

## **LAURENCIA MICROCLADIA (CERAMIALES, RHODOMELACEAE) EN CANARIAS. II. ESTUDIO PRELIMINAR QUÍMICO.**

**E. AYLAGAS<sup>1</sup>, M.<sup>a</sup> L. SOUTO<sup>2</sup>, M. MACHÍN-SÁNCHEZ<sup>1</sup> & M. C. GIL-RODRÍGUEZ<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Departamento de Biología Vegetal (Botánica). Universidad de La Laguna  
38071 La Laguna, Tenerife, Islas Canarias. evabiologia@gmail.com

<sup>2</sup> Instituto Universitario de Bio-Orgánica "Antonio González". Universidad de La Laguna  
Astrofísico Francisco Sánchez 2. 38206 La Laguna, Tenerife, Islas Canarias

### **RESUMEN**

En este trabajo se aborda el estudio químico preliminar del alga roja recolectada en la isla de Fuerteventura, *Laurencia microcladia*. El metabolito mayoritario aislado de esta rodofita corresponde a una sustancia halogenada con esqueleto carbonado C<sub>15</sub>, no terpénico. El compuesto se trata de una acetogenina conocida *E*-dihidrorhodofitín. Dicho compuesto no mostró actividad antiproliferativa significativa frente a las líneas celulares de tumores sólidos ensayados.

**Palabras clave:** Acetogeninas, productos naturales, Canarias, *Laurencia microcladia*, Rhodophyta.

### **ABSTRACT**

In this paper, we report a chemical preliminary study of the red seaweed *Laurencia microcladia* collected in Fuerteventura Island. The main secondary metabolite isolated was a previously reported halogenated substance possessing a non terpenoid C<sub>15</sub>, skeleton, *E*-dihidrorhodophytin. This compound was evaluated against five human solid tumor cell lines and was essentially inactive.

**Key words:** Acetogenins, natural products, Canary Islands, *Laurencia microcladia*, Rhodophyta.

### **1. INTRODUCCIÓN**

Los productos naturales están considerados una importante fuente de sustancias biológicamente activas que son aplicadas en diferentes terapias y/o tratamientos. Se les considera naturales por su aislamiento a partir de organismos vivos, bien terrestres o marinos, y pueden emplearse directamente como drogas o servir de modelos para sintetizar compuestos, así como para modificar sus estructuras y generar análogos que las optimicen [13].

En las últimas décadas, gran parte de la investigación ha sido dedicada a los recursos marinos, donde el 1,8 % de sus extractos han mostrado actividad en ensayos *in vitro*, frente al 0,4 % en los terrestres. Esta mayor diversidad tiene sentido si se entiende el carácter his-

tórico del medio marino y la presión selectiva que éste ejerce sobre los organismos que lo habitan [10]. Todo esto ha dado lugar a que las especies adaptadas a este ecosistema hayan desarrollado numerosos y diversos mecanismos bioquímicos y fisiológicos que incluyan la producción de compuestos bioactivos para completar funciones tan importantes como la reproducción, comunicación, o protección contra otros depredadores, entre otras.

Así, entre los organismos empleados por los investigadores para el aislamiento y elucidación de nuevos productos, las algas han demostrado poseer gran cantidad de metabolitos halogenados con importante actividad biológica. Particularmente, las algas de la división Rhodophyta, las cuales han dado lugar, hasta la fecha, a más de 1.500 compuestos publicados. Más de la mitad de estas citas (75%) han tenido lugar en la familia Rhodomelaceae, donde el 85% han sido aislados del género *Laurencia* Lamouroux [2] y, en el cual, la mayoría de los compuestos contenían halógenos [4] [6], principalmente terpenoides, acetogeninas y aromáticos, aunque también son citados como fuentes de derivados de ácido eicosanoico [7]. La elevada producción química por parte de estas especies, hace que sea, probablemente, el género más estudiado y químicamente más complejo [15].

Las especies del género *Laurencia* se caracterizan por ser productoras de numerosos metabolitos secundarios con diferentes propiedades biológicas [3], entre las que se incluyen antimicrobianas, antitumorales, inmunosupresoras, anticolesterolémicas, pesticidas, etc. [5]. La producción de dichos metabolitos en las algas se ha relacionado con la capacidad de almacenaje en estructuras especializadas, unas vesículas refractantes ubicadas generalmente en la capa de células más superficial, a las que se les ha denominado *corps en cerise* o cuerpos de cereza [16]. Las especies de este género se encuentran ampliamente distribuidas en mares tropicales, subtropicales y templados [8] [12] y están representadas en las islas Canarias, donde *L. microcladia* Kützing ha sido citada para las islas de El Hierro, La Palma, Tenerife, Gran Canaria, Fuerteventura y Lanzarote [9].

Por otra parte, la identificación de las especies se ve dificultada por el solapamiento de características morfológicas y una gran flexibilidad fenotípica. Como resultado de ello, se ha generado confusión y controversia en lo que a su clasificación, identificación, sinonimia y nomenclatura se refiere [17]. Así, los estudios moleculares y las aproximaciones quimio-taxonómicas se están empleando como herramientas complementarias a los estudios morfológicos con el fin de esclarecer la identidad de cada taxón.

El objetivo de este trabajo es el estudio químico preliminar de la especie *Laurencia microcladia*, recolectada en el archipiélago Canario. Se centra en el aislamiento y elucidación de metabolitos secundarios halogenados, a los que posteriormente se les somete a evaluación de su actividad biológica frente a líneas celulares tumorales.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### RECOLECCIÓN Y ESTUDIO PRELIMINAR DE LAS MUESTRAS

*Laurencia microcladia* se recolectó en la localidad de El Cotillo, isla de Fuerteventura durante el mes de Julio de 2009. La recolección se llevó a cabo en los primeros metros del sublitoral haciendo uso de equipo de buceo ligero y redes que permitían ir almacenando el material *in situ*. Una vez realizada la colecta, el material, de 2.032 g de peso húmedo, se guardó en bolsas de plástico refrigeradas hasta su traslado al laboratorio. Una muestra de este material fue depositado en el Herbario de la Universidad de La Laguna, Departamento de Biología Vegetal, Botánica, bajo la referencia TFC Phyc 14446.

## EXTRACCIÓN Y AISLAMIENTO DE METABOLITOS SECUNDARIOS

La muestra húmeda, una vez en el laboratorio, se extrajo por maceración a temperatura ambiente, en una mezcla de  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (1:1) (3x) durante cinco días. El disolvente fue evaporado obteniéndose un extracto orgánico de aspecto aceitoso y color verdoso de 14 g, al cual se le denominó LM-1.

Los restos de material vegetal que quedaron tras la maceración se dejaron secar a temperatura ambiente, se trituraron y posteriormente, se sometieron a una segunda extracción en Soxhlet, usando como disolvente  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , hasta agotamiento. Se obtuvo finalmente un extracto de 1.1 g al que se le denominó LM-2 y se almacenó en la nevera, para posibles estudios posteriores.

