

Nuevas toxinas relacionadas con el Ácido Okadaico

Blanca Suárez-Gómez, María L. Souto, Manuel Norte y José J. Fernández
*Instituto Universitario de Bio-Orgánica “Antonio González”, Universidad de La Laguna,
C/ Astrofísico Francisco Sánchez 2, 38206 La Laguna, Tenerife*

Resumen

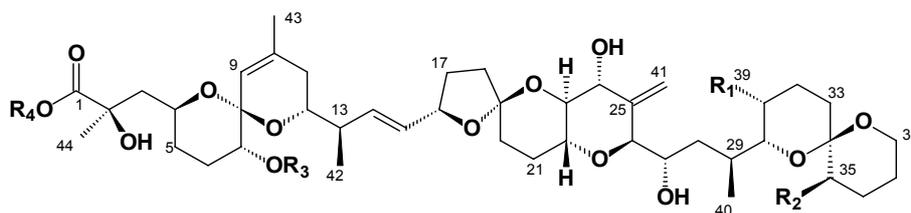
El “envenenamiento diarreico de los mariscos” (Diarrhetic Shellfish Poisoning, DSP) es un fenómeno producido por dinoflagelados, principalmente de los géneros *Dinophysis* y *Prorocentrum*. En el presente trabajo describimos el aislamiento y la elucidación estructural mediante métodos espectroscópicos de varios nuevos compuestos relacionados con el ácido okadaico (**1**), obtenidos a partir de cultivos artificiales de *P. lima*.

Introducción

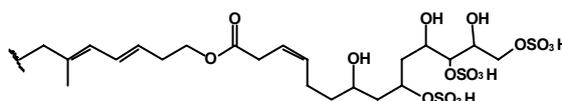
El estudio de los fenómenos tóxicos asociados con determinados episodios de proliferaciones de microalgas, popularmente conocidas como “mareas rojas”, ha sido objeto de gran interés en los últimos años, especialmente en el caso de las toxinas polietéreas.

El DSP es un serio problema para la salud pública y la economía a nivel mundial y las toxinas responsables del mismo son el ácido okadaico (AO), dinofisistoxinas (DTXs) y toxinas relacionadas (**1-13**).¹ Este tipo de sustancias han atraído especial atención tanto por sus estructuras químicas como por sus propiedades farmacológicas.² Así, son capaces de provocar diarreas, náuseas y cefaleas de cierta intensidad, y tras exposición crónica, pueden llegar a producir tumores. Estas toxinas son unas herramientas biomédicas extremadamente valiosas como inhibidores de las proteínas fosfatasa serina/treonina del tipo 1 y 2A, responsables del control de procesos intracelulares tales como la transducción, la duplicación celular o la memoria.

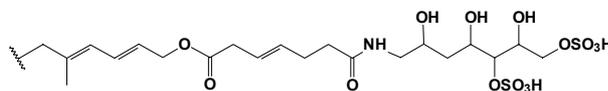
En el presente trabajo se describen el aislamiento y la elucidación estructural mediante el uso de métodos espectroscópicos, de varios compuestos relacionados con el ácido okadaico, 7 nuevos (**14-20**) y otros ya conocidos, a partir de cultivos artificiales de *P. lima* realizados en nuestro laboratorio.



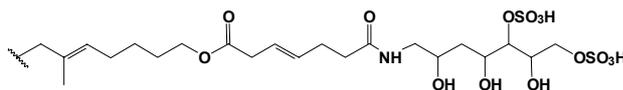
- 1 **Ácido Okadaico:** $R_1=CH_3$; $R_2=R_3=R_4=H$
- 2 **DTX1:** $R_1=R_2=CH_3$; $R_3=R_4=H$
- 3 **DTX2:** $R_1=H$; $R_2=CH_3$; $R_3=R_4=H$
- 4 **DTX3:** $R_1=R_2=CH_3$; $R_3=acilo$; $R_4=H$



