's, deduciendo que la fistularina-3 es 11*S* y la 11-*epi*-fistularina-3 es la 11*R*. Esto nos fija la configuración en C-11 para nuestra molécula (11*R*). Queda, pues, por abordar la configuración absoluta en C-17. En este estudio, en el que por primera vez se describe la 11-*epi*-fistularina-3 en *V. aerophoba*, hemos planteado una correlación biogénica de esta molécula con el verongiolido (**14**), en el que se encuentran los mismos centros quirales conservados (Figura 1.20) y, por ello, proponemos para el C-17 la misma configuración que para el verongiolido, es decir, R. Apoyando esta conclusión, podemos citar al grupo de Proksch [Ebel et al., 1997] quienes describieron que las esponjas *Aplysina spp.* liberan verongiolido por una fragmentación química espontánea de fistularina-3 que es inducida por daños en el tejido y catalizada por un enzima aún no definido.

La extrapolación de estos razonamientos nos lleva a proponer para la descrita hemifistularina-3 [Mancini et al., 1993] la estereofórmula **16**, con el centro quiral

Tabla 1.10: Desplazamientos químicos (δ , ppm) observados en los espectros de ^{13}C -RMN de la (11*R*, 17*R*)-11-*epi*-fistularina-3 (**15**) y la 11-*epi*-fistularina-3 descrita en la bibliografía [König and Wright, 1993] en acetona- d_6 .

Posición	^{13}C -RMN (75 MHz) de (11 <i>R</i> , 17 <i>R</i>)-11- <i>epi</i> -fistularina-3 (15)	^{13}C -RMN (75 MHz) de 11- <i>epi</i> -fistularina-3 en la bibliografía [König and Wright, 1993]
1,1'	75.0; 75.1 (CH)	75.0; 75.1 (CH)
2,2'	122.0; 122.1 (C)	122.0; 122.1 (C)
3,3'	148.6; 148.6 (C)	148.6; 148.6 (C)
4,4'	113.8; 113.8 (C)	113.7; 113.7 (C)
5,5	132.1; 132.2 (CH)	132.0; 132.1 (CH)
6,6'	91.7; 91.7 (C)	91.8; 91.8 (C)
7,7'	39.9; 39.9 (CH ₂)	39.8; 39.9 (CH ₂)
8,8'	155.0; 155.1 (C)	154.9; 155.0 (C)
9,9'	160.2; 160.4 (C)	160.4; 160.5 (C)
10	43.4 (CH ₂)	43.4 (CH ₂)
11	69.7 (CH)	69.7 (CH)
12	75.8 (CH ₂)	75.7 (CH ₂)
13	152.5 (C)	152.5 (C)
14,14'	118.3; 118.3 (C)	118.3; 118.3 (C)
15,15'	131.4; 131.4 (CH)	131.3; 131.3 (CH)
16	143.1 (C)	142.9 (C)
17	71.3 (CH)	71.3 (CH)
18	47.5 (CH ₂)	47.5 (CH ₂)
OMe	60.2; 60.2 (CH ₃)	60.2; 60.2 (CH ₃)

en C-7 con configuración *R*. La coincidencia de sus datos espectroscópicos con los de la parte correspondiente de nuestra (11*R*, 17*R*)-*epi*-fistularina-3 parece apoyar esta propuesta.

Tabla 1.11: Desplazamientos químicos (δ , ppm) observados en los espectros de RMN de la (11*R*, 17*R*)-11-*epi*-fistularina-3 (**15**) DMSO- d_6 .

Posición	^1H -RMN (300 MHz)	^{13}C -RMN (75 MHz)
1,1'	3.91 (2H, s)	73.8 (CH)
2,2'		112.5 (C)
3,3'		147.7; 148.1 (C)
4,4'		121.1 (C)
5,5	6.56 (1H, s); 6.58 (1H, s)	130.5; 130.6 (CH)
6,6'		90.7; 90.9 (C)
7,7'	Solapado	38.5 (CH ₂)
8,8'		153.5; 153.6 (C)
9,9'		160.4; 160.2 (C)
10	Solapado	42.2 (CH ₂)
11	4.06 (1H, m)	68.4 (CH)
12	3.83 (2H, m)	74.2 (CH ₂)
13		151.6 (C)
14,14'		117.3 (C)
15,15'	7.59 (1H, s); 7.58 (1H, s)	130.2 (CH)
16		141.5 (C)
17	4.68 (1H, m)	70.0 (CH)
18	3.30 (2H, m)	46.1 (CH ₂)
3,3'-OMe	3.64 (6H, s)	58.8 (CH ₃)
1,1'-OH	7.80 (2H, s)	
11-OH, 17-OH	5.37 (2H, s)	
NH	8.41 (2H, m)	

Tabla 1.12: Desplazamientos químicos (δ , ppm) observados en los espectros de RMN de la (11*R*, 17*R*)-11-*epi*-fistularina-3 (**15**) CD₃OD.

Posición	¹ H-RMN (400 MHz)	¹³ C-RMN (100 MHz)
1,1'	4.11 (2H, s)	73.8 (CH)
2,2'		112.5 (C)
3,3'		147.7; 148.1 (C)
4,4'		121.2 (C)
5,5	6.41 (1H, s); 6.42 (1H, s)	130.5; 130.6 (CH)
6,6'		90.7; 90.9 (C)
7,7'	Sistema AB, $\delta_A = 3.06$, $\delta_B = \text{solapado}$, $J = 19.4$ Hz Sistema A'B', $\delta_{A'} = 3.12$, $\delta_{B'} = \text{solapado}$, $J = 19.4$ Hz	38.5 (CH ₂)
8,8'		153.5; 153.6 (C)
9,9'		160.1; 160.2 (C)
10	3.82 (1H, m), 3.54 (1H, m)	42.1 (CH ₂)
11	4.18 (1H, m)	68.4 (CH)
12	4.03 (2H, m)	74.2 (CH ₂)
13		151.6 (C)
14,14'		117.3 (C)
15,15'	7.62 (1H, s), 7.61 (1H, s)	130.2 (CH)
16		141.5 (C)
17	4.75 (1H, m solapado con la señal del metanol)	70.0 (CH)
18	3.30 (1H, m), 3.63 (1H, m)	46.1 (CH ₂)
3,3'-OMe	3.72 (6H, s)	58.8 (CH ₃)
NH	7.60 (1H, m)	
NH	7.36 (1H, m)	

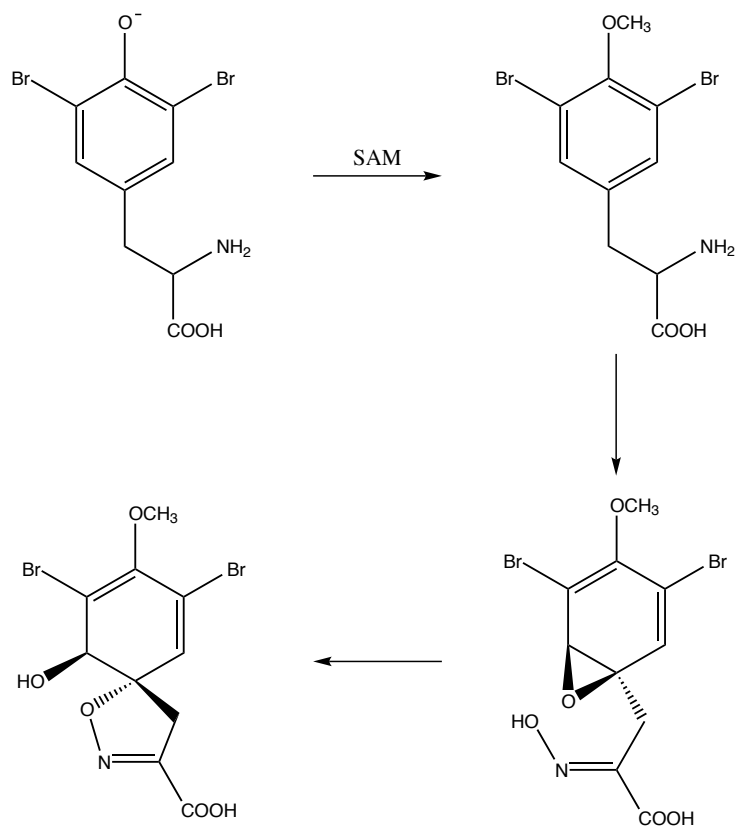


Figura 1.19: Ruta biogénica de la dibromotirosina y formación del sistema espiroisoxazolinico. (SAM=S-adenosilmetionina)

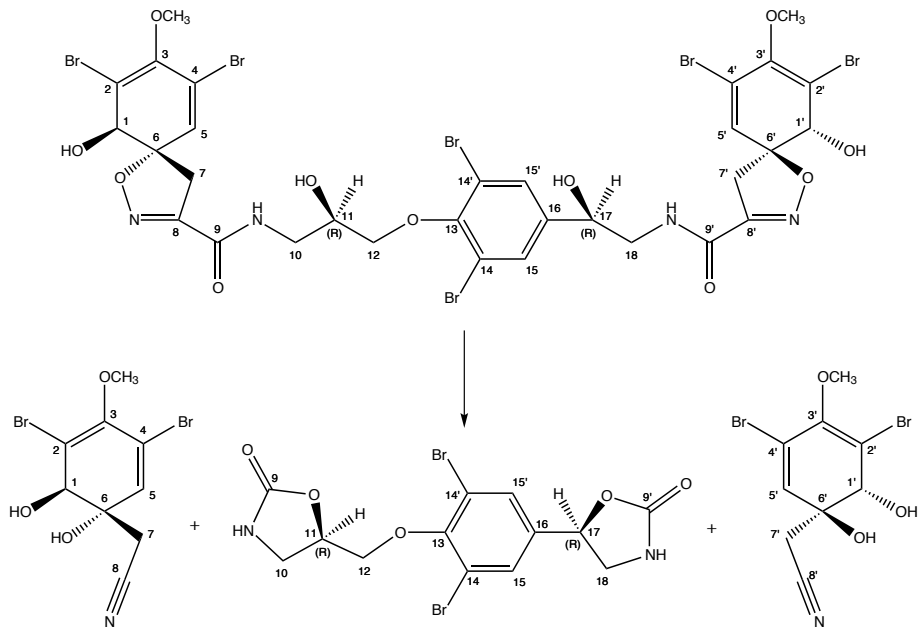
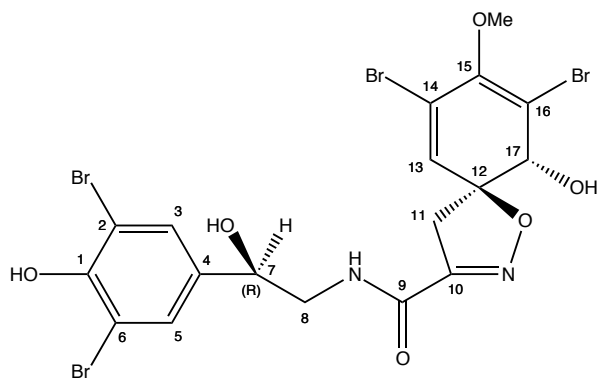


Figura 1.20: Correlación de la 11-*epi*-fistularina-3 con verongiolido (1 mol) y aeroplysinina (2 moles). Obsérvese que los centros quirales 11*R* y 17*R* se conservan en la degradación enzimática de la primera.

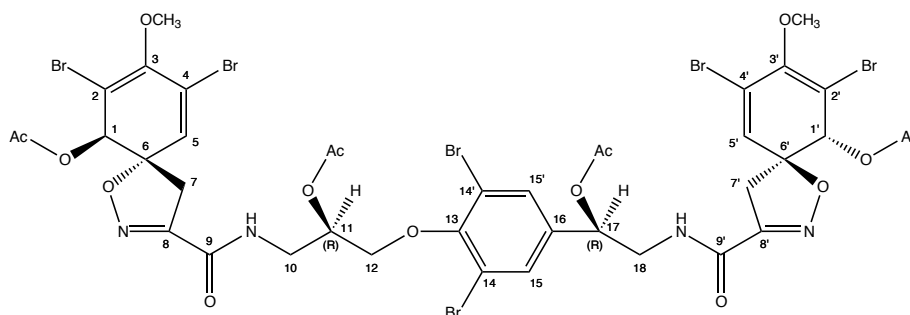


16

Estructura de la (7*R*)-hemifistularina-3

Estudio por ^1H -RMN en dos dimensiones del tetraacetato de (11*R*,17*R*)-*epi*-fistularina-3 (17).

Al objeto de confirmar la estructura asignada se procedió a un estudio por RMN de protón en dos dimensiones del tetraacetato de (11*R*,17*R*)-*epi*-fistularina-3 (17), observándose los datos que se resumen en la Tabla 1.13. Es digno de resaltar que el metino C-11 se correlaciona en el espectro NOESY sólo con uno de los dos protones sobre C-10 y, evidentemente el que está del mismo lado en el espacio. Este hecho apoya la idea de que se da una alta pureza enantiomérica en el mencionado centro quiral, el carbono 11.



17

Estructura del tetraacetato de (11*R*,17*R*)-*epi*-fistularina-3

Tabla 1.13: ^1H -RMN del tetraacetato de (11*R*,17*R*)-*epi*-fistularina-3 (**17**) y correlaciones observadas en los espectros COSY, TOCSY y NOESY.

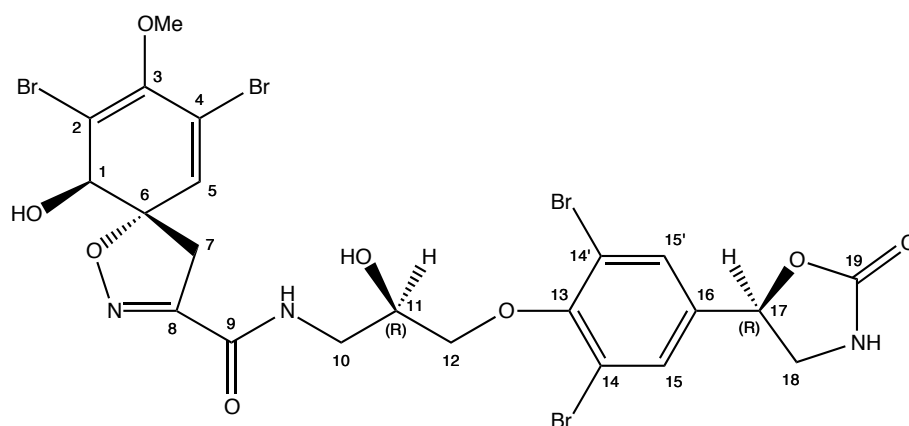
Posición	^1H -RMN, δ_H (300 MHz), Cl_3CD	COSY	TOCSY	NOESY
1,1'	5.86 (1H, s) 5.82 (1H, s)			H1,1'
5,5'	6.33 (2H, s)			
7a/b	Sistema AB $\delta_A = 3.08$ $\delta_B = 3.46$ $J_{AB} = 18.4 \text{ Hz}$	H7b/a		
7'a/b	Sistema A'B' $\delta_{A'} = 3.09$ $\delta_{B'} = 3.46$ $J_{A'B'} = 18.4 \text{ Hz}$	H7'b/a		
10a	3.79 (1H, m)	H10b, NH, H11a/b	H11a/b	
10b	4.00 (1H, m)	H10a, NH, H11a/b	H11a/b	
11	5.28 (1H, m)	H10a/b, H12	H12, H10a/b	H10a, H12
12a/b	4.22 (2H, m)	H11	H11, NH	
15,15'	7.51 (2H, s)			H17
17	5.74 (1H, dd, $J = 3.7 \text{ Hz}$, $J = 8.6 \text{ Hz}$)	H18a/b	H18a/b	
18a	3.53 (1H, m)	H18b, H17, N'H	H17	H18b
18b	3.78 (1H, m)	H18a, H17, N'H	H17	H18a
OMe	3.77 (6H, s)			
OAc	2.15 (12H, s)			
NH	7.10	H10a/b	H11, H12	
N'H	6.86	H18a/b	H17, H18	

1.9. Aislamiento y elucidación estructural de la (11*R*,17*R*)-fistularina-1(**18**).

La (11*R*,17*R*)-fistularina-1 (**18**) se aisló de la fracción eluida con Hexano/AcOEt como un sólido amorfo y fue purificada por cromatografía en columna de gel de sílice con polaridad creciente de la mencionada mezcla eluyente. Su punto de fusión resultó ser de 108°C (a los 96°C sufre un cambio de aspecto).

El espectro de masas mostró el ión molecular con un ión sodio añadido en forma de un quintuplete que delata cuatro bromos, según se especifica en la Tabla 1.14. Obsérvese que este ión molecular es, además, el pico base.

También se observaron los fragmentos indicados en la Figura 1.24, todo lo



18

(11*R*,17*R*)-fistularina-1

Tabla 1.14: El ión molecular de la (11*R*,17*R*)-fistularina-1 (**18**) observado en el espectrómetro de masas (muestra inyectada con NaCl).

Ión observado (<i>m/z</i>)	Intensidad (%)	Fórmula
793.8006	11.90	C ₂₂ H ₂₁ ⁷⁹ Br ₄ N ₃ O ₈ Na
795.7783	74.22	C ₂₂ H ₂₁ ⁷⁹ Br ₃ ⁸¹ BrN ₃ O ₈ Na
797.7776	100.00 (pico base)	C ₂₂ H ₂₁ ⁷⁹ Br ₂ ⁸¹ Br ₂ N ₃ O ₈ Na
799.7775	81.60	C ₂₂ H ₂₁ ⁷⁹ Br ⁸¹ Br ₃ N ₃ O ₈ Na
801.7908	29.06	C ₂₂ H ₂₁ ⁸¹ Br ₄ N ₃ O ₈ Na

cual nos conduce a la fórmula molecular C₂₂H₂₁Br₄N₃O₈. De nuevo se observaron fragmentos con las tres señales de los isótopos 79 y 81 del bromo en la proporción que implica dos bromos para cada fragmento, es decir, tripletes separados por dos unidades de masa con intensidades relativas 1:2:1.

En el espectro IR se observan las bandas de tensión de los grupos carbonilo del grupo oxazolidona, a 1739.54 y la amida α,β -insaturada a 1712.41 cm⁻¹, así como picos a 3618.17 (OH libre), 3031.72 (tensión =C-H), 2933.98 y 2857.96 (tensión C-H), 1603 (tensión C=C) y la 'huella dactilar' a 1544.20; 1462.80; 1234.90; 1175.21; 779.10 y 735.69 cm⁻¹.

En el espectro de ¹H-RMN se observa una señal a δ 7.69 ppm que, como hemos dicho, corresponde a los dos protones de anillos aromático y una señal a δ 6.58 ppm que corresponde al protón olefínico sobre C-5. Además, el singlete que aparece a δ 3.63 y tiene una curva integral proporcional a 3 protones, la hemos asignado a los 3H de un grupo metoxilo. Para poder observar la señal del protón de las amidas se realizaron los espectros de ¹H-RMN en diferentes disolventes diferentes (DMSO-d₆, Cl₃CD y CD₃OD). Obsérvese en la Tabla 1.15 la correspondencia que hay entre las señales en los tres disolventes.

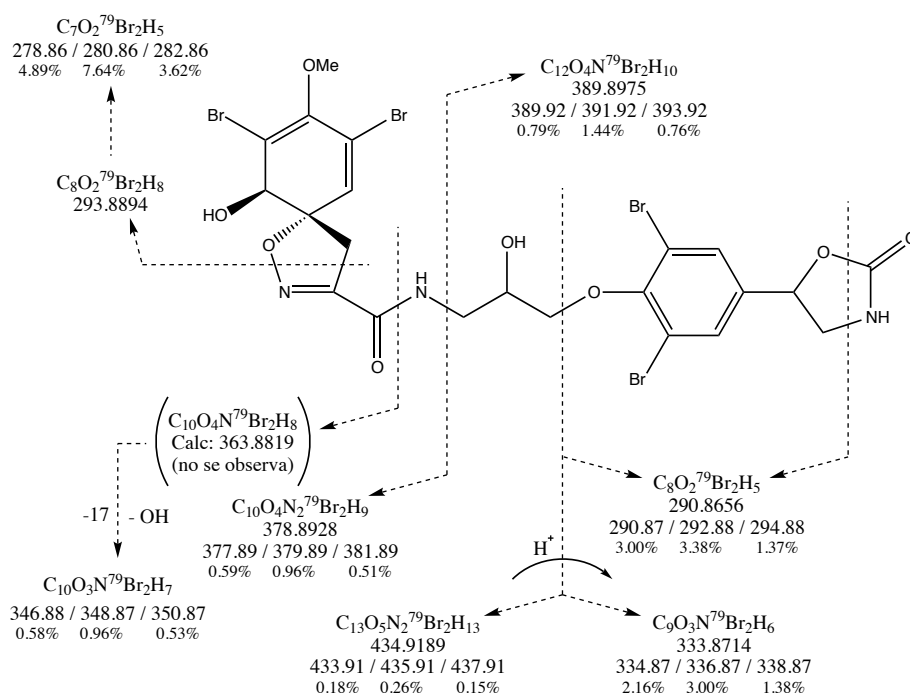


Figura 1.24: Fragmentaciones de la (11*R*,17*R*)-fistularina-1 (**18**) en el espectrómetro de masas.

Tabla 1.15: Desplazamientos químicos (δ , ppm) observados en los espectros RMN de la (11*R*,17*R*)-fistularina-1 (**18**).

Posición	¹ H-RMN		¹³ C-RMN	
	δ_H DMSO-d ₆ (300 MHz)	δ_H CDCl ₃ (500 MHz)	δ_H CD ₃ OD (300 MHz)	δ_C DMSO-d ₆ (75 MHz) δ_C CD ₃ OD (75 MHz)
1	Solapado	4.43 (1H, s)	4.11 (1H, d) <i>J</i> = 0.7 Hz	75.7 75.6 (CH)
2				113.3 113.0 (C)
3				147.4 147.0 (C)
4				121.1 121.2 (C)
5	6.58 (1H, s)	6.34 (1H, s)	6.41 (1H, d) <i>J</i> = 0.7 Hz	131.4 130.6 (CH)
6				90.5 90.9 (C)
7	Solapado	Sistema AB $\delta_A = 3.02$; $\delta_B = 3.96$ <i>J</i> _{AB} = 18.5 Hz	Sistema AB $\delta_A = 3.10$; $\delta_B = 3.80$ <i>J</i> _{AB} = 18.4 Hz	Solapada 38.5 (CH ₂)
8				154.7 153.6 (C)
9				159.3 160.0 (C)
10	Solapado	3.49 (1H, dd) <i>J</i> = 6.8 Hz; <i>J</i> = 8.9 Hz 3.49 (1H, dd) <i>J</i> = 6.8 Hz; <i>J</i> = 5.8 Hz	3.53 (1H, m) 3.75 (1H, m)	42.8 42.1 (CH ₂)
11	Solapado	4.23 (1H, m)	4.25 (1H, m)	68.2 68.4 (CH)

Tabla 1.15: Desplazamientos químicos (δ , ppm) observados en los espectros RMN de la (11*R*,17*R*)-fistularina-1 (**18**).

Posición	¹ H-RMN			¹³ C-RMN	
	δ_H DMSO-d ₆ (300 MHz)	δ_H CDCl ₃ (500 MHz)	δ_H CD ₃ OD (300 MHz)	δ_C DMSO-d ₆ (75 MHz)	δ_C CD ₃ OD (75 MHz)
12	Solapado	4.06 (2H, m)	4.05 (2H, m)	74.7	74.3 (CH ₂)
13				152.6	153.0 (C)
14,14'				118.0	117.9 (C)
15,15'	7.69 (2H, s)	7.54 (2H, s)	7.64 (2H, s)	130.7	129.8 (CH)
16				138.9	138.5 (C)
17	5.57 (1H, dd) $J = 7.6$ Hz; $J = 7.9$ Hz	5.54 (1H, dd) $J = 7.0$ Hz; $J = 8.4$ Hz	5.62 (1H, dd) $J = 7.1$ Hz; $J = 8.8$ Hz	73.8	73.8 (CH)
18	Solapado	3.59 (1H, dd) $J = 7.0$ Hz; $J = 8.5$ Hz 3.99 (1H, dd) $J = 8.4$ Hz; $J = 8.5$ Hz	3.44 (1H, dd) $J = 7.1$ Hz; $J = 9.2$ Hz 3.99 (1H, dd) $J = 8.8$ Hz; $J = 9.2$ Hz	47.3	47.3 (CH ₂)
19				158.5	158.3 (C)
OMe	3.64 (3H, s)	3.76 (3H, s)	3.73 (3H, s)	59.8	58.9 (CH ₃)
1-OH, 11-OH	5.21 (1H, s)				
NH	8.39 (2H, t)				

La asignación de los picos fue asistida por la espectroscopía de RMN en dos dimensiones. Así, en el espectro TOCSY se observa correlación entre los protones sobre C-15 y el metino C-17, así como entre los protones sobre C-1 y C-5, el metino C-17 y los dos protones sobre C-18, los dos protones sobre C-18 entre sí, el metileno sobre C-12 y el metino C-11, el metileno C-12 y ambos protones sobre C-10, los dos protones sobre C-10 y el metino C-11 y los dos protones sobre C-10 entre sí. Finalmente, entre los dos protones del sistema AB sobre C-7. En el espectro COSY se observan las mismas correlaciones que en el TOCSY excepto la de los metilenos C-10 y C-12. En el espectro NOESY se observa correlación entre los hidrógenos sobre C-15/C-15' y el metino C-17, así como entre este último y los dos protones sobre C-18, entre los dos protones sobre C-7, entre los dos protones sobre C-10, entre los dos protones sobre C-18 y entre el metino C-11 y el metileno C-12. En el espectro ROESY se observa correlación entre el metino C-17 y el metileno C-18, entre los dos protones sobre C-18 entre sí, entre los dos protones sobre C-10 entre sí y entre los dos protones sobre C-7 entre sí.

Los espectros de ^{13}C -RMN y DEPT indican la presencia de un metoxilo (δ 58.9), cuatro metilenos (δ 38.5; 42.1; 47.3; 74.3), cinco metinos (δ 68.4; 73.8; 75.6; 129.8; 130.6) y diez carbonos cuaternarios agrupados en siete señales (δ 90.9; 113.0; 117.9; 121.2; 138.5; 147.0; 153.0; 153.6; 158.3; 160.0). De nuevo se observa la señal de los carbonos aromáticos sustituidos con bromo (δ 117.9 ppm), característica de los metabolitos derivados de la dibromotirosina.

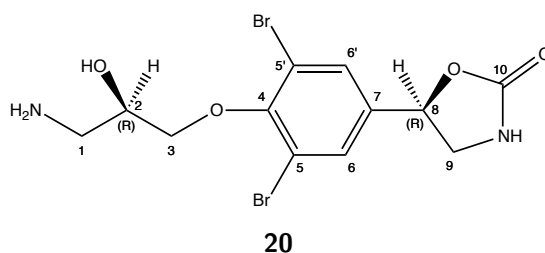
La (11*R*,17*R*)-fistularina-1 (**18**) se acetila en frío con piridina y anhídrido acético para dar su derivado diacetilado. El espectro de ^1H RMN del producto obtenido muestra la presencia de dos grupos acetoxi mediante dos singletes a δ 2,18 y 2,15, respectivamente cuyas curvas integrales sumadas son el doble de la mostrada por el singlete originado por el grupo metoxilo. Al mismo tiempo, los metinos C-1 y C-11, geminales a ambos grupos acetoxi, sufren los previstos desplazamientos paramagnéticos apareciendo ahora a δ 5.86 (singlete) y 5.28 (multiplete), respectivamente. Otras señales características de este diacetato son las que aparecen en el espectro a δ 6.32 (1H, s, =CH), un sistema AB originado por el metileno sobre C-7 a $\delta_A = 3.08$ y $\delta_B = 3.46$ ($J_{AB} = 18.0$ Hz), dos protones aromáticos a δ 7.55 y el metino bencílico en C-17 a δ 5.54 (t, $J = 7.9$ Hz).

La comparación de estos datos con los aportados en la bibliografía [Gopichand and Schmitz, 1979] para la denominada fistularina-1 (sin configuración asignada en C-1, C-6, C-11 y C-17) nos confirma que ambas deben de ser la misma molécula. Dado que está biogenéticamente correlacionada con verongiolido (**14**), y la 11-*epi*-fistularina-3 (**15**) donde sí se ha esclarecido la configuración absoluta de los cuatro centros estereogénicos (1*R*, 6*S*, 11*R*, 17*R*), deducimos que nuestra fistularina-1 debe de ser 1*R*, 6*S*, 11*R* y 17*R*, pues el mecanismo de reacción que lleva de este metabolito a los otros no implica ni inversión ni racemización en los mencionados centros quirales.

1.10. Aislamiento y elucidación estructural de verongiamina (**19**).

Verongiamina es un derivado de la oxazolidinona que se aisló de la misma fracción que contuvo a la fistularina-1 (**18**), por lo que sospechamos se trata

de un artefacto producido por hidrólisis ácida –catalizada por el mismo ácido silícico– del grupo amida de la mencionada fistularina-1 (**18**). En el espectro de ^1H -RMN se detecta el anillo aromático por una señal que integra para dos protones a δ 7.64 y el anillo de oxazolidona por una señal de tipo doble doblete que integra para un protón a δ 5.62. El resto de señales son consistentes con la estereoestructura **19**. Así, el metino C-2 se desplaza un multiplete que integra para un protón a δ 4.20, el metileno sobre C-3 resuena a δ 4.02, el metileno sobre C-9 aparece como dos multipletes solapados a δ 3.43 (1H) y δ 3.98 (1H). El resto de las señales corresponden al metileno sobre C-1, el protón hidroxílico, los dos protones de la amida primaria y el protón amídico del heterociclo de oxazolidona (en total, seis hidrógenos que se solapan en el intervalo δ 3.35-3.85).



Verongiamina

Bibliografía

- Aydogmus, Z., Ersoy, N., and Imre, S. Chemical investigation of the sponge *Verongia aerophoba*. *Turk. J. Chem.*, 23(3):339–344, 1999.
- Bergmann, W., Gould, D., and Low, E. Contributions to the study of marine products; spongosterol. *The Journal of organic chemistry*, 10:570–579, 1945.
- Bergmann, W. Comparative biochemical studies on the lipids of marine invertebrates, with special reference to the sterols. *J. mar. Res*, 8:137–176, 1949.
- Bergquist, P. R. and de Cook, S. C. Family Aplysinidae Carter, 1875. In *Systema Porifera*, pages 1082–1085. Springer, 2002.
- Bergquist, P. and Hartman, W. Free amino acid patterns and the classification of the Demospongiae. *Marine Biology*, 3(3):247–268, 1969.
- Borders, D., Morton, G., and Wetzel, E. Structure of a novel bromine compound isolated from a sponge. *Tetrahedron Letters*, 31:2709–2712, 1974.
- Boury-Esnault, N. and van Soest, R. *Aplysina aerophoba* (Nardo, 1833). In *World Porifera database. Accessed through: World Register of Marine Species*. Van Soest, R.W.M; Boury-Esnault, N.; Hooper, J.N.A.; Rützler, K.; de Voogd, N.J.; Alvarez de Glasby, B.; Hajdu, E.; Pisera, A.B.; Manconi, R.; Schoenberg, C.; Janussen, D.; Tabachnick, K.R., Klautau, M.; Picton, B.; Kelly, M.; Vacelet, J.; Dohrmann, M.; Díaz, M.-C.; Cárdenas, P, 2015. URL <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetailsid=133911>.

- Bowerbank, J. Observations on the Spongiadae, with descriptions of some new genera. *Annals and Magazine of Natural History (1)*, 16(107):400–410, 1845. pls XIII–XIV.
- Cimino, G., De Rosa, S., De Stefano, S., Spinella, A., and Sodano, G. The zoonochrome of the sponge *Verongia aerophoba* (“Uranidine”). *Tetrahedron letters*, 25(27):2925–2928, 1984.
- Cruz, F., Quijano, L., Gómez-Garibay, F., and Rios, T. Brominated metabolites from the sponge *Aplysina (Verongia) thiona*. *Journal of Natural Products*, 53(3):543–548, 1990.
- Cruz, T. *Esponjas marinas de Canarias*. Banco de datos de Biodiversidad de Canarias. Gobierno de Canarias, 2002.
- De Luca, P., De Rosa, M., Minale, L., and Sodano, G. Marine sterols with a new pattern of side-chain alkylation from the sponge *Aplysina (=Verongia) aerophoba*. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, pages 2132–2135, 1972.
- De Rosa, M., Minale, L., and Sodano, G. Metabolism in Porifera—II. Distribution of sterols. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 46(4):823–837, 1973a.
- De Rosa, M., Minale, L., and Sodano, G. Metabolism in porifera—I. Some studies on the biosynthesis of fatty acids, sterols and bromo-compounds by the sponge *Verongia aerophoba*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 45(4):883–893, 1973b.
- Ebel, R., Brenzinger, M., Kunze, A., Gross, H., and Proksch, P. Wound activation of protoxins in marine sponge *Aplysina aerophoba*. *J. Chem. Ecol.*, 23:1451–1462, 1997.
- Erpenbeck, D., Sutcliffe, P., Cook, S. d. C., Dietzel, A., Maldonado, M., van Soest, R. W., Hooper, J. N., and Wörheide, G. Horny sponges and their affairs: On the phylogenetic relationships of keratose sponges. *Molecular phylogenetics and evolution*, 63(3):809–816, 2012.
- Espino, F., Boyra, A., Tuya, F., and Haroun, R. *Guía visual de Especies Marina de Canarias*. Oceanográfica: Divulgación, Educación y Ciencia S.L., 2006.
- Fattorusso, E., Minale, L., and Sodano, G. Aeroplysinin-1, an antibacterial bromo-compound from the sponge *Verongia aerophoba*. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, pages 16–18, 1972.
- Gopichand, Y. and Schmitz, F. Marine Natural Products: fistularin-1, -2 and -3 from the sponge *Aplysina fistularis* forma *fulva*. *Tetrahedron Letters*, 41:3921–3924, 1979.
- Hernández, J. Comunicación personal, 2005. Universidad de La Laguna.
- Kelecom, A., Kannengiesser, G., and Baker, P. Chemical constituents of *Verongia* sponges. III. Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance of aplysterol and 24,28-didehydroaplysterol. *An. Acad. Brasil. Cienc.*, 51(4):643–645, 1979.

- Kossuga, M., MacMillan, J., Rogers, E., Molinski, T., Nascimento, G., Rocha, R., and Berlinck, R. (2*S*,3*R*)-2-Aminododecan-3-ol, a new antifungal agent from the ascidian *Clavelina oblonga*. *J. Nat. Prod.*, 67:1879–1881, 2004.
- Kreuter, M. H., Leake, R., Rinaldi, F., Müller-Klieser, W., Müller, W., and Schröder, H. Inhibition of intrinsic protein tyrosine kinase activity of EGF-receptor kinase complex from human breast cancer cells by the marine sponge metabolite (+)-aerophysinin-1. *Comp. Biochem. Physiol., B: Comp. Biochem.*, 97(1):151–158, 1990.
- Kreuter, M., Bernd, A., Holzmann, H., Müller-Klieser, W., Maidhof, A., Weißmann, N., Kljajic, Z., Batel, R., Schröder, H., and Müller, W. Cytostatic activity of aerophysinin-1 against lymphoma and epithelioma cells. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 44(7–8):680–688, 1989.
- Kreuter, M., Robitzki, A., Chang, S., Steffen, R., Michaelis, M., Kljajic, Z., Bachmann, M., Schröder, H., and Müller, W. Production of the cytostatic agent aerophysinin by the sponge *Verongia aerophoba* in in vitro culture. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 101(1):183–187, 1992.
- König, G. and Wright, A. Agelorins A and B, and 11-*epi*-Fistularin-3, three new antibacterial fistularin-3 derivatives from the tropical marine sponge *Agelas oroides*. *Heterocycles*, 36(6):1351–1358, 1993.
- Makarieva, T., Stonik, V., Alcolado, P., and Elyakov, Y. Comparative study of the halogenated tyrosine derivatives from Demospongiae (Porifera). *Comp. Biochem. Physiol.*, 68B:481–484, 1981.
- Mancini, I., Guella, G., Laboute, P., Debitus, C., and Pietra, F. Hemifistularin-3: a degraded peptide or biogenetic precursor?. Isolation from a sponge of the order *Verongida* from the Coral Sea or generation from base treatment of 11-oxofistularin-3. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 1:3121–3125, 1993.
- Minale, L. and Sodano, G. Non-conventional Sterols of Marine Origin. In Faulkner, D. and Fenical, W., editors, *Marine natural products Chemistry*, pages 87–109. Springer Science & Business Media, 1977.
- Minale, L., Cimino, G., De Stefano, S., and Sodano, G. Natural products from Porifera. In *Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe/Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, pages 1–72. Springer, 1976.
- Mörner, C. T. Zur Kenntnis der organischen Gerüstsubstanz des Anthozoönskeletts. IV. Mitt. Isolierung und Identifizierung der Bromgorgosäure. *Z. physiol. Chem.(Hoppe-Seyler)*, 88:138, 1913.
- Nardo, G. *Isis, oder Encyclopädische Zeitung Coll.(Oken: Jena)*., chapter Auszug aus einem neuen System der Spongiarien, wonach bereits die Aufstellung in der Universitäts-Sammlung zu Padua gemacht ist, pages 519–523. 1833.
- Nechev, J., Christie, W. W., Robaina, R., de Diego, F., Popov, S., and Stefanov, K. Lipid composition of the sponge *Verongia aerophoba* from the Canary Islands. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104(12):800–807, 2002.