### Marcha cromatográfica del extracto LM-1.

El extracto resultante de la maceración del alga, LM-1, fue sometido a cromatografía de exclusión molecular en una columna de Sephadex LH-20 usando como eluyente una mezcla de MeOH: $\text{CHCl}_3$  (1:1) (Fig. 1). El extracto se añade en la columna en dos pinchazos de, aproximadamente, 6 g cada uno. Una vez comienza la marcha cromatográfica se recogen

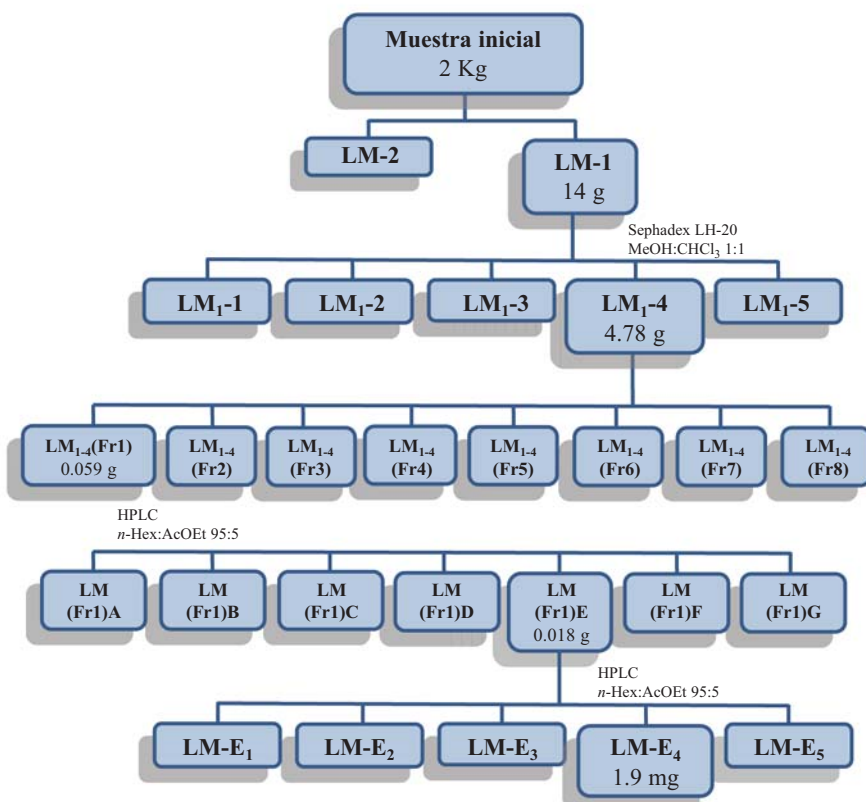


Figura 1.- Marcha cromatográfica del extracto LM-1.

fracciones de 12 ml en una gradilla de 50 tubos. Cuando se recogen todos los tubos, de ambos pinchazos, se lava la columna con MeOH, recogiendo también ese volumen, para no perder posibles metabolitos presentes en la fracción del lavado. Finalmente, las fracciones se reunieron de acuerdo al comportamiento observado en capa fina (TLC), dando lugar a: LM<sub>1</sub>-1, LM<sub>1</sub>-2, LM<sub>1</sub>-3, LM<sub>1</sub>-4 y LM<sub>1</sub>-5, las cuales se analizaron por RMN <sup>1</sup>H.

Los datos espectroscópicos obtenidos, nos hicieron decidir continuar con la fracción LM<sub>1</sub>-4, sometiendo, en cuatro porciones de 1 g, dicha fracción a cromatografía en fase normal usando una columna Lobar Lichropred Si 60 y, como fase móvil mezclas de *n*-Hex:AcOEt. La primera mezcla empleada fue *n*-Hex:AcOEt (9:1), pero tras pasar un volumen elevado de eluyente, la mayoría de los compuestos permanecían en la columna, lo que condujo a decidir llevar a cabo un percolado de polaridad ascendente. Este aumento progresivo de polaridad permite la elución de los compuestos más polares. El percolado se llevó a cabo con las siguientes proporciones de *n*-Hex:AcOEt: (9:1); (7:3); (5:5); (3:7) y (0:10), modificándolas conforme avanzaba la separación.

Se obtuvieron 8 fracciones, que fueron sometidas a espectroscopía de RMN, tras lo cual se prosiguió el estudio con la fracción LM<sub>1</sub>-4 (Fr-1). La purificación final de esta fracción se llevó a cabo a través de cromatografía de alta presión HPLC usando una columna de fase normal preparativa  $\mu$ -Porasil en *n*-Hex:AcOEt (95:5). Tras recolectar los tubos y ver el comportamiento en TLC, procedimos a agrupar en 7 fracciones. Los datos espectroscópicos correspondientes a cada una de las fracciones lleva a seguir el estudio de la fracción LM-Fr1-E, la cual es sometida nuevamente en las mismas condiciones a cromatografía de HPLC. Se obtuvieron cinco fracciones, de las que de la fracción 4 se logró purificar completamente el compuesto I.

#### PROCEDIMIENTOS ESPECTROSCÓPICOS GENERALES UTILIZADOS EN LA ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS METABOLITOS AISLADOS

**Resonancia magnética nuclear:** Para la realización de los experimentos de RMN se utilizaron los espectrómetros BRUKER® AVANCE 500 MHz y 600 MHz, de acuerdo a las necesidades. Los experimentos <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, COSY, HSQC, HMBC y ROESY, fueron realizados usando los programas suministrados por la casa BRUKER. En todos los casos se empleó CDCl<sub>3</sub> (99.9%) como disolvente, usando como referencia interna la señal de CHCl<sub>3</sub> residual para <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C (7.26 ppm y 77.2 ppm, respectivamente). Los datos de adquisición se procesaron con el programa MestReC (V 4.8.6.0).

**Absorción en el infrarrojo:** El experimento de IR fue realizado en un espectrofotómetro FT-IR BRUKER®, modelo IFS-55. El espectro fue registrado empleando disolución del producto en CHCl<sub>3</sub> seco sobre una pastilla de NaCl.

**Rotación óptica:** La determinación de la actividad óptica para el producto se realizó empleando un polarímetro PERKIN-ELMER®, modelo 241, a una temperatura de 20 °C y usando la línea D del sodio ( $\lambda = 589$  nm). El producto fue disuelto en CHCl<sub>3</sub> seco y se empleó una celda con longitud óptica de 1 dm.