- 5 **DTX4:** $R_1=CH_3$; $R_2=R_3=H$; $R_4=$

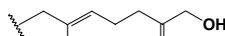


- 6 **DTX5a:** $R_1=CH_3$; $R_2=R_3=H$; $R_4=$

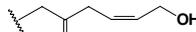


- 7 **DTX-5b:** $R_1=CH_3$; $R_2=R_3=H$; $R_4=$

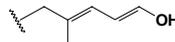
- 8 $R_1=CH_3$; $R_2=R_3=H$; $R_4=$



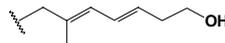
- 9 $R_1=CH_3$; $R_2=R_3=H$; $R_4=$



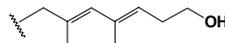
- 10 $R_1=CH_3$; $R_2=R_3=H$; $R_4=$



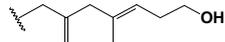
- 11 $R_1=CH_3$; $R_2=R_3=H$; $R_4=$



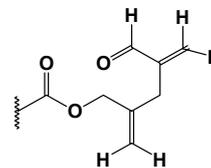
- 12 $R_1=CH_3$; $R_2=R_3=H$; $R_4=$



- 13 $R_1=CH_3$; $R_2=R_3=H$; $R_4=$



- 14 **DTX6:** $R_1=CH_3$; $R_2=R_3=H$; $R_4=$



- 15 **Metil okadaato:** $R_1=CH_3$; $R_2=R_3=H$; $R_4=CH_3$

Material y métodos

Cepas

Para el cultivo se utilizó la cepa PL2V del dinoflagelado *P. lima*, que nos fue suministrada por Isabel Bravo, del Instituto Oceanográfico de Vigo. Esta cepa fue adaptada a un crecimiento a gran escala en nuestro laboratorio en las condiciones que a continuación se describen.

Cultivos a gran escala y preparación del extracto

Se siguió un ciclo de cultivo donde se partió de una batería de erlenmeyers de 250 mL que contenían 150 mL de cultivo. Se dejaron crecer las células durante un periodo de 28-30 días a temperatura de 23 °C y un fotoperiodo de luz:oscuridad 18:6 horas. Se llevó a cabo entonces el trasvase de las células contenidas en 3 erlenmeyers, a cada uno de los erlenmeyers de 5 L, que contienen 3 L de medio Guillard K. Una vez alcanzado el máximo de crecimiento en esta etapa, y tras otro mes, las células son utilizadas como inóculos de tanques de 60 L que contenían 40 L de cultivo. Después de 4 meses de un ciclo de cultivo completo, se obtuvieron unos 700 litros de cultivo. Las células fueron entonces, recolectadas y extraídas mediante ruptura por ultrasonido y maceración en acetona, hasta agotamiento. Posteriormente el disolvente fue evaporado a vacío, dando lugar a 22 g de extracto.

Separación cromatográfica

El extracto resultante del cultivo anterior fue cromatografiado en una columna de Sephadex LH20 eluida con CHCl₃:MeOH:*n*-Hex en las proporciones 1:1:2 y a continuación en una columna de media presión Lobar LiChroprep RP18, eluida con MeOH:H₂O en proporciones 17:3. La purificación final de la muestra se llevó a cabo mediante HPLC en una columna μ -Bondapak C18, en dos etapas. En un primer paso se empleó un gradiente binario de disolventes, que comienza con la disolución A=CH₃CN:H₂O:AcOH 50:50:0.1, y termina con B=CH₃CN:AcOH 100:0.1, después de 1h, y en una etapa posterior en un sistema isocrático de MeOH:H₂O en proporciones 17:3. Partiendo de 22 gramos de extracto acetónico, llegamos a la obtención de nuevos compuestos (**14-20**) así como ácido okadaico, la DTX1, y varios ésteres del AO ya conocidos.

Datos físicos del metil okadaato (15)

Sólido amorfo de color blanquecino; $[\alpha]_D^{25} = +10.0$ (*c* 0.27, CHCl₃); IR (CHCl₃) ν_{\max} 3444, 2934, 1739, 1681, 1454, 1382, 1236, 1182 y 1077 cm⁻¹; FAB MS *m/z*: 841.4709 (calc. C₄₅H₇₀O₁₃ + Na, 841.4714); los datos de RMN de ¹³C y ¹H están recogidos en la Tabla 1.

Datos físicos de la norokadanona (16)

Sólido amorfo de color blanquecino; $[\alpha]_D^{25} = +9.8$ (*c* 0.06, CHCl₃); UV (EtOH) λ_{\max} 242 and 270 nm; IR (CHCl₃) ν_{\max} 3453, 2929, 1715, 1455, 1381, 1236, 1182, 1076 y 1045

cm⁻¹; FAB MS *m/z*: HRMS: 758.4610 (calc. C₄₃H₆₆O₁₁, 758.4605); los datos de RMN de ¹³C y ¹H están recogidos en la Tabla 1.

Datos físicos de 17

Sólido amorfo de color blanquecino; $[\alpha]_D^{25} = -15$ (*c* 0.02, CHCl₃); IR (CHCl₃) ν_{\max} 3428, 2924, 2852, 2360, 2341, 1739, 1462, 1379, 1261, 1236, 1212, 1182, 1159, 1112, 1078 y 1045 cm⁻¹; FAB MS *m/z* 874.5156 (calc. C₄₈H₇₄O₁₄, 874.5078); los datos de RMN de ¹³C y ¹H están recogidos en la Tabla 1.