- Norte, M., Rodríguez, M., Fernández, J., Eguren, L., and Estrada, D. Aplysinadiene and (R,R)-5-[3,5-dibromo-4-[(2-oxo-5-oxazolidinyl)]-methoxyphenyl]-2-oxazolidinone, two novel metabolites from *Aplysina aerophoba*. Synthesis of aplysinadiene. *Tetrahedron*, 44(15):4973–4980, 1988.
- Ogamino, T. and Nishiyama, S. A new ring-opening access to aeroplysinin-1, a secondary metabolite of *Verongia aerophoba*. *Tetrahedron*, 59(47):9419–9423, 2003.
- Rodríguez-Nieto, S., González-Iriarte, M., Carmona, R., Muñoz-Chápuli, R., Medina, M., and Quesada, A. Antiangiogenic activity of aeroplysinin-1, a brominated compound isolated from a marine sponge. *FASEB J.*, 16(2):261–263, 2002.
- Rogers, E., de Oliveira, M., Berlinck, R., Köenig, G., and Molinski, T. Stereochemical heterogeneity in Verongid sponge metabolites. Absolute stereochemistry of (+)-fistularin-3 and (+)-11-*epi*-fistularin-3 by microscale LCMS-Marfey’s analysis. *Journal of Natural Products*, 68(6):891–896, 2005.
- Schmidt, O. Zweites Supplement der Spongien des Adriatischen Meeres. *Enthaltend die Vergleichung der Adriatischen und Britischen Spongiengattungen*, page 10, 1866.
- Schulze, F. Untersuchungen über den Bau und die Entwicklung der Spongien. Vierte Mittheilung. Die Familie der Aplysinidae. *Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie*, 30:379–420, 1878.
- Sharma, G. and Burkholder, P. Studies on the antimicrobial substances of sponges II. Structure and synthesis of a bromine-containing antibacterial compound from a marine sponge. *Tetrahedron Lett.*, 42:4147–4150, 1967.
- Sharma, G., Vig, B., and Burkholder, P. Antimicrobial substances of sponges. IV. Structure of a bromine-containing compound from a marine sponge. *J. Org. Chem.*, 35(8):2823–2826, 1970.
- Teeyapant, R. and Proksch, P. Biotransformation of brominated compounds in the marine sponge *Verongia aerophoba* – Evidence for an induced chemical defense? *Naturwissenschaften*, 80(8):369–370, 1993.
- Teeyapant, R., Woerdenbag, H., Kreis, P., Hacker, J., Wray, V., Witte, L., and Proksch, P. Antibiotic and cytotoxic activity of brominated compounds from the marine sponge *Verongia aerophoba*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 48(11–12):939–945, 1993.
- Tymiak, A. and Rinehart, K. Biosynthesis of dibromotyrosine-derived antimicrobial compounds by the marine sponge *Aplysina fistularis* (*Verongia aurea*). *J. Am. Chem. Soc.*, 103:6763–6765, 1981.
- Vacelet, J. Répartition générale des éponges et systématique des éponges cornées de la région de marseille et de quelques stations méditerranéennes. *Recueil des Travaux de la Station marine d’AôEndoume*, 1959.
- van Soest, R. W., Boury-Esnault, N., Vacelet, J., Dohrmann, M., Erpenbeck, D., De Voogd, N. J., Santodomingo, N., Vanhoorne, B., Kelly, M., and Hooper, J. N. Global diversity of sponges (Porifera). *PLoS one*, 7(4):e35105, 2012.

van Soest, R., Boury-Esnault, N., Hooper, J., Rützler, K., de Voogd, N., Alvarez de Glasby, B., Hajdu, E., Pisera, A., Manconi, R., Schoenberg, C., Janussen, D., Tabachnick, K., Klautau, M., Picton, B., Kelly, M., Vacelet, J., Dohrmann, M., Díaz, M.-C., and Cárdenas, P. World porifera database, October 2015. URL <http://www.marinespecies.org/porifera/>.

Wiedenmayer, F. *Shallow-water sponges of the western Bahamas*, volume 28. Birkhäuser, 2013.

Capítulo 2

Cultivo de la esponja *Verongia aerophoba* para la producción de citotóxicos

2.1. Introducción

Las esponjas del orden Verongida son ricas en alcaloides bromados que derivan de la dibromotirosina [Tymiak and Rinehart, 1981], como la aeroplysinina-1 (**13**) y la dienona (**11**) [Fattorusso et al., 1972; Cimino et al., 1983; Ciminiello et al., 1997; Aydogmus et al., 1999]. En estos compuestos se han detectado diferentes actividades biológicas, como puede ser antimicrobiana (y antifúngica) respecto a diferentes cepas, anti-incrustante (en inglés *antifouling*, actividad inhibidora del crecimiento de una serie de organismos marinos asociados con el “ensuciamiento biológico”) y principalmente una importante citotoxicidad respecto a diferentes células tumorales [Peng et al., 2005].

La actividad anticancerosa de la aeroplysinina-1 ha sido la más estudiada de entre todos los derivados de la bromotirosina. En 1989, Kreuter y colaboradores evaluaron la actividad anticancerosa de la aeroplysinina-1 en experimentos tanto *in vitro* como *in vivo*, y encontraron que la aeroplysinina-1 mostraba una pronunciada actividad citostática frente a células de linfoma, de leucemia y de carcinoma de pecho y colon, pero no mostraba ninguna actividad frente a las células humanas normales [Kreuter et al., 1989]. Otros estudios han demostrado la inhibición, por parte de la aeroplysinina-1, de la actividad de la enzima tirosina-quinasa de las células del cáncer de pecho humano [Kreuter et al., 1990], además de citotoxicidad frente a otras células tumorales [Koulman et al., 1996]. De estos datos, se concluyó que la aeroplysinina-1 es un compuesto prometedor para una quimioterapia racional [Kreuter et al., 1990].

Otros estudios, llevados a cabo por el grupo de Rodríguez-Quesada en la Universidad de Málaga, han revelado que la aeroplysinina-1 tiene una fuerte actividad antiangiogénica (impide el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos) [Rodríguez-Nieto et al., 2002]. Esto aumenta el interés farmacológico de esta molécula, ya que se sabe que interferir con la angiogénesis y/o prevenirla es un método terapéutico atractivo para el tratamiento de enfermedades dependien-

tes de la angiogénesis, como por ejemplo el crecimiento tumoral, la retinopatía diabética o la psoriasis [Harris, 1998]. Un estudio realizado por el grupo del Dr. Estévez (de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria) para evaluar la citotoxicidad de la dienona (**11**) aislada por nosotros, demostró actividad citotóxica en células de leucemia humana (HL-60).

Debido a las potentes actividades biológicas de los metabolitos de *Verongia aerophoba* ha habido un creciente interés en obtener cantidades suficientes de estos productos para llevar a cabo las pruebas preclínicas y clínicas. Las esponjas generalmente producen estos metabolitos en pequeñas cantidades y por ello varios autores han hecho hincapié en que se necesita mucha más biomasa de esponjas de la que se puede obtener de las poblaciones naturales sin que tenga un impacto negativo en el medio ambiente [Munro et al., 1994; Pomponi and Willoughby, 1994; Ilan et al., 1996; Osinga et al., 1998, 1999; de Caralt et al., 2007]. Esto se conoce como el "problema del suministro" ("*supply problem*"), y en el caso de la aeroplysinina-1, se han hecho estudios para la producción del metabolito a través del cultivo *in vitro* de la esponja *Verongia aerophoba* [Kreuter et al., 1992], del cultivo *ex situ* [Hausmann et al., 2006] y por síntesis [Ogamino and Nishiyama, 2003]. La síntesis de aeroplysinina-1 es un proceso caro y con un bajo rendimiento, y ni la producción *in vitro* ni tampoco el cultivo *ex situ* han satisfecho las necesidades de una producción eficiente de biomasa. A pesar de que se ha progresado bastante en el cultivo de esponjas de diferentes especies en acuarios con condiciones controladas [Camacho et al., 2006; Xue and Zhang, 2009; Carballo et al., 2010], el cultivo *ex situ* no puede competir con la maricultura *in situ*, ya que esta última es mucho más productiva y coste-efectiva [Schippers et al., 2012]. Según nuestro conocimiento, no se han hecho estudios de maricultura *in situ* de *Verongia aerophoba*.

Las aguas procedentes de cultivos de peces, ya sean transportadas por las corrientes en los cultivos en jaulas o conducidas al mar por emisarios de los cultivos en tierra, liberan al medio gran cantidad de nutrientes tanto disueltos como particulados. La acuicultura integrada multitrófica (IMTA) se ha propuesto como la única estrategia práctica para mitigar los impactos de la acuicultura, ya que con ella se obtienen cosechas adicionales con valor comercial. La práctica de la IMTA combina el cultivo de la especie principal (normalmente peces) con otras especies que extraen nutrientes inorgánicos (algas) y con especies que eliminan las partículas orgánicas (principalmente filtradores y detritívoros) [Troell et al., 2009]. Existe un creciente interés en utilizar las esponjas marinas como un compartimento de los sistemas de acuicultura integrada multitrófica [Duckworth, 2009; Osinga et al., 2010; Page et al., 2011; Schippers et al., 2012]. Osinga y colaboradores publicaron un experimento de cultivo de las esponjas *Dysidea avara* y *Chondrosia reniformis* cerca de una granja de peces y observaron que estas esponjas crecían más rápido respecto a otras cultivadas en un lugar prístino [Osinga et al., 2010]. Hacia esta línea se encaminaron los trabajos descritos en la primera sección de este capítulo.

Como se ha dicho antes, la esponja *Verongia aerophoba*, igual que el resto del orden Verongida, acumula metabolitos bromados derivados de la tirosina. Algunos de estos metabolitos son alcaloides isoxazolínicos de alto peso molecular, como la 11-*epi*-fistularina-3 (**15**), que pueden llegar a constituir entre el 7% y el 12% del peso seco de la esponja [Teeyapant et al., 1993]. Teeyapant y Proksch (1993) estudiaron la ruptura de estos alcaloides isoxazolínicos en el tejido liofilizado de *V. aerophoba* según el disolvente utilizado para la

extracción. Extrayendo la esponja liofilizada con metanol 100% encontraron mayoritariamente estos metabolitos de mayor peso molecular, mientras que al extraer con agua o con MeOH acuoso aparecían los metabolitos monocíclicos como la aeroplysinina-1 (**13**) y la dienona (**11**). Esto les indujo a pensar que estos metabolitos de menor peso molecular y con importante actividad biológica procedían de la degradación de otros metabolitos de reserva inactivos o débilmente activos, como la 11-*epi*-fistularina-3 (**15**) (Figura 2.1) [Teeyapant and Proksch, 1993]. Más tarde, Ebel y col. (1997) publicaron un estudio en el que dañaban mecánicamente tejido fresco de la esponja y demostraron que se producía una bioconversión enzimática de los alcaloides isoxazolinicos, como defensa química activada por las heridas producidas en el tejido [Ebel et al., 1997]. Sin embargo, Puyana y col. (2003) investigaron dos esponjas del Caribe del orden Verongida (*Aplysina archeri* y *A. insularis*) para comprobar si también existía biotransformación de los alcaloides isoxazolinicos después de haber dañado el tejido punzándolo con un bisturí. En este estudio concluyeron que no había evidencias de transformación química después de dañar el tejido, ya que ni se observó una reducción en la concentración de los metabolitos precursores ni un aumento de los productos finales, y que las diferencias encontradas en los estudios anteriores podrían deberse a diferentes eficiencias de extracción, a la hidrólisis de los precursores insolubles o a una distribución heterogénea de los metabolitos en la esponja [Puyana et al., 2003]. Para aclarar estos resultados contradictorios, Thoms y col. (2006) repitieron el estudio en diferentes esponjas del género *Aplysina*, tanto del Mediterráneo como del Caribe, y concluyeron que, efectivamente, el daño al tejido produce la bioconversión enzimática de los alcaloides isoxazolinicos en aeroplysinina-1 (**13**) y la dienona (**11**) [Thoms et al., 2006]. Con la intención de arrojar luz sobre esta cuestión en las esponjas *V. aerophoba* cultivadas, nuestro grupo de investigación también realizó experimentos en este sentido y se describen en el presente capítulo.

2.2. Cultivo integrado de *Verongia aerophoba*

2.2.1. Material y métodos

Esponjas, preparación de los explantes y montaje del cultivo

La esponja *Verongia aerophoba* se recogió mediante equipos de buceo autónomo en la Bahía del Confital (Las Palmas de Gran Canaria, España) a finales de Julio de 2006. Los fragmentos de la esponja viva se colocaron en un recipiente isotérmico manteniendo la temperatura por debajo de los 20°C y evitando el contacto con el aire. Inmediatamente se trasladaron a las instalaciones del Instituto Canario de Ciencias Marinas (ICCM, Taliarte, Gran Canaria) donde se procedió a la preparación de los explantes y montaje del cultivo.

Para la preparación de los explantes, los fragmentos de esponja se cortaron con una cuchilla afilada evitando el contacto con el aire y procurando separar los tubos dejando aproximadamente 0.5-1 cm³ de la base, con lo que se obtuvieron 170 explantes de entre 3.7 y 5.0 cm³. De estos explantes, 140 se utilizaron para el cultivo y el resto (30) se reservaron para llevar al laboratorio con la intención de determinar algunas relaciones biométricas (volumen, peso húmedo, densidad y peso seco).

Seguidamente, los explantes se introdujeron en el tanque de sedimentación

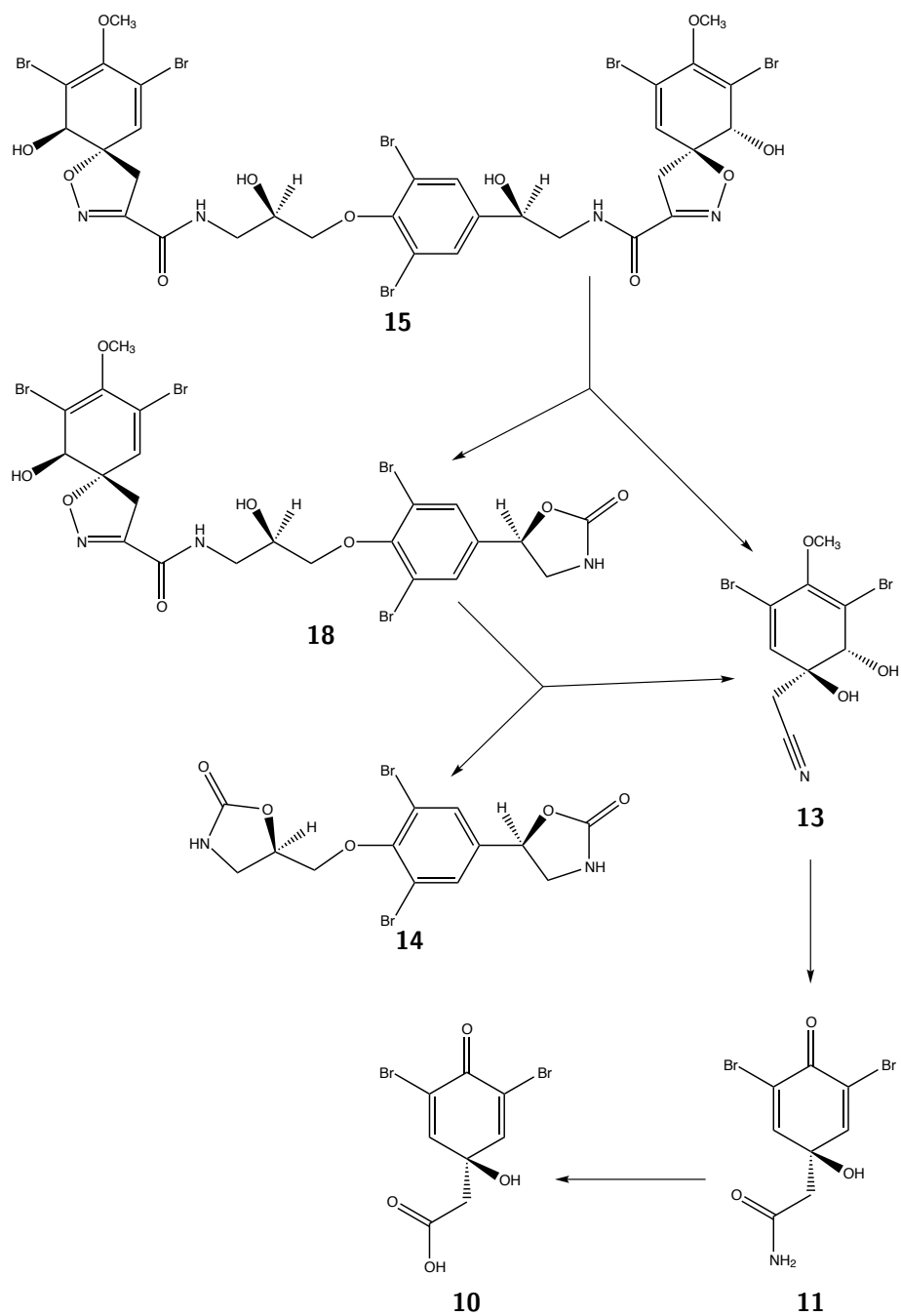


Figura 2.1: Biotransformación de los alcaloides bromados de *V. aerophoba*. Las estructuras corresponden a 11-*epi*-fistularina-3 (**15**), fistularina-1 (**18**), aeroplysinina-1 (**13**), verongioldo (**14**), dienona (**11**), ácido verónico (**10**). (Modificado de [Teyapant and Proksch, 1993]).

situado en el exterior de la planta de cultivos marinos del ICCM y allí se procedió al montaje del cultivo. Para ello, los explantes se clavaron en palillos de poliestireno de (8 cm alto \times 0.35 cm ancho, Papstar, #10216-9) y se insertaron en unos agujeros hechos en la base de unas cajas de PVC (48 cm ancho \times 23 cm alto \times 35 cm fondo). Se colocaron en 4 cajas con 35 explantes cada una, distribuidos a una distancia de unos 6 cm entre ellos. Las cajas con los explantes se apilaron dos a dos, de manera que dos de ellas se quedaron expuestas a la luz mientras que las otras dos se mantuvieron prácticamente en oscuridad. Cada una de las pilas se lastró con otra caja llena de piedras que se colocó en la parte inferior y se sujetaron entre ellas con bridas de plástico (Figura 2.2).

El cultivo de esponjas se mantuvo durante más de un año (20/07/2006 – 01/08/2007) recibiendo un flujo continuo de agua de mar proveniente de los efluentes de la planta de cultivos marinos. No se realizaron labores de limpieza ni mantenimiento de los cultivos durante todo el periodo. Finalizado el tiempo de cultivo, se contaron los explantes supervivientes, se reunieron por cajas y se llevaron al laboratorio, donde se dividieron en submuestras para posteriormente analizar el contenido en metabolitos secundarios según diferentes métodos de extracción.



Figura 2.2: Sistema cultivo *ex situ* en el tanque de sedimentación de la planta de acuicultura marina del ICCM.

Extracción, biotransformación y análisis de los metabolitos por HPLC

Para ensayar la biotransformación de los metabolitos según diferentes métodos de extracción, los explantes reunidos por cajas de cultivo se pesaron conjuntamente y se dividieron en submuestras como se indica a continuación:

- Una cantidad determinada (aproximadamente la mitad) de cada muestra se secó sobre silica gel a temperatura ambiente durante 24 horas y seguidamente se extrajo con acetona.
- Se añadieron 100 ml de agua de mar a los fragmentos de esponja restantes y se trituraron con una batidora eléctrica. La mitad de la pasta resultante se subdividió en dos partes, una de ellas se extrajo inmediatamente con acetona (250 ml) mientras que la otra se incubó durante 24 horas a temperatura ambiente antes de extraerse con acetona (250 ml).

También se extrajeron con acetona fragmentos de las esponjas madres de las que se obtuvieron los explantes para el cultivo, que se habían guardado a -20°C .

Posteriormente se evaporó el disolvente orgánico de cada uno de los extractos acetónicos y el residuo acuoso resultante se extrajo tres veces con acetato de etilo, que se secó sobre sulfato sódico, se filtró y se llevó a sequedad obteniendo un residuo pardo.

Para el análisis por HPLC, los extractos brutos se diluyeron con metanol hasta obtener concentraciones de aproximadamente unas 1000 ppm (1 mg ml^{-1}). También se hicieron disoluciones patrón a 100 ppm (0.1 mg ml^{-1}) de los compuestos 11-*epi*-fistularina-3 (**15**), verongiolido (**14**) y ácido verónico (**10**).

Los metabolitos se separaron por HPLC mediante una columna Waters Novapak C18 (60 \AA , $4\text{ }\mu\text{m}$, $3.9 \times 150\text{ mm}$) en las siguientes condiciones:

- Inicio: 90 % de agua y 10 % de metanol
- Hasta el minuto 30: subir la composición del metanol en gradiente lineal desde el 10 % al 100 %
- Del minuto 30 al 32: mantener la elución isocrática con metanol 100 %
- Del minuto 32 al 45: gradiente lineal aumentando la composición de agua hasta volver a las condiciones iniciales
- Flujo: 1 ml min^{-1}
- Volumen inyectado: 10 μl

Mediante un detector UV ($\lambda = 210\text{--}400\text{ nm}$) se pudo observar la separación de los compuestos 11-*epi*-fistularina-3 (**15**), verongiolido (**14**) y ácido verónico (**10**) a 6.8, 2.8 y 3.3 minutos, respectivamente.

Análisis de datos

Se calculó un "índice de bioconversión" para relacionar la proporción del metabolito de mayor peso molecular 11-*epi*-fistularina-3 (**15**), respecto al producto de la transformación enzimática inducida por el daño mecánico a los tejidos de la esponja, el verongiolido (**14**). Para ello, se estimó la composición micromolar de cada compuesto por gramo de peso seco de esponja ($\mu\text{mol g}^{-1}$) y se relacionó teniendo en cuenta que por cada mol de 11-*epi*-fistularina-3 que se bioconvierte, se forma un mol de verongiolido. Por tanto, el índice no es más que la ratio molar entre verongiolido y 11-*epi*-fistularina-3, lo que significa que a mayor valor del índice, mayor bioconversión habrá tenido lugar.

Para comprobar si el índice de bioconversión variaba significativamente entre tratamientos se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) multifactorial mediante el programa estadístico R. Los datos se transformaron logarítmicamente para cumplir con los requisitos de esta prueba paramétrica y se comprobó la normalidad mediante el test de Shapiro-Wilk [Zar, 1999].

2.2.2. Resultados y discusión

Un año después de iniciado el cultivo en el tanque de sedimentación de la piscifactoría (sin ningún mantenimiento) se observó un alto grado de ensuciamiento biológico, especialmente en las cajas superiores. Los explantes cultivados

con luz solar directa se encontraron cubiertos de gran cantidad de algas y cianobacterias filamentosas (Figura 2.3a), además de un gran número de anémonas del género *Aiptasia* (Cnidaria: Anthozoa) adheridas a las paredes de las cajas y sipuncúlidos *Sipunculus nudus* (Sipuncula: Sipunculidea) en el fondo de la caja, donde se llegó a acumular hasta un centímetro de sedimento. También cabe remarcar la alta abundancia de gusanos poliquetos (Annelida: Polychaeta), probablemente nereidos, eunícidos o sílidos endobiontes de *V. aerophoba* [Voultsiadou-Koukoura et al., 1987; Núñez et al., 1997; López et al., 2001], además de un ejemplar de *Tyrodina perversa* (Mollusca: Gastropoda) que es un conocido predador de *V. aerophoba* [Becerro et al., 2003]. Las esponjas de las cajas superiores mostraban manchas de tonos rojizos, fibras de esponjina al descubierto (tejido muerto) y se observó que algunos explantes presentaban nuevos tubos con ósculos (Figuras 2.3a,2.3b). Se recogió una biomasa de esponjas de 37 g en una de las cajas superiores y 57.7 g en la otra.

En el interior de las cajas inferiores no se encontraron algas ya que penetraba muy poca luz en el interior. Como en las cajas superiores, también se encontraron anémonas del género *Aiptasia* pero en menor cantidad. Además se observaron pequeñas ofiuras (Echinodermata: Ophiuroidea), un ejemplar del poliqueto *Eulalia clavigera* y varias colonias de la esponja *Spongionella pulchella* creciendo en las paredes de la caja y sobre los tejidos muertos de *V. aerophoba*. Las esponjas cultivadas en oscuridad mostraron mayor cantidad de tejido muerto y más ramificaciones en comparación con las superiores, lo cual es debido al menor flujo de agua que recibían los explantes inferiores [Kaandorp, 1999; Pawlik et al., 2015] (Figuras 2.3c,2.3d). Se recogió una biomasa de esponjas de 22.5 g en una de las cajas inferiores y 59.5 g en la otra.

La supervivencia de las esponjas cultivadas en las cajas inferiores fue mayor que en las superiores, con unas tasas de supervivencia del 100 % y del 82.9 %, respectivamente. Cabe destacar que algunos explantes de las cajas inferiores se desprendieron de los palillos pero permanecieron dentro de las cajas.

Aunque no se tomaron medidas directas de la biomasa inicial, a partir del peso húmedo de los explantes recogidos al finalizar el experimento y de las relaciones biométricas de las réplicas de los explantes sembrados inicialmente, se pudo deducir un rango de tasas de crecimiento entre -0.611 y -0.703 por año para los explantes superiores, y entre -0.721 y -0.787 por año para los explantes inferiores. Los principales factores que inhibieron el crecimiento de las esponjas podrían ser: a) la presencia de partículas indeseadas que pudieran bloquear los poros inhalantes, b) la calidad del agua –particularmente la concentración de amonio– y c) los predadores que se encontraron en el cultivo, como *Tyrodina perversa* o los poliquetos [Osinga et al., 1999; Belarbi et al., 2003].

Las concentraciones de los metabolitos 11-*epi*-fistularina-3 (**15**), verongiolido (**14**) y ácido verónico (**10**) que se separaron y cuantificaron por HPLC se resumen en la Tabla 2.1. Estos valores están en el mismo orden de magnitud que los obtenidos por Teeyapant y col. en extractos de *V. aerophoba*, recogida en 1991 en diferentes puntos de las Islas Canarias [Teeyapant et al., 1993].

No se encontraron diferencias significativas en los índices de bioconversión entre los explantes provenientes de esponjas salvajes o de las diferentes condiciones de cultivo ($F_{2,9} = 1.112, p = 0.370$), ni entre las fechas de recogida ($F_{1,10} = 2.292, p = 0.161$). Tampoco se observaron diferencias significativas en los índices dependiendo del proceso seguido para la extracción de los metabolitos, es decir, según si estaban secas o húmedas ($F_{1,10} = 0.347, p = 0.569$), o

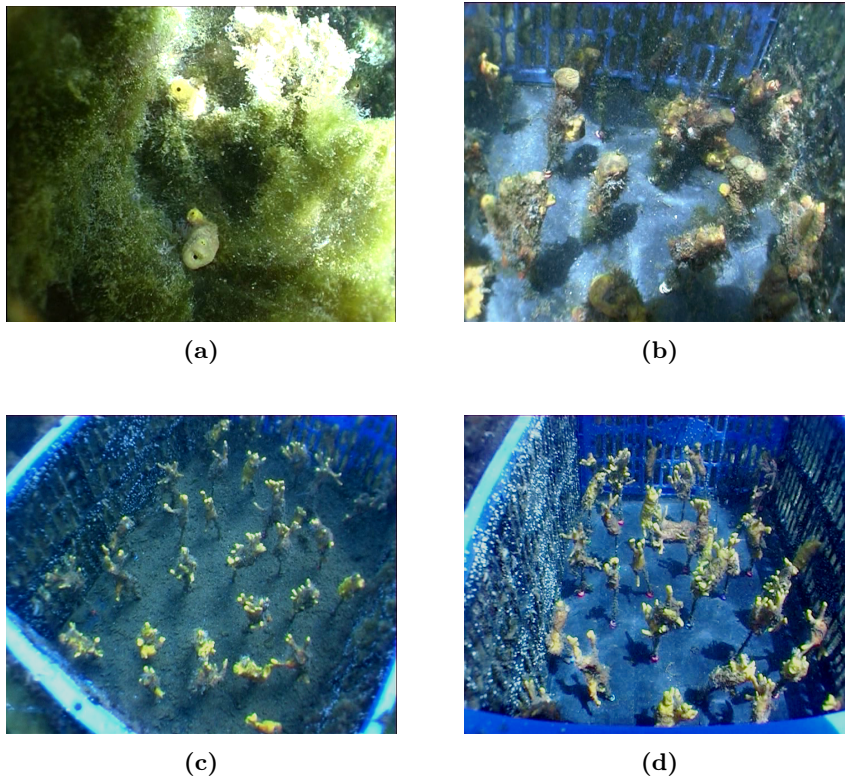


Figura 2.3: Cultivo de *V. aerophoba* en el tanque de sedimentación de la planta de cultivo de peces (ICCM, Taliarte, Gran Canaria). (a, b) Esponjas cultivadas en las cajas superiores, antes y después de la limpieza de algas y material sedimentado, respectivamente. (c, d) Esponjas cultivadas en las cajas inferiores, antes y después de la limpieza del material sedimentado, respectivamente.

según si estaban enteras o trituradas ($F_{1,10} = 0.790, p = 0.395$), o si la acetona se añadió inmediatamente o después de incubar las esponjas a 20°C durante 24 h ($F_{1,10} = 0.031, p = 0.864$). Esto podría ser debido a una gran variabilidad en el contenido de metabolitos de cada uno de los explantes individuales.

A partir de este experimento se puede concluir que las esponjas *V. aerophoba* tienen una alta supervivencia cuando son cultivadas con el sistema descrito en aguas residuales procedentes de plantas de acuicultura de peces. Sin embargo, las tasas de crecimiento negativas indican que es necesaria una adecuación del sistema para eliminar o minimizar los factores que limitan el crecimiento de las esponjas. Estas actuaciones se podrían dirigir hacia la integración del cultivo de esponjas en un sistema de cultivo multitrofico [Fu et al., 2007], con algunos pasos previos al propio cultivo de esponjas, como podrían ser: 1) filtros de arena donde se retendrían las partículas de mayor tamaño (las cuales incluso podrían ser consumidas por detritívoros, como holoturias) a la vez que darían soporte a bacterias nitrificantes que reducirían la carga de amonio, y 2) incluir un segundo paso con microalgas (p. ej. *Chlorella* sp.) que fijarían el nitrato y podrían servir de alimento al propio cultivo de esponjas [Belarbi et al., 2003; de Caralt et al., 2003]. Además, habría que incluir un mantenimiento del cultivo que controlase

Tabla 2.1: Concentraciones medias (en mg/g PS) de los metabolitos identificados por HPLC [11-*epi*-fistularina-3 (**15**), verongiolido (**14**) y ácido verónico (**10**)] en las esponjas cultivadas *ex situ* e índices de bioconversión (en $\mu\text{mol } \mu\text{mol}^{-1}$ de verongiolido/11-*epi*-fistularina-3) según diferentes condiciones de cultivo y procesos de extracción. Los valores entre paréntesis corresponden al error estándar.

Origen	Proceso de extracción			(15)	(14)	(10)	Índice
Salvaje	Húmeda	Entera	Inmediata	24.84	4.98	3.94	2.05
				(15.42)	(0.76)	(1.09)	(1.31)
Cultivo Luz	Seca	Entera	Inmediata	12.15	1.47	0.83	0.60
					(1.36)	(0.13)	
Cultivo Luz	Húmeda	Triturada	Inmediata	42.25	2.23	1.89	0.15
				(12.81)	(0.14)	(0.60)	(0.05)
Cultivo Luz	Húmeda	Triturada	Incubación 24h	0.92	0.40	1.51	1.11
Cultivo Oscuridad	Seca	Entera	Inmediata	103.28	4.04	3.79	0.10
						(1.85)	
Cultivo Oscuridad	Húmeda	Triturada	Inmediata	37.04	1.29	3.52	1.30
				(35.90)	(0.15)	(2.55)	(1.25)
Cultivo Oscuridad	Húmeda	Triturada	Incubación 24h	14.14	2.56	3.28	0.12
				(13.90)		(2.88)	

la proliferación de epibiontes y/o predadores.

2.3. Cultivo *in situ* de *Verongia aerophoba*

2.3.1. Material y métodos

Esponjas, preparación de los explantes y montaje del cultivo

La esponja *Verongia aerophoba* se recogió mediante equipos de buceo autónomo en la Bahía de Alcúdia (Mallorca, España) a finales de Septiembre de 2009, a unos 5-6 metros de profundidad. Los fragmentos de la esponja viva se cortaron de la esponja madre con una cuchilla afilada, dejando al menos 1/3 de cada esponja para que se recuperase. Inmediatamente y bajo el agua en el mismo sitio de recogida, se prepararon los explantes para su cultivo *in situ*, procurando separar las chimeneas dejando aproximadamente 3-5 cm³ de la base, con lo que se obtuvieron explantes de unos 8-20 cm³.

La estructura de cultivo consistía en un marco cuadrado de acero inoxidable de 80 × 80 cm de lado, el cual sostenía dos capas de malla de polipropileno con una luz de 1.6 × 2.0 cm. Los explantes se fueron colocando entre las dos capas de malla, separándolos entre ellos con un hilo de nylon formando bolsillos de 16 × 16 cm. Se colocaron un total de 25 explantes provenientes de 5 esponjas madre diferentes. Finalmente, la estructura de cultivo se encadenó por un vértice al fondeo, mientras que en el vértice opuesto se amarró un cabo unido a una boya

subsuperficial para mantener la verticalidad y a la vez pivotar a merced de las corrientes (Figura 2.4).

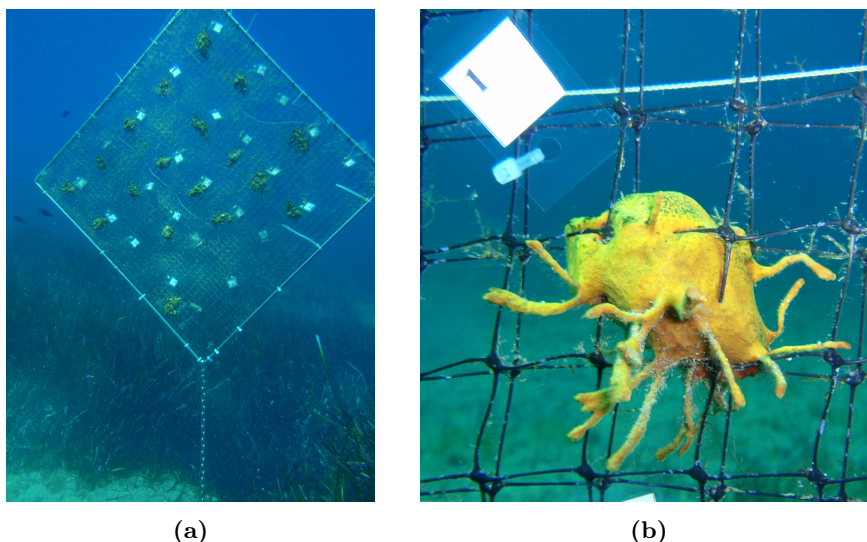


Figura 2.4: (a) Estructura de cultivo *in situ* en la Bahía de Alcúdia (Mallorca, Islas Baleares). (b) Explante de *V. aerophoba* creciendo en la malla. Obsérvese la formación de tejido nuevo sobre la malla y la aparición de ramificaciones.

