

Ácido Belizeánico, un nuevo derivado del ácido okadaico

Antonio H. Daranas^{1,2}, Patricia G. Cruz¹, Manuel Norte¹
y José J. Fernández¹

(1) Instituto Universitario de Bioorganica "Antonio González", Departamento de Química Orgánica, Universidad de La Laguna, La Laguna 38206, Tenerife

(2) Departamento de Ingeniería Química y Tecnología Farmacéutica, Universidad de La Laguna, Francisco Sánchez 1, La Laguna 38071, Tenerife

Resumen

En el marco de nuestro programa de búsqueda de nuevas moléculas bioactivas de origen marino, hemos estudiado el dinoflagelado *Prorocentrum belizeanum*, a partir del cual se encontró el ácido belizeánico. Este es un nuevo derivado del ácido okadaico, del que puede considerarse un precursor de interés. Utilizando fundamentalmente técnicas de resonancia magnética nuclear se determinó su estructura y mediante la utilización de diferentes técnicas de modelización molecular se ha estudiado su conformación en disolución. Es interesante el hecho de que este metabolito también presenta una potente actividad inhibidora de la proteína fosfatasa 2A pese a las diferencias estructurales que presenta con el ácido okadaico.

Materiales y métodos

Como primera etapa, se realizaron cultivos monoclonales del dinoflagelado *P. belizeanum* a gran escala (1.000L). Estos cultivos se llevaron a cabo en tanques de 80 L a una temperatura de 21°C en un medio Guillard K utilizando un fotoperiodo de 16:8 (luz:oscuridad). Las células se recogieron por centrifugación a 7.000 rpm y posteriormente fueron extraídas en un baño de ultrasonidos a temperatura ambiente en acetona, que fue eliminada por evaporación a vacío para rendir un extracto de 21 g. A continuación, el extracto se purificó por cromatografías de exclusión molecular y de fase reversa (MeOH:H₂O y CH₃CN:H₂O).

El ácido belizeánico presentó un espectro de masas con una *m/z* 847.4820 [C₄₄H₇₂O₁₄+Na]⁺ correspondiente a la siguiente fórmula molecular C₄₄H₇₂O₁₄. La estructura de este nuevo metabolito se determinó fundamentalmente utilizando espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) mono y bidimensional. El análisis de los experimentos COSY, TOCSY, HSQC y HMBC permitió establecer conectividades entre los fragmentos protonados de la molécula, así como la diferente naturaleza de sus carbonos.

Resultados y discusión

Llegados a este punto se propone para este compuesto una estructura en la que aparecen dos regiones, C-1/C-15 y C-22/C-38, que coinciden con las regiones equivalentes en el ácido okadaico. Sin embargo, la zona C-16/C-21 presenta diferencias, ya que los anillos C y D característicos del ácido okadaico no se encuentran en este compuesto, teniendo en su lugar una cadena abierta con dos alcoholes secundarios en las posiciones C-16 y C-19, así como sobre el metino del anillo C-23.

La estereoquímica de esta molécula se asignó en base a las señales observadas en el experimento ROESY. Este estudio nos llevó a una situación configuracional equivalente a la de ácido okadaico en todos aquellos centros que se mantienen inalterados. Pero, en el caso de los carbonos C-16 y C-19 no ha sido posible determinar su configuración debido a la falta de diastereotopía en los metilenos adyacentes.

Una vez concluido el estudio estructural del ácido belizeánico, y debido a la relación existente entre la conformación que adoptan este tipo de moléculas y su actividad, se inició un estudio conformacional con este metabolito. A su vez se intentó resolver la estereoquímica de los centros quirales, C-16 y C-19. Como punto de partida para abordar este problema se tomaron los cuatro posibles isómeros $16S^*19S^*$, $16S^*19R^*$, $16R^*19S^*$ y $16R^*19R^*$, para así posteriormente comparar los resultados teóricos con los datos obtenidos de distintos experimentos espectroscópicos.

En el caso del ácido belizeánico las búsquedas conformacionales se realizaron sin ningún tipo de restricción. Fue posteriormente, en el análisis de estos resultados, cuando se tuvieron en cuenta las restricciones experimentales. El programa que se utilizó para realizar los estudios computacionales fue MacroModel 8.5. Nuevamente fue de la RMN de donde se obtuvieron los datos experimentales que nos sirvieron para desechar aquellas estructuras resultantes de los estudios teóricos que no se ajustaran a estos valores. Esta información se obtuvo básicamente del RMN¹H, TOCSY y ROESY. En los dos primeros experimentos se midieron constantes de acoplamiento, mientras que en el tercero se integraron los ROEs que se transformaron en distancias interprotónicas.