**Espectrometría de masas:** Los espectros de masas fueron obtenidos de un espectrómetro VG-Autospec FISIONS®.

**Datos físicos del *E*-dihidrorodophytin (I):** ver tabla 1.

## ENSAYOS DE BIOACTIVIDAD FRENTE A LÍNEAS CELULARES TUMORALES

Las líneas celulares seleccionadas para el desarrollo de los ensayos de bioactividad fueron líneas de tumores sólidos A2780 (ovario) HBL-100 (mama), HeLa (cerviz), ISHIKAWA (endometrio), SW1573 (pulmón) y WiDr (colon).

**Cultivo de células tumorales:** Las células se cultivaron en medio RPMI 1640 con un suplemento de suero fetal bovino inactivo (5%) y L-glutamina (2 mM), utilizando un incubador a 37 °C en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> y una humedad del 95%.

**Ensayo de viabilidad/toxicidad:** Los ensayos se realizaron empleando el método de sulforodamina B (SRB) del NCI [18] con pequeñas modificaciones. Las células tumorales se cultivaron en monocapa en placas de 96 pocillos. Los compuestos aislados fueron disueltos en DMSO a 400 veces la concentración máxima de ensayo, que es 25 µM. Los pocillos control fueron expuestos a una cantidad equivalente de DMSO (0,25% v/v). Cada compuesto fue únicamente ensayado en una ocasión con concentraciones dentro del rango entre 1 y 25 µM. Transcurrido el tiempo de incubación de las células expuestas a los compuestos de interés (48 horas) éstas fueron precipitadas en frío con 25 µl de ácido tricloroacético al 50% (p/v) y fijadas durante 60 minutos a 4 °C. A continuación, se llevó a cabo el ensayo colorimétrico con sulforodamina B, midiendo la densidad óptica de cada pocillo a 492 nm utilizando un lector de microplacas PowerWave™ XS (Bio-Tek® Instruments, Inc.). A los valores de absorbancia se les aplicó una corrección de fondo cuantificada en los pocillos que sólo contienen medio de cultivo. El porcentaje de crecimiento para cada concentración de compuesto empleado se calculó con respecto a los pocillos control, a partir de la diferencia de densidad óptica al inicio y al final del tiempo de exposición al compuesto. Finalmente, la actividad biológica se expresó en términos de GI<sub>50</sub> (concentración inhibitoria del 50%).

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL

El compuesto **I** fue aislado como un sólido incoloro amorfo. La fórmula molecular fue establecida como C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>O<sup>81</sup>Br<sup>35</sup>Cl, indicando cinco grados de insaturación, en base al ion molecular a *m/z* 332.0401 de su espectro de masas de alta resolución, así como a los 15 átomos de carbono observados en el experimento de RMN <sup>13</sup>C (Fig 2). Los desplazamientos químicos de carbono, así como las multiplicidades determinadas en el experimento HSQC editado, permiten hacer la siguiente aproximación en cuanto al tipo de carbonos presentes en la molécula: un metilo (δ<sub>C</sub> 12.5), cuatro metilenos (δ<sub>C</sub> 29.4, 31.4, 33.6, 38.0), nueve metinos de los cuáles cuatro son olefínicos (δ<sub>C</sub> 62.1, 63.9, 73.8, 77.0, 78.8, 112.2, 127.3, 129.9 y 141.5) y un carbono cuaternario (δ<sub>C</sub> 82.0). Por otro lado, en el espectro de RMN <sup>1</sup>H (Fig 3), la señales más relevantes son la de un protón acetilénico a δ<sub>H</sub> 2.87, así como la de un metilo triplete a δ<sub>H</sub> 1.09, cuatro protones sobre heteroátomos a δ<sub>H</sub> 3.96, 4.06, 4.07 y 4.34, y cuatro señales de protones sobre dobles enlaces a δ<sub>H</sub> 5.65, 5.87, 5.93 y 6.23.

El análisis del experimento COSY (Figs. 4 y 5) permitió establecer los sistemas de acoplamiento que agrupan a todos los protones pertenecientes a un mismo sistema de spin en la molécula. En este caso se trata de un sistema de spin amplio donde la correlación entre los protones del mismo facilita, en gran medida, la elucidación de la molécula. Así, partiendo de la señal δ<sub>H</sub> 1.09 ppm, correspondiente al grupo metilo según su desplazamiento químico

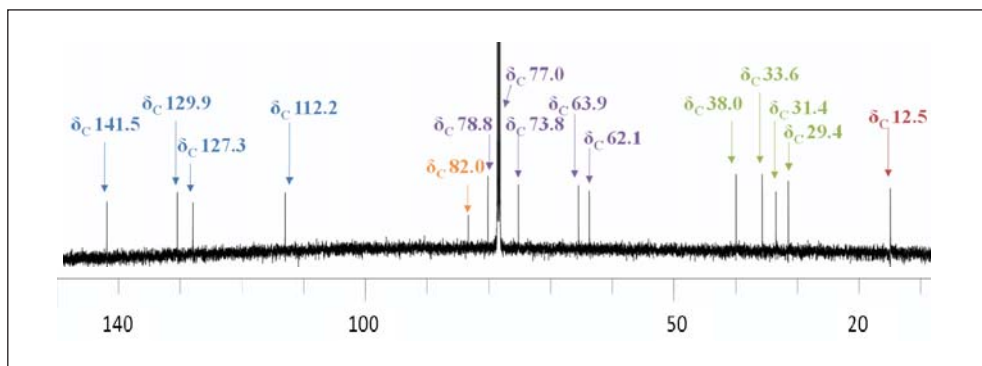


Figura 2.- Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto I.