Crecimiento de los explantes

El cultivo de esponjas *in situ* se mantuvo durante 315 días (de noviembre 2009 a octubre 2010). En este tiempo y con una periodicidad de entre 1 y 3 meses, se realizaron labores de mantenimiento del cultivo (limpieza de partículas indeseadas e incrustaciones biológicas, principalmente algas creciendo sobre la malla) y se monitorizó el crecimiento de los explantes. Para estimar el crecimiento de los explantes se tomaron fotografías con una cámara digital (Olympus $\mu 1010$) equipada con una carcasa submarina (Olympus PT-042), y las áreas proyectadas de los explantes se calcularon con un programa de análisis de imágenes (ImageJ). Los cambios en el área proyectada se consideraron una buena estimación de los cambios en biomasa [Turón et al., 1998; de Caralt et al., 2003; Osinga et al., 2010] ya que los explantes crecieron principalmente en dos dimensiones. A partir de los cambios del área proyectada en un periodo de tiempo, se calculó la tasa de crecimiento TC_t con la fórmula:

$$TC_t = \frac{(A_t - A_{t-1})}{A_{t-1} \Delta t}$$

donde A_t y A_{t-1} son las áreas en el tiempo t y en el tiempo de muestreo anterior, respectivamente, y Δt es el espacio de tiempo (en meses) entre dos muestreos consecutivos. Esta tasa de crecimiento es el cambio en área relativo al área en el tiempo anterior por unidad de tiempo [Turón et al., 1998; Duckworth and Battershill, 2001].

Después de fotografiar los explantes, se tomaban de 3 a 5 muestras de esponja (aproximadamente entre 100 y 400 mg de peso fresco), cada una de ellas de

explantes diferentes y provenientes de esponjas madre diferentes. Cada uno de estos fragmentos de esponja se guardaban en tubos de polipropileno de 15 ml. Seguidamente, se refotografiaban los explantes muestreados para obtener la diferencia en área proyectada antes y después del muestreo.

Extracción, biotransformación y análisis de los metabolitos por HPLC

Inmediatamente después de finalizar los muestreos, cada una de las muestras tomadas se dividía en dos partes, una de ellas se extraía directamente con metanol (10 ml) mientras que la otra parte se machacaba con un pistilo dentro del propio tubo con un poco de agua de mar (aproximadamente 1 ml) y se dejaba reposar durante unas 12 horas antes de añadir el metanol para la extracción. Las muestras en metanol se guardaron a -20°C hasta su análisis por HPLC.

Para el análisis por HPLC, los extractos metanólicos se filtraron por $0.45\ \mu\text{m}$ y se inyectaron directamente. También se hicieron disoluciones patrón a 250 ppm ($0.25\ \text{mg ml}^{-1}$) de los compuestos 11-*epi*-fistularina-3 (**15**), verongiolido (**14**), ácido verónico (**10**), dienona (**11**), aeroplysinina-1 (**13**) y fistularina-1 (**18**).

Los metabolitos se separaron por HPLC mediante una columna Waters Novapak C18 ($60\ \text{Å}$, $4\ \mu\text{m}$, $3.9 \times 150\ \text{mm}$) en las siguientes condiciones:

- Inicio: 80 % de agua y 20 % de metanol
- Hasta el minuto 15: subir la composición del metanol en gradiente lineal desde el 20 % al 100 %
- Del minuto 15 al 20: mantener la elución isocrática con metanol 100 %
- Del minuto 20 al 25: gradiente lineal aumentando la composición de agua hasta volver a las condiciones iniciales (80 % de agua y 20 % de metanol)
- Flujo: $1\ \text{ml min}^{-1}$
- Volumen inyectado: $10\ \mu\text{l}$

Mediante un detector UV ($\lambda = 254\ \text{nm}$) se pudo observar la separación de los compuestos según se indica en la Tabla 2.2:

Tabla 2.2: Tiempos de retención de los productos naturales de *Verongia aeorophoba* que se separaron e identificaron por HPLC.

Compuesto	Tiempo de retención (min)
ácido verónico (10)	1.8
dienona (11)	4.8
aeroplysinina-1 (13)	6.4
verongiolido (14)	8.9
fistularina-1 (18)	11.9
11- <i>epi</i> -fistularina-3 (15)	13.3

Una vez extraídas y analizadas las muestras, la biomasa de esponja se secó en una estufa a 110°C durante 8-12 horas, para posteriormente obtener el peso seco de cada muestra.

Análisis de datos

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante el programa R. La supervivencia se calculó como el porcentaje de los explantes que permanecían vivos en relación al número de fragmentos iniciales. Se comprobó la normalidad mediante el test de Shapiro-Wilk y no se consiguió una distribución normal con ningún tipo de transformación (logarítmica o arcoseno), por consiguiente, para el análisis estadístico de la supervivencia se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida de una prueba *post-hoc* de Dunn.

Para analizar el crecimiento, los datos de área proyectada y las tasas de crecimiento se transformaron logarítmicamente para cumplir con los requisitos de ANOVA [Zar, 1999]. La normalidad se comprobó mediante las pruebas de Shapiro-Wilk y de Kolmogorov-Smirnov. Utilizando un análisis ANOVA de medidas repetidas se compararon los datos de crecimiento entre fechas y entre grupos de explantes (agrupados según procedieran de la misma esponja madre). Además, a los datos de área y tasas de crecimiento sin transformar también se les aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida de una prueba *post-hoc* de Dunn.

Las variaciones en las concentraciones de metabolitos y del índice de bioconversión entre fechas, grupos de explantes o tratamiento (esponja entera o triturada) se examinaron mediante un análisis de la varianza (ANOVA) de un factor. Siempre que fuese necesario, los datos se transformaban logarítmicamente para cumplir con los requisitos de esta prueba paramétrica y la normalidad se comprobó mediante la prueba de Shapiro-Wilk.

2.3.2. Resultados y discusión

La supervivencia de los explantes se vio afectada principalmente por los temporales que dañaron el cultivo durante los meses de invierno y primavera, durante los cuales algunos explantes se desprendieron de la malla. A partir de los meses de verano la supervivencia se mantuvo constante, con una supervivencia promedio del 72 % (Figura 2.5). Se realizó una prueba de Kruskal-Wallis para determinar si la supervivencia entre los diferentes grupos de explantes variaba. Los resultados demostraron que hubo diferencias significativas entre grupos ($H(4) = 14.135, p < 0.01$). Una prueba *post-hoc* de Dunn indicó que los explantes del grupo D se diferenciaban significativamente de los de los grupos A y E. Los explantes del grupo D mantuvieron una supervivencia del 100 % durante todo el periodo de cultivo, mientras que un 40 % de los explantes de los grupos A y E se hubieron desprendido de la malla ya desde el segundo muestreo (enero 2010) y permanecieron con esta tasa de supervivencia (60 %) durante el resto del experimento.

Las mediciones de área proyectada se iniciaron una semana después de iniciado el cultivo (21/11/2009). Pasado este periodo de tiempo los explantes ya mostraban nuevo pinacodermo, en algunos casos incluso por encima de la malla de cultivo. En los 4 primeros meses (otoño-invierno) apenas se apreció crecimiento en términos de área proyectada, solamente se observó que las heridas se habían curado completamente y seguía formándose nuevo tejido envolviendo la malla. A principios de verano (26/06/2010) empezaron a crearse ramificaciones delgadas, que fueron creciendo durante toda la estación hasta mediados de septiembre. En el último muestreo (02/10/10) se observó que se habían perdido

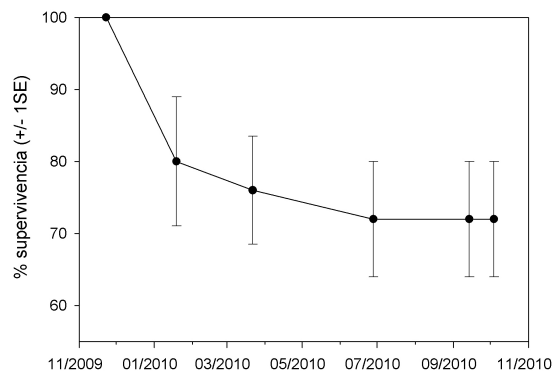


Figura 2.5: Supervivencia de los explantes de *Verongia aerophoba* durante el cultivo *in situ*. Las barras de error representan la variación (error estándar) en la supervivencia entre los diferentes grupos de explantes.

algunas de estas ramificaciones, probablemente debido a un temporal acaecido a finales de septiembre (Figura 2.6).

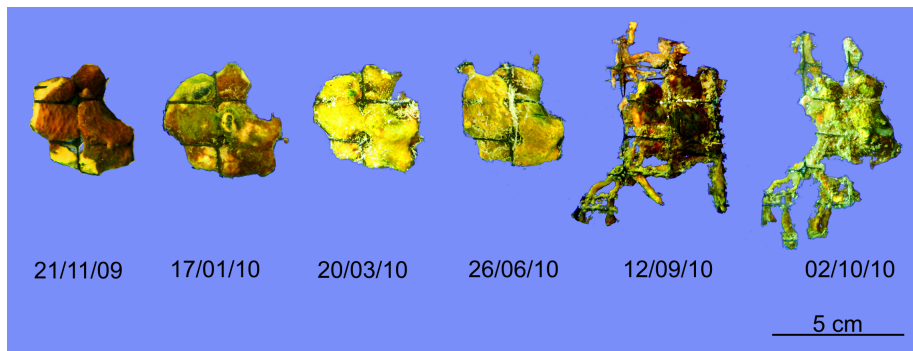


Figura 2.6: Ejemplo del crecimiento de un explante de *Verongia aerophoba* durante todo el periodo de cultivo *in situ*.

Utilizando el análisis de la varianza (ANOVA) para comparar las áreas de los explantes entre fechas y entre grupos (agrupados según provinieran de la misma esponja madre), se observaron diferencias significativas tanto entre fechas ($F_{5,112} = 9.017, p < 0.001$) como entre grupos de explantes ($F_{4,113} = 14.15, p < 0.001$). Estas diferencias entre fechas fueron significativas al comparar las áreas de los meses de septiembre y octubre ($p < 0.001$) con las del resto del periodo de cultivo, y además los explantes del grupo E fueron significativamente más grandes durante todo el periodo de cultivo ($p < 0.01$) (Tabla 2.3, Figuras 2.7a, 2.8a).

En lo que se refiere a las tasas de crecimiento, mediante la prueba ANOVA de medidas repetidas se observaron diferencias entre fechas con un bajo nivel de significación ($F_{4,88} = 2.139, p = 0.083$), y no se encontraron diferencias significativas entre grupos de explantes ($F_{4,88} = 0.750, p = 0.561$). La prueba *t* de Student para muestras apareadas mostró que las diferencias eran significativas cuando se comparaban las tasas de crecimiento de invierno con las de primavera

Tabla 2.3: Áreas proyectadas (en cm^2) de los explantes del cultivo *in situ*, desglosadas por fechas y grupos de explante. Los valores entre paréntesis corresponden a la desviación estándar.

Grupo	21/11/09 ^a	17/01/10 ^a	20/03/10 ^a	26/06/10 ^a	12/09/10 ^b	02/10/10 ^b
A ^c	13.98 (5.11)	12.26 (1.10)	11.38 (1.09)	18.65 (4.58)	28.42 (10.07)	24.43 (7.82)
B ^d	11.83 (2.14)	11.50 (1.77)	11.15 (1.55)	11.97 (0.80)	17.23 (1.56)	14.67 (3.87)
C ^c	14.90 (3.68)	14.92 (2.45)	14.54 (1.16)	16.02 (2.32)	18.10 (4.08)	20.41 (4.17)
D ^{c,e}	16.12 (2.37)	17.98 (4.12)	16.56 (3.37)	19.80 (3.48)	22.53 (5.00)	23.89 (6.59)
E ^e	21.39 (4.26)	18.43 (4.83)	19.25 (4.78)	24.60 (6.92)	25.26 (5.36)	28.20 (1.30)

^{a,b,c,d,e} Letras diferentes entre fechas o grupos de explantes indican diferencias estadísticamente significativas.

($p = 0.05$) y verano ($p < 0.01$). Estas afirmaciones se corroboraron realizando la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis a las tasas de crecimiento sin transformar, seguidas del test *post-hoc* de Dunn.

La máxima tasa mensual de crecimiento registrada en un explante durante todo el experimento fue un $45.3\% \text{ mes}^{-1}$, y la mínima un $-48\% \text{ mes}^{-1}$ (es decir, una disminución en tamaño) (Figura 2.7b). Estos valores se transformaron en tasas diarias asumiendo crecimiento lineal entre muestreos, para poder comparar con la literatura [Schippers et al., 2012] y se obtuvieron valores máximos y mínimos de 0.0151 día^{-1} y -0.0160 día^{-1} , respectivamente. Además de estos valores extremos, cabe remarcar que estas tasas diarias promediadas por estaciones fueron máximas en primavera y verano (con valores de 0.0027 día^{-1} y 0.0030 día^{-1} , respectivamente) y mínimas en invierno (-0.0004 día^{-1}) (Tabla 2.4, Figura 2.8b). Salvo pocas excepciones [Battershill and Page, 1996; Carballo et al., 2010], la mayoría de las tasas de crecimiento de esponjas cultivadas se encuentran en el mismo orden de magnitud que las que se han calculado para nuestro experimento. Muchos autores calculan las tasas de crecimiento como el incremento en tamaño entre el inicio y el final del experimento [Schippers et al., 2012], y las presentan en porcentajes por año o en porcentajes indicando el periodo de tiempo que duró el cultivo. Por ello, también se calcularon de esta manera las tasas de crecimiento de nuestro cultivo, ofreciendo valores promedio del $59.3\% \text{ año}^{-1}$ (intervalo de confianza al 95%: $33.4\text{--}85.1\% \text{ año}^{-1}$) o del 51.1% (intervalo de confianza al 95%: $28.8\text{--}73.4\%$) si solo consideramos el periodo de muestreo (10.5 meses). Existen pocos datos sobre el crecimiento de *Verongia aerophoba* y, según nuestro conocimiento, hasta momento no hay ningún dato de esta esponja cultivada en mar abierto. Sin embargo, en 1979 Wilkinson y Vacelet publicaron un trabajo sobre los efectos de transplantar seis especies de esponjas marinas (entre ellas *V. aerophoba*) a diferentes condiciones de luz y corriente, y encontraron tasas medias de crecimiento del 80% durante

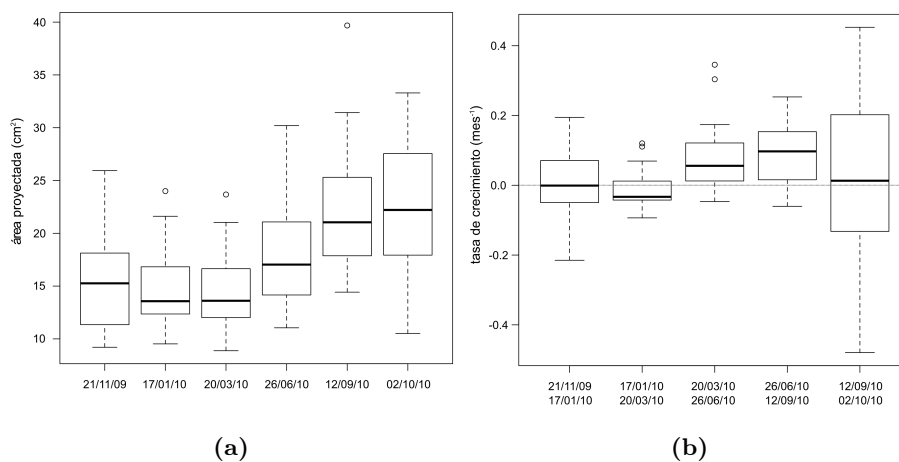


Figura 2.7: Diagrama de cajas (a) del área proyectada (cm^2) y (b) de las tasas de crecimiento (mes^{-1}) de los explantes durante el periodo de cultivo. En estos diagramas, la caja está delimitada por los cuartiles Q_1 y Q_3 , y la línea interior señala la mediana. Los bigotes indican los límites superior e inferior y los valores atípicos se señalan con círculos pequeños.

las 47 semanas que duró el experimento [Wilkinson and Vacelet, 1979], valor que se encontraría dentro del rango de nuestros resultados.

Tabla 2.4: Tasas de crecimiento (día^{-1}) de los explantes del cultivo *in situ*, desglosadas por fechas. Los valores entre paréntesis corresponden a la desviación estándar.

Intervalo de muestreo	Media (SD) (día^{-1})	Intervalo de confianza 95 %	
		Límite inferior	Límite superior
21/11/09 – 17/01/10	0,0001 (0,0035)	-0,0014	0,0017
17/01/10 – 20/03/10	-0,0004 (0,0020)	-0,0013	0,0005
20/03/10 – 26/06/10	0,0027 (0,0035)	0,0011	0,0043
26/06/10 – 12/09/10	0,0030 (0,0030)	0,0016	0,0044
12/09/10 – 02/10/10	0,0010 (0,0083)	-0,0029	0,0048

Los resultados del análisis ANOVA de las concentraciones (expresadas en % de compuesto en el extracto) de los metabolitos identificados por HPLC comparadas según tratamiento (esponja entera o triturada) se muestran en la Tabla 2.5. Se observan diferencias significativas entre tratamientos para aeroplisinina-1 (**13**), verongiolido (**14**), fistularina-1 (**18**) y, con un menor nivel de significación, 11-*epi*-fistularina-3 (**15**). No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos para el ácido verónico (**10**) ni para la dienona (**11**), sin embargo, únicamente en estos dos últimos compuestos sí que se encontraron diferencias entre fechas, mostrando concentraciones más bajas en las muestras de enero respecto a las del resto del año.

El análisis ANOVA del índice de bioconversión, calculado como la relación molar entre el verongiolido (**14**) y la 11-*epi*-fistularina-3 (**15**), reveló diferencias significativas según el tratamiento ($F_{1,24} = 4.371, p < 0.05$). Los valores medios

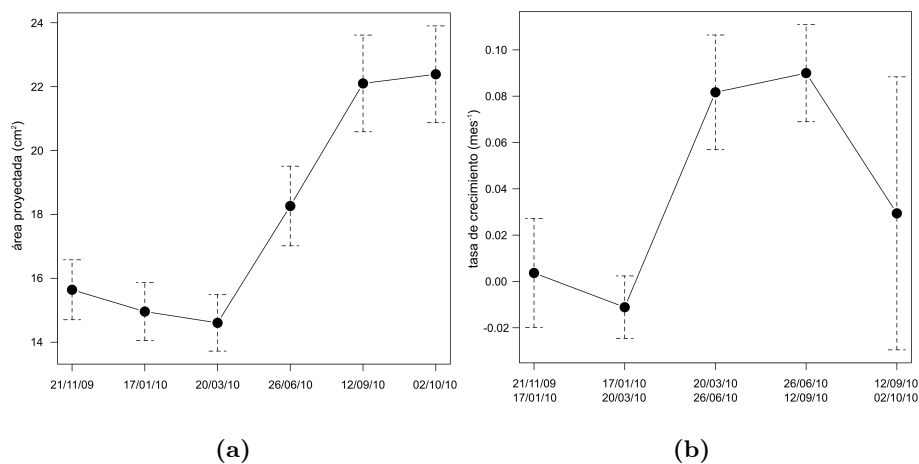


Figura 2.8: (a) Área proyectada (cm^2) y (b) tasas de crecimiento (mes^{-1}) de los explantes durante el periodo de cultivo. Las barras de error representan el error estándar.

Tabla 2.5: Concentraciones medias (%) de los metabolitos identificados en los explantes del cultivo *in situ* de *V. aerophoba*. Los valores entre paréntesis corresponden a la desviación estándar. También se incluyen el número n de muestras analizadas, el estadístico F y el p -valor

Metabolito	Tratamiento	Media (SD)	n	F	p -valor
ácido veróngico (10)	Entera	0.71 (0.65)	15	0.984	0.331
	Triturada	0.46 (0.54)	11		
dienona (11)	Entera	4.21 (3.09)	15	0.257	0.617
	Triturada	3.63 (2.61)	11		
aeroplysinina-1 (13)	Entera	20.07 (4.49)	15	44.3	< 0.001
	Triturada	8.42 (4.29)	11		
verongiolido (14)	Entera	1.41 (0.66)	15	7.526	< 0.05
	Triturada	2.10 (0.60)	11		
fistularina-1 (18)	Entera	4.70 (2.79)	15	10.9	< 0.01
	Triturada	1.63 (1.49)	11		
11- <i>epi</i> -fistularina-3 (15)	Entera	40.59 (6.84)	15	3.472	0.075
	Triturada	46.12 (8.28)	11		

(y sus desviaciones estándar) de estos índices para cada uno de los tratamientos fueron de 0.088 (0.034) y 0.119 (0.040) para las esponjas enteras y trituradas, respectivamente, por tanto una mayor proporción de verongiolido respecto a 11-*epi*-fistularina-3 en las esponjas trituradas. Esto indica que, después de dañar el tejido de la esponja, ha habido una bioconversión del metabolito de reserva 11-*epi*-fistularina-3, liberando verongiolido. Sin embargo, observando los valores obtenidos para las concentraciones de fistularina-1 (**18**) en muestras de esponjas trituradas se puede apreciar que este valor es menor que el de las esponjas

enteras, lo que sugiere que fistularina-1 (**18**) también debe sufrir algún tipo de biotransformación enzimática cuando el tejido de la esponja es dañado. En el caso de aeroplysinina-1 (**13**), su concentración también disminuye claramente cuando la esponja es triturada, lo cual podría indicar que durante la incubación de la esponja dañada ha continuado la transformación de aeroplysinina-1 (**13**) hacia la dienona (**11**) y de ésta al ácido verónico (**10**), sin embargo, no se observa tal correlación entre la concentración de aeroplysinina-1 y la suma de las concentraciones de la dienona y el ácido verónico. Una posible explicación sería que durante el largo periodo de incubación (12 h) de la esponja triturada en agua de mar se formaran radicales semiquinona no identificados por HPLC. Se sabe que los radicales semiquinona son muy tóxicos y que pueden ser los responsables, o al menos en parte, de la actividad citotóxica de aeroplysinina-1 (**13**) y la dienona (**11**) [Koulman et al., 1996].

Se puede concluir que el cultivo *ex situ* de *V. aerophoba*, utilizando el sistema de panel de malla descrito en este trabajo, puede proporcionar biomasa de esponja para la extracción de productos químicos con interés en la industria farmacéutica. Sin embargo, antes de empezar un cultivo a escala comercial, sería aconsejable evaluar la productividad en diferentes condiciones (profundidad, corrientes, alimento –por ejemplo, en los alrededores de granjas de peces–, etc. . .) y con otros métodos de cultivo (ensartadas en cuerdas horizontales o verticales, en tubos de malla, etc. . .). Aunque se han encontrado evidencias de que después de dañar el tejido de la esponja se produce una transformación de los metabolitos de reserva hacia los alcaloides monocíclicos más activos, también hay que decir que es necesario profundizar más en el conocimiento de la bioconversión de los alcaloides isoxazólicos, con la intención de optimizar el rendimiento en los productos con mayor actividad biológica.

Bibliografía

- Aydogmus, Z., Ersoy, N., and Imre, S. Chemical investigation of the sponge *Verongia aerophoba*. *Turk. J. Chem.*, 23(3):339–344, 1999.
- Battershill, C. and Page, M. Sponge aquaculture for drug production. *Aquaculture update*, 16:5–6, 1996.
- Becerro, M., Turon, X., Uriz, M., and Templado, J. Can a sponge feeder be a herbivore? *Tyrodina perversa* (Gastropoda) feeding on *Aplysina aerophoba* (Demospongiae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 78(4), 2003.
- Belarbi, E. H., Domínguez, M., Cerón, G. M., Contreras, G. A., García, C. F., and Molina, G. E. Cultivation of explants of the marine sponge *Crambe crambe* in closed systems. *Biomolecular engineering*, 20(4-6):333, 2003.
- Camacho, F. G., Chileh, T., García, M., Mirón, A. S., Belarbi, E., Gómez, A. C., and Grima, E. M. Sustained growth of explants from Mediterranean sponge *Crambe crambe* cultured *in vitro* with enriched rpmi 1640. *Biotechnol Prog*, 22(3):781–790, 2006.
- Carballo, J. L., Yañez, B., Zubía, E., Ortega, M. J., and Vega, C. Culture of explants from the sponge *Mycale cecilia* to obtain bioactive mycalazal-type metabolites. *Marine biotechnology*, 12(5):516–525, 2010.

- Ciminiello, P., Fattorusso, E., Forino, M., Magno, S., and Pansini, M. Chemistry of Verongida Sponges VIII - Bromocompounds from the Mediterranean Sponges *Aplysina aerophoba* and *Aplysina cavernicola*. *Tetrahedron*, 53 (18):6565–6572, 1997.
- Cimino, G., De Rosa, S., De Stefano, S., Self, R., and Sodano, G. The bromocompounds of the true sponge *Verongia aerophoba*. *Tetrahedron Lett.*, 24: 3029–3032, 1983.
- de Caralt, S., Agell, G., and Uriz, M.-J. Long-term culture of sponge explants: conditions enhancing survival and growth, and assessment of bioactivity. *Biomolecular Engineering*, 20(4):339–347, 2003.
- de Caralt, S., Uriz, M. J., and Wijffels, R. H. Cell culture from sponges: pluripotency and immortality. *Trends in biotechnology*, 25(10):467–471, 2007.
- Duckworth, A. Farming sponges to supply bioactive metabolites and bath sponges: a review. *Marine Biotechnology*, 11(6):669–679, 2009.
- Duckworth, A. R. and Battershill, C. N. Population dynamics and chemical ecology of New Zealand Demospongiae *Latrunculia* sp. nov. and *Polymastia croceus* (Poecilosclerida: Latrunculiidae: Polymastiidae). *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 35(5):935–949, 2001.
- Ebel, R., Brenzinger, M., Kunze, A., Gross, H., and Proksch, P. Wound activation of protoxins in marine sponge *Aplysina aerophoba*. *J. Chem. Ecol.*, 23: 1451–1462, 1997.
- Fattorusso, E., Minale, L., and Sodano, G. Aeroplysinin-1, an antibacterial bromo-compound from the sponge *Verongia aerophoba*. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, pages 16–18, 1972.
- Fu, W., Wu, Y., Sun, L., and Zhang, W. Efficient bioremediation of total organic carbon (TOC) in integrated aquaculture system by marine sponge *Hymeniacidon perleve*. *Biotechnology and Bioengineering*, 97(6):1387–1397, 2007.
- Harris, A. Anti-angiogenesis therapy and strategies for integrating it with adjuvant therapy. In *Adjuvant Therapy of Primary Breast Cancer VI*, pages 341–352. Springer, 1998.
- Hausmann, R., Vitello, M. P., Leitermann, F., and Syldatk, C. Advances in the production of sponge biomass *Aplysina aerophoba*—a model sponge for *ex situ* sponge biomass production. *Journal of biotechnology*, 124(1):117–127, 2006.
- Ilan, M., Contini, H., Carmeli, S., and Rinkevich, B. Progress towards cell cultures from a marine sponge that produces bioactive compounds. *Journal of Marine Biotechnology*, 4(3):145–149, 1996.
- Kaandorp, J. Morphological analysis of growth forms of branching marine sessile organisms along environmental gradients. *Marine Biology*, 134(2):295–306, 1999.

- Koulman, A., Proksch, P., Ebel, R., Beekman, A. C., van Uden, W., Konings, A. W. T., Pedersen, J. A., Pras, N., and Woerdenbag, H. J. Cytotoxicity and mode of action of aeroplysinin-1 and a related dienone from the sponge *Aplysina aerophoba*. *Journal of Natural Products*, 59(6):591–594, 1996.
- Kreuter, M. H., Leake, R., Rinaldi, F., Müller-Klieser, W., Müller, W., and Schröder, H. Inhibition of intrinsic protein tyrosine kinase activity of EGF-receptor kinase complex from human breast cancer cells by the marine sponge metabolite (+)-aeroplysinin-1. *Comp. Biochem. Physiol., B: Comp. Biochem.*, 97(1):151–158, 1990.
- Kreuter, M., Bernd, A., Holzmann, H., Müller-Klieser, W., Maidhof, A., Weißmann, N., Kljajic, Z., Batel, R., Schröder, H., and Müller, W. Cytostatic activity of aeroplysinin-1 against lymphoma and epithelioma cells. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 44(7–8):680–688, 1989.
- Kreuter, M., Robitzki, A., Chang, S., Steffen, R., Michaelis, M., Kljajic, Z., Bachmann, M., Schröder, H., and Müller, W. Production of the cytostatic agent aeroplysinin by the sponge *Verongia aerophoba* in in vitro culture. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 101(1):183–187, 1992.
- López, E., Britayev, T. A., Martin, D., and San Martín, G. New symbiotic associations involving syllidae (annelida: Polychaeta), with taxonomic and biological remarks on *Pionosyllis magnifica* and *Syllis* cf. *armillaris*. *Journal of the Marine Biological Association of the UK*, 81(03):399–409, 2001.
- Munro, H., Blunt, J., Lake, R., Litaudon, M., Battershill, C., and Page, M. From seabed to sickbed: what are the prospects? In Van Soest, R., Van Kempen, T., and Braekman, J., editors, *Sponges in time and space.*, volume 473–484. A.A. Balkema, 1994.
- Núñez, J., Pascual, M., Delgado, J., and Brito, M. Anélidos poliquetos de canarias: familia eunicidae. *Vieraea*, 26:47–75, 1997.
- Ogamino, T. and Nishiyama, S. A new ring-opening access to aeroplysinin-1, a secondary metabolite of *Verongia aerophoba*. *Tetrahedron*, 59(47):9419–9423, 2003.
- Osinga, R., Tramper, J., and Wijffels, R. H. Cultivation of marine sponges for metabolite production: applications for biotechnology? *Trends in biotechnology*, 16(3):130–134, 1998.
- Osinga, R., Tramper, J., and Wijffels, R. H. Cultivation of marine sponges. *Marine Biotechnology*, 1(6):509–532, 1999.
- Osinga, R., Sidri, M., Cerig, E., Gokalp, S. Z., and Gokalp, M. Sponge aquaculture trials in the east-mediterranean sea: new approaches to earlier ideas. *Open Marine Biology Journal*, 4:74–81, 2010.
- Page, M. J., Handley, S. J., Northcote, P. T., Cairney, D., and Willan, R. C. Successes and pitfalls of the aquaculture of the sponge *Mycale hentscheli*. *Aquaculture*, 312(1):52–61, 2011.

- Pawlik, J. R., McMurray, S. E., Erwin, P., and Zea, S. A review of evidence for food-limitation of sponges on Caribbean reefs. *Marine Ecology Progress Series*, 519:265–283, 2015.
- Peng, J., Li, J., and Hamann, M. T. The marine bromotyrosine derivatives. In Cordell, G., editor, *The Alkaloids: Chemistry and Biology*, volume 61, pages 59 – 262. Academic Press, 2005.
- Pomponi, S. and Willoughby, R. Sponge cell culture for the production of bioactive metabolites. In Van Soest, R., Van Kempen, T., and Braekman, J., editors, *Sponges in time and space.*, volume 395–400. A.A. Balkema, 1994.
- Puyana, M., Fenical, W., and Pawlik, J. R. Are there activated chemical defenses in sponges of the genus *Aplysina* from the caribbean? *Marine Ecology Progress Series*, 246:127–135, 2003.
- Rodríguez-Nieto, S., González-Iriarte, M., Carmona, R., Muñoz-Chápuli, R., Medina, M., and Quesada, A. Antiangiogenic activity of aeroplysinin-1, a brominated compound isolated from a marine sponge. *FASEB J.*, 16(2):261–263, 2002.
- Schippers, K., Sipkema, D., Osinga, R., Smidt, H., Pomponi, S., Martens, D., and Wijffels, R. Cultivation of sponges, sponge cells and symbionts: Achievements and future prospects. *Advances in Marine Biology*, 62:273–337, 2012.
- Teeyapant, R. and Proksch, P. Biotransformation of brominated compounds in the marine sponge *Verongia aerophoba* – Evidence for an induced chemical defense? *Naturwissenschaften*, 80(8):369–370, 1993.
- Teeyapant, R., Kreis, P., Wray, V., Witte, L., and Proksch, P. Brominated secondary compounds from the marine sponge *Verongia aerophoba* and the sponge feeding gastropod *Tyrodina perversa*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 48(7-8):640–644, 1993.
- Thoms, C., Ebel, R., and Proksch, P. Activated chemical defense in *Aplysina* sponges revisited. *Journal of chemical ecology*, 32(1):97–123, 2006.
- Troell, M., Joyce, A., Chopin, T., Neori, A., Buschmann, A. H., and Fang, J.-G. Ecological engineering in aquaculture – Potential for integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) in marine offshore systems. *Aquaculture*, 297(1):1–9, 2009.
- Turon, X., Tarjuelo, I., and Uriz, M. Growth dynamics and mortality of the encrusting sponge *Crambe crambe* (Poecilosclerida) in contrasting habitats: correlation with population structure and investment in defence. *Functional Ecology*, 12(4):631–639, 1998.
- Tymiak, A. and Rinehart, K. Biosynthesis of dibromotyrosine-derived antimicrobial compounds by the marine sponge *Aplysina fistularis* (*Verongia aurea*). *J. Am. Chem. Soc.*, 103:6763–6765, 1981.
- Voultsiadou-Koukoura, H., Koukouras, A., and Eleftheriou, A. Macrofauna associated with the sponge *Verongia aerophoba* in the North Aegean Sea. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 24(2):265–278, 1987.

- Wilkinson, C. R. and Vacelet, J. Transplantation of marine sponges to different conditions of light and current. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 37(1):91–104, 1979.
- Xue, L. and Zhang, W. Growth and survival of early juveniles of the marine sponge *Hymeniacidon perlevis* (Demospongiae) under controlled conditions. *Marine biotechnology*, 11(5):640–649, 2009.
- Zar, J. *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall, 1999.

Capítulo 3

Identificación de una nueva especie de *Myxilla* (Porifera: Demospongiae) para las Islas Canarias

3.1. Introducción

A pesar de su simplicidad, las esponjas están adaptadas para colonizar una gran variedad de nichos ecológicos desde los niveles intermareales a las zonas abisales y también en aguas dulces. En algunos de estos medios desempeñan un papel ecológico de primera magnitud ya que son capaces de filtrar enormes volúmenes de agua eliminando las partículas finas y reciclando una gran parte de la materia orgánica particulada.

Las esponjas pueden actuar como bioindicadores de la contaminación marina y pueden servir como alimento a algunos grupos de moluscos gasterópodos y de peces. A lo largo del periodo evolutivo de las esponjas, han desarrollado mecanismos para prevenir la depredación y la competición. Algunos de ellos incluyen la producción de una gran cantidad de compuestos que pueden ser repugnantes o tóxicos para evitar que otros organismos se los coman. Estos compuestos suponen una nueva vía para la búsqueda de sustancias efectivas contra diferentes enfermedades como el cáncer o el SIDA.

Aunque este filo es uno de los grupos de invertebrados más representativos del medio marino de Canarias, la fauna de poríferos de este archipiélago apenas había sido estudiada hasta los años 80 cuando Cruz y Bacallado publican una serie de trabajos sobre este grupo dentro de varios proyectos de investigación sobre el bentos marino [Cruz, 1980; Cruz and Bacallado, 1983, 1984, 1985a,b]. En la actualidad se compone de unas 170 especies [Cruz, 2002].

El presente trabajo contribuye al conocimiento de este grupo en Canarias con la descripción de una especie del género *Myxilla* Schmidt, 1862.

3.2. Material y métodos

3.2.1. Esponjas

Los especímenes se recogieron por primera vez (febrero, 2005) durante una campaña de bioprospección de esponjas marinas para la extracción de productos naturales en la población de Castillo del Romeral, municipio de Santa Lucía de Tirajana, Gran Canaria, Islas Canarias (27°47'53" N, 15°26'51" W), a 5 m de profundidad.