Datos físicos de 18

Sólido amorfo de color blanquecino; $[\alpha]_D^{25} = +27$ (*c* 0.04, CHCl₃); IR (CHCl₃) ν_{\max} 3418, 2956, 2854, 2360, 2341, 1732, 1670, 1455, 1380, 1236, 1215, 1160, 1078, 1045 cm⁻¹; MS *m/z* 921.7 (calc. C₅₀H₇₆O₁₄ Na, [M+Na]⁺); los datos de RMN de ¹³C y ¹H están recogidos en la Tabla 2.

Datos físicos de 19

Sólido amorfo de color blanquecino; $[\alpha]_D^{25} = +10$ (*c* 0.10, CHCl₃); IR (CHCl₃) ν_{\max} 3427, 2932, 1737, 1651, 1455, 1382, 1236, 1160, 1077, 999, 975, 916 y 877 cm⁻¹; MS *m/z* 980.1 (calc. C₅₃H₈₂O₁₅ Na, [M+Na]⁺); los datos de RMN de ¹³C y ¹H están recogidos en la Tabla 2.

Datos físicos de 20

Sólido amorfo de color blanquecino; $[\alpha]_D^{25} = +10$ (*c* 0.06, CHCl₃); IR (CHCl₃) ν_{\max} 3417, 2923, 2851, 2360, 2341, 1738, 1531, 1455, 1379, 1350, 1235, 1213, 1161, 1078, 875, 797 cm⁻¹; MS *m/z* 996.2 (calc. C₅₃H₈₂O₁₆ Na, [M+Na]⁺); los datos de RMN de ¹³C y ¹H están recogidos en la Tabla 2.

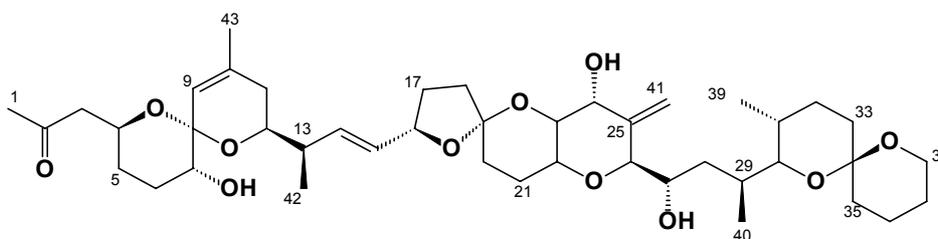
Resultados y discusión

Con el fin de estudiar las toxinas minoritarias existentes en el dinoflagelado *Prorocentrum lima*. Para ello se siguió un ciclo de cultivo donde en un último estadio se inoculan las células contenidas en erlenmeyers de 5 L, conteniendo 3 L de cultivo, a tanques de vidrio de 60 L conteniendo 40 L de medio Guillard K obteniéndose finalmente 700 litros de cultivo. Las células fueron entonces recolectadas por centrifugación, y se maceraron en acetona hasta agotamiento, al tiempo que fueron sometidas a ultrasonido para producir la ruptura del dinoflagelado. Una vez evaporado el disolvente, se obtuvo un extracto de color verde oscuro de 22 g, que fue cromatografiado como se detalla en la parte experimental.

Del extracto acetónico obtuvimos, además del AO (**1**), la DTX-1 (**2**) y el éster **13**, éster mayoritario en los extractos de esta cepa, el dioléster **11** que había sido aislado previamente de *P. concavum*, y el compuesto **12** aislado de la cepa PL3V de *P. lima*.

El primer compuesto identificado fue un derivado del AO que denominamos DTX6 (**14**), y presentado en la anterior VII Reunión Ibérica sobre fitoplancton tóxico y biotoxinas celebrada en Alicante.³

Seguidamente se aisló el metil okadaato (**15**). Este compuesto fue fácilmente identificado comparando sus datos espectroscópicos con los del AO (**1**). El espectro de masas de alta resolución nos indicó la existencia de un carbono adicional ($C_{45}H_{70}O_{13}$, δ_H 3.79, C-1'). La presencia de un éster es confirmada por la fuerte banda observada a 1739 cm^{-1} en el espectro de IR. La pequeña cantidad obtenida de este compuesto, junto con el hecho de que nunca antes había sido aislado por procedimientos similares, sugieren que debe tratarse de un metabolito del microalga.