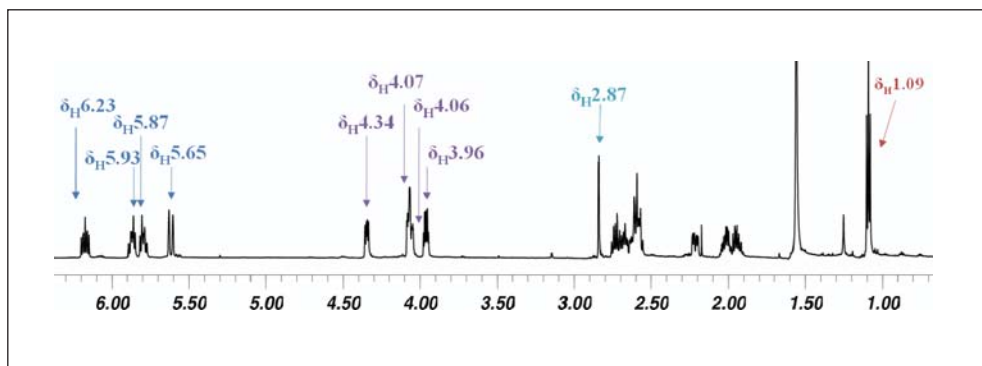
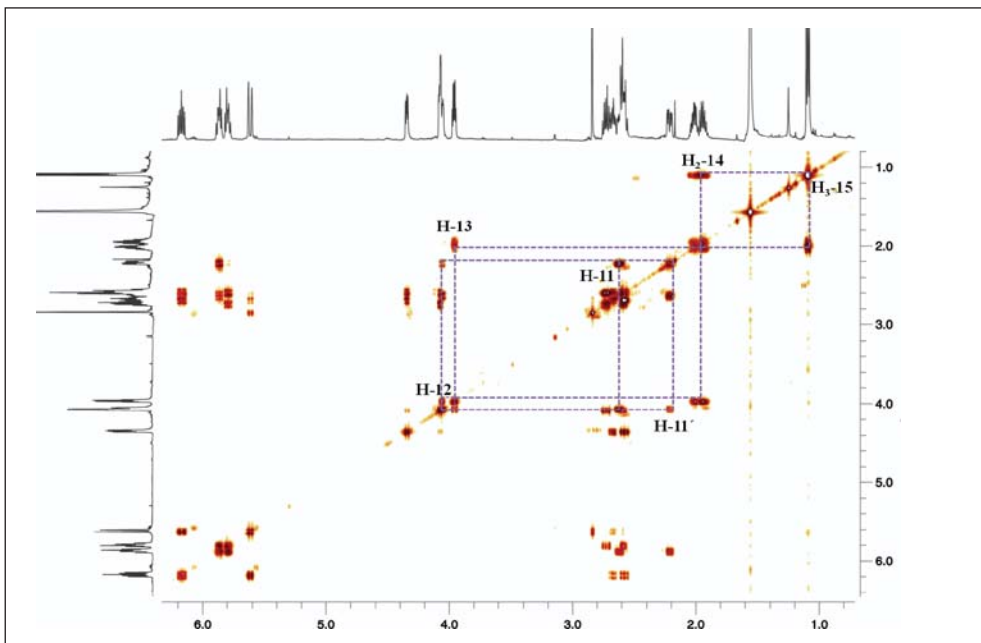
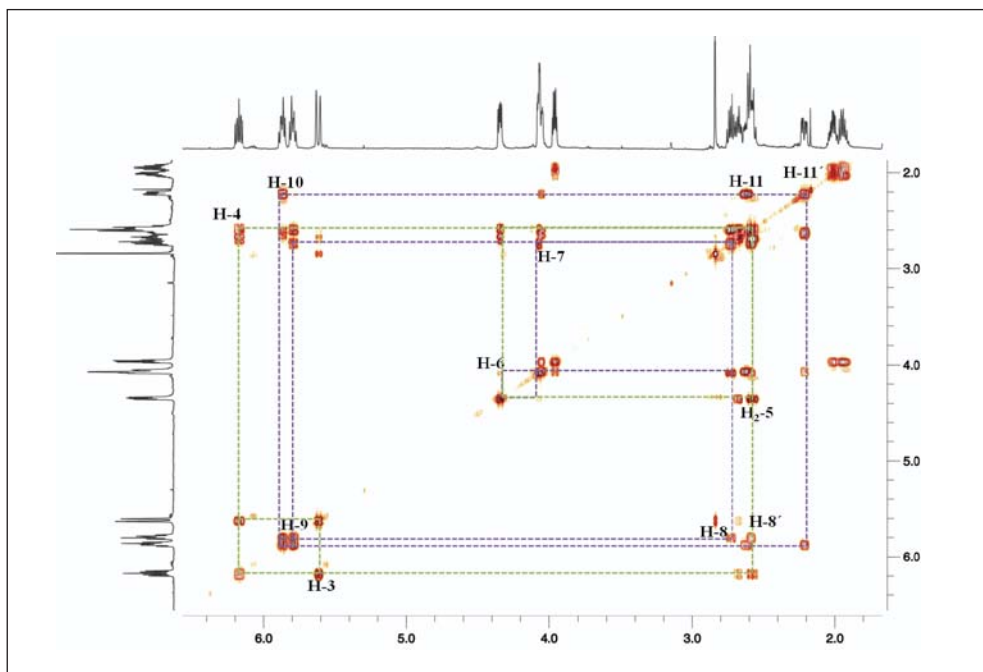


Figura 3.- Espectro RMN  $^1\text{H}$  del compuesto I.

mico ( $\text{H}_3$ -15), se observa correlación con una señal que integra para dos protones y que corresponde con el metileno situado a  $\delta_{\text{H}}$  1.94 y 2.01 ( $\text{H}_2$ -14). Esta señal tiene acoplamiento con una situada a  $\delta_{\text{H}}$  3.96 (H-13), zona que corresponde a los protones unidos a carbonos con heteroátomos, acoplada asimismo con una señal con desplazamiento muy cercano, lo cual nos hace asumir la presencia de otro protón unido a carbono con heteroátomo. Esta última señal aparece a  $\delta_{\text{H}}$  4.06 (H-12). Partiendo de ella, encontramos otra correlación con las dos señales de otro metileno diastereotópico a  $\delta_{\text{H}}$  2.22 y 2.63 ( $\text{H}_2$ -11), que a su vez muestran conectividad con una centrada a  $\delta_{\text{H}}$  5.93 (H-10), la cual integra para un solo protón y corresponde a la zona de los alquenos. El segundo acoplamiento de esta señal es con otro de los metinos vinílicos situado a  $\delta_{\text{H}}$  5.87 (H-9), que a su vez conecta con los protones del metileno centrados a  $\delta_{\text{H}}$  2.60 y 2.75 ( $\text{H}_2$ -8). Continuando con el sistema de spin, vemos que las señales de este metileno se correlacionan con la señal de metino sobre heteroátomo a  $\delta_{\text{H}}$  4.07 (H-7), y ésta con una señal perteneciente a la misma zona del espectro y situada a  $\delta_{\text{H}}$  4.34 (H-6). A partir de esta señal, entramos en la última secuencia de conectividades con el metileno a  $\delta_{\text{H}}$  2.58 y 2.68 ( $\text{H}_2$ -5), de éste con el metino olefínico a  $\delta_{\text{H}}$  6.23 (H-4), que a su vez está correlacionado con el también metino sobre doble enlace a  $\delta_{\text{H}}$  5.65 (H-3).



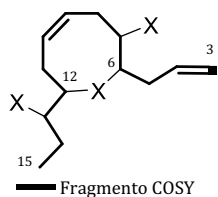
**Figura 4.-** Experimento COSY, donde se indican las conectividades  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  correspondientes a la secuencia entre las posiciones 15 y 11 de la molécula.