Posteriormente, se recolectaron en el mismo lugar en julio de 2006, febrero y marzo de 2007. Para su recolección se usaron equipos de buceo autónomo. Después de fijarlas en formol 4 %, se guardaron en etanol 70 %. Se guardó un espécimen de referencia (Por.11) en la Colección de Zoología ZCM de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

3.2.2. Preparación de las espículas

La identificación de la esponja se basa fundamentalmente en el examen de los caracteres esqueléticos [Cristobo et al., 1992]. Para ello fue necesario preparar las espículas de manera que pudieran ser observadas al microscopio, realizando una digestión con ácido nítrico según se describe en van Soest et al. [2001]. Brevemente, pequeños fragmentos de diferentes individuos se dejaron secar y se introdujeron en tubos de vidrio con unas gotas de ácido nítrico concentrado, que se pusieron a calentar suavemente con un mechero Bunsen. Una vez la materia orgánica se hubo digerido, la muestra se diluyó con agua destilada (aproximadamente 10 ml) y se centrifugó 5 minutos a 3000 rpm. Seguidamente se eliminó el sobrenadante y se repitió el proceso 5 veces. Finalmente, una parte de la muestra se montó en bálsamo de Canadá para su observación al microscopio óptico y la otra parte se filtró sobre un filtro de policarbonato negro con un diámetro de poro de 0.2 μm (Millipore, GTBP02500) aplicando vacío suave (<200 mm Hg) para su observación al microscopio electrónico de barrido (MEB).

3.2.3. Observación por microscopía

El microscopio óptico usado fue un Leica DM 2500 equipado con una cámara Leica DFC420C y con objetivos de 63x y 100x (aceite), además del ocular 10x. Para su observación en el MEB, las muestras se recubrieron en oro y se visualizaron en un microscopio electrónico de barrido HITACHI S-3400N.

3.3. Resultados y discusión

En las costas españolas se habían registrado 6 especies de este género (Tabla 3.1) [Cristobo et al., 1999] de las cuales tan solo una, *Myxilla rosacea*, se había citado de las costas canarias [Cruz, 2002]. Este género se caracteriza por poseer un esqueleto coanosómico formado por un retículo de acantostilos o estilos lisos sin espículas accesorias y con espículas ectosómicas con ápices espinosos. Las microscleras incluyen quelas ancoradas con 3 dientes [Hooper et al., 2002].

En general, las especies de este género se caracterizan por su apariencia masiva (hasta 20 cm), color rojo, anaranjado y de preferencias ecológicas esciáfilas.

Tabla 3.1: Distribución de las especies de esponjas del género *Myxilla* en aguas de España y Portugal.

Área	Especies	Fuente consultada
Canarias	<i>M. rosacea</i>	Cruz [2002]
Selvagens	<i>M. rosacea</i>	Lopes [1995]
Gorringe	<i>M. rosacea</i>	Xavier and van Soest [2007]
Gibraltar	<i>M. rosacea</i> <i>M. iotrochotina</i> <i>M. tarifensis</i>	Carballo [1994]
Alborán	<i>M. rosacea</i>	Maldonado [1993]
Azores	<i>M. rosacea</i> <i>M. macrosigma</i> <i>M. prouhoi</i>	Boury-Esnault and Lopes [1985]
Arrábida	<i>M. rosacea</i> <i>M. macrosigma</i>	Naveiro [2002]
Portugal	<i>M. rosacea</i>	Lopes [1989]
Baleares	<i>M. rosacea</i>	Bibiloni [1990]
Galicia	<i>M. rosacea</i> <i>M. iotrochotina</i> <i>M. macrosigma</i> <i>M. incrustans</i> <i>M. fimbriata</i>	Cristobo et al. [1999]
Cantábrico	<i>M. rosacea</i> <i>M. iotrochotina</i> <i>M. macrosigma</i>	Preciado [2002]

Con respecto a sus elementos esqueléticos posee acantostilos de una sola talla, estrangilos o tornotes, isoquelas y sigmas.

Los ejemplares de *Myxilla* sp. se encontraron en el interior de tubos de hormigón (aprox. 1.2 m de diámetro) que se habrían roto/descolocado a la hora de instalar un emisario submarino, tanto en el techo como en la parte inferior del tubo, los del techo con forma laminar (5-8 cm de alto, 10-15 cm de ancho y 1-2 cm de grosor) mientras que los del suelo tenían forma masiva (5-8 cm altura, 8-10 cm ancho, 4-6 cm grosor). En las siguientes recogidas de muestras, se encontraron ejemplares de la misma esponja (forma masiva, algunos ejemplares de hasta 20 cm) en zonas a la sombra del tubo de hormigón, por lo que se podría pensar que se trata de una especie con preferencias esciáfilas.

El entorno en el que se encuentran estos tubos es un fondo es de arena de grano medio-grueso, llano con algunas rocas bajas. En la arena y en zonas más expuestas a la luz se encontraban abundantes ejemplares de la esponja *Verongia aerophoba* así como algunos del género *Ircinia*. En las rocas y, principalmente, en el exterior del tubo de hormigón, esponjas del género *Phorbas* y *Batzella*.

La forma es masiva, en vivo presentan una gama de colores que va del

naranja-amarillento a diferentes tonos de rojo (??); en alcohol es de color amarillo-beige. Tiene algunos ósculos circulares dispersos en su superficie. La apariencia del coanosoma es cavernosa. Segregan gran cantidad de mucus e incorporan grandes cantidades de arena.

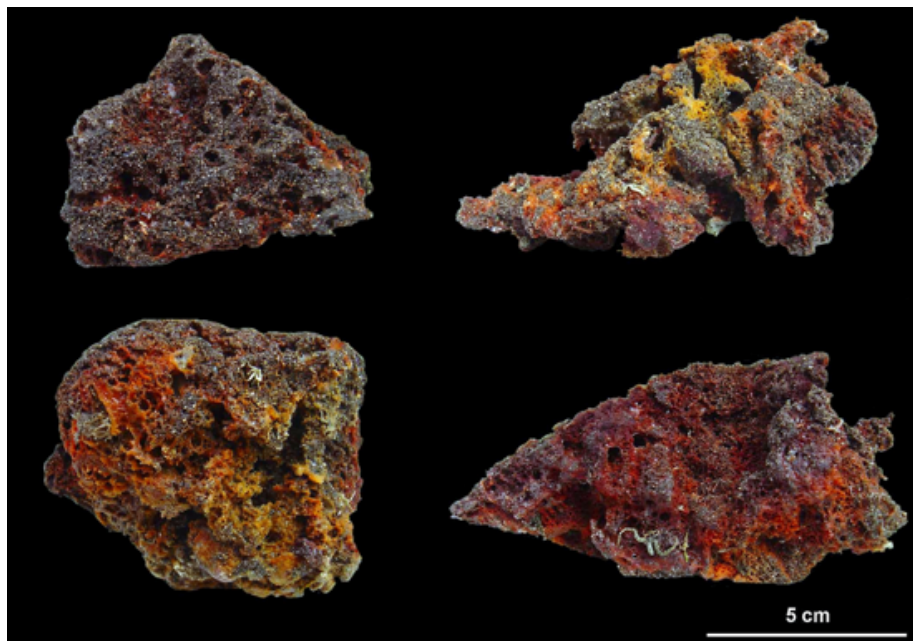


Figura 3.1: Habitus de algunos de los ejemplares recolectados de *Myxilla* sp.

Su esqueleto se caracteriza por la presencia de acantostilos con pocas espinas (longitud: 128.4 ± 28.1 μm , grosor: 3.44 ± 0.72 μm) (Figura 3.2), tornotes mucronados (longitud: 156.7 ± 28.1 μm , grosor: 2.40 ± 0.44 μm) (Figura 3.3), isoquelas arqueadas con tres dientes (longitud: 13.4 ± 1.4 μm) (Figura 3.4) y sigmas (longitud: 26.1 ± 4.2 μm) (Figura 3.5).

La especie más próxima es *Myxilla tarifensis* de la que se diferencia claramente por la morfología de las isoquelas [Carballo and García-Gómez, 1996].

Ninguna de las especies descritas del Atlántico noreste se corresponde con la nueva especie de Canarias, por lo que para su identificación definitiva será necesario un estudio en profundidad de su disposición esquelética y la aplicación de técnicas moleculares.

Agradecimientos

Quiero agradecer a Ferran Hierro del servicio de microscopía electrónica de la Universitat de les Illes Balears por las imágenes tomadas en el MEB. También agradezco a Javier Cristobo, Pilar Ríos, Iosune Uriz y Tomás Cruz por sus consejos y ayuda en la identificación de esta esponja.



Figura 3.2: Megascleras de *Myxilla* sp.: tornotes (izquierda) y acantostilos (derecha).

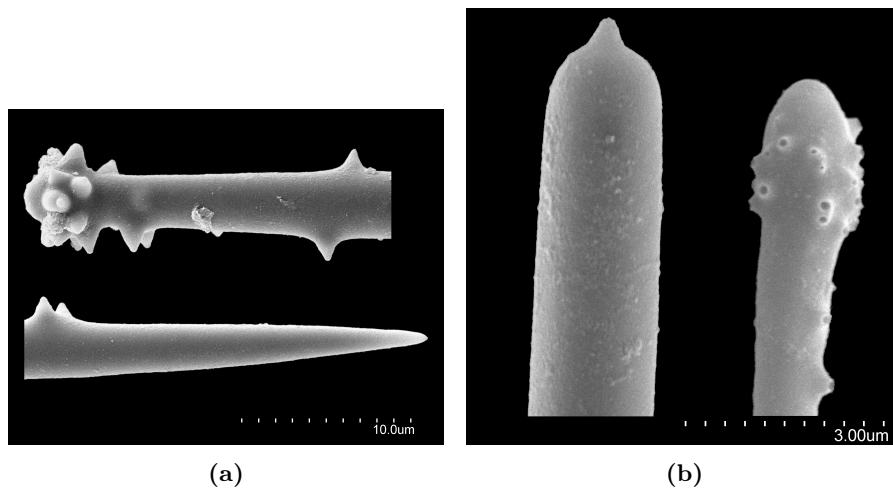


Figura 3.3: (a) Detalle de los extremos de los acantostilos. (b) Detalle del extremo de un tornote mucronado (izquierda) y de un acantostilo con las espinas romas (derecha).



Figura 3.4: Microscleras de *Myxilla* sp.: isoquelas arqueadas.



Figura 3.5: Microscleras de *Myxilla* sp.: sigmas.

Bibliografía

- Bibiloni, M. *Fauna de Esponjas de las Islas Baleares. Variación cualitativa y cuantitativa de la población de esponjas en un gradiente batimétrico. comparación Baleares-Costa Catalana*. PhD thesis, Universitat de Barcelona, 1990.
- Boury-Esnault, N. and Lopes, M. T. Les Démosponges littorales de l'Archipel des Açores. In *Annales de l'Institut océanographique*, volume 61, pages 149–225. Institut océanographique, 1985.
- Carballo, J. *Taxonomía, zoogeografía y autoecología de los Poríferos del Estrecho de Gibraltar*. PhD thesis, Universidad de Sevilla, España, 1994.
- Carballo, J. and García-Gómez, J. *Myxilla tarifensis* sp. nov. (Porifera, Poecilosclerida), with remarks on the genus *Myxilla* in the Strait of Gibraltar (Iberian Peninsula). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 76(04):875–884, 1996.
- Cristobo, F., Urgorri, V., Solrzano, M., and Ríos, P. Métodos de recogida, estudio y conservación de las colecciones de poríferos. In *Simposio Internacional y Primer Congreso Mundial sobre Preservación y Conservación de Colecciones de Historia Natural*, volume 2, pages 277–287. Ministerio de cultura. Dirección General de Bellas Artes y Archivos, 1992.
- Cristobo, F., RIOS, P., and URGORRI, V. Remarks on the status of *Myxilla* (Porifera: Poecilosclerida) on the Galician coast (NW Iberian Peninsula). *Memoirsof the Queensland Museum*, 44:101–124, 1999.
- Cruz, T. Contribución al estudio de los espongiarios de las Islas Canarias. Demosponjas (Homosclerophorida, Astrophorida y Hadromerida) del litoral de Tenerife. *Memoria de Licenciatura, Universidad de La Laguna*, 1980.
- Cruz, T. *Esponjas marinas de Canarias*. Banco de datos de Biodiversidad de Canarias. Gobierno de Canarias, 2002.
- Cruz, T. and Bacallado, J. Esponjas perforantes (Porifera, Clionidae) de Tenerife, Islas Canarias. *Vieraea*, 12(1-2):37–48, 1983.
- Cruz, T. and Bacallado, J. Contribucion al conocimiento de los espongiarios de las Islas Canarias. II–Demosponjas Hadromerida del Litoral de Tenerife. *Servicio Publicaciones Universidad La Laguna*, pages 63–73, 1984.
- Cruz, T. and Bacallado, J. Contribucion al conocimiento de los espongiarios de las Islas Canarias: demosponjas de los fondos de *Dendrophyllia ramea* en Tenerife. *Anales Facultad de Ciencias*, 10:71–98, 1985a.
- Cruz, T. and Bacallado, J. Introduccion a los poblamientos de espongiarios de las Islas Canarias. In *IV Simposio Iberico Bentos Marino*, pages 141–150, 1985b.
- Hooper, J., van Soest, R., and Willenz, P., editors. *Systema Porifera: A Guide to the Classification of Sponges*. Springer US, 2002.
- Lopes, M. *Demospongiae Intertidais de Portugal Continental*. PhD thesis, Universidade de Lisboa, Portugal, 1989.

- Lopes, M. Littoral sponges from selvagens islands. *Boletim do Museu Municipal do Funchal*, 4:387–394, 1995.
- Maldonado, M. *Demosponjas litorales de Alborán: faunística y biogeografía*. PhD thesis, Universidad de Barcelona, 1993.
- Naveiro, A. Poríferos de la costa da Arrábida (Portugal): Clase Demospongiae. *Memoria para optar al grado de licenciado, Universidad de Santiago de Compostela*, 2002.
- Preciado, I. *Desmosponjas litorales del entorno de la Isla de Mouro (Santander, Mar Cantábrico): Taxonomía y Ecología*. PhD thesis, Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid, Spain, 2002.
- van Soest, R., Richelle-Maurer, E., Gomez, R., and Braekman, J. Protocols for developing sponge compounds involving the source organism. *Final report, Symbiosponge Project*, 2001.
- Xavier, J. and van Soest, R. Demosponge fauna of Ormonde and Gettysburg Seamounts (Gorringe Bank, north-east Atlantic): diversity and zoogeographical affinities. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 87(06):1643–1653, 2007.

Capítulo 4

Productos naturales en *Myxilla* sp.

4.1. Introducción

Los invertebrados marinos son una rica fuente de productos naturales que poseen variadas actividades biológicas y la mayoría de estos compuestos (más de 3500, [Hu et al., 2011]), se han aislado de esponjas. La clase Demospongiae es la clase más grande del filo Porifera [van Soest et al., 2012], y dentro de esta clase el orden Poecilosclerida es el más diverso. Nuestro grupo ha identificado una esponja de la familia Myxillidae (Poecilosclerida), perteneciente al género *Myxilla* y que parece ser una especie no descrita en las Islas Canarias. No hay muchos trabajos sobre productos naturales de este género, sin embargo, en uno de ellos se aisló un polisacárido sulfatado de un extracto acuoso de *Myxilla rosacea*, que mostró actividad anti-VIH y al que llamaron rosacelosa [Cimino et al., 2001]. Mucho tiempo antes, Kochetkov et al. [1967] aislaron glucolípidos de *Myxilla incrustans*, cuyas estructuras moleculares contenían esfingosina, fitoesfingosina, ácidos grasos y fósforo.

En base a esto, decidimos realizar un estudio químico de un extracto etanólico de la esponja *Myxilla* sp. de las Islas Canarias, aportando nuevos datos espectroscópicos y cromatográficos de los metabolitos aislados.

4.2. Aislamiento, purificación e identificación de los esteroides de *Myxilla* sp.

Las fracciones que contuvieron los esteroides se eluyeron con una mezcla de Hexano/AcOEt 80:20, se recromatografiaron repetidamente hasta conseguir la purificación y se identificaron los componentes como estigmasta-5-en-3 β -ol (β -sitosterol) (**21**, 75%), estigmasta-5,23-dien-3 β -ol (**22**, 16%), estigmasta-5,24(25)-dien-3 β -ol (**23**, 2%) y estigmasta-5,25-dien-3 β -ol (**24**, 7%). La mezcla de estigmasteroles tiene el aspecto de un sólido blanco y es homogéneo por CCF. Tras cristalización a partir de MeOH se determinó el punto de fusión de la mezcla de estigmasteroles resultando 277-278°C. También se midió la rotación óptica, resultando $[\alpha]_D^{25} = -15.2^\circ$ (c 0.2; CHCl₃). Obsérvese que ambos valores coinci-

den con los descritos en la bibliografía para el β -sitosterol (p.f.=277-278°C,[Kim et al., 2005]; $[\alpha]_D^{25^\circ\text{C}} = -15.2^\circ$ (c 0.2; CHCl_3), [Holzbach and Lopes, 2010]).

El espectro de masas de alta resolución muestra el pico correspondiente al ion molecular a m/z 414.3854 que corresponde a la fórmula molecular $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$. Esta fórmula indica que nuestro producto tiene dos carbonos más que el colesterol (éste es C_{27}). Un estudio detallado del espectro de masas indica que los dos carbonos adicionales se encuentran en la cadena lateral, que estaría así formada por diez carbonos. Así por ejemplo, picos a m/z 273 (pérdida de la cadena lateral de diez carbonos) y 255 (pérdida de la cadena lateral de diez carbonos y agua) nos llevan a proponer un núcleo tetracíclico idéntico al del colesterol. La presencia de productos secundarios con una insaturación en la cadena lateral queda evidenciado por la observación del ion molecular de los mismos a m/z 412 ($\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$). Por las intensidades de los iones moleculares –414 vs 412– deducimos que los insaturados en la cadena lateral están presentes con una concentración total del 25%, e impurifican al esteroles mayoritario, el β -sitosterol.

El espectro de ^1H -RMN desplaza una señal a δ 5.35 (1H, dobles dobles superpuestos) que es característica de un doble enlace entre los carbonos 5 y 6 de los cuatro esteroides con el mismo esqueleto del β -sitosterol. Una señal a δ 5.16 en forma de un triplete deformado delata la presencia minoritaria (16%) del regioisómero 23(24)-didehidroestigmasterol (**22**). Dos singletes anchos a δ 4.71 y δ 4.67, ambos en relación 1:1 delatan el metileno olefínico del 25(26)-didehidroestigmasterol (**24**) (Figura 4.1). La señal del H geminal al grupo alcohol (δ 3.51; 1H; m) delata a un hidroxilo 3β típico de los esteroides. También se observaron los singletes de los hidrógenos sobre los carbonos angulares C18 y C19 (δ 0.68 y 1.04 respectivamente), que se corresponden con los encontrados en la bibliografía para los cuatro esteroides que componen la mezcla.

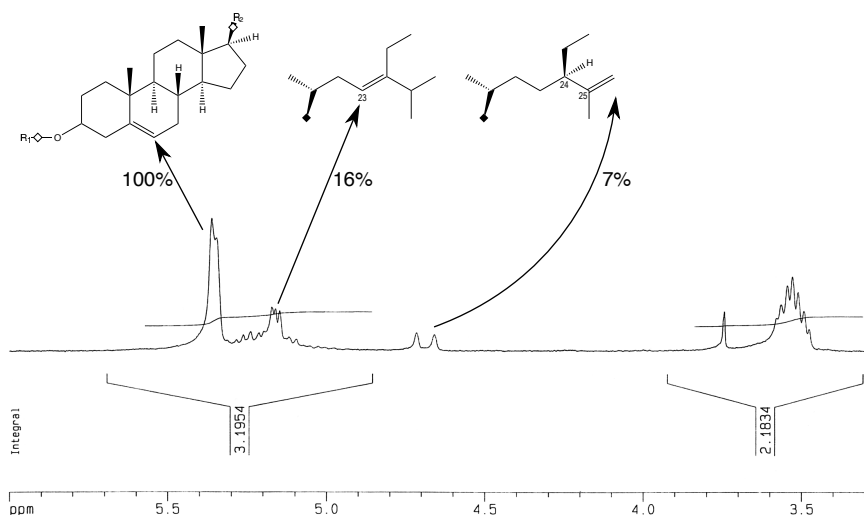
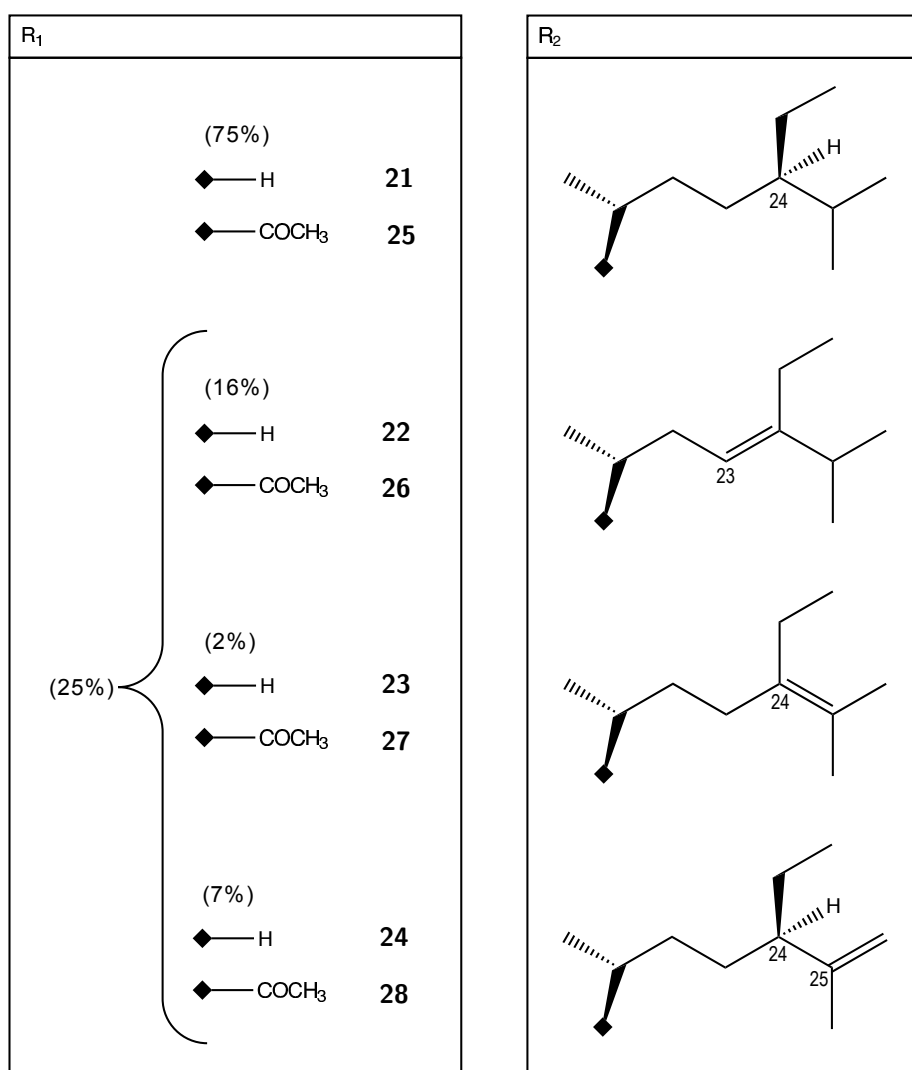
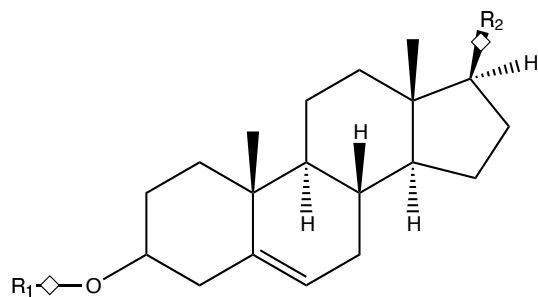


Figura 4.1: Protones olefínicos de la mezcla de β -sitosterol (**21**, 75%), 23(24)-didehidro- β -sitosterol (**22**, 16%), 24(25)-didehidro- β -sitosterol (**23**, 2%) y 25(26)-didehidro- β -sitosterol (**24**, 7%) .

El espectro de ^{13}C -RMN muestra la presencia de picos asignables a todos los carbonos del núcleo esteroidal presente en los cuatro esteroides, datos que se presentan en la Tabla 4.1. Son características las señales de los carbonos C5 y C6 que conforman el doble enlace del núcleo esteroidal (δ 140,7 y 121,7 respectivamente). Paralelamente se observan las señales asignables a C25 y C26 del 25(26)-didehidro- β -sitosterol (**24**, δ 145.6 y 116.4, respectivamente), a C23 y C24 del 23(24)-didehidro- β -sitosterol (**22**, δ 135.9 y 131.7, respectivamente) y a C24 y C25 del 24(25)-didehidro- β -sitosterol (**23**, δ 124.0 y 126.1, respectivamente).

Tabla 4.1: Desplazamientos de carbono del núcleo esteroidal presente en los cuatro esteroides (**21**, **22**, **23**, **24**) y sus acetatos (**25**, **26**, **27**, **28**) en Cl_3CD y a 75 MHz.

Nº Carbono	β -sitosterol (21) (δ , ppm)	Acetato de β -sitosterol (25) (δ , ppm)
1 (CH ₂)	37.2	36.9
2 (CH ₂)	31.6	27.7
3 (CH)	71.8	73.8
4 (CH ₂)	42.2	38.0
5 (C)	140.7	139.5
6 (CH)	121.7	122.5
7 (CH ₂)	31.6	31.8
8 (CH)	31.9	31.8
9 (CH)	50.1	49.9
10 (C)	36.5	36.9
11 (CH ₂)	21.0	20.9
12 (CH ₂)	39.7	39.6
13 (C)	39.7	39.4
14 (CH)	56.7	56.6
15 (CH ₂)	24.3	24.2
16 (CH ₂)	28.2	28.2
17 (CH)	56.0	56.1
18 (CH ₃)	11.8	11.8
19 (CH ₃)	19.4	19.2
20 (CH)	36.1	36.5
21 (CH ₃)	19.0	18.6
CH ₃ C=O		170.3
C=O		21.3



Esteroles identificados en *Myxilla* sp.

La mezcla de esteroides anterior se acetiló de la forma usual para dar la mezcla equivalente de sus acetatos, el acetato de estigmasta-5-en-3 β -ol (acetato del β -sitosterol) (**25**, 75 %), acetato de estigmasta-5,23-dien-3 β -ol (**26**, 16 %), acetato de estigmasta-5,24(25)-dien-3 β -ol (**27**, 2 %) y acetato de estigmasta-5,25-dien-3 β -ol (**28**, 7 %). En el espectro de ^1H -RMN de esta mezcla de acetatos se presenta a δ 4.59 un multiplete que integra para 1H correspondiente al protón geminal a los grupos acetoxi, así como un singlete que integra para 3H correspondiente al metilo de los mencionados grupos acetoxi. La curva integral demuestra que se trata de monocetatos, y la única desaparición de la señal correspondiente al protón geminal al 3-OH de los esteroides (δ 3.51) demuestra que la acetilación ha ocurrido exclusivamente en posición 3. El espectro de ^1H -RMN también muestra la señal típica del protón olefínico en C6 a δ 5.37. El resto de las señales desplazadas en el espectro son consistentes con el esqueleto esteroideal del β -sitosterol, su esteroide mayoritario. Un triplete centrado a δ 5.16 delata el esqueleto del 23(24)-didehidro- β -sitosterol (**26**) y dos señales a δ 4.71 y δ 4.65 delatan el metileno del 25(26)-didehidro- β -sitosterol (**28**). Las curvas integrales de estas señales son consistentes con la proporción asignada a los mismos en la Figura 4.1.

En el espectro de ^{13}C -RMN (Tabla 4.1) se observa la señal del carbono carbonílico del grupo acetoxi a δ 170.3 y también el metilo del mismo grupo acetoxi a δ 21.3 así como las señales de los carbonos olefínicos C5 y C6 del esqueleto del β -sitosterol (δ 139.5 y 122.5, respectivamente); también el resto de señales esperadas. Señales minoritarias en la zona olefínica del espectro (δ 116-146) se deben a los estigmasteroides insaturados (**26**, **27** y **28**).

En el espectro de masas de la mezcla de acetatos se observa el pico del ión molecular a m/z 456.3976 (M^+ , $\text{C}_{31}\text{H}_{52}\text{O}_2$) correspondiente al acetato del β -sitosterol.

4.3. Ceramidas de *Myxilla* sp.

La mezcla de ceramidas (Figura 4.2) tiene el aspecto de un sólido blanco y es homogénea por TLC [$R_f=0.42$ en Hexano:AcOEt (1:1, v/v) y $R_f=0.80$ en CHCl_3 :MeOH:AcOH:H $_2$ O (50:30:8:7, v/v) como eluyente] en consistencia con la bibliografía [Dressler and Kolesnick, 1990].

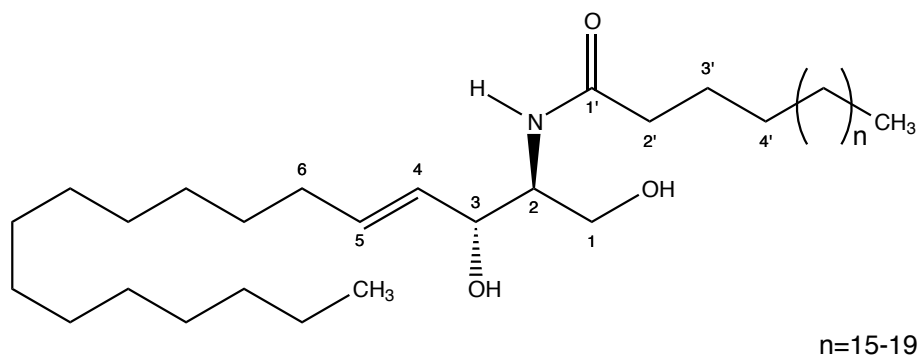


Figura 4.2: Ceramidas aisladas de *Myxilla* sp.

Los datos fisicoquímicos de la mezcla de ceramidas son los siguientes: m.p. 87-88°C, $[\alpha]_D^{20} = -2.6$ (CHCl₃, c 0.945).

Las estructuras se confirmaron por HRMS, DEPT-135, DEPT-90 y espectroscopía de resonancia magnética nuclear bi-dimensional (COSY, NOESY, HSQC y HMBC).

El espectro de resonancia magnética nuclear de protón presentó los siguientes datos:

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 6.26 (d, $J = 7.26$ Hz), 5.77 (1 H, dt, $J_{H_4,H_5} = 15.3$ Hz, $J_{H_5,H_6} = 6.6$ Hz), 5.53 (1 H, dd, $J_{H_3,H_4} = 6.4$ Hz, $J_{H_4,H_5} = 15.3$ Hz), 3.60-4.31 (4 H, m, H-1a, H-1b, H-2, H-3), 2.80 (2 H, PO(OH)₂), 2.23 (4 H, t, $J = 7.6$ Hz, H-2'), 2.04 (2 H, m, H-6), 1.66 (1 H, br s, OH), 1.63 (2 H, m, H-3'), 1.25 (34 H, CH₂), 1.22 (22 H, CH₂), 0.88 (3 H, t, $J = 6.6$ Hz, CH₃), 0.87 (3H, t, $J = 6.6$ Hz, CH₃).

Los experimentos de resonancia magnética nuclear de carbono presentaron los siguientes espectros:

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 173.95, 134.31, 128.76, 74.66, 62.49, 54.46, 36.84, 32.28, 31.92, 29.69, 29.36, 25.75, 22.68, 14.11.

¹³C-RMN (125 MHz, Py-d₅): δ (ppm) = 175.44, 134.36, 134.24, 75.29, 64.14, 58.85, 38.87, 34.12, 34.10, 32.00, 31.98, 31.90, 31.87, 31.84, 31.76, 31.71, 31.61, 31.59, 31.55, 28.42, 24.92, 16.26.

En el experimento DEPT-135 se separan los cuatro metinos y dos metilos (señales positivas) del resto de metilenos (señales negativas). Las últimas incluyen al C1. En el experimento DEPT-90 se separan sólo los cuatro metinos (señales positivas).

En el espectro COSY se observan las siguientes correlaciones: (2,NH); (3,4); (5,6); (1a,1b); (6,7); (2',3') y (3',4'), entre otras.

En el espectro NOESY sobresale la correlación entre los hidroxilos de la unidad de fosfato y el hidroxilo en C-3, entre otras.

En el espectro HSQC se correlaciona cada protón con el carbono al que está unido (H_{1a} y H_{1b} con C₁, H₂ con C₂, etc.), y en el espectro HMBC se correlaciona cada protón con los carbonos separados por dos o tres enlaces (H₃ con C₁, C₂, C₄ y C₅, etc).

En el espectro de masas se observan los iones moleculares formando aducto con el sodio de todos los componentes de la serie representada por la fórmula de la Figura 4.2 desde n=15 (ceramida C20) hasta n=19 (ceramida C-24) .

Estos datos son consistentes con las conocidas características de las ceramidas naturales, esto es, configuración *eritro* (2*S*,3*R*) y un doble enlace 4,5-*trans* en el componente base y éste unido mediante una unión amídica a ácidos grasos de cadenas largas (más de 20 carbonos).

4.4. Ceramidas-1-fosfato de *Myxilla* sp.

Se detectaron a nivel trazas contaminando la fracción anterior de ceramidas. Así, se observaron sus fragmentos fosforilados en el espectro de masas de alta resolución (Figura 4.4). Pudieron ser determinadas (% w/w) gracias a una técnica analítica de alta sensibilidad, como es la HPLC-MS.

Tabla 4.2: Iones moleculares de la mezcla de ceramidas aislada de *Myxilla* sp. observados en el espectro de masas de alta resolución. Sus intensidades relativas nos dan el porcentaje de cada componente en la mezcla

Ion observado (Calc.)	Fórmula	Concentración (% w/w)	Ceramida (Valor de n)
616.5662 (M+Na ⁺) (616.5645)	C ₃₈ H ₇₅ NO ₃ Na	8.47	CerC ₂₀ (n=15)
630.5812 (M+Na ⁺) (630.5801)	C ₃₉ H ₇₇ NO ₃ Na	7.97	CerC ₂₁ (n=16)
644.6007 (M+Na ⁺) (644.5958)	C ₄₀ H ₇₉ NO ₃ Na	40.25	CerC ₂₂ (n=17)
658.6120 (M+Na ⁺) (658.6114)	C ₄₁ H ₈₁ NO ₃ Na	11.52	CerC ₂₃ (n=18)
672.6302 (M+Na ⁺) (672.6302)	C ₄₂ H ₈₃ NO ₃ Na	31.79	CerC ₂₄ (n=19)

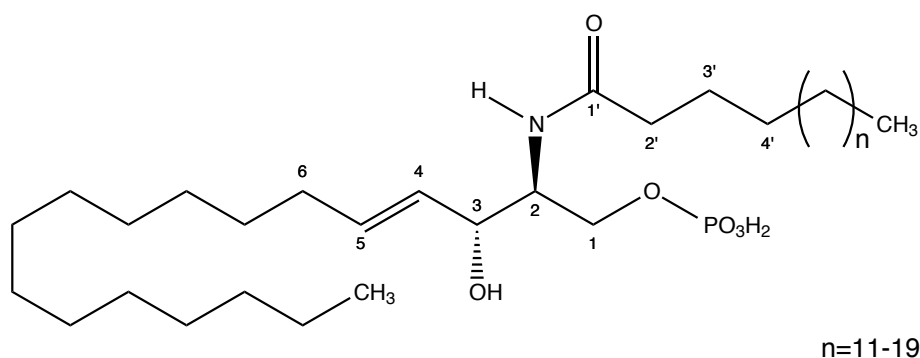


Figura 4.3: Ceramidas-1P aisladas de *Myxilla* sp.

4.4.1. Determinación por infusión directa (HPLC-MS).

Tras hacer la infusión directa de la mezcla de ceramidas a una concentración de 1 mg l⁻¹, se obtuvo el espectro de masas que se muestra en la Figura 4.4, lo que nos da los porcentajes de la Tabla 4.3. Se puede comprobar que las masas mayoritarias corresponden a las ceramidas fosforadas ionizadas positivamente. Las diferencias entre ellas son de 14 unidades, correspondientes a la adición de un grupo metileno en cada una de ellas. La ceramida mayoritaria es la de masa 644.6 (Cer1PC₁₈), constituida por el ácido esteárico.