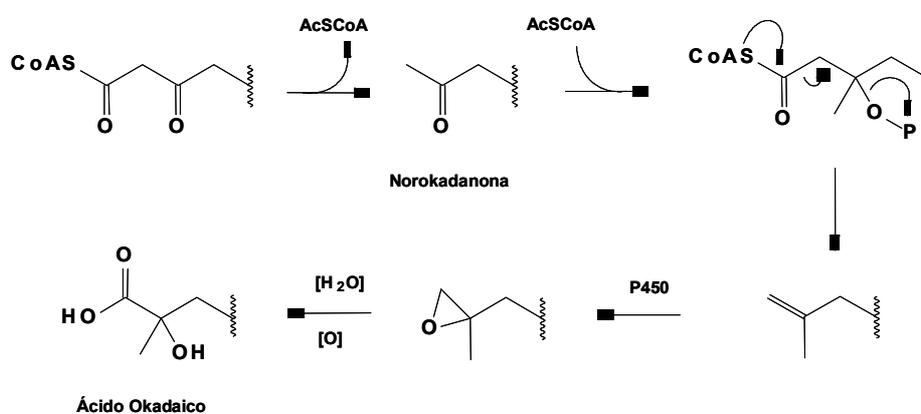


16 Norokadanona

La norokadanona (**16**) fue aislada como un sólido blanco amorfo y sus datos de masas de alta resolución muestran que se trata de un nor-derivado del AO. La fuerte banda observada a 1715 cm^{-1} en el espectro de IR nos señala la existencia de un grupo carbonilo. Estos datos fueron confirmados en base a los espectros de RMN ya el carbono cuaternario C-2 presenta un desplazamiento a δ_C 207.2. Además, el grupo metilo C-1 aparece centrado en el espectro de trotona a δ_H 2.15 que indica claramente que debe tratarse de una metil cetona. Conjuntamente, las señales para los protones H-3 y H-4 son bastante diferentes a las observadas en el AO (**1**) o en el metil okadaato (**15**). La estructura fue confirmada en base a los datos obtenidos del experimento HMBC, donde el carbono cuaternario C-2 presentó correlaciones con los protones en H₃-1, H₂-3 y H-4. Este compuesto había sido sintetizado a partir del AO, pero nunca antes se había obtenido de fuente natural.⁴ Los datos de RMN de ^{13}C y 1H para **14**, **15** y **16** están recogidos en la Tabla 1.

La biosíntesis de este tipo de sustancias es aún un problema por resolver a pesar de la gran cantidad de experimentos que se han llevado a cabo. Sin embargo, el aislamiento de la norokadanona refuerza la hipótesis sobre el origen biogénico de los oxígenos en el AO (Esquema 1). Murata y col.^{5 y 6} habían observado una fuerte incorporación de ^{18}O en el

carbono C-2 procedente de oxígeno molecular, mientras que para el carbono C-1 tan sólo uno de los dos oxígenos, aparecía enriquecido con ^{18}O procedente de agua. De esta forma, consideramos a la norokadanona como un intermedio en la biosíntesis del AO, sobre el cual se incorporaría otra molécula de acetil coenzima A. El intermedio resultante sufriría descarboxilación dando lugar a una olefina terminal. El oxígeno podría ser introducido por enzimas del tipo P450, para formar un epóxido. La hidratación del mismo, dejaría el oxígeno procedente de oxígeno molecular en la posición 2, y el procedente de agua en el carbono C-1, tal y como se había observado. Finalmente, una oxidación nos daría el AO.



Esquema 1.- Propuesta biosintética del origen de oxígenos enlazados a los carbonos C-1 y C-2 del ácido okadaico, suponiendo la norokadanona como posible intermedio.

Otro de los nuevos compuestos obtenidos en nuestro laboratorio fue el 3'-hidroxi-2'-metilen-propil Okadaato (**17**). Los datos espectroscópicos de RMN ^1H para este compuesto mostraron la presencia de tres nuevos grupos metilenos: dos metilenos arílicos $\text{H}_{2-1'}$ a δ_{H} 4.72, 4.83 ($J=13$ Hz) y $\text{H}_{2-3'}$ a δ_{H} 4.15; y un metileno olefínico $\text{H}_{2-4'}$ a δ_{H} 5.19 y 5.25. El experimento de HSQC permitió establecer los desplazamientos por los carbonos: C-1' (δ_{C} 75.6), C-3' (δ_{C} 63.9) y C-4' (δ_{C} 114.6). La estructura de la cadena del éster fue completada en base a los datos del experimento de HMBC, donde el carbono C-1 (δ_{C} 176.0) mostró conectividades con los protones H-1', y el carbono cuaternario C-2' (δ_{C} 142.1) con todos los protones de la nueva cadena carbonada. Estas correlaciones se señalan mediante flechas en la Figura 1. Por último, y según los datos extraídos del experimento de ROESY, este compuesto muestra la misma estereoquímica que la propuesta para el AO.