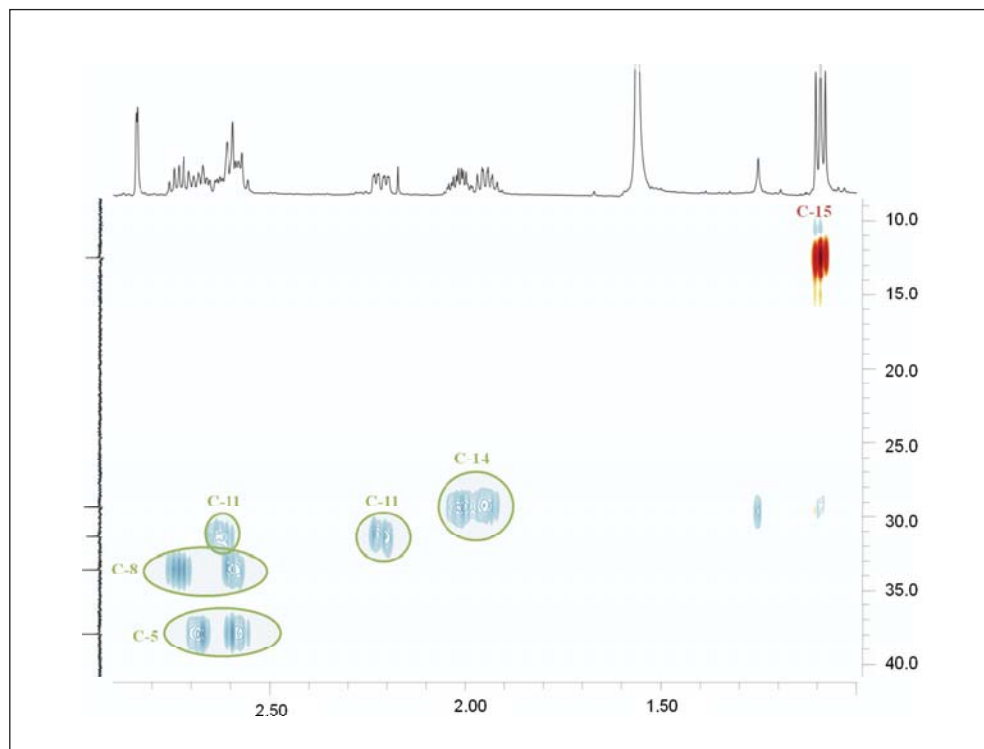
**Figura 5.-** Zona ampliada del espectro COSY entre 1.8 y 6.6 ppm, donde se indican las conectividades  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  correspondientes a la secuencia entre las posiciones 11 y 3.

Es hasta este punto donde nos permite estudiar la molécula el experimento COSY, habiendo permitido asignar los protones de 13 carbonos de forma lineal y estableciendo la siguiente secuencia:

$\delta_H$  1.09 (H<sub>3</sub>-15)  $\leftrightarrow$   $\delta_H$  1.94/2.01 (H<sub>2</sub>-14)  $\leftrightarrow$   $\delta_H$  3.96 (H-13)  $\leftrightarrow$   $\delta_H$  4.06 (H-12)  $\leftrightarrow$   $\delta_H$  2.22/2.63 (H<sub>2</sub>-11)  $\leftrightarrow$   $\delta_H$  5.93 (H-10)  $\leftrightarrow$   $\delta_H$  5.87 (H-9)  $\leftrightarrow$   $\delta_H$  2.60/2.75 (H<sub>2</sub>-8)  $\leftrightarrow$   $\delta_H$  4.07 (H-7)  $\leftrightarrow$   $\delta_H$  4.34 (H-6)  $\leftrightarrow$   $\delta_H$  2.58/2.68 (H<sub>2</sub>-5)  $\leftrightarrow$   $\delta_H$  6.23 (H-4)  $\leftrightarrow$   $\delta_H$  5.65 (H-3).

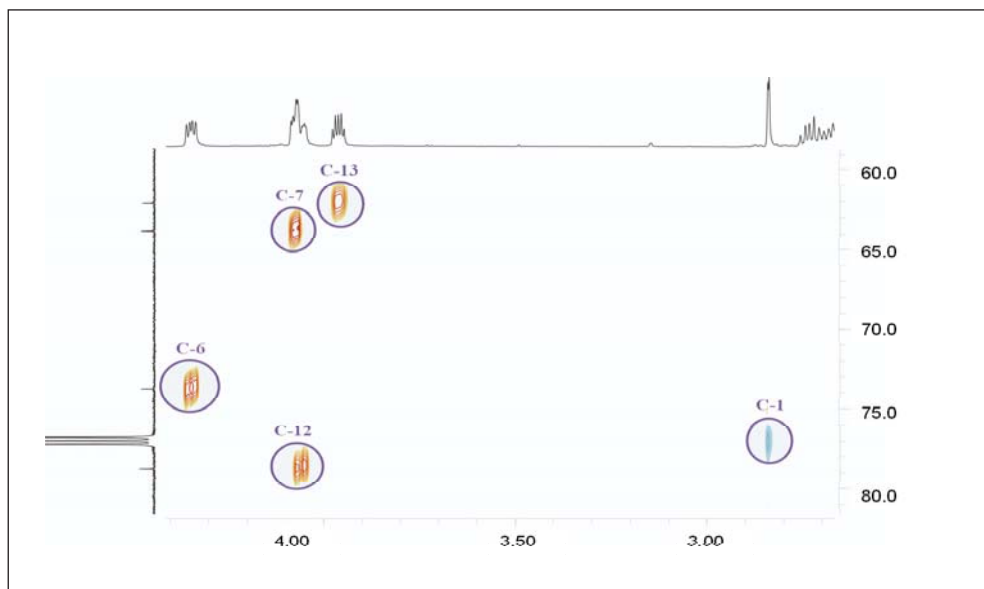


A continuación, a través del experimento HSQC, cada señal de protón se relacionó con su correspondiente señal de carbono (Figs 6, 7, 8), estando en condiciones a través del estudio del experimento HMBC, de interconectar el sistema definido de spin con la parte de la molécula aún no identificada.