4.4.2. Determinación cromatográfica (HPLC-MS).

Una vez determinadas las masas de las ceramidas, éstas se inyectaron en el cromatógrafo y se hicieron pasar a través de la columna para producir la separación de éstas. Sin embargo, la similitud de los compuestos hizo que no se pudieran separar cromatográficamente, sin embargo, se obtuvo el cromatograma

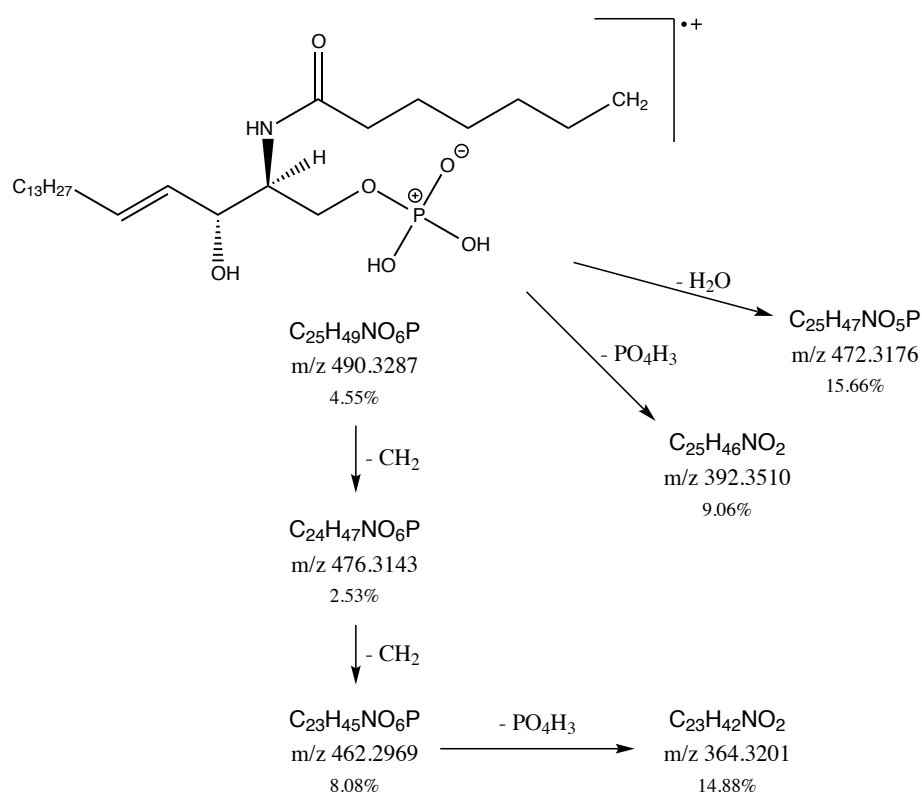


Figura 4.4: Esquema de fragmentaciones observadas en el espectro de masas de alta resolución de la mezcla de ceramidas-1-fosfato aislada de *Myxilla* sp.

que se muestra en la Figura 4.5, donde se ven las transiciones de cada una de las ceramidas. Se trabajó utilizando sólo el primer cuadrupolo, debido a que no se obtuvo ningún “ión hijo” estable al realizar la fragmentación de los “iones padres”.

En el espectro de masas, obtenido en un espectrómetro de masas normal, y en consistencia con lo descrito antes por infusión directa en un aparato HPLC-MS, se observan los iones moleculares de todos los componentes de la serie representada por la fórmula de la Figura 4.3, desde n=11 (ceramida-1P-C16) hasta n=19 (ceramida-1P-C24).

Las esponjas se han revelado como una rica fuente de productos naturales incluyendo la esfingosina-1-fosfato a partir de *Myxilla incrustans* [Kochetkov et al., 1967]. Aparentemente, las ceramidas-1-fosfato están presentes en los tejidos del animal a niveles comparables a los de la esfingosina-1-fosfato.

Según se describe en la bibliografía [Gómez-Muñoz, 2006], las ceramidas y las ceramidas-1-fosfato tienen funciones antagónicas, y es necesario alcanzar un balance correcto entre las concentraciones de ambos metabolitos para que se de la homeóstasis de las células y el tejido. La mezcla de ceramidas-1-fosfato, al ser esfingolípidos análogos al ácido fosfatídico, son metabolitos implicados en el “ciclo de la esfingomielina”. Se forman a partir de las ceramidas por la acción de una ceramida-kinasa específica, la cual debe de estar relacionada con

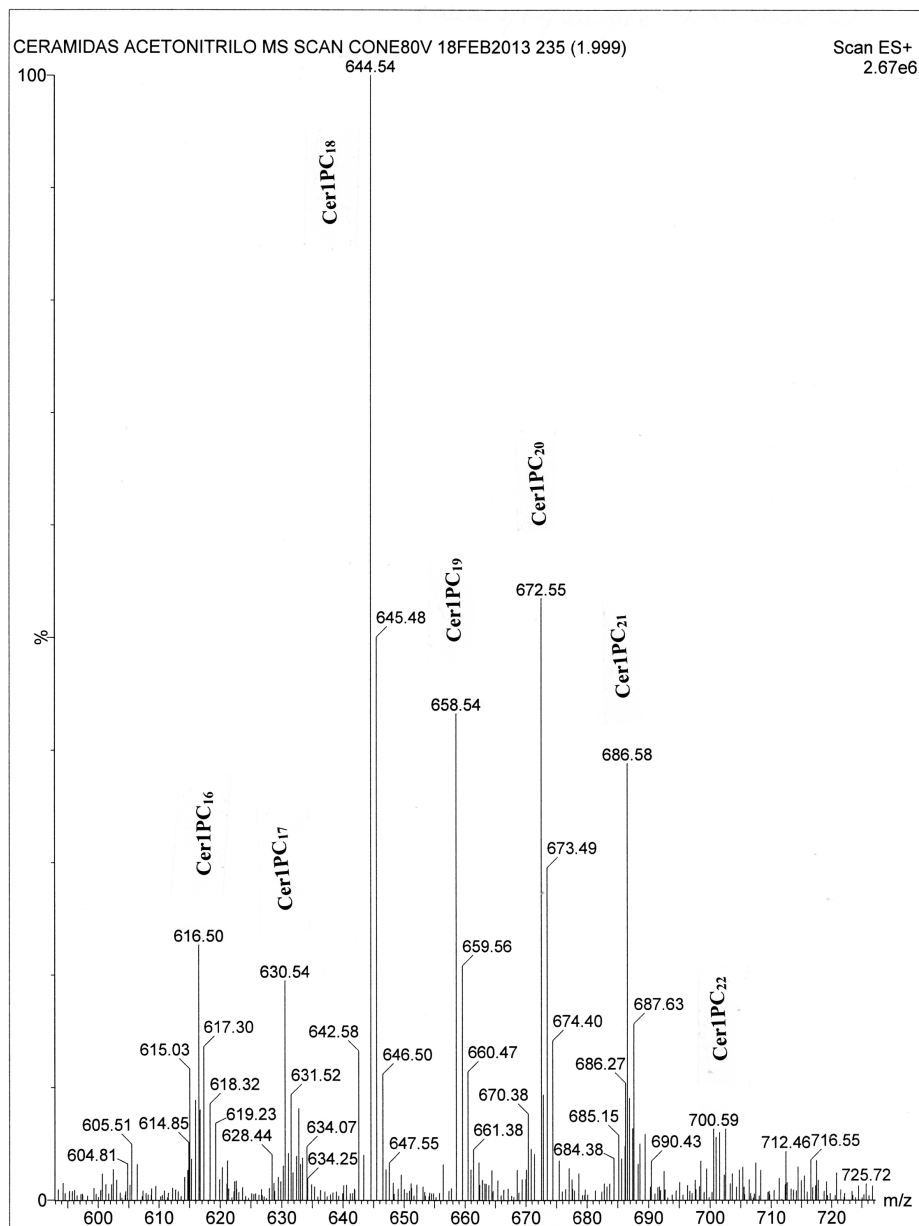


Figura 4.5: Iones moleculares de la mezcla ceramidas-1P aislada de *Myxilla* sp. detectados por HPLC-MS (infusión directa).

la esfingosina kinasa que sintetiza la esfingosina-1-fosfato, pero es diferente de la misma.

Tabla 4.3: Iones moleculares de la mezcla de ceramidas-1P aislada de *Myxilla* sp. detectados en el espectro de masas. Sus intensidades relativas nos dan el porcentaje de cada componente en la mezcla.

Ion observado	Fórmula	Concentración (% w/w)	Ceramida (Valor de n en la Figura 4.3)
616.57 (M-1 ⁺)	C ₃₄ H ₆₇ NO ₆ P	6.50	Cer1P-C ₁₆ (n=11)
617.58 (M ⁺)	C ₃₄ H ₆₈ NO ₆ P		
630.58 (M-1 ⁺)	C ₃₅ H ₆₉ NO ₆ P	6.62	Cer1P-C ₁₇ (n=12)
631.59 (M ⁺)	C ₃₅ H ₇₀ NO ₆ P		
644.60 (M-1 ⁺)	C ₃₆ H ₇₁ NO ₆ P	32.82	Cer1P-C ₁₈ (n=13)
645.60 (M ⁺)	C ₃₆ H ₇₂ NO ₆ P		
658.61 (M-1 ⁺)	C ₃₇ H ₇₃ NO ₆ P	9.85	Cer1P-C ₁₉ (n=14)
659.62 (M ⁺)	C ₃₇ H ₇₄ NO ₆ P		
672.63 (M-1 ⁺)	C ₃₈ H ₇₅ NO ₆ P	28.45	Cer1P-C ₂₀ (n=15)
673.63 (M ⁺)	C ₃₈ H ₇₆ NO ₆ P		
686.64 (M-1 ⁺)	C ₃₉ H ₇₇ NO ₆ P	8.75	Cer1P-C ₂₁ (n=16)
687.65 (M ⁺)	C ₃₉ H ₇₈ NO ₆ P		
700.56 (M-1 ⁺)	C ₄₀ H ₇₉ NO ₆ P	3.28	Cer1P-C ₂₂ (n=17)
701.57 (M ⁺)	C ₄₀ H ₈₀ NO ₆ P		
714.58 (M-1 ⁺)	C ₄₁ H ₈₁ NO ₆ P	2.19	Cer1P-C ₂₃ (n=18)
715.59 (M ⁺)	C ₄₁ H ₈₂ NO ₆ P		
728.60 (M-1 ⁺)	C ₄₂ H ₈₃ NO ₆ P	1.53	Cer1P-C ₂₄ (n=19)
729.60 (M ⁺)	C ₄₂ H ₈₄ NO ₆ P		

Experimental: Material y métodos.

Reactivos

Se trabajó con una disolución patrón de 1000 mg l⁻¹, disolviendo el extracto de ceramidas en tetrahidrofurano (Fischer Chemical). Ésta fue guardada en viales ámbar a -20°C. La disolución patrón se disolvió en acetonitrilo (Panreac Química, Barcelona, España) diariamente para ser introducida por infusión directa en el equipo de espectrometría de masas. Todos los disolventes usados como fases móviles (agua, acetonitrilo y ácido fórmico) fueron también de la marca Panreac Química (Barcelona, España).

Instrumentación

Para la determinación de la masas de las ceramidas de estudio se utilizó un equipo ACQUITY UPLC[®] de Waters (Madrid, España) equipado con un autosampler modelo 2777, con una jeringa de 25 µl y una bandeja para viales de 2 ml, una bomba binaria ACQUITY para impulsar las fases móviles y un detector de espectrometría de masas de triple cuadrupolo (TQD) con ionización de electrospray (ESI). Todos los componentes Waters fueron controlados mediante el software MassLynx Mass Spectrometry. Los parámetros de la ionización de electrospray fueron:

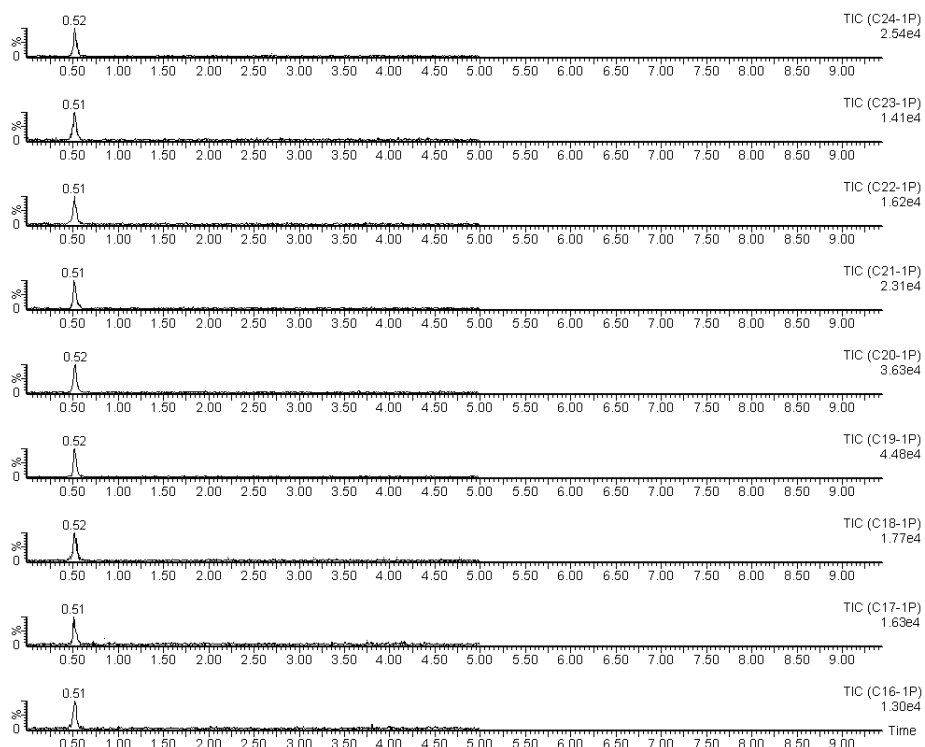


Figura 4.6: Cromatograma de la mezcla de ceramidas.

- Voltaje de capilar: 4.0 kV en modo positivo
- Voltaje de cono: 80 V
- Temperatura de la fuente: 120°C
- Temperatura de desolvatación: 450°C
- Flujo del gas de desolvatación: 1000 l h⁻¹

Estos parámetros fueron optimizados mediante infusión directa de la mezcla de ceramidas a una concentración de 1 mg l⁻¹ a un flujo de 10 μl min⁻¹.

Condiciones cromatográficas

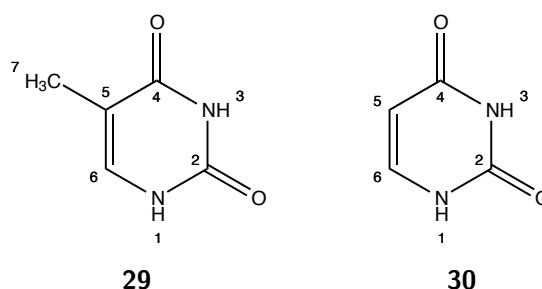
Para la separación cromatográfica se utilizó una columna analítica ACQUITY UHPLC BEH C₁₈ de Waters (Madrid, España) de 50 mm × 2.1 mm con un tamaño de partícula de 1.7 μm, la cual operó a una temperatura de 30°C. Se trabajó en modo isocrático 95:5 utilizando agua con un 5 mM de ácido fórmico (fase A) y acetonitrilo (fase B). El volumen de muestra inyectado fue de 10 μl.

4.5. Aislamiento, purificación e identificación de dos bases pirimidínicas de *Myxilla* sp.

Las fracciones más polares el extracto contuvieron las bases pirimidínicas timina (**29**) y uracilo (**30**). Ambas bases aparecen mezcladas en forma de un sólido blanco que cristaliza espontáneamente a partir de n-hexano/ acetato de etilo. Por integración del espectro de ^1H -RMN de la mezcla se dedujo la composición de la misma:

$$\frac{C_{\text{uracilo}}}{C_{\text{timina}}} = 1.8$$

Tras sucesivas cromatografías en columna de gel de sílice a baja presión se consiguieron cristales de la timina (**29**) pura. Este producto mostró los datos espectroscópicos que se muestran en las tablas Tabla 4.4 y Tabla 4.5 y, por diferencia a partir del espectro de la mezcla deducimos los espectros del uracilo (**30**), que se presentan también en las mencionadas tablas Tabla 4.4 y Tabla 4.5.



Estructuras de la Timina (**29**) y Uracilo (**30**).

Tabla 4.4: Desplazamientos de RMN de protón (δ , ppm) de las bases pirimidínicas (**29** y **30**) en DMSO-d_6 a 300 MHz.

Posición	Timina (29) (δ , ppm)	Uracilo (30) (δ , ppm)
1	10.63 (1H, s ancho)	11.00 (1H, s ancho)
2		
3	11.02 (1H, s ancho)	11.00 (1H, s ancho)
4		
5		5.46 (1H, d, $J = 7.5$ Hz)
6	7.26 (1H, s ancho)	7.40 (1H, d, $J = 7.5$ Hz)
7	1.73 (3H, d, $J = 0.6$ Hz)	

En estudios anteriores se aislaron estas bases de extractos de esponjas marinas de Indonesia [Rao et al., 2003], sin embargo, esta es la primera vez que se describen en el género *Myxilla*.

Tabla 4.5: Desplazamientos de RMN de carbono (δ , ppm) de las bases pirimídicas (**29** y **30**) en DMSO-d₆ a 75 MHz.

Posición	Timina (29) (δ , ppm)	Uracilo (30) (δ , ppm)
1		
2	165.2	164.7
3		
4	151.7	151.7
5	107.9	100.4
6	138.0	142.5
7	12.0	

Bibliografía

- Cimino, P., Bifulco, G., Casapullo, A., Bruno, I., Gomez-Paloma, L., and Riccio, R. Isolation and NMR characterization of rosacelose, a novel sulfated polysaccharide from the sponge *Mixylla rosacea*. *Carbohydrate research*, 334 (1):39–47, 2001.
- Dressler, K. and Kolesnick, R. Ceramide 1-phosphate, a novel phospholipid in human leukemia (HL-60) cells. Synthesis via ceramide from sphingomyelin. *Journal of Biological Chemistry*, 265(25):14917–14921, 1990.
- Gómez-Muñoz, A. Ceramide 1-phosphate/ceramide, a switch between life and death. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1758(12):2049–2056, 2006.
- Holzbach, J. and Lopes, L. Aristolactams and alkaloids of *Aristolochia gigantea*. *Molecules*, 15(12):9462–9472, 2010.
- Hu, G.-P., Yuan, J., Sun, L., She, Z.-G., Wu, J.-H., Lan, X.-J., Zhu, X., Lin, Y.-C., and Chen, S.-P. Statistical research on marine natural products based on data obtained between 1985 and 2008. *Marine drugs*, 9(4):514–525, 2011.
- Kim, D., Lim, J., Kim, J., Park, H., and Enn, J. Antitumor and antiinflammatory constituents from *Celtis sinensis*. *Archives of Pharmacal Research*, 28 (1):39–43, 2005.
- Kochetkov, N., Vas'kovsky, V., Zhukova, I., Smirnova, G., and Kostetsky, E. [Glycolipids in star fish (*Patiria pectinifera*) and sponges (*Myxilla incrustans*)]. *Doklady Akademii Nauk SSSR*, 173(6):1448–1450, 1967.
- Rao, K., Santarsiero, B., Mesecar, A., Schinazi, R., Tekwani, B., and Hamann, M. New Manzamine Alkaloids with Activity against Infectious and Tropical Parasitic Diseases from an Indonesian Sponge. *Journal of Natural Products*, 66(6):823–828, 2003.
- van Soest, R. W., Boury-Esnault, N., Vacelet, J., Dohrmann, M., Erpenbeck, D., De Voogd, N. J., Santodomingo, N., Vanhoorne, B., Kelly, M., and Hooper, J. N. Global diversity of sponges (Porifera). *PLoS one*, 7(4):e35105, 2012.

Capítulo 5

Productos naturales en *Ircinia variabilis*

5.1. Introducción

Las esponjas del orden Dictyoceratida son relativamente fáciles de distinguir a nivel de familia según las diferentes fibras o filamentos que conforman su estructura esquelética. Sin embargo, distinguir entre géneros puede ser más complicado y debido a ello se ha creado cierta confusión entre algunos géneros de la misma familia, como por ejemplo los géneros *Ircinia*, *Psammocinia* y *Sarcotragus* dentro de la familia Irciniidae [Cook, 2007].

En Canarias, la familia Irciniidae está representada por las especies *Ircinia dendroides* (Schmidt, 1862), *Ircinia variabilis* (Schmidt, 1862), *Ircinia oros* (Schmidt, 1864), *Sarcotragus foetidus* (Schmidt, 1862) y *Sarcotragus spinosulus* (Schmidt, 1862) [van Soest et al., 2015]. En cuanto a su quimiotaxonomía, esta familia se caracteriza por contener sesterterpenos con grupos terminales furánicos o de ácido tetrónico. Los sesterterpenos furánicos tienen diversas actividades biológicas, como antiinflamatoria, citotóxica, antimicrobiana y fagorepelente [Liu et al., 2007].

El estudio de los sesterterpenos en esponjas de las Islas Canarias se reduce a los trabajos del grupo de Antonio González a principios de la década de 1980, en los que describen el aislamiento de diferentes furanoterpenos de tres esponjas del género *Ircinia* no identificadas [González et al., 1982], de *Ircinia muscarum* (aceptado como *Sarcotragus foetidus* [González et al., 1983a], y de *Ircinia dendroides* [González et al., 1983b].

En este trabajo se pretende continuar investigando en los productos naturales de esta familia de esponjas, concretamente en *Ircinia variabilis*.

5.2. Resultados

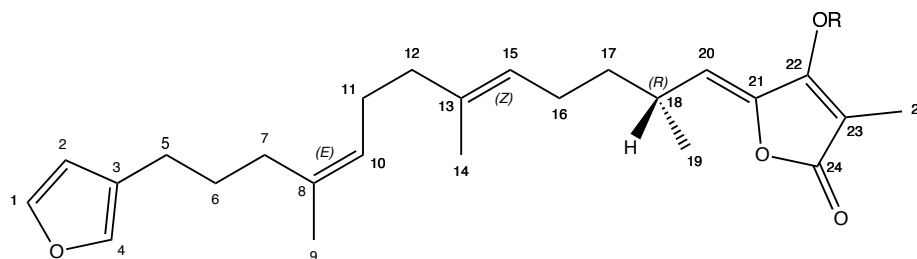
Estudio de los sesterterpenos de *Ircinia variabilis*

Por maceración de trozos de la esponja marina *Ircinia variabilis*. con acetona seguida de filtración y concentración en rotavapor se obtuvo un extracto bruto de la misma como un jarabe oscuro. Por cromatografía en columna eluyendo con

n-hexano/AcOEt con cantidades incrementales del último se obtuvieron sucesivas fracciones que se monitorizaron por espectroscopía de resonancia magnética nuclear buscando los típicos protones furánicos de los sesterterpenos a δ 7.32, 7.19 y 6.25 [Faulkner, 1973; Rothberg and Shubiak, 1975].

Aislamiento e identificación de la mezcla de (8*Z*,13*E*,20*Z*)-strobilinina (**31**) y (8*E*,13*Z*,20*Z*)-strobilinina (**32**).

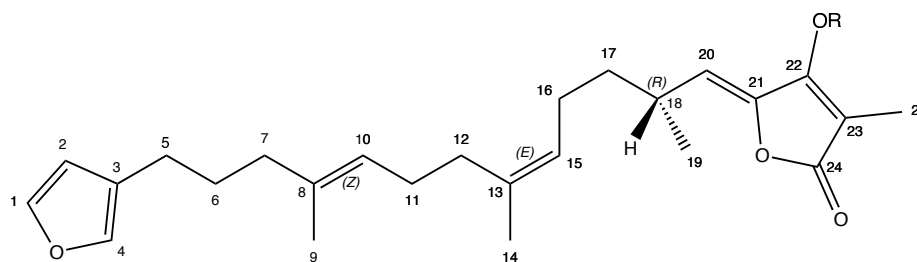
Las fracciones que contuvieron sesterterpenos se recromatografiaron por cromatografía en columna de gel de sílice hasta llegar a una fracción homogénea por CCF. Su análisis espectroscópico permitió identificarla como una mezcla previamente descrita en la bibliografía, las strobilinas **31** (Figura 5.1) y **32** (Figura 5.2). Ambas moléculas resultaron ser los estereoisómeros (8*Z*,13*E*,18*R*,20*Z*)-strobilinina (**31**) y (8*E*,13*Z*,18*R*,20*Z*)-strobilinina (**32**) según la elucidación estructural que se discute a continuación.



R = H **31**

R = Ac **33**

Figura 5.1: Estructura de (8*Z*,13*E*,18*R*,20*Z*)-strobilinina (**31**) y su acetato (**33**).



R = H **32**

R = Ac **34**

Figura 5.2: Estructura de (8*E*,13*Z*,18*R*,20*Z*)-strobilinina (**32**) y su acetato (**34**).

En la Tabla 5.1 se describen los espectros de RMN de nuestro producto. Obsérvese la duplicación de las señales de los carbonos 8, (δ 134.5/135.1), 10 (δ 123.5/124.5), 13 (δ 134.9/135.7) y 15 (δ 123.9/125.1) lo que nos informa que la sustancia es una mezcla de los estereoisómeros (8*Z*,13*E*) y (8*E*,13*Z*), en concordancia con lo previamente descrito en la bibliografía [Davis and Capon, 1994]. También cabe remarcar que las asignaciones han sido apoyadas por los experimentos DEPT-135, COSY-90, HSQC y HMBC. Así, podemos destacar que en el espectro DEPT se observan siete metinos, siete metilenos y cuatro metilos, y en el espectro COSY se observan las correlaciones H-18→H-19 y H-18→H-20 que delatan la unidad estructural de ácido tetrónico.

Las strobilininas mezcladas dan un espectro de masas con el ión molecular a m/z 398.2457 que corresponde a la fórmula molecular $C_{25}H_{34}O_4$ y, además, los fragmentos previstos para un esqueleto carbonado de strobilininina (Figura 5.3). Nótese que este esquema de fragmentaciones viene apoyado por las fórmulas moleculares de los fragmentos, las cuales fueron determinadas por espectrometría de masas de alta resolución. Así, por ejemplo, al fragmento a m/z 163.1118 viene asociada la fórmula $C_{11}H_{15}O$, al fragmento a m/z 153.0548 le corresponde la fórmula $C_8H_9O_3$ y al fragmento a m/z 109.0649, la fórmula C_7H_9O , todos los cuales demuestran la presencia de un anillo furánico en el comienzo de la estructura y un grupo de ácido tetrónico al fin de la misma.

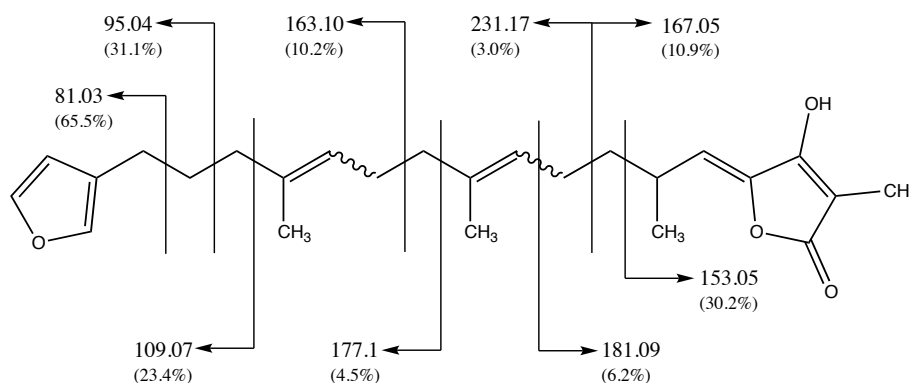


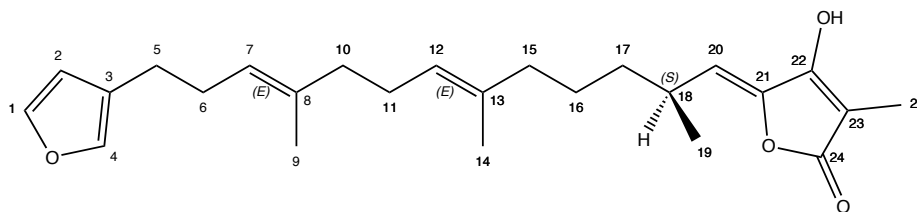
Figura 5.3: Fragmentaciones observadas en el espectro de masas de strobilininina [mezcla de estereoisómeros 8*Z*,13*E*+8*E*,13*Z* (**31**+**32**)].

Los sesterterpenos que comienzan con un anillo furánico y terminan con un grupo de ácido tetrónico son metabolitos característicos de un gran número de esponjas marinas. El primero en ser descrito [Faulkner, 1973] de esta familia de compuestos se llamó variabilina **35**. Variantes estructurales de ésta fueron posteriormente descritas, y entre ellas, se encuentra la strobilininina [Rothberg and Shubiak, 1975], la cual, aunque no se separó cromatográficamente de su acompañante la variabilina **35**, fue sin embargo caracterizada por análisis espectroscópico y degradación química. Mientras la variabilina **35** posee dobles enlaces en las posiciones 7 y 12, la strobilininina los posee en 8 y 13 (Figura 5.1 y Figura 5.2). La estereoquímica de estos dobles enlaces en 8 y 13 no fue resuelta hasta 1994 [Davis and Capon, 1994], año en el que se esclarece que strobilininina en realidad es una mezcla de los estereoisómeros (8*Z*,13*E*,20*Z*)-strobilininina (**31**) y (8*E*,13*Z*,20*Z*)-strobilininina (**32**), justo los aislados por nosotros.

Tabla 5.1: Desplazamientos químicos (ppm) observados en los espectros RMN de strobilinina. La duplicación de las señales de los carbonos 8, 10, 13, y 15 nos informa de que el producto es una mezcla de los estereoisómeros (8*Z*,13*E*) y (8*E*,13*Z*) (**31** y **32**), en concordancia con la bibliografía [Davis and Capon, 1994].

N° Carbono	¹ H-RMN (300 MHz, CDCl ₃) (δ , ppm)	¹³ C-RMN (75 MHz, CDCl ₃) (δ , ppm)	Tipo (DEPT)
1	7.32 (1H, s)	142.5	CH
2	6.25 (1H, s)	111.0	CH
3		124.0	C
4	7.19 (1H, s)	138.7	CH
5	2.42 (2H, m)	25.6	CH ₂
6	2.22 (2H, m)	28.1	CH ₂
7	2.66 (2H, m)	26.7	CH ₂
8		134.5 135.1	C
9	1.64 (3H, s)	23.3	CH ₃
10	5.08 (1H, m, solapado)	123.5 124.5	CH
11	2.00 (2H, m)	31.5	CH ₂
12	2.36 (2H, m)	24.2	CH ₂
13		134.9 135.7	C
14	1.60 (3H, s)	15.9	CH ₃
15	5.08 (1H, m, solapado)	123.9 125.1	CH
16	2.00 (2H, m)	39.1	CH ₂
17	1.36 (2H, m)	36.8	CH ₂
18	2.77 (1H, m)	30.9	CH
19	1.05 (3H, d, $J = 6.5$ Hz)	20.6	CH ₃
20	5.43 (1H, d, $J = 10.1$ Hz)	116.7	CH
21		143.0	C
22		163.3	C
23		98.9	C
24		173.3	C
25	1.82 (3H, s)	6.0	CH ₃

Esta mezcla se acetiló y purificó por cromatografía en capa gruesa, lo que permitió profundizar en su estudio espectroscópico. Así, se observaron en el espectro de ¹H-RMN dos lotes de resonancias correspondientes a los metilos olefinicos 9 y 14 (uno mayoritario a δ 1.60 y 1.67 y otro minoritario a δ 1.57 y 1.64. La duplicación de las señales de los carbonos 8, 10, 13, 15 y 16 (Tabla 5.2) y la coincidencia del resto de los datos espectroscópicos con la bibliografía [Davis and Capon, 1994] nos confirmó que el producto es en efecto una mezcla de los estereoisómeros (8*Z*,13*E*,20*Z*)-strobilinina (**31**) y (8*E*,13*Z*,20*Z*)-strobilinina



35

Figura 5.4: Estructura de la variabilina.

(**32**). En el “acetato de strobilinina” uno de los metilos olefínicos (C-9) resuena a δ 23.0 ppm (en contraste con 15.7 ppm de la variabilina) y uno de los metilenos alílicos (C-11) resuena a δ 31.2 ppm (frente a 39.6 ppm de la variabilina). Estas diferencias pueden atribuirse a que uno de los dobles enlaces trisustituidos del “acetato de strobilinina” tiene geometría *Z* en lugar de *E*. La geometría del doble enlace en 20 en el “acetato de strobilinina” debe de ser asignado como *Z* debido al desplazamiento en ^{13}C -RMN del C-20 (116.1 ppm), el cual fue idéntico al del acetato de variabilina [González et al., 1983b]. Obsérvese que las asignaciones descritas en la Tabla 5.2 vienen corroboradas por las correlaciones observadas en los experimentos bidimensionales (COSY-90, HSQC y HMBC), así como por el experimento DEPT-135, en el que se observan de nuevo siete metinos, siete metilenos y cinco metilos.

El espectro de masas del “acetato de strobilinina” resultó también consistente con las estructuras asignadas (**33** y **34**). Así, fragmentos en el espectro de masas a m/z 81.03 (75.2%), 95.04 (26.7%), 109.07 (11.6%), 163.10 (10.0%) y 177.1 (13.2%) soportan la regioquímica aportada originalmente (los iones a m/z 95.04 y 109.07) no se observan en el acetato de variabilina debido a la fácil fragmentación bisalílica del enlace 5-6 que presentaría la misma.

Por ahora, sin embargo, no es posible determinar cual de los estereoisómeros (**31** o **32**) es mayoritario.

Finalmente, es interesante hacer notar que la rotación óptica $[\alpha]_D^{20\text{C}} = +31.50^\circ$ (c 5.57, CHCl_3) de nuestra mezcla de “acetatos de strobilinina” resultó opuesta en signo a la del acetato de variabilina, $[\alpha]_D = -28.90^\circ$ [Capon et al., 1994], lo que nos lleva a proponer, dado que sólo hay un centro estereogénico, que las strobilininas tienen estereoquímica opuesta a la variabilina **35** en dicho centro quiral. Como la estereoquímica absoluta de variabilina **35** fue establecida como 18*S* [Capon et al., 1994] deducimos que nuestras strobilininas tienen la configuración 18*R* (Figura 5.1 y Figura 5.2).

Agradecimientos

La identificación de la esponja *Ircinia variabilis* con la que se ha trabajado en este capítulo ha sido posible gracias a la ayuda y los consejos de T. Cruz, J.J. Bacallado y J. Vacelet.

Tabla 5.2: Desplazamientos químicos (ppm) observados en los espectros RMN del acetato de strobilina. La duplicación de las señales de los protones 9 y 14 y de los carbonos 8, 10, 13, 15 y 16 nos informa de que el producto es una mezcla de los estereoisómeros (8*Z*,13*E*) y (8*E*,13*Z*) (**33** y **34**), en concordancia con la bibliografía [Davis and Capon, 1994]).