El 5'-hidroxi-2'-metilen-penta-3'-enil okadaato (**18**). Se aisló un nuevo éster del AO como un sólido amorfo de color blanquecino. El espectro de masas de alta resolución permitió establecer su fórmula molecular como $\text{C}_{50}\text{H}_{76}\text{O}_{14}$ y una banda a 1732 cm^{-1} en el espectro de IR, nos indica que se trata de un éster. En el espectro de RMN ^1H se observan varias señales nuevas a campos bajos como son un metileno olefínico, $\text{H}_{2-6'}$ a δ_{H} 4.95 y 5.13, dos grupos

metilenos, H₂-1' y H₂-5' a δ_H 4.54, 5.09 y δ_H 4.17, respectivamente; y dos protones vinílicos, H-4' a δ_H 5.85 y H-3' a δ_H 5.90. Los experimentos de HMBC y HSQC permitieron completar la estructura de la cadena del fragmento éster de la molécula y establecer de esta forma, los desplazamientos para todos los carbonos y protones de este nuevo éster del AO (Tabla 2). Las conectividades más significativas observadas en el experimento HMBC se muestran en la Figura 1.

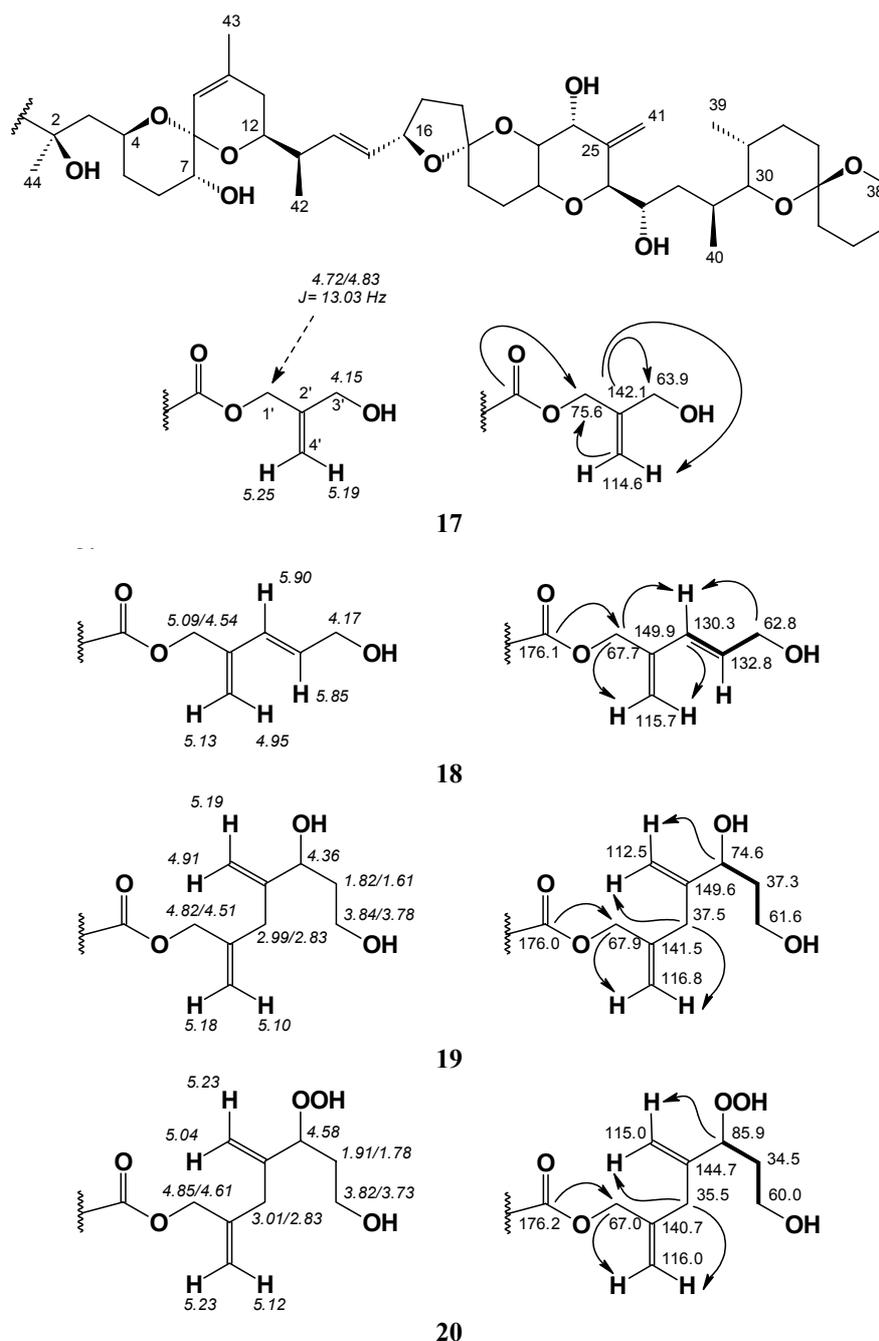


Figura 1.- Desplazamientos químicos para los compuestos 17-20. Mediante flechas se indican las correlaciones HMBC más significativas, que ayudaron a establecer las estructuras de las cadenas de los ésteres de estos nuevos metabolitos.