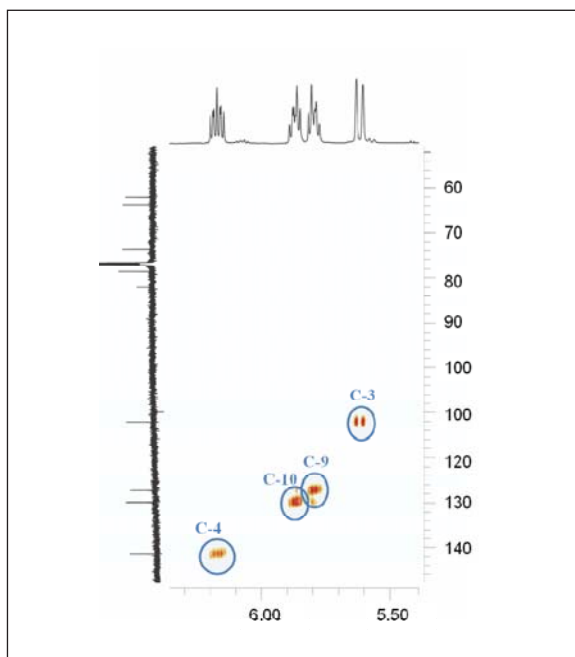


**Figura 6.-** Primera sección ampliada del espectro HSQC del compuesto I.





**Figura 7.-** Segunda sección ampliada del espectro HSQC del compuesto I.



**Figura 8.-** Tercera sección ampliada del espectro HSQC del compuesto I.

Para llevar a cabo el análisis HMBC (Fig 9) nos centramos en la señal de H-3 ( $\delta_H$  5.65). Su correlación con el C-5 ( $\delta_C$  38.0) y con la señal de carbono situada a un desplazamiento químico de 77.0 ppm nos hace asumir que esta última debe tratarse de C-1. Por otra parte, la correlación que se establece entre H-4 ( $\delta_H$  6.23) y la señal de carbono a  $\delta_C$  82.0 permite identificar a C-2, habiendo completado el esqueleto carbonado de la molécula. La presencia de este acetileno terminal está de acuerdo con la absorción de IR obtenida a 3292  $\text{cm}^{-1}$  (Tabla 1).

Una vez establecido el esqueleto carbonado, el acoplamiento HMBC entre H-6 ( $\delta_H$  4.34) y C-12 ( $\delta_C$  78.8) (Fig 10) permite determinar el cierre de un anillo entre los carbonos 6 y 12 mediante un enlace éter, y así corroborar con este heterociclo de 8 miembros y los enlaces múltiples descritos, el número de insaturaciones determinadas en el espectro de masas.

Finalmente, de acuerdo con los espectros de masas y los desplazamientos químicos observados, el heteroátomo unido a C-13 debe ser un bromo, por lo que el heteroátomo restante en la posición C-7 debe ser el cloro. Así se establece la estructura plana del compuesto **I** (Fig 11).

En el siguiente paso se trataron los aspectos configuracionales de la molécula, por un lado las geometrías de los dobles enlaces, y por otro la estereoquímica relativa del cierre del heterociclo y del centro estereogénico en C-7. En el primer caso nos fijamos en el desplazamiento de protón del acetileno, así como en las constantes de acoplamiento de los protones vinílicos. Así, el protón acetilénico sale con un desplazamiento inferior a 3 ppm,  $\delta_H$  2.87, característico de un sistema *trans* enino conjugado, lo que se confirma con la constante de

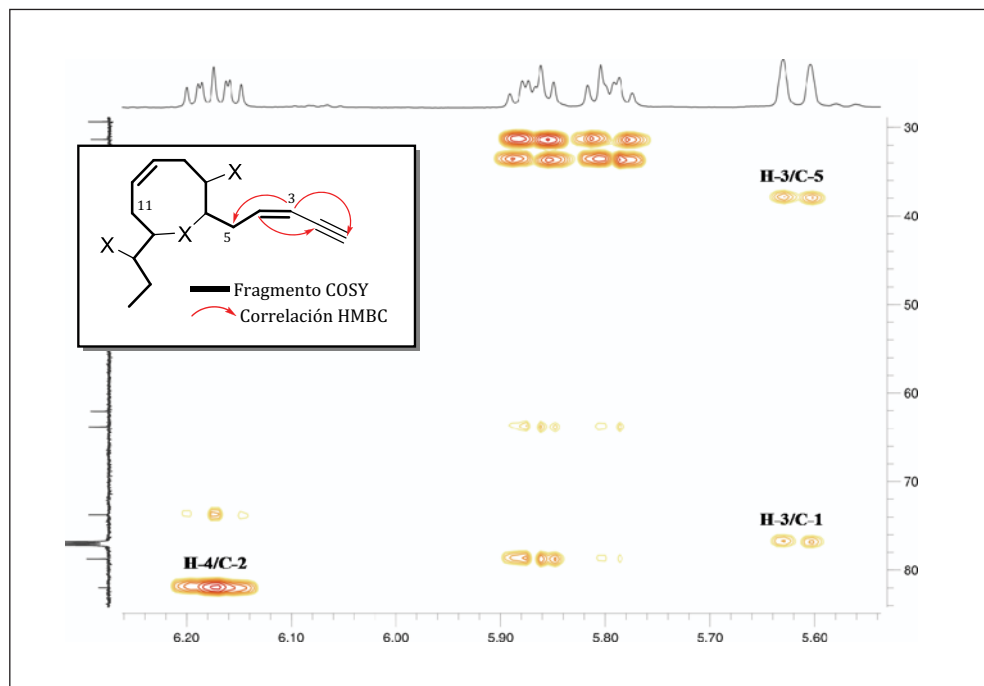


Figura 9.- Experimento HMBC ampliado del compuesto **I**.

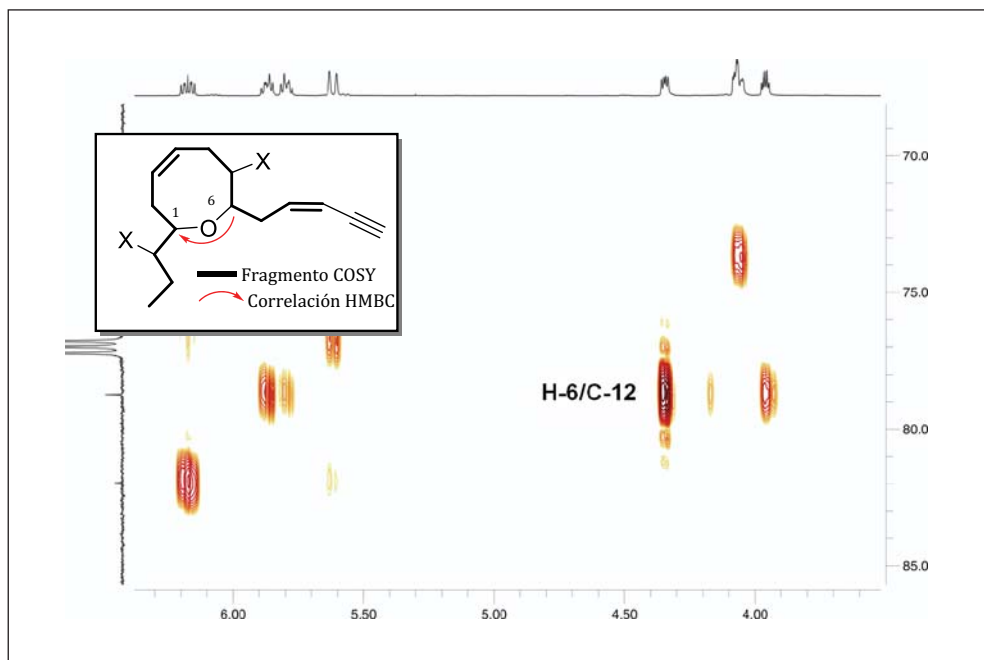


Figura 10.- Experimento HMBC ampliado del compuesto I.

acoplamiento “grande” entre los protones olefinicos H-3 y H-4,  $^3J_{3-4} = 15.7$  Hz. Respecto al doble enlace en las posiciones C-9 y C-10, se define su configuración como *cis* al presentar valores de constantes de acoplamiento “medias”  $^3J_{8-9} = 7.5$  Hz (Tabla 1).