N° Carbono	¹ H-RMN (300 MHz, CDCl ₃) (δ, ppm)	¹³ C-RMN (75 MHz, CDCl ₃) (δ, ppm)	Tipo (DEPT)
1	7.31 (1H, s)	142.3	CH
2	6.25 (1H, s)	110.7	CH
3		124.8	C
4	7.18 (1H, s)	138.5	CH
5	2.43 (2H, m)	25.0	CH ₂
6	2.25 (2H, m)	26.5	CH ₂
7	2.67 (2H, m)	25.4	CH ₂
8		134.1 134.8	C
9	1.67 (3H, s) 1.65	23.0	CH ₃
10	5.12 (1H, m, solapado)	123.3 124.4	CH
11	2.00 (2H, m)	31.2	CH ₂
12	2.36 (2H, m)	24.0	CH ₂
13		134.6 135.3	C
14	1.61 (3H, s) 1.57	15.6	CH ₃
15	5.12 (1H, m, solapado)	123.8 124.8	CH
16	2.00 (2H, m)	39.4 38.8	CH ₂
17	1.34 (2H, m)	36.5	CH ₂
18	2.81 (1H, m)	30.8	CH
19	1.05 (3H, d, <i>J</i> = 6.7 Hz)	20.0	CH ₃
20	5.06 (1H, d, <i>J</i> = 10.1 Hz)	116.1	CH
21		142.3	C
22		154.1	C
23		114.4	C
24		168.3	C
25	1.80 (3H, s)	8.0	CH ₃
CH ₃ COO	2.33 (3H, s)	20.3	CH ₃
CH ₃ COO		165.1	C

Bibliografía

Capon, R. J., Dargaville, T. R., and Davis, R. The Absolute Stereochemistry of Variabilin and Related Sesterterpene Tetrionic Acids. *Natural Product Letters*,

- 4(1):51–56, 1994.
- Cook, S. d. C. Clarification of dictyoceratid taxonomic characters, and the determination of genera. *Porifera Research: Biodiversity, Innovation and Sustainability*. Museu Nacional, Rio de Janeiro, pages 265–274, 2007.
- Davis, R. and Capon, R. Two for One: Structure Revision of the Marine Sesterterpene Tetroneic Acid Strobilinin to (8Z,13E,20Z)-Strobilinin and (8E,13Z,20Z)-Strobilinin. *Australian Journal of Chemistry*, 47(5):933–936, 01 1994.
- Faulkner, D. J. Variabilin, an antibiotic from the sponge, *Ircinia variabilis*. *Tetrahedron Letters*, 14(39):3821–3822, 1973.
- González, A. G., López, M., and San Martín, A. Furanoterpenos de esponjas marinas del género *Ircinia*. *Bol. Soc. Chil. Quím.*, 27(2):170–171, 1982.
- González, A. G., Estrada, D., Rodríguez, M. L., and San Martín, A. Furanoterpenos lineales de la esponja *Ircinia muscarum*. *Anales de Química*, pages 69–71, 1983a.
- González, A. G., Rodríguez, M. L., and Barrientos, A. S. M. On the Stereochemistry and Biogenesis of C21 Linear Furanoterpenes in *Ircinia* sp. *Journal of Natural Products*, 46(2):256–261, 1983b.
- Liu, Y., Zhang, S., Jung, J. H., and Xu, T. Bioactive furanosesterterpenoids from marine sponges. In *Bioactive Heterocycles V*, pages 231–258. Springer, 2007.
- Rothberg, I. and Shubiak, P. The structure of some antibiotics from the sponge *Ircinia strobilina*. *Tetrahedron Letters*, 16(10):769 – 772, 1975.
- van Soest, R., Boury-Esnault, N., Hooper, J., Rützler, K., de Voogd, N., Alvarez de Glasby, B., Hajdu, E., Pisera, A., Manconi, R., Schoenberg, C., Janussen, D., Tabachnick, K., Klautau, M., Picton, B., Kelly, M., Vacelet, J., Dohrmann, M., Díaz, M.-C., and Cárdenas, P. World porifera database, October 2015. URL <http://www.marinespecies.org/porifera/>.

Capítulo 6

Caracterización de un tapete microbiano productor de escitonemina

6.1. Introducción

El término tapete microbiano se usa para describir comunidades microbianas multicapa que crecen en los sedimentos de hábitats tan diversos como llanuras intermareales, charcos hipersalinos o fuentes de aguas termales. Los tapetes microbianos normalmente están formados por organismos filamentosos que se enmarañan entre si y producen unas estructuras parecidas a alfombrillas. Estas comunidades normalmente se aparecen en condiciones ambientales extremas, lo cual excluye muchos organismos eucariotas favoreciendo a los procariotas ya que estos últimos tienen mayor capacidad para adaptarse a los cambios y fluctuaciones de las condiciones ambientales [Stal, 2012].

Los tapetes microbianos se caracterizan por la estratificación vertical de diferentes grupos de microorganismos, como resultado de los gradientes de luz, oxígeno y azufre. Así, en la capa superior se encuentran los organismos fototróficos aeróbicos, normalmente cianobacterias pero también puede contener diatomeas. Estas cianobacterias pueden estar cubiertas por una capa mucilaginosa formada por los exopolisacáridos de sus propias vainas y éstas suelen contener pigmentos fotoprotectores como la escitonemina. La escitonemina perdura mucho tiempo en las vainas vacías que las cianobacterias liberan y protege la comunidad subyacente de los daños causados por la radiación UV [García-Pichel and Castenholz, 1991]. Las capas inferiores se alimentan de la materia orgánica proveniente de la fotosíntesis y que se introduce en el sedimento. La degradación de esta materia orgánica da como resultado condiciones anóxicas que permiten el desarrollo de bacterias reductoras del azufre, las cuales producen sulfuro de hidrógeno que es aprovechado por las bacterias púrpuras del azufre al realizar la fotosíntesis anoxigénica.

Aparte de algunos estudios en salinas [Gerdes, 2007] y en cultivos hidropónicos de plantas halófitas [Giraldo-Silva, 2011], los tapetes microbianos marinos de las Islas Canarias apenas han sido estudiados. El orden Oscillatoriales en-

globan algunas de las cianobacterias filamentosas más comunes en las costas de Canarias, sin embargo, a pesar de ser un de los grupos más diverso y rico en especies también es uno de los menos caracterizados [Perkerson III et al., 2011]. Se ha demostrado que el grupo Oscillatoriales *sensu classicus* no es un grupo monofilético [Casamatta et al., 2005] y Komárek and Anagnostidis [2005] separaron este grupo en dos subclases (Pseudanabaenales y Oscillatoriales). Dentro de las Pseudanabaenales, el género *Leptolyngbya* es el más claramente polifilético, ya que contiene muchos clades y del que recientemente han surgido nuevos géneros. Aunque se sabía que algunos *Phormidium* (Oscillatoriales) estaban estrechamente relacionados con Pseudanabaenales [Komárek and Anagnostidis, 2005], mediante el uso de técnicas moleculares se han obtenido evidencias para transferir algunas especies de *Phormidium* a un nuevo género *Phormidesmis* dentro de Pseudanabaenales [Komárek et al., 2009].

En este capítulo se pretende hacer una primera aproximación a la caracterización de un tapete microbiano productor de escitonemina, utilizando técnicas moleculares y observación al microscopio.

6.2. Material y métodos

6.2.1. Tapetes microbianos

Con la intención de extraer escitonemina, a finales de junio de 2011 se recogieron tapetes microbianos de la zona supramareal, durante la marea baja, en unas terrazas escalonadas que refuerzan el muro de contención de la Avenida de Canarias GC-1 (Las Palmas de Gran Canaria, 28°05'58.50" N, 15°24'41.18" W) (Figura 6.1). Del total de biomasa recogida para la extracción de escitonemina, se separaron 5 muestras para su estudio mediante técnicas moleculares y microscópicas, y se guardaron en etanol a -20°C hasta el momento del análisis. De estas 5 muestras, 1 de ellas correspondía a la parte vertical de los escalones (más expuesta a la sequedad), mientras que el resto de muestras se recogió en la parte horizontal de los bancales (continuamente inundada). Las muestras horizontales se nombraron como AVM-H# (# representa un número del 1 al 4) y la muestra vertical se nombró como AVM-V3 (puesto que se recogió cerca de AVM-H3).

6.2.2. Análisis molecular

Extracción de ácidos nucleicos

La extracción de ácidos nucleicos de cada una de las muestras se realizó mediante un protocolo basado en la técnica del fenol-cloroformo. Brevemente, una pequeña muestra (aproximadamente 100 mg en peso húmedo) de cada uno de los tapetes microbianos se suspendió en 600 μ l de un tampón de extracción (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM Na-EDTA pH 8.0) al que se le añadió lisozima para digerir la pared celular y proteinasa K para inactivar las nucleasas. Después de incubar durante 30 minutos a 37°C, se añadieron 120 μ l de NaCl 5M y 90 μ l de una solución al 10 % de CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio) y la mezcla se incubó durante 10 minutos a 65°C. Seguidamente se congeló en nitrógeno líquido para a continuación descongelar en el baño termostático a 65°C, proceso que se repitió varias veces. El siguiente paso consistió en la extracción con 800 μ l de una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), y después de

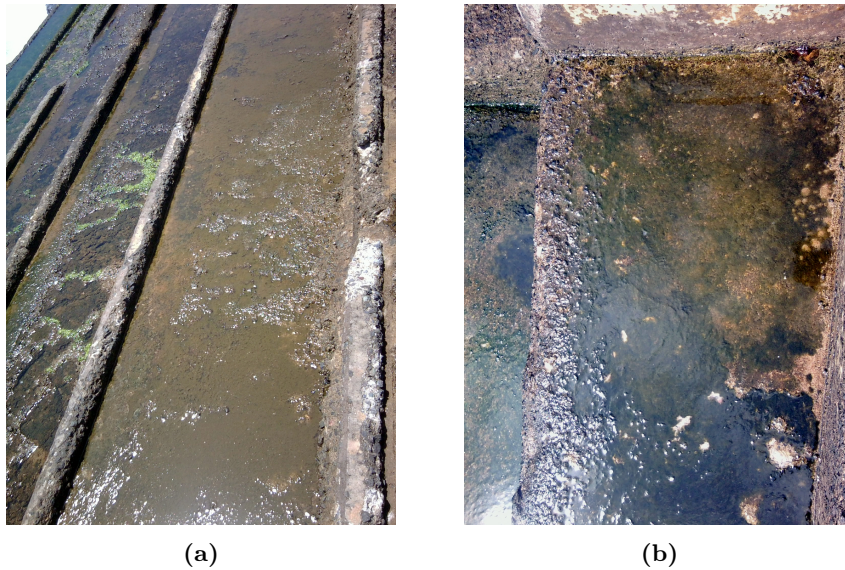


Figura 6.1: (a) Terrazas escalonadas en la zona supramareal donde se recogió el tapete microbiano. Nótese la diferencia de colores (y por tanto, de pigmentos) entre la parte superior y la inferior. (b) Detalle de los tapetes recogidos. Obsérvese los tapetes horizontales cubiertos de agua, mientras que los verticales están secos.

centrifugar durante 5 minutos a $16200g$ se recogió la fase superior (acuosa) y se repitió el proceso de extracción fenólica una segunda vez. Para precipitar los ácidos nucleicos, se añadieron $60 \mu\text{l}$ de acetato sódico 3M pH 0.6 junto con $360 \mu\text{l}$ de isopropanol, y se centrifugó. Eliminando el sobrenadante, el DNA precipitado se limpió con etanol 70% , se centrifugó de nuevo y una vez seco, se resuspendió con $50 \mu\text{l}$ de agua mQ estéril.

La concentración y calidad de los ácidos nucleicos extraídos se cuantificó mediante un espectrofotómetro UV/Vis Nanodrop 2000 (Thermo Scientific), y se diluyeron hasta obtener concentraciones de 10 a $20 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$.

Clonación del gen ADNr 16S

Para las muestras AVM-H3 y AVM-V3, se realizó una amplificación de los genes 16S del ADN ribosómico (ADNr) de las cianobacterias y de los cloroplastos, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los siguientes cebadores (*primers*): el cebador directo (*forward*) CYA359F ($5'$ -GGG GAA TYT TCC GCA ATG GG- $3'$) específico para cianobacterias [Nübel et al., 1997] y el cebador inverso (*reverse*) universal 1492R ($5'$ -CGG TTA CCT TGT TAC GAC TT- $3'$) que va dirigido al gen 16S del ADNr tanto de procariontas como de eucariontas [Weisburg et al., 1991]. Las reacciones de PCR contenían:

- $5 \mu\text{l}$ de tampón de PCR 10X (incluido Mg^{+2})
- $5 \mu\text{l}$ de una mezcla de nucleótidos (dNTP)
- $5 \mu\text{l}$ de una solución $4 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ de albúmina de suero bovino (BSA)

- 2.5 μl del *primer* CYA359F a una concentración 10 μM
- 2.5 μl del *primer* 1492R a una concentración 10 μM
- 1 μl de ADN a una concentración entre 10 y 20 $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$
- 1 unidad (0.25 μl) de Taq-polimerasa (Takara Bio Inc., Japan)
- 28.75 μl de agua mQ estéril

La termociclación se realizó en un termociclador MyCycler (Bio-Rad) y el programa consistió en 5 minutos de desnaturalización a 95°C, seguidos de 30 ciclos de un minuto a 95°C, 1 minuto a 55°C, 1 minuto a 72°C, y un tiempo de extensión final de 6 minutos a 72°C. La reacción se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.25 % y tñiendo con bromuro de etidio.

Los productos de PCR se ligaron al vector pCRTM2.1-TOPO[®] utilizando el TOPO[®] TA Cloning[®] Kit (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se obtuvieron 18 colonias de clones en total (11 de la muestra AVM-H3 y 7 de AVM-V3), de las cuales 15 (9 de AVM-H3 y 6 de AVM-V3) contuvieron un fragmento de la longitud esperada (unos 1130 pares de bases, pb, del amplicón más el fragmento de aproximadamente 200 pb del vector) y el resto se descartaron, según se observó después de amplificar cada colonia mediante una PCR utilizando los *primers* M13F y M13R del vector proporcionados por el fabricante. De cada una de las muestras amplificadas con el fragmento esperado, se realizaron dos reacciones de secuenciación utilizando el kit BigDye[®] Terminator v3.1, una con el *primer* M13F y la otra con el *primer* M13R, y se secuenciaron en los Serveis Científicotècnics de la Universitat de les Illes Balears utilizando un analizador genético 3130 (Applied Biosystems).

Cada par de secuencias obtenidas por muestra se solapó para obtener una sola secuencia de unos 1130 pb. Estas secuencias se compararon contra la base de datos GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information) utilizando el algoritmo *blastn*, que compara secuencias de nucleótidos y ofrece las de mayor grado de similitud, y se seleccionaron y descargaron las secuencias con mayor similitud con las nuestras, tanto de organismos cultivados como de muestras ambientales o no cultivadas. Estas secuencias junto con las nuestras se alinearon con el programa ClustalW integrado en la herramienta de análisis molecular MEGA6. Posteriormente se recortaron los extremos de algunas secuencias para homogeneizar las longitudes del alineamiento, obteniendo así secuencias de 950 a 957 pares de bases.

Se calculó una matriz de distancias entre pares de secuencias con el método de máxima verosimilitud compuesta (*Maximum Composite Likelihood*) y la estimación de la varianza se realizó mediante el método *bootstrap* con 100 réplicas del alineamiento.

Los árboles filogenéticos se construyeron a partir del alineamiento con el paquete informático MEGA6. Se utilizó el método estadístico de máxima verosimilitud (*Maximum Likelihood*) aplicando el modelo de Tamura-Nei. Para estimar la robustez y confiabilidad de las topologías obtenidas se realizaron 100 réplicas *bootstrap*.

Amplificación del gen *scyC*

La amplificación del gen *scyC*, que codifica la proteína ScyC involucrada en la biosíntesis de la escitonemina, se probó en las todas muestras de tapete

microbiano siguiendo el protocolo explicado en Balskus et al. [2011]. Brevemente, se realizó una PCR con el ADN extraído las muestras de tapete microbiano utilizando los *primers* degenerados *scyC*-F (5'-GTN TAY TTY CAY TGG-3') y *scyC*-R (5'-ADC KYT TDA TRT TCA T-3'). La termociclación se realizó en un termociclador MyCycler (Bio-Rad) y el programa consistió en 1 minutos de desnaturalización a 95°C, seguidos de 10 ciclos de 30 segundos a 95°C, 1 minuto a 46.2°C, 1 minuto a 72°C, seguidos de 44 ciclos de 30 segundos a 95°C, 1 minuto a 43.6°C, 1 minuto a 72°C y un tiempo de extensión final de 5 minutos a 72°C. La reacción se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.25 % y tñiendo con bromuro de etidio. Se observaron bandas de la longitud esperada (~550pb) en prácticamente todas las muestras (con poca intensidad en AVM-V3), pero solo se eligieron las muestras AVM-H3 y AVM-H4 para ensayar la clonación del gen *scyC* (Figura 6.2). Las bandas de las muestras AVM-H3 y AVM-H4 que aparecían a ~550 pb se recortaron del gel y el ADN se extrajo mediante el método *freeze/squeeze*, que consiste en congelar el trozo de gel con nitrógeno líquido y exprimirlo dentro de una jeringa pequeña. A pesar de que la reamplificación de la banda extraída mostró nuevamente una banda de la longitud esperada, la clonación del gen *scyC* no dió resultado, ya que no se consiguieron clones con el gen inserto.

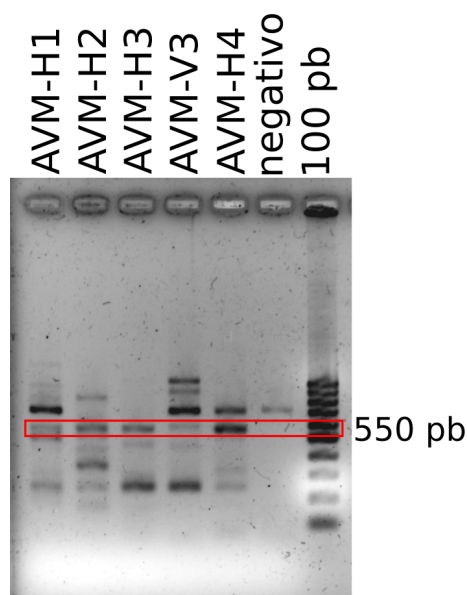


Figura 6.2: Gel de agarosa con los productos de la PCR diseñada para la amplificación del gen *scyC* de los tapetes microbianos, siguiendo el protocolo de Balskus et al. [2011]. Obsérvese la banda a ~550 pb (rectángulo rojo) que se corresponde con la longitud esperada del amplicón del gen *scyC*.

6.2.3. Observación de los tapetes por microscopía

Las muestras AVM-H3 y AVM-V3 se observaron al microscopio óptico y también al microscopio electrónico de barrido (MEB). Previamente, una pequeña cantidad de estas dos muestras (que se habían guardado en etanol a -20°C)

se hidrataron con 600 μ l de una mezcla que contenía 10 μ M de PBS (tampón fosfato salino), 10 μ M de EDTA y 0.05 % de Tween-20, y se fijaron con 72 μ l de glutaraldehído al 25 % (concentración final 3 %). Se mantuvieron en agitación (180 rpm) durante 3 horas a temperatura ambiente y después se filtraron sobre membranas de policarbonato negro con un diámetro de poro de 0.2 μ m (Millipore, GTBP02500) aplicando vacío suave (<200 mm Hg), finalmente se lavaron con PBS seguido de etanol 70 % . La mitad del filtro se guardó para su observación en el MEB y la otra mitad se resuspendió en PBS para observarla en el microscopio óptico.

El microscopio óptico usado fue un Leica DM 2500 equipado con una cámara Leica DFC420C y con objetivos de 10x, 40x, 63x y 100x (aceite), además del ocular 10x. Para su observación en el MEB, las muestras se recubrieron en oro y se visualizaron a unas magnificaciones de entre 2000 y 15000 aumentos en un microscopio electrónico de barrido HITACHI S-3400N.

6.3. Resultados y discusión

Con el análisis molecular de los tapetes mediante clonación y secuenciación se puede hacer una primera aproximación a la composición de la comunidad microbiana. De los 15 clones analizados, dos (AVM-H10 y AVM-V6) se descartaron porque no se obtuvieron buenas secuencias con el cebador inverso (M13-R) y por tanto no se pudo obtener la secuencia completa solapando ambos sentidos. Y también se descartó otra secuencia (AVM-V2) que resultó ser una quimera, es decir, aproximadamente la mitad correspondía al ADNr 16S del cloroplasto de un alga rodofícea y la otra mitad correspondía a una cianobacteria. Del resto, 10 secuencias pertenecieron a cianobacterias y 2 (ambas de la muestra AVM-V3, de la pared vertical de los escalones) pertenecieron a cloroplastos de algas rodofíceas (Bangiales).

En la Tabla 6.1 se resumen las secuencias más cercanas a cada uno de nuestros clones, tanto de organismos cultivados como de muestras ambientales. Como se puede observar, las secuencias de 5 clones son similares a los de la cianobacteria *Phormidesmis priestleyi* aislada de un lago de la Antártida. Sin embargo, de estos 5 clones solo 3 (H1, H3 y H4) tienen una identidad cercana al 97 % entre ellos () y con *P. priestleyi*, mientras que los otros 2 (H5 y H7) son idénticos entre ellos y solo comparten un 94.2 % de los nucleótidos con *P. priestleyi*. Si se considera que el umbral que separa una especie de otra está en el 97 % de identidad, estos dos últimos clones podrían considerarse provenientes de una especie diferente, aunque posiblemente dentro de la misma familia Pseudanabaenacea. En el árbol filogenético (Figura 6.3) se puede observar como el clon HX3-3 parece compartir identidad con los clones H1 y H3, aunque el análisis de la identidad lo relaciona más con la cepa de la cianobacteria unicelular *Synechococcus* sp. PCC7335. Se sabe que el género *Synechococcus* es claramente polifilético [Fuller et al., 2003] y, concretamente la cepa *Synechococcus* sp. PCC7335 está más estrechamente relacionada con cianobacterias Pseudanabaenales que con otras de su mismo género [Perkerson III et al., 2011]. El clon V7 también podría ser de una especie del grupo de las Pseudanabaenales pero con una identidad relativamente baja (93.7 %) con la especie más cercana *Leptolyngbya* sp. El clon H9 se relacionó con Oscillatoriales del género *Lyngbya*, y cabe señalar que a pesar de que solo se encontró un clon perteneciente a este grupo, la observación al mi-

croscopio de la muestra AVM-H3 parecía estar dominada por cianobacterias del orden Oscillatoriales (Figura 6.5). Los clones H8 y V1 estarían relacionados con cianobacterias del orden de las Chroococcales (géneros *Stanieria* y *Pleurocapsa*, respectivamente), pero el segundo con una identidad relativamente baja con el organismo secuenciado más cercano (93.5 %).

También cabe destacar la presencia de dos clones (V3 y V4) que corresponden a la secuencia del ADN_r 16S de los cloroplastos de un alga roja, encontrando una alta identidad (mayor o igual al 98 %) con los de la rodófito filamentosa *Bangia atropurpurea* (Tabla 6.1, Figura 6.4). En la observación al microscopio de la muestra AVM-V3 se observaron filamentos uniseriados muy similares a los descritos para esta especie en sus estadios iniciales [Guiry, 2015] (Figuras 6.6d, 6.6e, 6.6f). Aunque no producen escitonemina, se sabe que las Bangiales contienen aminoácidos tipo micosporina (MAAs) para protegerse de la radiación UV [Boedeker and Karsten, 2005].

Aunque se consiguió la amplificación del gen *scyC* involucrado en la biosíntesis de la escitonemina, no se logró clonar este amplificado y por tanto no se tienen las secuencias de este gen. Hay que decir que la base de datos del gen *scyC* todavía es escasa (en la base de datos NCBI actualmente hay unas 44 secuencias que se corresponderían con esta proteína implicada en la síntesis de escitonemina), sin embargo, algunas de estas secuencias corresponden a cepas de *Lyngbya* sp., género que parecía dominar la muestra AVM-H3 como se observó al microscopio. De haber tenido éxito en la clonación del gen *scyC* se habría podido determinar si efectivamente la principal cianobacteria productora de escitonemina en el tapete microbiano estaba relacionada con esta oscillatorial. Futuros trabajos utilizando las nuevas técnicas de pirosecuenciación con muestras de tapetes microbianos podrían contribuir a aumentar el conocimiento sobre la diversidad de este gen funcional.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido desarrollado utilizando los medios y servicios de la Universitat de les Illes Balears, y financiado por el proyecto MEDIFIX (CTM2011-23538) concedido por el Ministerio de Economía y Competitividad a la Dra. Nona S.R. Agawin.

Tabla 6.1: Emparejamientos más cercanos de las secuencias del gen 16S de los tapetes microbianos. Los porcentajes de identidad se han obtenido a partir de la matriz de distancias del alineamiento con ClustalW.

Clon ID	Secuencia más similar organismo cultivado (número de acceso)	Identidad (%)	Secuencia más similar muestra ambiental (número de acceso)	Identidad (%)
H1	<i>Phormidopsis priestleyi</i> (AY493585)	97.6	Uncultured bacterium clone HL7711.P5D1 (KC896689)	98.1
H3	<i>Phormidopsis priestleyi</i> (AY493585)	96.9	Uncultured cyanobacterium clone UMABcl31 (FN811215)	97.1
H4	<i>Phormidopsis priestleyi</i> (AY493585)	97.2	Uncultured bacterium clone HL7711.P5D1 (KC896689)	97.2
H5	<i>Phormidopsis priestleyi</i> (AY493585)	94.2	Uncultured cyanobacterium clone R8-B31 (DQ181689)	94.6
H7	<i>Phormidopsis priestleyi</i> (AY493585)	94.2	Uncultured cyanobacterium clone R8-B31 (DQ181689)	94.6
H8	<i>Stanieria</i> sp. PCC7301 (AB039009)	97.8	Uncultured compost bacterium clone CDM2 (KC243420)	96.6
H9	<i>Lyngbya</i> cf. <i>aestuarii</i> LEGE07165 (HQ832912)	97.2	Uncultured cyanobacterium clone Z4MB34 (FJ484833)	95.7
X3-3	<i>Synechococcus</i> sp. PCC7335 (AB015062)	98.0	Uncultured cyanobacterium clone UMABcl31 (FN811215)	97.5
V1	<i>Pleurocapsa</i> sp. HA4302 clone A (KC525078)	93.5	Uncultured compost bacterium clone CDM2 (KC243420)	93.0
V3	<i>Bangia atropurpurea</i> chloroplast (AF545616)	98.0	Uncultured bacterium clone LX-79 (JF514264)	93.4
V4	<i>Bangia atropurpurea</i> chloroplast (AF545616)	98.3	Uncultured bacterium clone LX-79 (JF514264)	93.2
V7	<i>Leptolyngbya</i> sp. OU 6 (GQ162217)	93.7	Uncultured cyanobacterium clone R8-R13 (DQ181690)	93.7

Tabla 6.2: Matriz de distancias del gen 16S de los clones obtenidos a partir de los tapetes microbianos.

	H1	H3	H4	H5	H7	H8	H9	HX3-3	V1	V3	V4
HX3-3	98.6										
H3	97.6	96.9									
H4	97.1	96.1	96.0								
H5	93.7	93.6	94.5	93.1							
H7	93.7	93.6	94.5	100.0	93.1						
H8	87.3	86.7	86.3	87.2	87.2	87.4					
H9	88.9	88.9	88.5	90.5	90.5	89.6	88.7				
V1	89.7	89.3	88.7	89.9	89.9	93.0	90.9	89.8			
V3	85.6	85.4	86.2	85.1	85.1	87.5	86.8	85.5	86.4		
V4	85.1	84.7	85.6	84.1	84.1	86.5	86.1	85.1	85.4	98.9	
V7	92.8	92.3	92.3	89.6	89.6	90.9	90.2	92.6	91.0	86.2	85.5

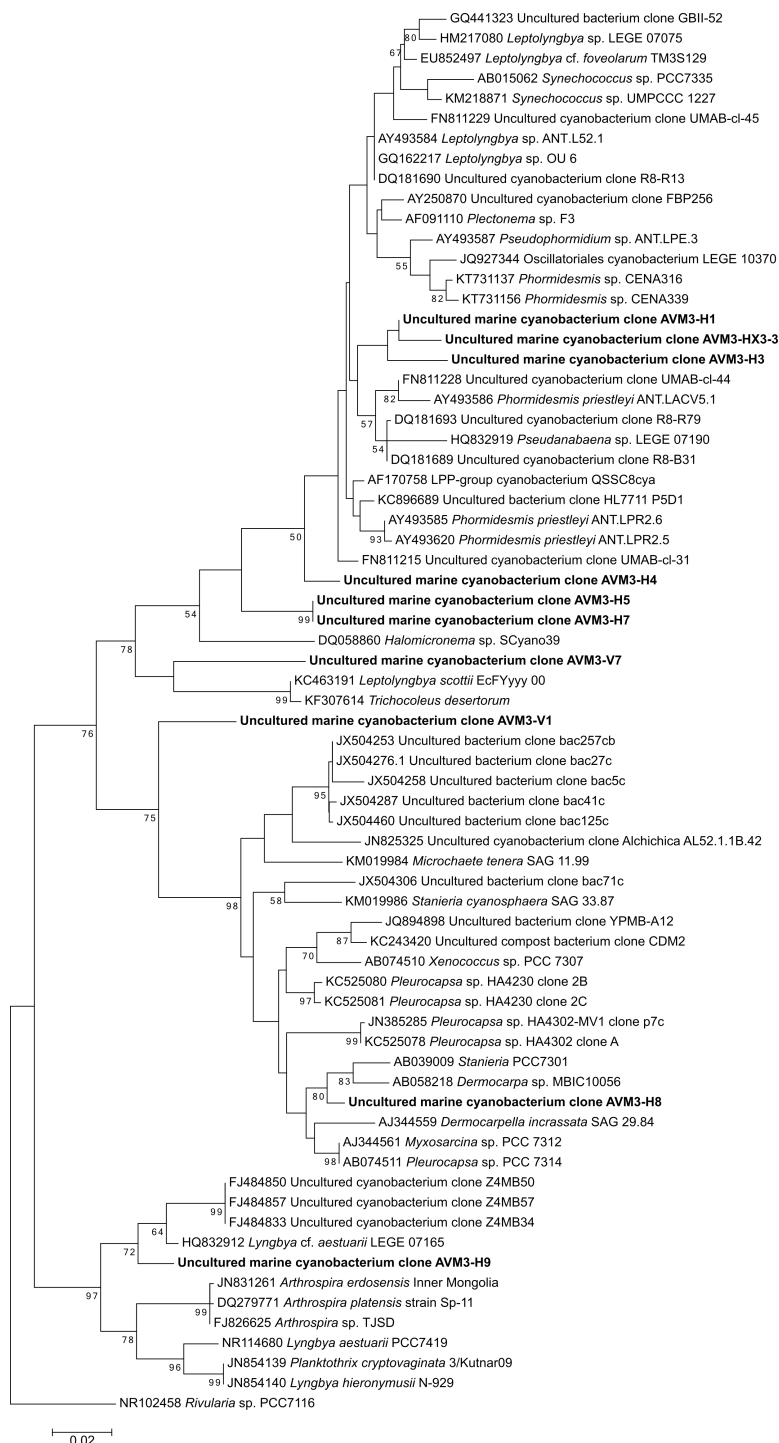


Figura 6.3: Árbol filogenético de las cianobacterias aisladas de los tapetes microbianos, realizado a partir de las secuencias del ADNr 16S utilizando el método de máxima verosimilitud basado en el modelo de Tamura-Nei. En negrita se muestran las secuencias obtenidas en este estudio.

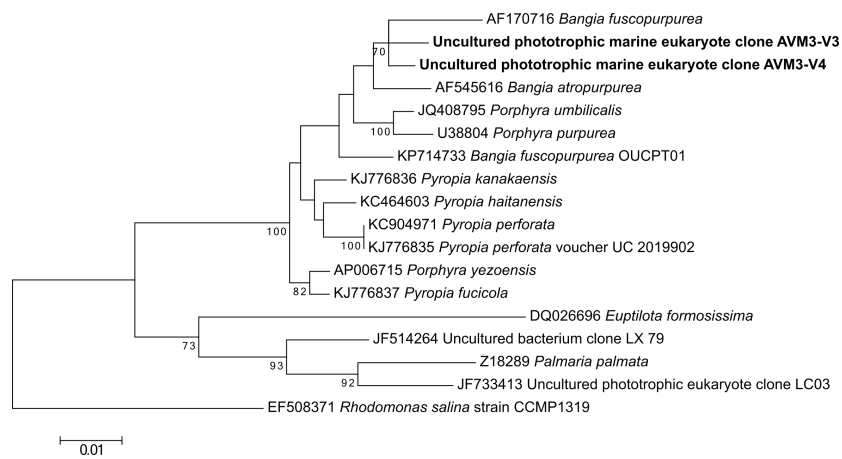


Figura 6.4: Árbol filogenético de cloroplastos de las rodófitas aisladas del tapete microbiano AVM-V3, realizado a partir de las secuencias del ADNr 16S utilizando el método de máxima verosimilitud basado en el modelo de Tamura-Nei. En negrita se muestran las secuencias obtenidas en este estudio.

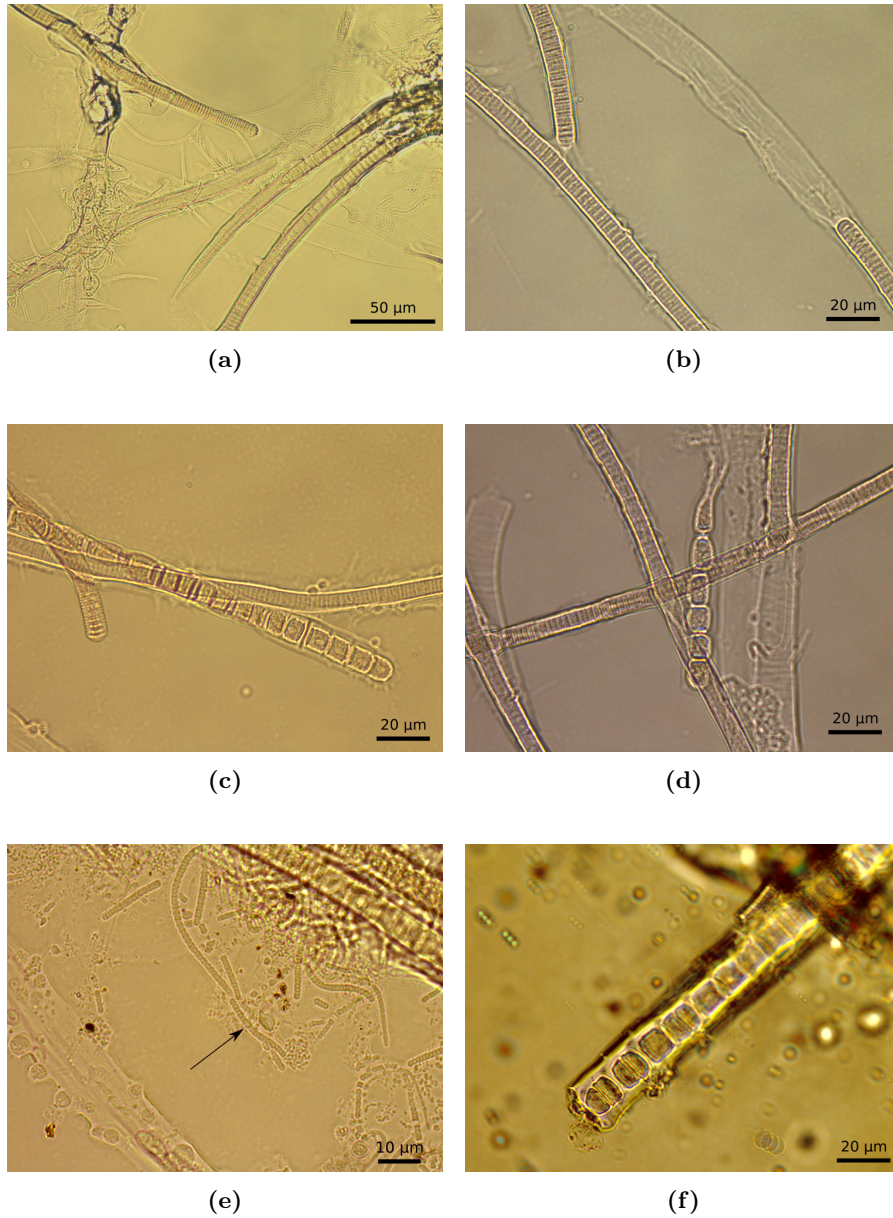


Figura 6.5: Fotografías realizadas al microscopio óptico de la muestra AVM-H3. (a) Aspecto general, (b) oscillatoriales, (c) filamentos de oscillatoriales, probablemente *Lyngbya* sp., y una pseudoanabaenal, que podría estar relacionada con *Phormidesmis priestleyi*, (d) oscillatoriales y un filamento de pseudoanabaenal, (e) nostocales, la flecha indica un heterociste, y (f) filamento eucariota con células en división, que se podría atribuir a *Bangia atropurpurea*.