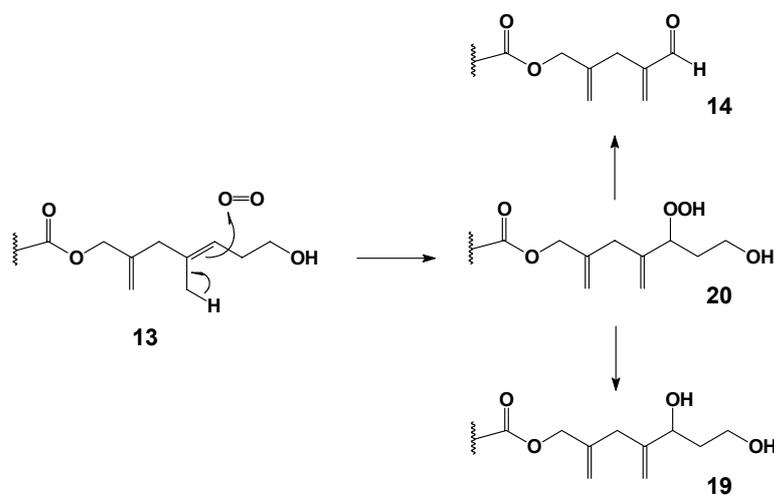
Carbono	15		16		17	
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
1	176.9		30.9	2.15	176.0	
2	75.9		207.2		75.8	
3	43.9	1.68/2.05	49.1	2.42/2.62	44.2	1.71/2.02
4	68.7	3.93	65.8	4.25	68.7	3.97
5	31.6	1.37/1.70	30.2	1.25/1.36	31.9	1.36/1.75
6	27.3	1.82/1.97	27.3	1.73/1.87	27.2	1.85/2.02
7	71.5	3.36	71.7	3.39	72.1	3.38
8	96.0		95.8		95.9	
9	121.6	5.31	122.9	5.34	122.0	5.32
10	138.6		138.7		138.5	
11	32.9	1.85/1.88	33.0	1.87/1.92	32.9	1.86/1.89
12	70.9	3.57	71.2	3.69	70.8	3.64
13	41.8	2.26	41.9	2.31	42.0	2.30
14	135.4	5.56	136.9	5.76	135.9	5.58
15	130.5	5.47	131.5	5.51	131.2	5.48
16	78.9	4.46	79.7	4.52	79.2	4.48
17	30.6	1.58/2.13	30.7	1.63/2.19	30.2	1.58/2.17
18	37.1	1.86/2.04	37.5	1.88/2.01	37.3	1.86/2.03
19	105.7		105.5		106.0	
20	31.5	1.28/1.42	32.2	1.36/1.53	32.0	1.26/1.40
21	26.4	1.80/1.87	26.9	1.84/1.90	26.5	1.82/1.89
22	69.5	3.58	70.3	3.57	69.4	3.59
23	75.5	3.39	77.1	3.45	76.8	3.42
24	70.8	4.10	70.7	4.11	71.2	4.11
25	143.9		143.1		143.8	
26	84.8	3.92	85.1	3.91	85.0	3.94
27	64.5	4.06	64.7	4.07	64.9	4.06
28	35.2	0.97/1.43	35.6	0.98/1.32	35.2	0.96/1.31
29	31.0	1.91	31.1	1.96	31.3	1.95
30	74.9	3.27	75.4	3.28	75.2	3.27
31	27.2	1.79	27.6	1.80	27.4	1.81
32	27.3	1.91/1.97	26.5	1.82/1.92	26.0	1.92/1.97
33	30.3	1.34/1.52	30.6	1.34/1.52	30.2	1.36/1.56
34	95.5		95.5		96.0	
35	35.8	1.31/1.48	36.4	1.31/1.46	36.0	1.31/1.47
36	18.7	1.39/1.61	23.5	1.48/1.65	20.2	1.45/1.65
37	25.4	1.44/1.51	25.0	1.58/1.82	25.2	1.51/1.60
38	60.3	3.54/3.64	61.0	3.56/3.66	60.3	3.56/3.66
39	10.6	0.90	10.8	0.92	11.0	0.91
40	16.1	1.04	16.2	1.06	16.1	1.05
41	112.4	5.04/5.38	113.0	5.02/5.35	112.4	5.04/5.35
42	15.8	1.01	16.2	1.05	16.1	1.03
43	22.9	1.71	22.6	1.75	23.0	1.73
44	27.6	1.34			27.3	1.39
1'	52.7	3.79			75.6	4.72/4.83
2'					142.1	
3'					63.9	4.15
4'					114.6	5.19/5.25

Tabla 1.- Datos de RMN- ^{13}C y ^1H (CDCl_3) para los compuestos 15, 16 y 17.