En el segundo caso, hacemos uso del experimento de ROESY. Así se observa correlación tipo ROE entre los protones H-6 y H-7 mientras que el protón H-12 no muestra ningún acoplamiento con estas señales (Fig 12).

Se puede concluir que los protones H-6 y H-7 se encuentran en la misma cara de la molécula mientras que H-12 en la opuesta. Esto nos permite establecer las configuraciones relativas de estos centros como 6  $S^*$ , 7  $S^*$  y 12  $R^*$ . Respecto al último centro quiral presente en la molécula, C-13, no nos fue posible establecer su configuración relativa a través de este experimento, al encontrarse situado con libre giro en una cadena lateral. Sin embargo, al consultar la bibliografía, y a pesar de observar ligeras diferencias en la actividad óptica con los datos publicados, podemos afirmar que nuestros resultados se ajustan bien con los del compuesto conocido ***E*-dihidrorhodofitín** [14], cuya configuración absoluta es la que se muestra en la figura 13.

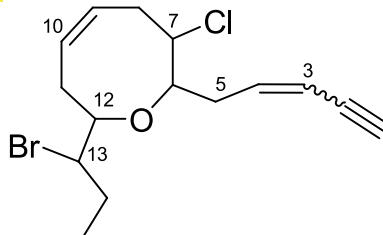
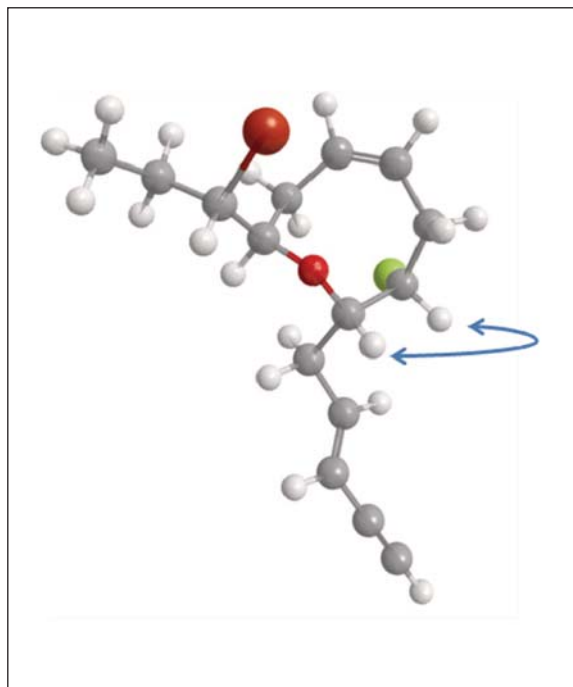


Figura 11.- Estructura plana del compuesto I.

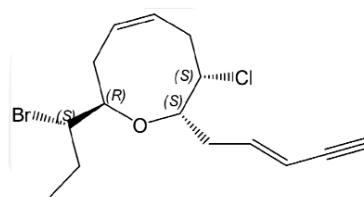
$[\alpha]_D^{25} = +107.4$  (c 0.19,  $\text{CHCl}_3$ )  
 IR  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{CHCl}_3$ ): 3292, 3027, 2966, 2935, 2101, 1734, 1657, 1454, 1355, 1263, 1093, 962.  
 HRMS  $m/z$ : 332.0401 (calc. 332.0366,  $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}^{35}\text{Cl}^{81}\text{Br}$  [ $\text{M}^+ - \text{H}$ ]) y 295.0698 (calc. 295.0698,  $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}^{79}\text{Br}$  [ $\text{M}^+ - \text{H-Cl}$ ]).  
 RMN  $^{13}\text{C}$  y  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):

Nº de Carbono	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidad	$J$ (Hz)
	77.0	2.87	d	1.9
2	82.0			
3	112.2	5.65	dd	1.9;15.7
4	141.5	6.23	ddd	6.7;8.7;15.7
5	38.0	2.58/2.68	m/m	
6	73.8	4.34	ddd	0.8;5;8.9
7	63.9	4.07	m	
8	33.6	2.60/2.75	m/ddd	7.8;7.5;15
9	127.3	5.87	ddd	7.5;7.5;10.5
10	129.9	5.93	ddd	7.5;7.3;10.5
11	31.4	2.22/2.63	ddd/m	2.0;7.3;15.3
12	78.8	4.06	m	
13	62.1	3.96	ddd	14.3;4.6;9.2
14	29.4	1.94/2.01	dq/dq	7.3;1.6;14.8/2.9;7.3;14.8
15	12.5	1.09	dd	7.3;7.3

**Tabla 1.-** Datos físicos del compuesto I.



**Figura 12.-** Experimento ROESY del compuesto I.



**Figura 13.-** Configuración absoluta del E-dihidrorhodofitín.

La molécula aislada se trata de la acetogenina *E*-Dihidrorhodofitín, una acetogenina heterocíclica de anillo de ocho miembros con un sistema enino conjugado terminal. Esta molécula se aisló por primera vez en el año 1988 por el grupo de Manuel Norte en el Centro de Productos Naturales Orgánicos “Antonio González” de la Universidad de La Laguna. Una vez obtenida la información de los datos físicos del compuesto de nuestro trabajo, se comparó con aquellos publicados. Así, se vieron ligeras diferencias entre los valores de desplazamiento químico de carbono y protón de la primera elucidación con los de nuestro estudio. No obstante, los acoplamientos y las correlaciones ROE permiten ajustar los datos con los de Norte *et al.* [14] confirmando así que la molécula aislada corresponde a *E*-Dihidrorhodofitín.

#### ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL *E*-DIHIDRORHODOFITÍN

Los ensayos de citotoxicidad fueron llevados a cabo por el grupo de José. M. Padrón del Instituto Universitario de Bio-Orgánica “Antonio González” (BioLab). Las líneas celulares frente a los que se ensayó fueron tumores sólidos de ovario, mama, cerviz, endometrio, pulmón y colon. En la Tabla 2 se recopilan los valores de las concentraciones inhibitorias del crecimiento del 50% (GI<sub>50</sub>) para el compuesto analizado.