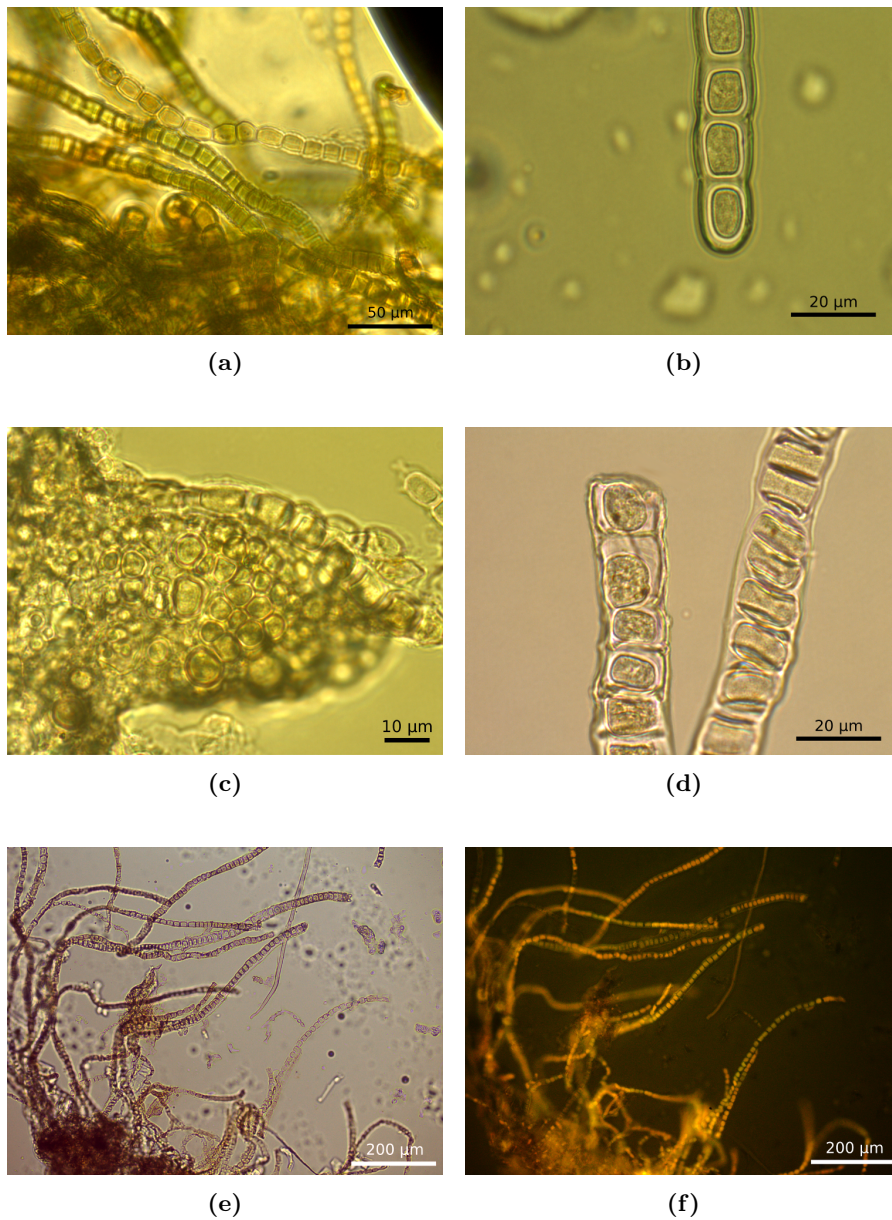


Figura 6.6: Fotografías realizadas al microscopio óptico de la muestra AVM-V3. (a) Filamentos de pseudanabaenales, (b) detalle de una cianobacteria pseudanabaenal, obsérvese el gran tamaño de las células, (c) chroococcales, (d) rodofceas bangiales, (e) visión general de tapete microbiano AVM-V3, dominado por filamentos de *Bangia atropurpurea* unidos por una estructura rizoide, y (f) la misma fotografía que la anterior pero tomada mediante epifluorescencia, donde se observa la fluorescencia anaranjada de la ficoeritrina, pigmento que contienen tanto cianobacterias como rodofceas.

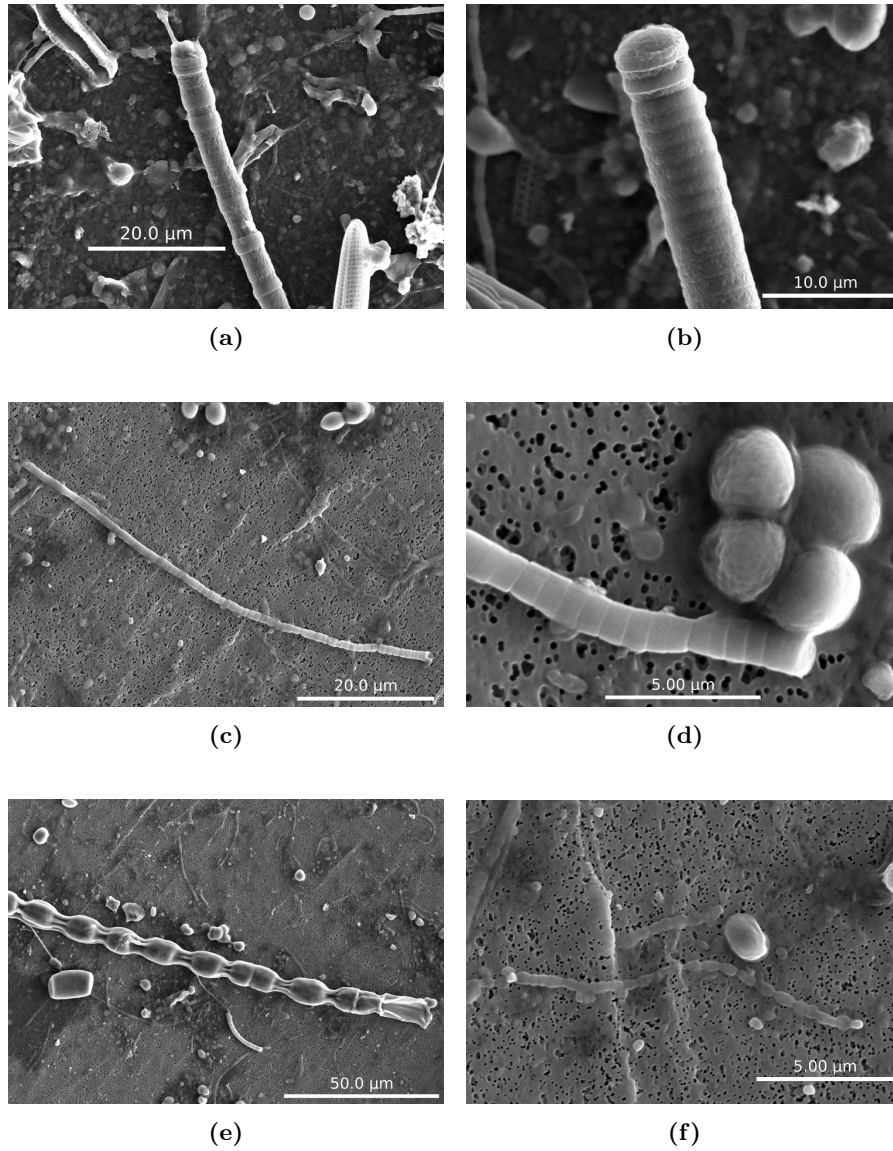


Figura 6.7: Fotografías del tapete microbiano realizadas al microscopio electrónico de barrido. (a) Visión general del tapete, con un filamento de *Lyngbya* sp. en el centro, (b) detalle del extremo de un filamento de *Lyngbya* sp. (c) pseudanabaenal relacionada con *Phormidesmis* sp., (d) detalle de la misma pseudanabaenal que la anterior, con una chroococcal, (e) filamento no identificado, similar a una pseudanabaenal, con células de gran tamaño, y (f) obsérvese los pequeños filamentos centrales que podrían corresponder a las nostocales visualizadas en el microscopio óptico.

Bibliografía

- Balskus, E. P., Case, R. J., and Walsh, C. T. The biosynthesis of cyanobacterial sunscreen scytonemin in intertidal microbial mat communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 77(2):322–332, 2011.
- Boedeker, C. and Karsten, U. The occurrence of mycosporine-like amino acids in the gametophytic and sporophytic stages of *Bangia* (Bangiales, Rhodophyta). *Phycologia*, 44(4):403–408, 2005.
- Casamatta, D. A., Johansen, J. R., Vis, M. L., and Broadwater, S. T. Molecular and morphological characterization of ten polar and near-polar strains within the oscillatoriales (Cyanobacteria). *Journal of phycology*, 41(2):421–438, 2005.
- Fuller, N. J., Marie, D., Partensky, F., Vaultot, D., Post, A. F., and Scanlan, D. J. Clade-specific 16S ribosomal DNA oligonucleotides reveal the predominance of a single marine *Synechococcus* clade throughout a stratified water column in the Red Sea. *Appl Environ Microbiol*, 69(5):2430–2443, 2003.
- Garcia-Pichel, F. and Castenholz, R. W. Characterization and biological implications of scytonemin, a cyanobacterial sheath pigment. *Journal of Phycology*, 27(3):395–409, 1991.
- Gerdes, G. Structures left by modern microbial mats in their host sediments. In Schieber, J., Bose, P. K., Eriksson, P., Banerjee, S., Sarkar, S., Altermann, W., and Catuneanu, O., editors, *Atlas of microbial mat features preserved within the siliciclastic rock record*, pages 5–38. Elsevier Amsterdam, 2007.
- Giraldo-Silva, A. M. Aislamiento y caracterización de microalgas formadoras de tapetes microbianos asociados a un cultivo hidropónico de plantas halófitas. Master’s thesis, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Facultad de Ciencias del Mar, 2011. URL <http://hdl.handle.net/10553/6792>.
- Guiry, M. *Bangia atropurpurea* (Mertens ex Roth) C.Agardh. AlgaeBase: Worldwide electronic publication, October 2015. URL <http://www.algaebase.org>.
- Komárek, J. and Anagnostidis, K. *Cyanoprokaryota: Oscillatoriales*. Cyanoprokaryota. Elsevier, 2005.
- Komárek, J., Kaštovský, J., Ventura, S., Turicchia, S., and Šmarda, J. The cyanobacterial genus *Phormidesmis*. *Algological Studies*, 129(1):41–59, 2009.
- Nübel, U., Garcia-Pichel, F., and Muyzer, G. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Applied and environmental microbiology*, 63(8):3327–3332, 1997.
- Perkerson III, R. B., Johansen, J. R., Kováčik, L., Brand, J., Kaštovský, J., and Casamatta, D. A. A unique pseudanabaenalean (Cyanobacteria) genus *Nodosilinea* gen. nov. based on morphological and molecular data. *Journal of Phycology*, 47(6):1397–1412, 2011.
- Stal, L. J. Cyanobacterial mats and stromatolites. In *Ecology of Cyanobacteria II*, pages 65–125. Springer, 2012.

Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., and Lane, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology*, 173(2): 697–703, 1991.

Capítulo 7

Aislamiento de escitonemina y dihidroescitonemina a partir de un tapete microbiano y de una cepa de *Nostoc* sp.

7.1. Introducción

La escitonemina (**36**) es un pigmento de la vaina de muchas cianobacterias [Proteau et al., 1993], y la dihidroescitonemina es su forma reducida (**37**). La escitonemina es una molécula fotoprotectora que ha permitido a las cianobacterias colonizar hábitats sometidos a altas intensidades de radiación UV-A [Balskus et al., 2011]. Es un pigmento amarillo-pardo con una estructura heterocíclica única, con un sistema de electrones π altamente conjugado que se biosintetiza y acumula en la región extracelular del organismo productor, formando una capa estable que absorbe el 90 % de la radiación UV-A incidente ($\lambda_{max} = 370$ nm *in vivo*, 384 nm *in vitro*) [Garcia-Pichel and Castenholz, 1991]. El pigmento puede constituir más del 5 % del peso seco de la cianobacteria en organismos cultivados y se acumula con mayores concentraciones en tapetes de cianobacterias naturales [Karsten et al., 1998].

Dado que tanto el ácido sulfhídrico como el sulfito sódico son capaces de convertir la escitonemina en su forma reducida [Garcia-Pichel and Castenholz, 1991], se ha sugerido un papel protector de la escitonemina frente a contaminantes reductores dado que el proceso se invierte por la acción del oxígeno y la actividad enzimática [Balskus et al., 2011].

En las cianobacterias del género *Nostoc* se ha encontrado la escitonemina. En concreto, se la ha descrito en *N. punctiforme* [Fleming and Castenholz, 2007; Soule et al., 2009], en *N. flagelliforme* [Ferroni et al., 2010] y en *N. commune* [Chen et al., 2013; Itoh et al., 2013]. La dihidroescitonemina se la ha encontrado también en *N. commune* y ha presentado actividad inhibitoria del crecimiento de las células linfoides Jurkat humanas [Itoh et al., 2013].

La farmacología de la escitonemina también ha dado resultados positivos, pues ha mostrado actividad anti-inflamatoria y antiproliferativa [Stevenson et al.,

2002a,b].

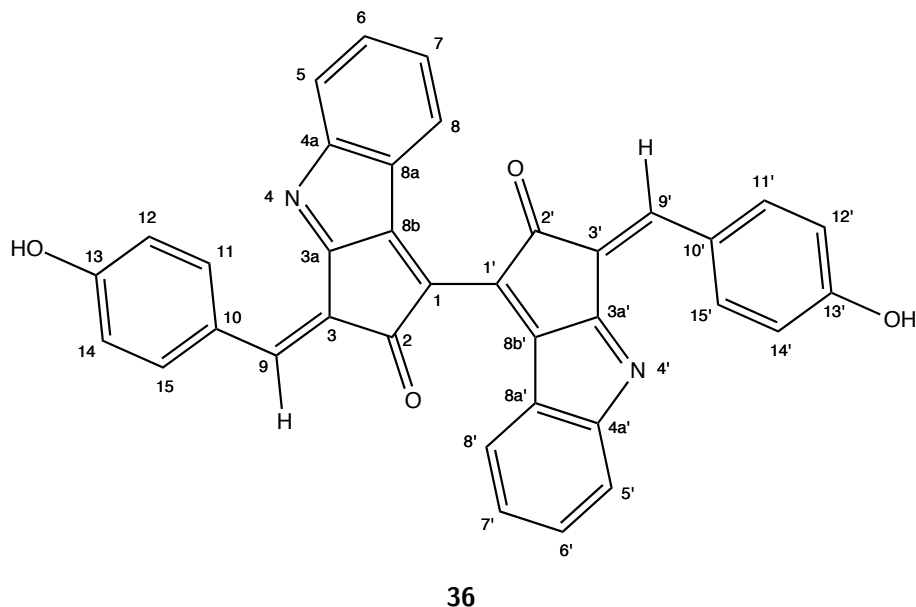
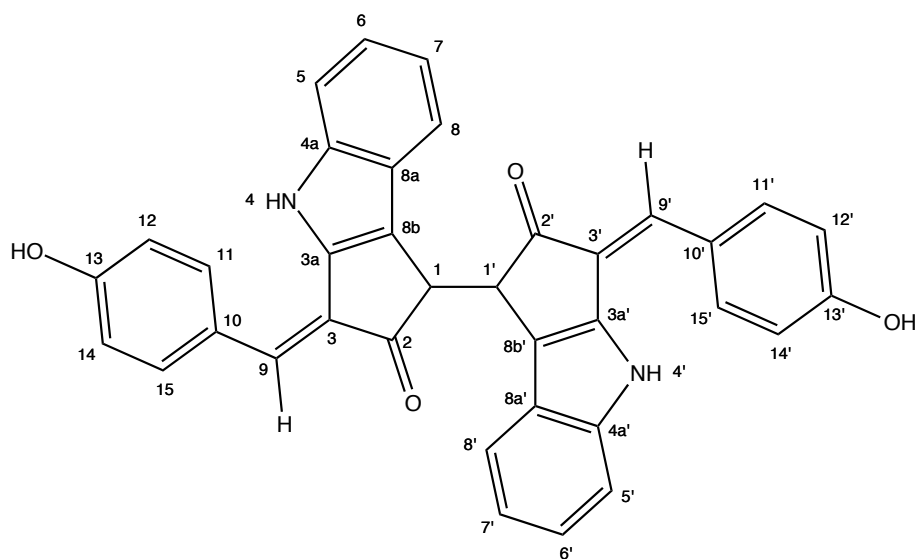


Figura 7.1: Estructura de la escitonemina.

7.2. Resultados

El primer producto en ser aislado resultó ser un polvo pardo que produce disoluciones verdes en los diferentes disolventes orgánicos. Su espectro de masas presenta el ión molecular a m/z 544.14 (43.76 %) y el pico base a m/z 543.13 ($[M - H]^+$, 100 %). Por espectrometría de masas de alta resolución se dedujo la fórmula molecular como $C_{36}H_{20}N_2O_4$. Así, el pico base aparece a m/z 543.1346 que al corresponder a $[M - H]^+$ nos da la fórmula $C_{36}H_{19}N_2O_4$ cuya masa calculada es 543.1345. El espectro UV-visible (Figura 7.3) presenta tres máximos de absorbancia centrados a 200.5, 254.0 y 398.5 nm. El espectro de 1H -RMN a 300 MHz (Tabla 7.1), enriquecido por experimentos en dos dimensiones (TOCSY y COSY) nos confirman que se trata de la escitonemina (**36**). Estos resultados son consistentes con la bibliografía [Proteau et al., 1993].

El segundo producto en ser aislado resultó ser un polvo pardo que produce disoluciones rojizas en los diferentes disolventes orgánicos. Su espectro de masas presenta el ión molecular a m/z 546.16 (40.89 %) y el pico base a m/z 545.15 ($[M - H]^+$, 100 %). Por espectrometría de masas de alta resolución se dedujo la fórmula molecular como $C_{36}H_{22}N_2O_4$. Así, el pico base aparece a m/z 545.1499 que al corresponder a $[M - H]^+$ nos da la fórmula $C_{36}H_{21}N_2O_4$ cuya masa calculada es 545.1501. El espectro de 1H -RMN a 300 MHz (Tabla 7.2), nos confirma, junto a los anteriores, que se trata de la dihidroescitonemina (**37**), de nuevo en consistencia con la bibliografía [Proteau et al., 1993].



37

Figura 7.2: Estructura de la dihidroescitonemina.

Tabla 7.1: ^1H -RMN de la escitonemina (**36**) y correlaciones observadas en los espectros TOCSY y COSY. ^a

Posición	^1H -RMN, (δ_H , ppm) (300 MHz, piridina- d_5)	TOCSY	COSY
5	7.75 (2H, d, $J = 6.94$ Hz)	H-6, H-8	H-6
6	7.48 (2H, m)	H-5, H-7	H-5, H-7
7	7.21 (2H, m)	H-6, H-8	H-6, H-8
8	7.86 (2H, d, $J = 6.54$ Hz)	H-5, H-7	H-7
9	7.99 (2H, s)		
11,15	8.97 (4H, d, $J = 6.84$ Hz)	H-11→H-12 H-15→H-14	H-11→H-12 H-15→H-14
12,14	7.33 (4H, d, $J = 6.84$ Hz)	H-12→H-11 H-14→H-15	H-12→H-11 H-14→H-15

^a Debido a la naturaleza dimérica de este compuesto, los desplazamientos químicos que se indican corresponden a ambas mitades de la molécula (ver Figura 7.1).

Análisis por HPLC.

Ambos metabolitos se separan por HPLC si se emplean condiciones de fase reversa y metanol-agua como eluyente (Figura 7.4).

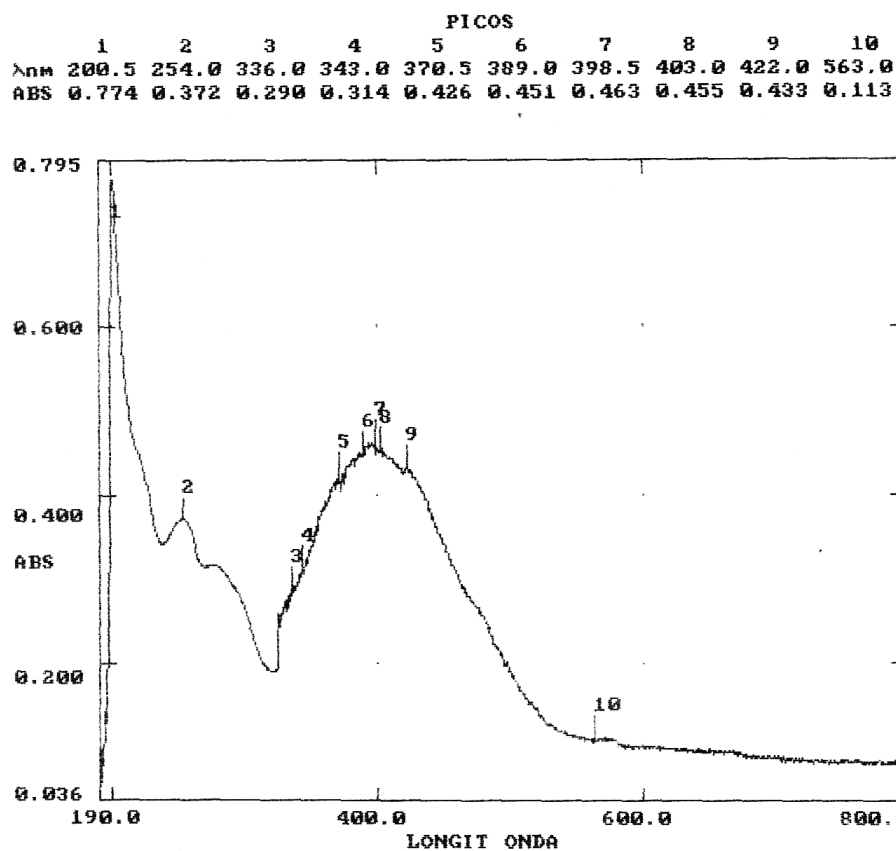


Figura 7.3: Espectro UV-visible de la escitonemina (36) aislada del tapete microbiano.

Tabla 7.2: ^1H -RMN de la dihidroescitonemina (37).^a

Posición	^1H -RMN, (δ_H , ppm) (300 MHz, piridina- d_5)
5	7.63 (2H, d, $J = 7.80$ Hz)
6,7	7.42 (4H, m)
8	8.40 (2H, d, $J = 7.80$ Hz)
9	7.82 (2H, s)
11,15	7.85 (4H, d, $J = 8.30$ Hz)
12,14	7.00 (4H, d, $J = 8.30$ Hz)
OH	12.09 (2H, brs)
NH	12.69 (2H, brs)

^a Debido a la naturaleza dimérica de este compuesto, los desplazamientos químicos que se indican corresponden a ambas mitades de la molécula (ver Figura 7.2).

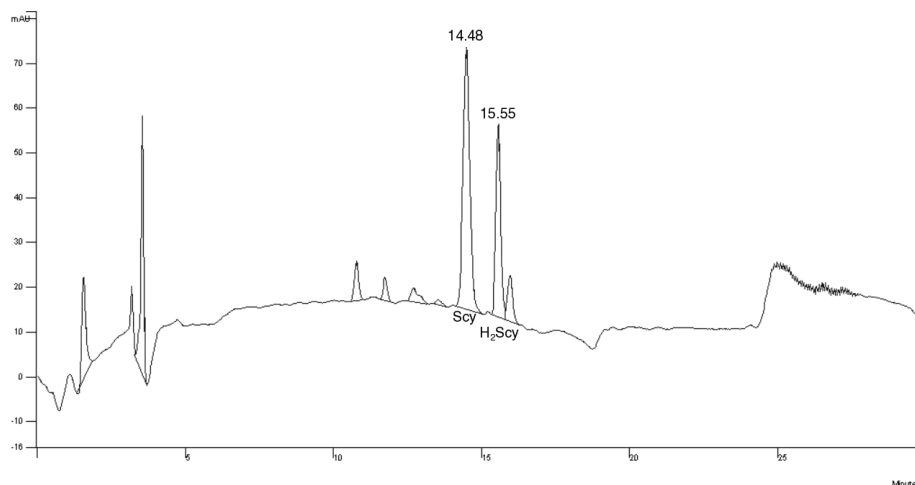


Figura 7.4: Cromatograma HPLC de una fracción que contiene escitonemina **36** ($T_r = 14.48$ min) y dihidroescitonemina **37** ($T_r = 15.55$ min).

Actividad citotóxica de escitonemina (**36**) y dihidroescitonemina (**37**).

Tanto la escitonemina (**36**) como la dihidroescitonemina (**37**) se aplicaron a un cultivo de células de la leucemia humana, HL-60, resultando actividad citotóxica, con IC_{50} de $4.6 \mu\text{M}$ y $1.9 \mu\text{M}$, respectivamente (Figura 7.5).

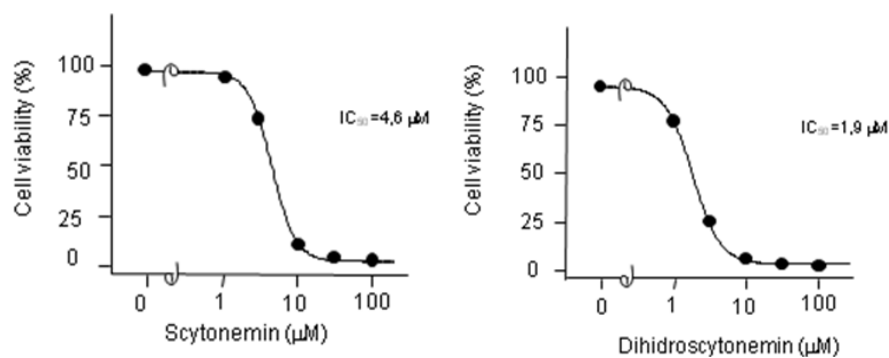


Figura 7.5: Viabilidad de las células HL-60 frente a la escitonemina (**36**) y dihidroescitonemina (**37**).

Resultados similares se obtuvieron con la línea celular de leucemia humana U937. En ambas líneas celulares se hicieron 3 experimentos de MTT independientes.

7.3. Experimental

Obtención de la biomasa.

Los tapetes microbianos se recogieron a finales de junio de 2011 de la zona supramareal, en unas terrazas escalonadas que refuerzan el muro de contención de la Avenida Marítima de Las Palmas de Gran Canaria. La biomasa de los tapetes se secó durante 24 h a 60°C.

La cianobacteria *Nostoc* sp. (cepa BEA1032B) se aisló de una colonia recogida en un camino hacia El Hornillo, en Gran Canaria, Islas Canarias, y se cultivó en el medio BG₁₁ (Tabla 7.3) [Stanier et al., 1971] en el Banco Español de Algas, en una cámara a 20°C, mediante irradiación de luz blanca fría (100 μmol fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) con un fotoperíodo de 14:10 (L:O). Posteriormente se liofilizó.

Tabla 7.3: Medio BG₁₁.

Componente	Concentración final	Disolución Stock (g l ⁻¹ H ₂ O)	Adición para 1 litro de medio de cultivo
NaNO ₃	17.6 mM		1.5 g
K ₂ HPO ₄	0.22 mM	40.0	1 ml
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0.03 mM	75.0	1 ml
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0.2 mM	36.0	10 ml
Ácido cítrico · H ₂ O	0.03 mM	6.00	10 ml
Citrato de amonio férrico	0.02 mM	0.60	10 ml
Na ₂ EDTA · 2 H ₂ O	0.002 mM	0.10	10 ml
Na ₂ CO ₃	0.18 mM	2.00	10 ml
Elementos traza	Ver Tabla 7.4		1 ml

Tabla 7.4: Disolución de elementos traza.

Compuesto	Adición para 1 litro de H ₂ O
H ₃ BO ₃	2.86 g
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	1.81 g
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	0.22 g
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0.39 g
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0.08 g
Co(NO ₃) ₂ · 6 H ₂ O	0.05 g

Preparación de la disolución de cultivo

Se prepararon las disoluciones stock añadiendo las cantidades indicadas de los compuestos químicos a 1000 ml de agua destilada. La disolución de metales traza se preparó en agua bidestilada. Estas disoluciones se combinaron según se indica y se ajustó el pH a 7.4 con NaOH. Finalmente se esterilizó en autoclave.

Extracción y purificación de los metabolitos.

La biomasa seca (441 g) del tapete microbiano se extrajo con acetona por maceración (3 veces) y posteriormente mediante un aparato soxhlet. Después de evaporar el disolvente se obtuvo un extracto pardo (8.815 g) que se cromatografió en columna sobre gel de sílice eluyendo con hexano y cantidades crecientes de AcOEt. Se separaron 9 fracciones, en la tercera de las cuales (eluida con hexano/AcOEt 2:8 v/v) resultó ser una disolución con un intenso color rojo que presentó dos productos homogéneos por TLC (CHCl_3 :MeOH 9:1 v/v). Mediante la recromatografía en capa gruesa (fase normal, CHCl_3 :MeOH 9:1 v/v) de esta fracción se separaron los dos productos, el menos polar (283 mg, $R_f=0.45$) produce disoluciones color verde caqui mientras que el más polar (475 mg, $R_f=0.34$) produce disoluciones color rojo brillante.

La biomasa liofilizada (6 g) de *Nostoc* sp. (cepa BEA1032B) se extrajo mediante un aparato soxhlet con acetona (250 ml). La eliminación del disolvente rindió un extracto pardo que se cromatografió con n-hexano/AcOEt con cantidades incrementales del último. Se obtuvieron sucesivas fracciones que se monitorizaron por cromatografía en capa fina en fase normal (gel de sílice) eluyendo con una mezcla de cloroformo y metanol (9:1). Se obtuvieron así dos productos homogéneos por TLC. El menos polar colorea sus disoluciones de color verde y el más polar las colorea de color rojo.

Estudio del producto menos polar.

Presenta en TLC (gel de sílice, 0.25 mm espesor) un $R_f=0.45$ cuando se eluye con cloroformo–metanol (9:1). Mancha de color verde. Fue identificada como escitonemina (**36**) por su espectro de ^1H -RMN, tanto en una como en dos dimensiones (ver Tabla 7.1 y discusión). El espectro de absorción UV (en DMSO) dio $\lambda_{max}=254$ nm, 389 nm.

Estudio del producto más polar.

Presenta en TLC (gel de sílice, 0.25 mm espesor) un $R_f = 0.34$ cuando se eluye con cloroformo–metanol (9:1). Mancha de color rojo. Fue identificado como dihidroescitonemina (**37**) por su espectro de ^1H -RMN, (ver Tabla 7.2).

Análisis por HPLC.

Ambos metabolitos se separaron por HPLC mediante una columna Waters μ Bondapak C18 (125 Å, 10 μm , 3.9 \times 300 mm) mediante el siguiente programa para el eluyente:

- Inicio: 80 % de agua y 20 % de metanol
- Minuto 2 al 15: subir la composición del metanol desde el 20 % al 100 %
- Flujo: 1 ml min⁻¹

En estas condiciones, y con un detector UV ($\lambda=386$ nm) la escitonemina (**36**) se eluye a 14.48 minutos y la dihidroescitonemina (**37**) a 15.55 minutos.

Bibliografia

- Balskus, E. P., Case, R. J., and Walsh, C. T. The biosynthesis of cyanobacterial sunscreen scytonemin in intertidal microbial mat communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 77(2):322–332, 2011.
- Chen, J., Zhao, L., Xu, J., Yang, R., He, S., and Yan, X. Determination of oxidized scytonemin in *Nostoc commune* Vauch cultured on different conditions by high performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry. *Journal of Applied Phycology*, 25(4):1001–1007, 2013.
- Ferroni, L., Klisch, M., Pancaldi, S., and Häder, D.-P. Complementary UV-Absorption of Mycosporine-like Amino Acids and Scytonemin is Responsible for the UV-Insensitivity of Photosynthesis in *Nostoc flagelliforme*. *Marine Drugs*, 8(1):106–121, 2010.
- Fleming, E. D. and Castenholz, R. W. Effects of periodic desiccation on the synthesis of the UV-screening compound, scytonemin, in cyanobacteria. *Environmental Microbiology*, 9(6):1448–1455, 2007.
- Garcia-Pichel, F. and Castenholz, R. W. Characterization and biological implications of scytonemin, a cyanobacterial sheath pigment. *Journal of Phycology*, 27(3):395–409, 1991.
- Itoh, T., Tsuzuki, R., Tanaka, T., Ninomiya, M., Yamaguchi, Y., Takenaka, H., Ando, M., Tsukamasa, Y., and Koketsu, M. Reduced scytonemin isolated from *Nostoc commune* induces autophagic cell death in human T-lymphoid cell line Jurkat cells. *Food and Chemical Toxicology*, 60:76 – 82, 2013.
- Karsten, U., Maier, J., and Garcia-Pichel, F. Seasonality in uv-absorbing compounds of cyanobacterial mat communities from an intertidal mangrove flat. *Aquatic Microbial Ecology*, 16:37–44, 1998.
- Proteau, P., Gerwick, W., Garcia-Pichel, F., and Castenholz, R. The structure of scytonemin, an ultraviolet sunscreen pigment from the sheaths of cyanobacteria. *Experientia*, 49(9):825–829, 1993.
- Soule, T., Garcia-Pichel, F., and Stout, V. Gene Expression Patterns Associated with the Biosynthesis of the Sunscreen Scytonemin in *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 in Response to UVA Radiation. *Journal of Bacteriology*, 191(14):4639–4646, 2009.
- Stanier, R., Kunisawa, R., Mandel, M., and Cohen-Bazire, G. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriological Reviews*, 35(2):171–205, 06 1971.
- Stevenson, C. S., Capper, E. A., Roshak, A. K., Marquez, B., Eichman, C., Jackson, J. R., Mattern, M., Gerwick, W. H., Jacobs, R. S., and Marshall, L. A. The Identification and Characterization of the Marine Natural Product Scytonemin as a Novel Antiproliferative Pharmacophore. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 303(2):858–866, 2002a.

Stevenson, C., Capper, E., Roshak, A., Marquez, B., Grace, K., Gerwick, W., Jacobs, R., and Marshall, L. Scytonemin-a marine natural product inhibitor of kinases key in hyperproliferative inflammatory diseases. *Inflammation Research*, 51(2):112–114, 2002b.

Capítulo 8

Estudio de los productos naturales del alga *Halopteris scoparia* (*Stypocaulon scoparium*).

8.1. Antecedentes

El alga *Halopteris scoparia* ha sido investigada previamente en lo que se refiere a sus extractos orgánicos y los productos naturales en ellos contenidos. Así, Augier [1970] encontró triptófano (**38**), β -indolil-acetonitrilo (**39**) y β -indolil-acetato de etilo (**40**), todos ellos precursores biogénéticos de una conocida hormona del crecimiento vegetal, el ácido β -indolil-acético (**41**) o auxina.

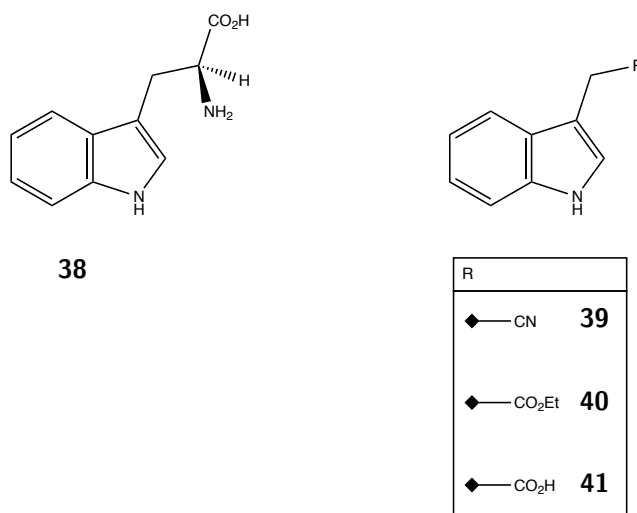


Figura 8.1: Indoles.

Posteriormente, Amico et al. [1976] identificaron y cuantificaron los aminoácidos, azúcares y esteroides mayoritarios presentes en *H. scoparia*. Así resultaron identificados los aminoácidos alanina (Ala), arginina (Arg), asparagina (Asn), ácido aspártico (Asp), glutamina (Gln), ácido glutámico (Glu), glicina (Gly), isoleucina (Ile), leucina (Leu), lisina (Lys), fenilalanina (Phe), prolina (Pro), serina (Ser), treonina (Thr) y valina (Val). También resultaron identificados los ácidos aminosulfónicos taurina (Tau, **42**); N-metiltaurina (Me-Tau, **43**); N,N-dimetiltaurina (Me₂-Tau, **44**); N,N,N-trimetiltaurina (Me₃-Tau, **45**) y ácido cisteinólico (CyA, **46**). Entre los azúcares fue identificado el manitol (**47**) a una concentración del 2.61% respecto al peso de alga seca. Y entre los esteroides fueron identificados como mayoritarios el fucosterol (**48**) y el colesterol (**49**).