Carbono	18		19		20	
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
1	176.1		176.0		176.2	
2	76.0		75.5		75.6	
3	44.0	2.10/1.70	43.9	2.06/1.69	44.0	2.07/1.68
4	68.4	3.98	69.0	3.97	68.6	3.99
5	32.0	1.75/1.38	31.9	1.71/1.34	31.7	1.73/1.34
6	26.5	2.10/1.85	27.3	1.83/1.68	26.4	2.01/1.86
7	71.8	3.39	71.6	3.39	71.8	3.39
8	96.1		95.9		96.5	
9	121.8	5.38	122.1	5.32	121.8	5.33
10	139.0		138.7		138.8	
11	32.9	1.88/1.86	33.1	1.94/1.89	33.0	1.90/1.85
12	71.1	3.53	71.6	3.49	71.0	3.50
13	42.2	2.26	42.2	2.27	42.0	2.28
14	136.0	5.52	136.6	5.50	135.9	5.51
15	131.3	5.49	131.3	5.47	131.1	5.47
16	79.1	4.50	79.4	4.47	79.1	4.43
17	30.5	2.22/1.58	30.8	2.17/1.60	30.8	2.17/1.59
18	37.1	2.04/1.88	37.7	2.09/1.87	37.3	2.05/1.87
19	106.0		105.2		105.8	
20	32.2	1.42/1.38	32.2	1.41/1.32	31.8	1.35/1.26
21	26.8	1.85/1.76	27.0	1.89/1.82	27.3	1.83/1.78
22	69.9	3.59	70.2	3.59	69.8	3.56
23	76.2	3.42	76.9	3.43	76.7	3.43
24	71.2	4.11	71.3	4.11	71.0	4.15
25	144.0		144.8		144.5	
26	84.7	3.95	85.1	3.95	84.8	3.96
27	64.4	4.06	64.9	4.07	64.6	4.08
28	35.1	1.35/0.98	35.3	1.30/0.98	35.1	1.32/0.97
29	31.2	1.91	31.8	1.97	31.2	1.95
30	75.0	3.29	75.1	3.29	75.1	3.30
31	27.2	1.81	27.6	1.79	27.5	1.80
32	26.2	1.99/1.86	26.8	2.00/1.90	26.4	2.01/1.86
33	30.4	1.53/1.38	30.7	1.53/1.39	30.3	1.57/1.40
34	95.6		95.0		95.4	
35	35.9	1.65/1.46	35.9	1.63/1.46	36.0	1.65/1.44
36	18.7	1.89/1.54	19.0	1.91/1.53	18.8	1.90/1.58
37	25.6	1.57/1.50	25.0	1.57/1.43	25.3	1.56/1.49
38	60.7	3.66/3.56	60.5	3.66/3.56	60.3	3.66/3.57
39	10.9	0.92	10.9	0.92	10.8	0.93
40	16.1	1.05	16.1	1.05	16.2	1.07
41	112.7	5.35/5.06	113.4	5.32/5.05	112.4	5.35/5.07
42	15.8	1.01	15.9	1.05	15.8	1.02
43	23.0	1.74	23.5	1.74	23.1	1.75
44	28.1	1.41	27.9	1.38	27.6	1.40
1'	67.7	5.09/4.54	67.9	4.82/4.51	67.0	4.85/4.61
2'	149.9		141.5		140.7	
3'	130.3	5.90	37.5	2.99/2.83	35.5	3.01/2.83
4'	132.8	5.85	149.6		114.7	
5'	62.8	4.17	74.6	4.36	85.9	4.58
6'	115.7	5.13/4.95	37.3	1.82/1.61	34.5	1.91/1.78
7'			61.6	3.84/3.78	60.0	3.82/3.73
8'			116.8	5.18/5.10	116.0	5.23/5.12
9'			112.5	5.19/4.91	115.0	5.23/5.04

Tabla 2.- Datos de RMN- ^{13}C y ^1H (CDCl_3) para los compuestos 18, 19 y 20.