<i>E</i> -Dihidrorhodofitín	Línea celular	GI <sub>50</sub> M	Exp
	<i>A2780</i>	2,2E-05	1
	<i>HBL-100</i>	2,5E-05	1
	<i>HeLa</i>	2,5E-05	1
	<i>ISHIKAWA</i>	2,5E-05	1
	<i>WiDr</i>	2,5E-05	1

**Tabla 2.-** Datos de inhibición del compuesto frente a las líneas celulares.

A la luz de los resultados se puede observar que, la acetogenina aislada no presentó actividad significativa frente a ninguna de las líneas celulares tumorales ensayadas.

Al realizar una revisión bibliográfica sobre estudios de bioactividad con C<sub>15</sub> acetogeninas, destaca que los compuestos que presentaban actividad [1] [12], en general tenían en común el poseer en su estructura un éter cíclico de 8 miembros y la presencia de grupos funcionales oxigenados (grupos hidroxilo o acetilo). Asimismo, cabe destacar que la isomería

geométrica del sistema enino también jugaba cierto papel en los mecanismos de actividad, mostrando mejores resultados los derivados *cis*. Comparando estos hechos con la estructura de la *E*-dihidrorhodofitín podemos señalar que quizás, la causa de que este compuesto no tenga actividad frente a las líneas celulares estudiadas, puede estar relacionada con la ausencia de grupos hidroxilos en posiciones tales como C-9 y C-10, donde existe un doble enlace, así como con la geometría *trans*-enino que presenta.

#### 4. CONCLUSIONES

El estudio preliminar químico de la especie *Laurencia microcladia* recolectada en la isla de Fuerteventura, rinde como uno de los metabolitos mayoritarios, una sustancia halogenada con esqueleto carbonado C<sub>15</sub> no terpénico. El compuesto se trataba de la acetogenina conocida *E*-dihidrorhodofitín. Dicho compuesto no mostró actividad antiproliferativa significativa frente a las líneas celulares de tumores sólidos ensayadas. Al comparar su estructura con la de otras acetogeninas activas de este tipo en la literatura, destaca la ausencia de grupos oxigenados en posiciones C9-C10 y su geometría *trans*-enino como posibles causas de su inactividad.

#### 5. AGRADECIMIENTOS

Nuestro agradecimiento al Lcdo. Adrián Gutiérrez. Este trabajo formó parte del trabajo de investigación final de Master Oficial de Biotecnología MCD 2007/00011 de la Lcda. Eva Aylagas Martínez y ha sido, en parte, financiado por los proyectos del MEC-Ministerio de Educación y Ciencia (CGL2007-60635/BOS; CTQ2008-06754-C04-01/PPQ). Los ensayos de bioactividad fueron llevados a cabo por C. Ríos-Luci y J. M. Padrón (BioLab, Instituto Universitario de Bio-Organica “Antonio González, Universidad de La Laguna)

#### 6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] ABDEL-MAGEED WAEL M., RAINER, E., VALERIOTE, F. A. & JASPARS, M. 2010. Laurefurenynes A–F, new cyclic ether acetogenins from a marine red alga, *Laurencia* sp. *Tetrahedron* 66: 2855-2862.
- [2] AMSLER, C. D. 2008. *Algal chemical ecology*. Ed Springer 311 pp.
- [3] ERICKSON, K. L. 1983. *Marine Nature Products, Chemical and Biological Perspectives*. P. J. Scheuer Ed., Academic Press. V:131-255.
- [4] FAULKNER, D. J. 2001. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.*, 18: 1-49.
- [5] FAULKNER, D. J. 2002. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 19: 1-48.
- [6] FENICAL, W. 1976. Chemical variation in a new bromochamigrene derivative from the red seaweed *Laurencia pacifica*. *Phytochemistry* 15: 511-512.
- [7] GERWICK, W.H. & BERNAT, M.W. 1993. *Marine biotechnology Pharmaceutical and bioactive Natural Products*. David H. Attaway y Oskar R. Zaborsky Ed. New York. 107 pp.
- [8] GUIRY M.D. & GUIRY, G.M. 2010. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. [acceso junio 2010: <http://www.algaebase.org>.]

- [9] HAROUN, R.J., GIL-RODRÍGUEZ, M.C. & WILDPRET DE LA TORRE, W. 2003. *Plantas marinas de las Islas Canarias*. Canseco Editorial, España. 319 pp.
- [10] JIMÉNEZ J. C., CUEVAS, V. & ALBERICIO, F. 2007. Productos naturales de origen marino. *Investigación y Ciencia*. Febrero 2007, 365: 75-83
- [11] KLADI M., VAGIAS, C., STAVRI, M., MUKHLESUR RAHMAN, M., GIBBONS, S. & ROUSSIS, V. 2008. C15 acetogenins with antistaphylococcal activity from the red alga *Laurencia glandulifera*. *Phytochemistry Letters* 1: 31-36.
- [12] McDERMID, K. 1988. Section V. *Laurencia* (Rhodophyta, Rhodomelaceae) Introduction. pp. 221-229. En: I.A. Abbott (ed.) *Taxonomy of Economic Seaweeds with Reference to some Pacific and Caribbean Species*. Vol. II. California Sea Grant College Program, La Jolla. California.
- [13] MONROE E. & MANSUKH, C.W. 1993. Camptothericin and analogues. En: *Human Medicinal Agents from plants*. A. Douglas Kinghorn & Manuel F. Balandrin Ed. ACS Symposium Series, *American Chemical Society*, Washington, D.C. pp. 282-286.
- [14] NORTE M, FERNÁNDEZ, J., CATALDO, F. & GONZÁLEZ, A.G. 1989. E-dihydro-rhodophytin, a C15 acetogenin from the red alga *Laurencia pinnatifida*. *Phytochemistry*. 28: 647-649.
- [15] PEREIRA, R.C., DA GAMA, B.A.P., TEIXEIRA, V.L. & YONESHIGUE-VALENTIN, Y. 2003. Ecological roles of natural products from the Brazilian red seaweed *Laurencia obtusa*. *Braz. J. Biol.* 63(4): 665-672.
- [16] SALGADO L.T., VIANA, N.B., ANDRADE, L.R., LEAL, R.N., DA GAMA, B.A.P., ATTIAS, M., PEREIRA, R.C. & AMADO FILH, G.M. 2008. Intra-cellular storage, transport and exocytosis of halogenated compounds in marine red alga *Laurencia obtusa*. *Journal of Structural Biology* 162: 345-355.
- [17] SENTÍES A. & FUJII, M.T. 2002. El complejo *Laurencia* (Rhodomelaceae) en el Caribe mejicano. En: Senties, A. y K. Dreckmann (Eds.) *Monografías Ficológicas*. UAMI y RLB. pp 119-192.
- [18] STORENG R., SKEHAN P., SCUDIERO, D., MONKS, A., MCMAHON, J. & VISTICA, D. 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancerdrug screening. *J Natl Cancer Inst.* 82(13): 1107-1112.