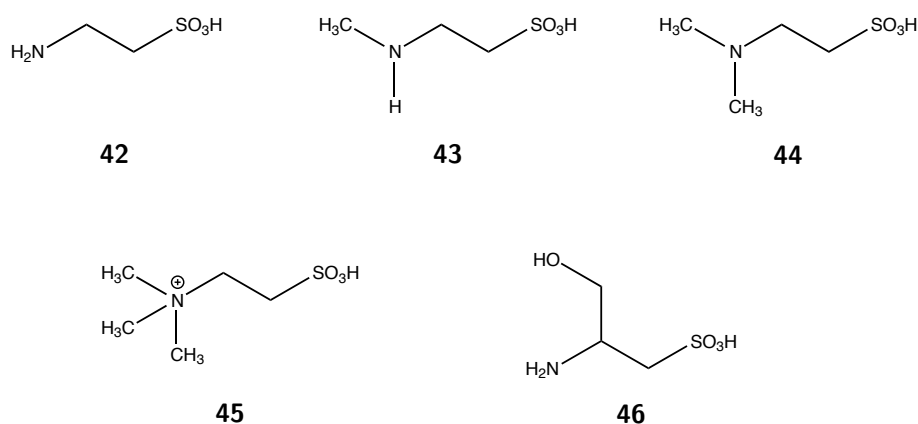


Figura 8.2: Ácidos aminosulfónicos.

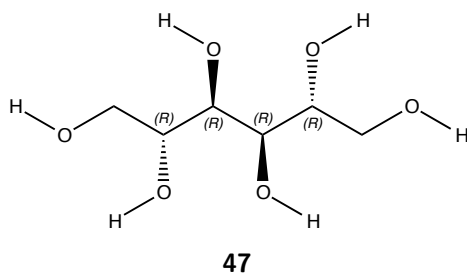


Figura 8.3: Manitol.

Posteriormente, Güven and Güvener [1981] confirmaron la presencia de los aminoácidos y esteroides descritos en *H. scoparia* y, además, aislaron el polisacárido ácido alginico (**50**).

Posteriormente, Munda and Gubenšek [1986] detectaron sorbitol (**51**) en varias algas pardas, entre ellas, *H. scoparia*.

Más tarde, Munda [1987] cuantificó el ácido ascórbico (**52**) junto a su forma oxidada (**53**) en varias algas, encontrando niveles de 20.9–50.0 mg en 100 g de peso fresco en *H. scoparia*.

Karsten et al. [1998] describieron aminoácidos del tipo de la micospolina (MAAs) que tienen la propiedad de absorber la radiación UV, como porfira-334

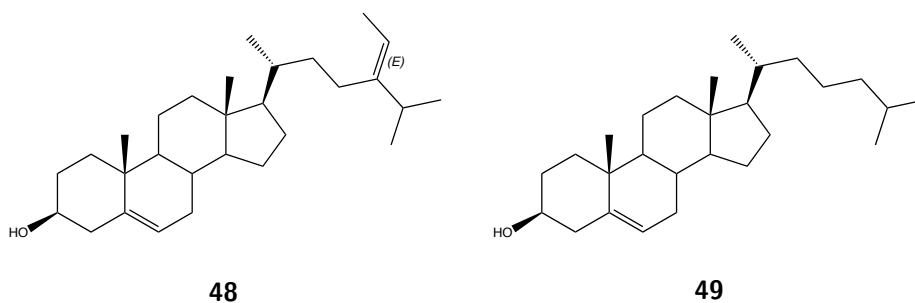


Figura 8.4: Esteroles.

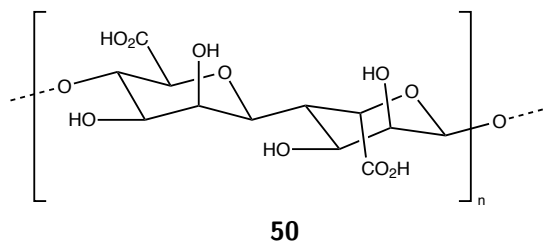


Figura 8.5: Ácido algínico.

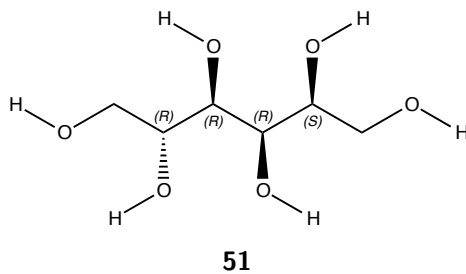


Figura 8.6: Sorbitol.

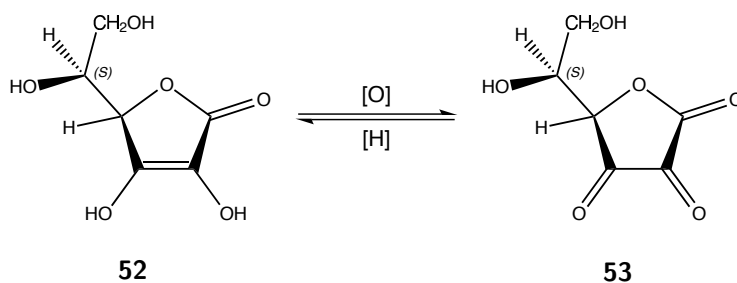


Figura 8.7: Ácido L-ascórbico (**52**) y dehidroascórbico (**53**).

(**54**), palithina-treonina (**55**) y shinorina (**56**). Los autores ponen de manifiesto que a menos irradiación solar natural en el ecosistema, menos MAAs se biosintetizan y acumulan en el alga.

Hellio et al. [2001] encontraron actividad antiincrustante en el extracto bruto de *H. scoparia* pero no llegaron a identificar los metabolitos responsables de dicha actividad.

Orhan et al. [2003] estudiaron la composición en ácidos grasos de varias algas encontrando en *H. scoparia* cantidades significativas de ácido cáprico (C₁₀), palmítico (C₁₆), oleico (C_{18-ω9}) y esteárico (C₁₈).

Finalmente, comentar que Gerald et al. [2002] patentaron una fórmula dentro del sector de la cosmética para tratar las arrugas y el envejecimiento a base de extractos de *H. scoparia* y que López et al. [2011] estudiaron la actividad antioxidante de *H. scoparia*.

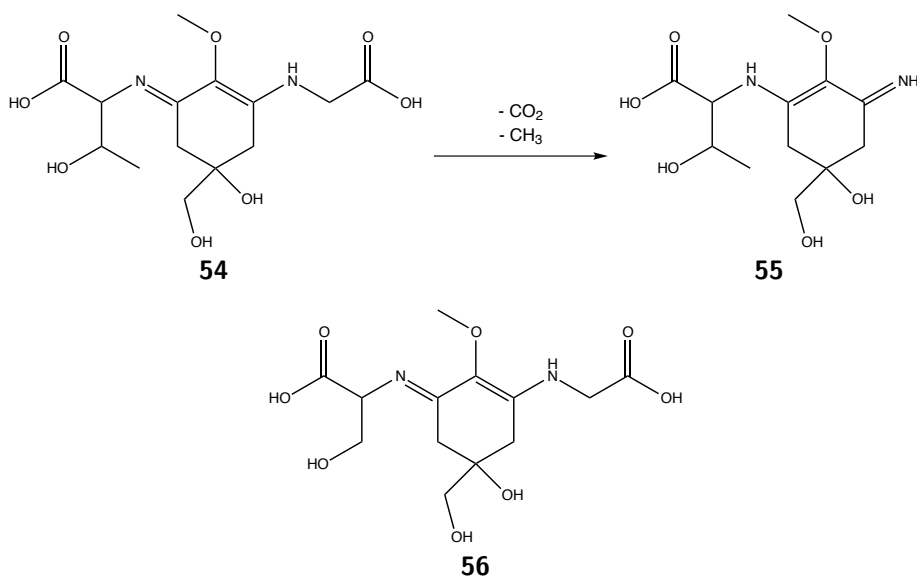


Figura 8.8: Aminoácidos del grupo de la micosporina (MAAs).

8.2. Experimental

Por maceración de trozos del alga marina *Halopteris scoparia* con acetona seguida de filtración y concentración en rotavapor se obtuvo un extracto bruto de la misma como un jarabe oscuro. Por cromatografía en columna eluyendo con n-hexano / acetato de etilo con cantidades incrementales del último se obtuvieron sucesivas fracciones que se monitorizaron por cromatografía en capa fina aislándose una fracción apolar y otra polar según su comportamiento en cromatografía en capa fina.

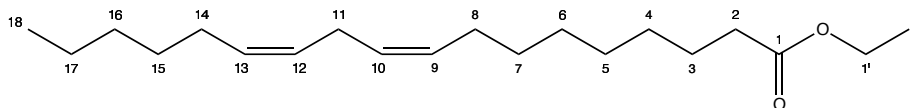
Estudio de la fracción apolar.

Fue identificada como linoleato de etilo (**57**) a partir de sus espectros de ¹³C-RMN (Tabla 8.1) y ¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz): δ 5.34 (4H, m, H-9, H-10,

H-12, H-13), 4.12 (2H, q, $J = 7.12$ Hz, H-1'), 2.80 (2H, m, H-11), 2.28 (2H, t, $J = 7.33$ Hz, H-2), 2.03 (4H, m, H-8, H-14), 1.61 (2H, m, H-3), 1.25 (14H, s, H-4 a H-7; H-15 a H-17), 0.88 (6H, m, H-18, H-2').

Tabla 8.1: ^{13}C -RMN del linoleato de etilo (**57**) en CDCl_3 .

Carbono	^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3)
1	179.9
10	129.8
12	129.6
9, 13	128.0
1'	60.1
Resto	34.2 34.0 31.9 29.6 29.4 29.3 29.2 29.0 27.1 25.5 24.9 24.6 22.6 14.0



57

Figura 8.9: Linoleato de etilo.

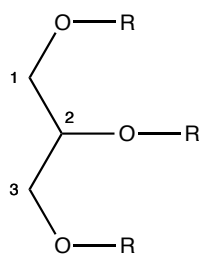
Estudio de la fracción polar.

El jarabe polar muestra un espectro de ^1H -RMN con señales en torno a δ 4.0 ppm que corresponden a protones geminales a oxígeno, lo que delata compuestos polihidroxílicos. Éste se acetiló con piridina y anhídrido acético (24 horas, temperatura ambiente) y extrajo de la manera usual, lo que supuso hidrólisis con hielo, extracción con éter dietílico, lavado con ácido clorhídrico acuoso al 10%, lavado con bicarbonato sódico acuoso al 10% y desecado sobre sulfato sódico anhidro. La eliminación del disolvente en rotavapor, redisolución en 100 ml de cloroformo y adición de 50 g de gel de sílice nos condujo, tras evaporar el cloroformo en rotavapor, a una cabeza cromatográfica que se colocó en lo alto de una columna cromatográfica de gel de sílice. Su elución cromatográfica con

n-hexano y acetato de etilo nos produjo dos sustancias homogéneas por CCF, a saber:

a) Triacetato del glicerol (58).

Fue identificado a partir de sus espectros de ^{13}C -RMN (Tabla 8.2) y ^1H -RMN (CDCl_3 , 300 MHz): δ 5.25 (1H, m, H-2), 4.30 (2H, dd, $J_1 = 4.22$ Hz, $J_2 = 11.93$ Hz, H-1, H-3), 4.16 (2H, dd, $J_1 = 5.84$ Hz, $J_2 = 11.93$ Hz, H-1, H-3), 2.10 (3H, s, CH_3CO), 2.08 (6H, s, $2 \times \text{CH}_3\text{CO}$).



59 R = H

58 R = COCH_3

Figura 8.10: Glicerol (**59**) y su triacetato (**58**).

Tabla 8.2: ^{13}C -RMN del triacetato del glicerol (**58**) en CDCl_3 .

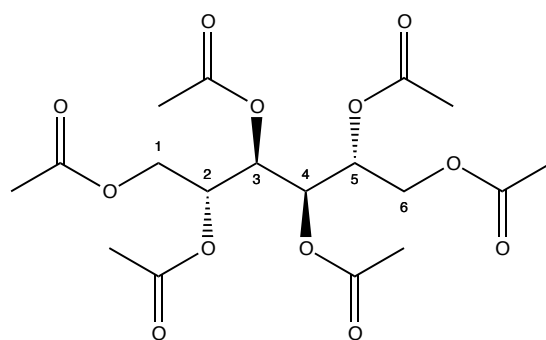
Carbono	^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3)
CO	170.5
2	69.0
12	129.6
1, 3	62.2
CH_3	20.8
CH_3	20.6

b) Hexaacetato del manitol (60).

Fue identificado a partir de sus espectros de ^{13}C -RMN (Tabla xx) y ^1H -RMN (CDCl_3 , 300 MHz): δ 5.45 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-2 y H-4), 5.10 (2H, ddd, $J_1 = 8.5$ Hz, $J_2 = 5.1$ Hz, $J_3 = 2.3$ Hz, H-2, H-5), 4.22 (2H, dd, $J_1 = 2.3$ Hz, $J_2 = 12.5$ Hz, H-1, H-6), 4.07 (2H, dd, $J_1 = 5.1$ Hz, $J_2 = 12.5$ Hz, H-1, H-6), 2.10 (6H, s, $2 \times \text{CH}_3\text{CO}$), 2.08 (6H, s, $2 \times \text{CH}_3\text{CO}$), 2.05 (6H, s, $2 \times \text{CH}_3\text{CO}$).

El producto cristalizó en forma de cristales hexagonales transparentes. El punto de fusión mixto (con acetato del manitol auténtico) dió 123-124°C, dato que concuerda con la bibliografía.

La rotación óptica también concordó con la bibliografía: $[\alpha]_D^{20^\circ\text{C}} = +23.68^\circ$ (c 1.93; CHCl_3).



60

Figura 8.11: Hexaacetato del manitol (**60**).

Tabla 8.3: ^{13}C -RMN del hexaacetato del manitol (**60**) en CDCl_3 .

Carbono	^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3)
CO	170.45
CO	169.79
CO	169.58
2, 5	67.74
3, 4	67.30
1, 6	61.73
CH_3	20.74
CH_3	20.56
CH_3	20.47

El espectro NOESY presenta correlación entre los protones 2 (o 5) y 3 (o 4), así como entre 3 (o 4) y 1 (o 6).

Bibliografía

- Amico, V., Oriente, G., Piattelli, M., Tringali, C., Fattorusso, E., Magno, S., Mayol, L., Santacroce, C., and Sica, D. Amino acids, sugars and sterols of some Mediterranean brown algae. *Biochemical Systematics and Ecology*, 4(3): 143–146, 1976.
- Augier, H. Presence de la beta-indolyl-acetonitrile et de la beta-indolyl-acetate d'ethyle chez l'algue brune *Halopteris scoparia* (linne) Sauvageau. *Acad Sci Compt Rend Ser D*, 1970.
- Gerald, A., Pellegrini, M., and Pellegrini, L. Cosmetic or dermatological compositions especially useful as antiaging and antiwrinkle products comprise extracts of *Ascophyllum* and *Halopteris* seaweeds, 2002.
- Güven, K.-C. and Güvener, B. Biochemical investigations on *Halopteris scoparia* (Linn) Sauvageau. *Chimica Acta Turcica*, 9:389–394, 1981.

- Hellio, C., Thomas-Guyon, H., Culioli, G., Piovett, L., Bourgoignon, N., and le Gal, Y. Marine antifoulants from *Bifurcaria bifurcata* (Phaeophyceae, Cystoseiraceae) and other brown macroalgae. *Biofouling*, 17(3):189–201, 2001.
- Karsten, U., Sawall, T., and Wiencke, C. A survey of the distribution of UV-absorbing substances in tropical macroalgae. *Phycological Research*, 46(4):271–279, 1998.
- López, A., Rico, M., Rivero, A., and de Tangil, M. S. The effects of solvents on the phenolic contents and antioxidant activity of *Stypocaulon scoparium* algae extracts. *Food Chemistry*, 125(3):1104–1109, 2011.
- Munda, I. M. Preliminary information on the ascorbic acid content in some adriatic seaweeds. In *Twelfth International Seaweed Symposium*, pages 477–481. Springer, 1987.
- Munda, I.-M. and Gubenšek, F. The amino acid content of some benthic marine algae from the northern adriatic. *Botanica marina*, 29(4):367–372, 1986.
- Orhan, I., Sener, B., and Atici, T. Fatty acid distribution in the lipid extracts of various algae. *Chemistry of natural compounds*, 39(2):167–170, 2003.

Conclusiones

A partir del trabajo realizado en esta tesis se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. De la esponja marina *Verongia aerophoba* se han identificado tres esteroides junto con sus derivados acetilados y, de ellos, el 23(24)-didehidroaplisteroles ha sido aislado por primera vez como producto natural. También se han identificado tres ácidos grasos y seis metabolitos derivados de la bromotirosina. De estos últimos, el ácido verónico se ha aislado por primera vez de *Verongia aerophoba*.
2. *Verongia aerophoba* mostró una alta supervivencia en cultivos *ex situ* recibiendo aguas provenientes de piscifactorías. Sin embargo, si se quiere integrar el cultivo de esta esponja en un sistema multitrofico, sería necesario mejorar y optimizar el método.
3. El cultivo *in situ* de *Verongia aerophoba* puede ser una técnica viable para la producción de citotóxicos de interés en la industria farmacéutica.
4. Se ha identificado una nueva especie de *Myxilla* sp. (Porifera: Poecilosclerida) para las Islas Canarias.
5. De la esponja *Myxilla* sp. de las Islas Canarias se han aislado e identificado cuatro esteroides, una mezcla de ceramidas y ceramidas-1-fosfato, y dos bases pirimidínicas.
6. Se ha elucidado la estructura y la estereoquímica absoluta de una mezcla de sesterterpenos, los estereoisómeros (8*Z*,13*E*)-strobilinina y (8*E*,13*Z*)-strobilinina aislados de la esponja *Ircinia variabilis*.
7. La identificación de un tapete microbiano mediante técnicas moleculares ha resultado en doce secuencias de ADN ribosomal, de las cuales diez corresponden a cianobacterias y dos a cloroplastos de algas rojas. De las secuencias cianobacterianas obtenidas, cinco están relacionadas con Pseudanabaenales del género *Phormidesmis*.
8. Los compuestos anti-UV escitonemina y dihidroescitonemina se han aislado e identificado de un tapete microbiano y de una cepa de *Nostoc* sp. Ambos compuestos presentan actividad citotóxica frente a células de leucemia humana HL-60 con valores de IC₅₀ de 4.6 μM y 1.9 μM, respectivamente.
9. El alga marina *Halopteris scoparia* es una fuente importante de manitol. Además, de ella también se han aislado linoleato de etilo y glicerol.

Índice de figuras

1.1. Esponja marina <i>Verongia aerophoba</i>	20
1.2. Esteroles identificados en <i>Verongia aerophoba</i>	24
1.3. Transposición de McLafferty para el 24(28)-didehidroaplistero (2).	25
1.4. Protones olefínicos de la mezcla de aplistero (1), 24(28)-didehidroaplistero (2) y 23(24)-didehidroaplistero (3)	25
1.5. Ácidos grasos de <i>Verongia aerophoba</i> : ácidos heneicosanoico (7), oleico (8) y linoleico (9)	27
1.6. Esquema de fragmentaciones observadas en el espectro de masas que confirman el ácido heneicosanoico (7).	27
1.7. Ácido verónico	28
1.8. Principales fragmentaciones del ácido verónico (10) en el espectrómetro de masas.	29
1.9. Dienona de <i>Verongia aerophoba</i>	30
1.10. Principales fragmentaciones de la dienona (11) observadas en el espectrómetro de masas.	32
1.11. Acetato de la dienona	33
1.12. Aeroplysinina-1	34
1.13. Verongiolido	35
1.14. Fragmentaciones de verongiolido (14) en el espectrómetro de masas.	36
1.15. Comparación de los espectros ¹ H-RMN de verongiolido (14) en dos disolventes diferentes: a) DMSO-d ₆ , 500 MHz; b) CD ₃ OD, 300 MHz.	37
1.16. Estructura de la (11 <i>R</i> , 17 <i>R</i>)-11- <i>epi</i> -fistularina-3	39
1.17. Fragmentaciones en espectrómetro de masas de la 11- <i>epi</i> -fistularina-3.	40
1.18. Espectrometría de masas de alta resolución de la 11- <i>epi</i> -fistularina-3.	41
1.19. Ruta biogénica de la dibromotirosina y formación del sistema sistema espiroisoxazolinico. (SAM=S-adenosilmetionina)	46
1.20. Correlación de la 11- <i>epi</i> -fistularina-3 con verongiolido (1 mol) y aeroplysinina (2 moles). Obsérvese que los centros quirales 11 <i>R</i> y 17 <i>R</i> se conservan en la degradación enzimática de la primera.	47
1.21. Estructura de la (7 <i>R</i>)-hemifistularina-3	47
1.22. Estructura del tetraacetato de (11 <i>R</i> ,17 <i>R</i>)- <i>epi</i> -fistularina-3	48
1.23. (11 <i>R</i> ,17 <i>R</i>)-fistularina-1	50
1.24. Fragmentaciones de la (11 <i>R</i> ,17 <i>R</i>)-fistularina-1 (18) en el espectrómetro de masas.	51
1.25. Verongiamina	55

2.1.	Biotransformación de los alcaloides bromados de <i>V. aerophoba</i> . Las estructuras corresponden a 11- <i>epi</i> -fistularina-3 (15), fistularina-1 (18), aeroplysinina-1 (13), verongiolido (14), dienona (11), ácido verónico (10). (Modificado de [Teeyapant and Proksch, 1993]).	64
2.2.	Sistema cultivo <i>ex situ</i> en el tanque de sedimentación de la planta de acuicultura marina del ICCM.	65
2.3.	Cultivo de <i>V. aerophoba</i> en el tanque de sedimentación de la planta de cultivo de peces (ICCM, Taliarte, Gran Canaria). (a, b) Esponjas cultivadas en las cajas superiores, antes y después de la limpieza de algas y material sedimentado, respectivamente. (c, d) Esponjas cultivadas en las cajas inferiores, antes y después de la limpieza del material sedimentado, respectivamente.	68
2.4.	(a) Estructura de cultivo <i>in situ</i> en la Bahía de Alcúdia (Mallorca, Islas Baleares). (b) Explante de <i>V. aerophoba</i> creciendo en la malla. Obsérvese la formación de tejido nuevo sobre la malla y la aparición de ramificaciones.	70
2.5.	Supervivencia de los explantes de <i>Verongia aerophoba</i> durante el cultivo <i>in situ</i> . Las barras de error representan la variación (error estándar) en la supervivencia entre los diferentes grupos de explantes.	73
2.6.	Ejemplo del crecimiento de un explante de <i>Verongia aerophoba</i> durante todo el periodo de cultivo <i>in situ</i>	73
2.7.	Diagrama de cajas (a) del área proyectada (cm ²) y (b) de las tasas de crecimiento (mes ⁻¹) de los explantes durante el periodo de cultivo. En estos diagramas, la caja está delimitada por los cuartiles Q ₁ y Q ₃ , y la línea interior señala la mediana. Los bigotes indican los límites superior e inferior y los valores atípicos se señalan con círculos pequeños.	75
2.8.	(a) Área proyectada (cm ²) y (b) tasas de crecimiento (mes ⁻¹) de los explantes durante el periodo de cultivo. Las barras de error representan el error estándar.	76
3.1.	Habitus de algunos de los ejemplares recolectados de <i>Myxilla</i> sp.	86
3.2.	Megascleras de <i>Myxilla</i> sp.: tornotes (izquierda) y acantostilos (derecha).	87
3.3.	(a) Detalle de los extremos de los acantostilos. (b) Detalle del extremo de un tornote mucronado (izquierda) y de un acantostilo con las espinas romas (derecha).	88
3.4.	Microscleras de <i>Myxilla</i> sp.: isoquelas arqueadas.	88
3.5.	Microscleras de <i>Myxilla</i> sp.: sigmas.	89
4.1.	Protones olefínicos de la mezcla de β -sitosterol (21 , 75%), 23(24)-didehidro- β -sitosterol (22 , 16%), 24(25)-didehidro- β -sitosterol (23 , 2%) y 25(26)-didehidro- β -sitosterol (24 , 7%)	94
4.2.	Ceramidas aisladas de <i>Myxilla</i> sp.	97
4.3.	Ceramidas-1P aisladas de <i>Myxilla</i> sp.	99
4.4.	Esquema de fragmentaciones observadas en el espectro de masas de alta resolución de la mezcla de ceramidas-1-fosfato aislada de <i>Myxilla</i> sp.	100

4.5.	Iones moleculares de la mezcla ceramidas-1P aislada de <i>Myxilla</i> sp. detectados por HPLC-MS (infusión directa).	101
4.6.	Cromatograma de la mezcla de ceramidas.	103
5.1.	Estructura de (8Z,13E,18R,20Z)-strobilinina (31) y su acetato (33).	108
5.2.	Estructura de (8E,13Z,18R,20Z)-strobilinina (32) y su acetato (34).	108
5.3.	Fragmentaciones observadas en el espectro de masas de strobilinina [mezcla de estereoisómeros 8Z,13E+8E,13Z (31+32)].	109
5.4.	Estructura de la variabilina.	111
6.1.	(a) Terrazas escalonadas en la zona supramareal donde se recogió el tapete microbiano. Nótese la diferencia de colores (y por tanto, de pigmentos) entre la parte superior y la inferior. (b) Detalle de los tapetes recogidos. Obsérvese los tapetes horizontales cubiertos de agua, mientras que los verticales están secos.	117
6.2.	Gel de agarosa con los productos de la PCR diseñada para la amplificación del gen <i>scyC</i> de los tapetes microbianos, siguiendo el protocolo de Balskus et al. [2011]. Obsérvese la banda a ~550 pb (rectángulo rojo) que se corresponde con la longitud esperada del amplicón del gen <i>scyC</i>	119
6.3.	Árbol filogenético de las cianobacterias aisladas de los tapetes microbianos, realizado a partir de las secuencias del ADNr 16S utilizando el método de máxima verosimilitud basado en el modelo de Tamura-Nei. En negrita se muestran las secuencias obtenidas en este estudio.	124
6.4.	Árbol filogenético de cloroplastos de las rodófitas aisladas del tapete microbiano AVM-V3, realizado a partir de las secuencias del ADNr 16S utilizando el método de máxima verosimilitud basado en el modelo de Tamura-Nei. En negrita se muestran las secuencias obtenidas en este estudio.	125
6.5.	Fotografías realizadas al microscopio óptico de la muestra AVM-H3. (a) Aspecto general, (b) oscillatoriales, (c) filamentos de oscillatoriales, probablemente <i>Lyngbya</i> sp., y una pseudoanabaenal, que podría estar relacionada con <i>Phormidesmis priestleyi</i> , (d) oscillatoriales y un filamento de pseudoanabaenal, (e) nostocales, la flecha indica un heterociste, y (f) filamento eucariota con células en división, que se podría atribuir a <i>Bangia atropurpurea</i>	126
6.6.	Fotografías realizadas al microscopio óptico de la muestra AVM-V3. (a) Filamentos de pseudanabaenales, (b) detalle de una cianobacteria pseudanabaenal, obsérvese el gran tamaño de las células, (c) chroococcales, (d) rodofíceas bangiales, (e) visión general de tapete microbiano AVM-V3, dominado por filamentos de <i>Bangia atropurpurea</i> unidos por una estructura rizoide, y (f) la misma fotografía que la anterior pero tomada mediante epifluorescencia, donde se observa la fluorescencia anaranjada de la ficoeritrina, pigmento que contienen tanto cianobacterias como rodofíceas.	127

6.7.	Fotografías del tapete microbiano realizadas al microscopio electrónico de barrido. (a) Visión general del tapete, con un filamento de <i>Lyngbya</i> sp. en el centro, (b) detalle del extremo de un filamento de <i>Lyngbya</i> sp. (c) pseudanabaenal relacionada con <i>Phormidesmis</i> sp., (d) detalle de la misma pseudanabaenal que la anterior, con una chroococcal, (e) filamento no identificado, similar a una pseudanabaenal, con células de gran tamaño, y (f) obsérvese los pequeños filamentos centrales que podrían corresponder a las nostocales visualizadas en el microscopio óptico.	128
7.1.	Estructura de la escitonemina.	132
7.2.	Estructura de la dihidroescitonemina.	133
7.3.	Espectro UV-visible de la escitonemina (36) aislada del tapete microbiano.	134
7.4.	Cromatograma HPLC de una fracción que contiene escitonemina 36 ($T_r = 14.48$ min) y dihidroescitonemina 37 ($T_r = 15.55$ min).	135
7.5.	Viabilidad de las células HL-60 frente a la escitonemina (36) y dihidroescitonemina (37).	135
8.1.	Indoles.	141
8.2.	Ácidos aminosulfónicos.	142
8.3.	Manitol.	142
8.4.	Esteroles.	143
8.5.	Ácido algínico.	143
8.6.	Sorbitol.	143
8.7.	Ácido L-ascórbico (52) y dehidroascórbico (53).	143
8.8.	Aminoácidos del grupo de la micosporina (MAAs).	144
8.9.	Linoleato de etilo.	145
8.10.	Glicerol (59) y su triacetato (58).	146
8.11.	Hexaacetato del manitol (60).	147

Índice de tablas

1.1. Desplazamientos de carbono del esteroil mayoritario, aplisterol (1), y su acetato (4) en Cl ₃ CD y a 75 MHz. Las asignaciones son consistentes con la bibliografía [Kelecom et al., 1979] y los datos del espectro DEPT.	23
1.2. Composición de la mezcla de ácidos grasos.	28
1.3. Desplazamientos químicos (δ , ppm) observados en los espectros de RMN del ácido verónico (10) en DMSO-d ₆	30
1.4. El ion molecular de la dienona (11) en el espectrómetro de masas.	31
1.5. Datos de RMN de la dienona (11).	31
1.6. Correlaciones observadas en los espectros HSQC y HMBC de la dienona (11).	32
1.7. Espectros de RMN y correlaciones observadas en los espectros HSQC y HMBC del monoacetato de la dienona (12).	33
1.8. Espectros de RMN de la aeroplisinina-1 (13).	34
1.9. Desplazamientos químicos (δ en ppm, J en Hz) observados en los espectros RMN de verongiolido (14).	38
1.10. Desplazamientos químicos (δ , ppm) observados en los espectros de ¹³ C-RMN de la (11 <i>R</i> , 17 <i>R</i>)-11- <i>epi</i> -fistularina-3 (15) y la 11- <i>epi</i> -fistularina-3 descrita en la bibliografía [König and Wright, 1993] en acetona-d ₆	43
1.11. Desplazamientos químicos (δ , ppm) observados en los espectros de RMN de la (11 <i>R</i> , 17 <i>R</i>)-11- <i>epi</i> -fistularina-3 (15) DMSO-d ₆	44
1.12. Desplazamientos químicos (δ , ppm) observados en los espectros de RMN de la (11 <i>R</i> , 17 <i>R</i>)-11- <i>epi</i> -fistularina-3 (15) CD ₃ OD.	45
1.13. ¹ H-RMN del tetraacetato de (11 <i>R</i> ,17 <i>R</i>)- <i>epi</i> -fistularina-3 (17) y correlaciones observadas en los espectros COSY, TOCSY y NOESY.	49
1.14. El ión molecular de la (11 <i>R</i> ,17 <i>R</i>)-fistularina-1 (18) observado en el espectrómetro de masas (muestra inyectada con NaCl).	50
1.15. Desplazamientos químicos (δ , ppm) observados en los espectros RMN de la (11 <i>R</i> ,17 <i>R</i>)-fistularina-1 (18).	52
1.15. Desplazamientos químicos (δ , ppm) observados en los espectros RMN de la (11 <i>R</i> ,17 <i>R</i>)-fistularina-1 (18).	53

2.1.	Concentraciones medias (en mg/g PS) de los metabolitos identificados por HPLC [11- <i>epi</i> -fistularina-3 (15), verongiolido (14) y ácido verónico (10)] en las esponjas cultivadas <i>ex situ</i> e índices de bioconversión (en $\mu\text{mol}\mu\text{mol}^{-1}$ de verongiolido/11- <i>epi</i> -fistularina-3) según diferentes condiciones de cultivo y procesos de extracción. Los valores entre paréntesis corresponden al error estándar.	69
2.2.	Tiempos de retención de los productos naturales de <i>Verongia aerophoba</i> que se separaron e identificaron por HPLC.	71
2.3.	Áreas proyectadas (en cm^2) de los explantes del cultivo <i>in situ</i> , desglosadas por fechas y grupos de explante. Los valores entre paréntesis corresponden a la desviación estándar.	74
2.4.	Tasas de crecimiento (día^{-1}) de los explantes del cultivo <i>in situ</i> , desglosadas por fechas. Los valores entre paréntesis corresponden a la desviación estándar.	75
2.5.	Concentraciones medias (%) de los metabolitos identificados en los explantes del cultivo <i>in situ</i> de <i>V. aerophoba</i> . Los valores entre paréntesis corresponden a la desviación estándar. También se incluyen el número <i>n</i> de muestras analizadas, el estadístico F y el <i>p</i> -valor	76
3.1.	Distribución de las especies de esponjas del género <i>Myxilla</i> en aguas de España y Portugal.	85
4.1.	Desplazamientos de carbono del núcleo esteroidal presente en los cuatro esteroides (21 , 22 , 23 , 24) y sus acetatos (25 , 26 , 27 , 28) en Cl_3CD y a 75 MHz.	95
4.2.	Iones moleculares de la mezcla de ceramidas aislada de <i>Myxilla</i> sp. observados en el espectro de masas de alta resolución. Sus intensidades relativas nos dan el porcentaje de cada componente en la mezcla	99
4.3.	Iones moleculares de la mezcla de ceramidas-1P aislada de <i>Myxilla</i> sp. detectados en el espectro de masas. Sus intensidades relativas nos dan el porcentaje de cada componente en la mezcla.	102
4.4.	Desplazamientos de RMN de protón (δ , ppm) de las bases pirimidínicas (29 y 30) en DMSO-d_6 a 300 MHz.	104
4.5.	Desplazamientos de RMN de carbono (δ , ppm) de las bases pirimidínicas (29 y 30) en DMSO-d_6 a 75 MHz.	105
5.1.	Desplazamientos químicos (ppm) observados en los espectros RMN de strobilinina. La duplicación de las señales de los carbonos 8, 10, 13, y 15 nos informa de que el producto es una mezcla de los estereoisómeros (8 <i>Z</i> ,13 <i>E</i>) y (8 <i>E</i> ,13 <i>Z</i>) (31 y 32), en concordancia con la bibliografía [Davis and Capon, 1994].	110
5.2.	Desplazamientos químicos (ppm) observados en los espectros RMN del acetato de strobilinina. La duplicación de las señales de los protones 9 y 14 y de los carbonos 8, 10, 13, 15 y 16 nos informa de que el producto es una mezcla de los estereoisómeros (8 <i>Z</i> ,13 <i>E</i>) y (8 <i>E</i> ,13 <i>Z</i>) (33 y 34), en concordancia con la bibliografía [Davis and Capon, 1994].	112

6.1.	Emparejamientos más cercanos de las secuencias del gen 16S de los tapetes microbianos. Los porcentajes de identidad se han obtenido a partir de la matriz de distancias del alineamiento con ClustalW.	122
6.2.	Matriz de distancias del gen 16S de los clones obtenidos a partir de los tapetes microbianos.	123
7.1.	^1H -RMN de la escitonemina (36) y correlaciones observadas en los espectros TOCSY y COSY.	133
7.2.	^1H -RMN de la dihidroescitonemina (37).	134
7.3.	Medio BG ₁₁	136
7.4.	Disolución de elementos traza.	136
8.1.	^{13}C -RMN del linoleato de etilo (57) en CDCl ₃	145
8.2.	^{13}C -RMN del triacetato del glicerol (58) en CDCl ₃	146
8.3.	^{13}C -RMN del hexaacetato del manitol (60) en CDCl ₃	147