El 5', 7'-dihidroxi-2', 4' dimetilen-heptil okadaato (**19**) presentó una fórmula molecular $C_{53}H_{82}O_{15}$, establecida gracias al espectro de masas de alta resolución. Este sólido blanco amorfo resultó ser un éster de AO (banda a 1737 cm^{-1} en el espectro de IR) con una cadena lateral de 7 átomos de carbono, como las observadas para los ésteres **11**, **12** y **13**. El espectro de RMN ^1H muestra señales pertenecientes al nuevo fragmento de la molécula: dos metilenos olefínicos $H_{2-9'}$ (δ_H 4.91, 5.19) y $H_{2-8'}$ (δ_H 5.10, 5.18); cuatro grupos metilenos $H_{2-1'}$ (δ_H 4.51, 4.82), $H_{2-3'}$ (δ_H 2.83, 2.99), $H_{2-6'}$ (δ_H 1.61, 1.82) y $H_{2-7'}$ (δ_H 3.84, 3.78) y por último, una señal para un protón geminal a un grupo alcohol $H_{5'}$ (δ_H 4.36). El experimento de HMBC nos ayudó a completar la estructura de la molécula gracias a las correlaciones observadas. Así, el carbono cuaternario C-1 (δ_C 176.0) muestra conectividad con los protones $H_{2-1'}$, que a su vez se correlacionan con C-2' (δ_C 141.5) y con C-8' (δ_C 116.8). C-2' presenta conectividad con los protones $H_{2-3'}$, que conectan además con el también carbono cuaternario C-4' (δ_C 149.6), con los carbonos olefínicos C-8' y C-9' (δ_C 112.5), con C-1' (δ_C 67.9) y con C-5' (δ_C 74.6). En la Figura 1 se recogen las conectividades encontradas en el experimento HMBC.



Esquema 2

Por último, se aisló otro nuevo éster del AO, el 5'-hidroperoxi-7'-hidroxi-2', 4'-dimetilen-heptil okadaato (**20**). El espectro de masas de alta resolución nos establece una fórmula molecular $C_{53}H_{82}O_{16}$ que pone de manifiesto la presencia de un oxígeno más que en el compuesto anterior. Los desplazamientos químicos son muy parecidos a los observados para el compuesto **19**, por lo que sus estructuras deben estar estrechamente relacionadas. En la **Figura 1** y **Tabla 2** se muestran los desplazamientos para todos los carbonos y protones de la cadena lateral de este nuevo compuesto **20**, así como las conectividades más representativas observadas en el experimento de HMBC.

La presencia de un grupo hidroperóxido en este último éster nos hace pensar en su posible origen biogénico (**Esquema 2**). De esta forma, a partir del éster mayoritario (**13**) obtenido *Prorocentrum lima* (cepa PL2V), y mediante una oxidación en el carbono C-5' daría lugar al compuesto **20**. Éste podría ser un intermedio implicado en la biosíntesis de la DTX6 (**14**) mediante una fragmentación oxidativa, o bien, por otro lado, en la formación del compuesto **19**, mediante un proceso de reducción.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el MCYT (REN2001-2959-C04-02 y PPQ2002-04361-C04-04). Agradecer a Isabel Bravo del Instituto Oceanográfico de Vigo por cedernos la cepa *P. lima*, PL2V. Al MEC por la concesión de una beca F.P.U, BSG, y una Ramón y Cajal, MLS.

REFERENCIAS

- 1 A.H. Daranas, M. Norte y J.J. Fernández, Toxic Marine Microalgae, *Toxicon*, 2001, 39, 1101-1132, y referencias citadas en él.
- 2 J.J. Fernández, M.L. Candenias, M.L. Souto, M.M. Trujillo y M. Norte, Okadaic acid, useful tool for studying cellular processes, *Current Medicinal Chemistry*, 2002, 9, 229-262.
- 3 B. Suárez-Gómez, M.L. Souto, M. Norte y J.J. Fernández, Isolation and structural determination of DTX6, a new okadaic acid derivative, *Journal of Natural Products*, 2001, 64, 1363-1364.
- 4 S. Nishiwaki, H. Fujiki, M. Saganuma, H. Furuya-Suguri, R. Matsushima, I. Yukahari, M. Ojiva, K. Yamada, D. Uemura, T. Yasumoto, F. J. Schmitz, y T. Sugimura, *Carcinogenesis*, 1990, 11, 1837.
- 5 M. Izumikawa, M. Murata, K. Tachibana, T. Fujita y H. Naoki, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, 120, 147.
- 6 M. Izumikawa, M. Murata, K. Tachibana, T. Fujita y H. Naoki, *Eur. J. Biochem.*, 2000, 267, 5179.
- 7 M.L. Fernández, A. Míguez, E. Cacho, A. Martínez, *Toxicon*, 1996, 34, 381-387.
- 8 I. Bravo, M.L. Fernández, I. Ramilo, A. Martínez, *Toxicon*, 2001, 39, 1537-1543.
- 9 J.J. Fernández, B. Suárez-Gómez, M.L. Souto, M. Norte, Identification of new okadaic acid derivatives from artificial cultures of *Prorocentrum lima*, *Journal of Natural Products*, 2003, 66, 1291-1296.