Con todas las búsquedas conformacionales y minimizaciones finalizadas se pasó a analizar las estructuras resultantes de acuerdo a los datos experimentales. Para ello en primer lugar se intentó llevar a cabo un estudio similar a los realizados por Snyder y col. y Nikiforovich y col., que se basan en la “*deconvolución*” de los datos de RMN (intensidad de las integrales de los ROEs y constantes de acoplamiento ³J_{H-H}) para obtener poblaciones conformacionales que sean capaces de explicar los datos experimentales. Por un lado Snyder y col. utilizan el programa NAMFIS, (NMR Analysis of Molecular Flexibility in Solution), mientras que Nikiforovich y col. aplican una aproximación estadística basada en la *t* de Student. Nosotros, utilizando como ejemplo estos trabajos, realizamos combinaciones estadísticas calculando la correspondiente desviación cuadrática media (RMSD). Para ello, las estructuras resultantes de la

búsqueda conformacional se agruparon con el programa XCluster (MacroModel 8.5), quedando un total de diez familias conformacionales. Seguidamente, utilizando el programa Mathematica se generaron combinaciones estadísticas que incluyeran a estas diez familias.

Por último se utilizaron las restricciones de distancias interprotónicas provenientes del experimento ROESY. A partir de estos datos se calculó la desviación cuadrática media para las violaciones de distancia de los confórmeros que quedaron para cada uno de los isómeros, resultando que en los cuatro casos el confórmero que mejor se ajustó a los datos experimentales fue el mismo, con un valor de RMSD de 0.20 Å. Estas estructuras se representan en la Fig. 1.

A continuación, para cada isómero, se calculó la estructura promedio de la dinámica. Obteniendo de este modo una información equivalente a las medidas experimentales, ya que las distancias obtenidas a partir del ROESY son un promedio de los posibles confórmeros en disolución, y lo mismo ocurre con las constantes de acoplamiento. Por lo tanto, se midieron las distancias entre los protones así como de los ángulos diedros, en las estructuras promedio, de los que se tenía información experimental.

Si nos fijamos únicamente en los valores de RMSD de los distintos isómeros del ácido belizeánico no es posible discernir entre ninguno de ellos ya que las diferencias con respecto a los datos experimentales son similares para todos los casos. Aunque, si atendemos a la distancia entre H-14 y H-16 se pueden apreciar diferencias entre los isómeros **16-S*** y **16-R***, siendo la distancia en el caso **16-S*** la más cercana a los datos experimentales. A su vez, si tenemos en cuenta los ángulos diedros, se observa que en el caso H-15 C-15 C-16 H-16 los valores son diferentes para los isómeros **16-S*** y **16-R***, ya que en los isómeros **16S*** nos encontramos con disposiciones *anti*, mientras que para el **16R*** los ángulos se corresponden con disposiciones *gauche*, y aunque J_{15-16} tiene un valor experimental de 6,60 Hz, que podría generar dudas en torno a esta disposición, también es cierto que en el caso del AO esta constante es de aproximadamente 7 Hz y se corresponde con una disposición anti. Por lo tanto, si tenemos en cuenta estos datos, podemos proponer que nos encontramos ante alguno de los isómeros con estereoquímica **16S***. Sin embargo, para el carbono C-19 no es posible seleccionar entre ninguna de las dos configuraciones debido a la falta de datos experimentales en torno a este centro.

Conclusión

Por lo tanto, finalizado el estudio de modelización con los cuatro isómeros del ácido belizeánico, **16S*19S***, **16S*19R***, **16R*19S*** y **16R*19R***, se puede proponer para el metino C-16 una configuración *S**, no pudiéndose resolver la situación en el caso del centro quiral C-19. De este modo, aunque no se pudo obtener la configuración relativa de C-19 sí que se pudo llegar a la disposición espacial que esta molécula adopta en disolución, ya que como se comentó anteriormente parece que la quiralidad de estos centros no afecta a las preferencias conformacionales de la molécula.

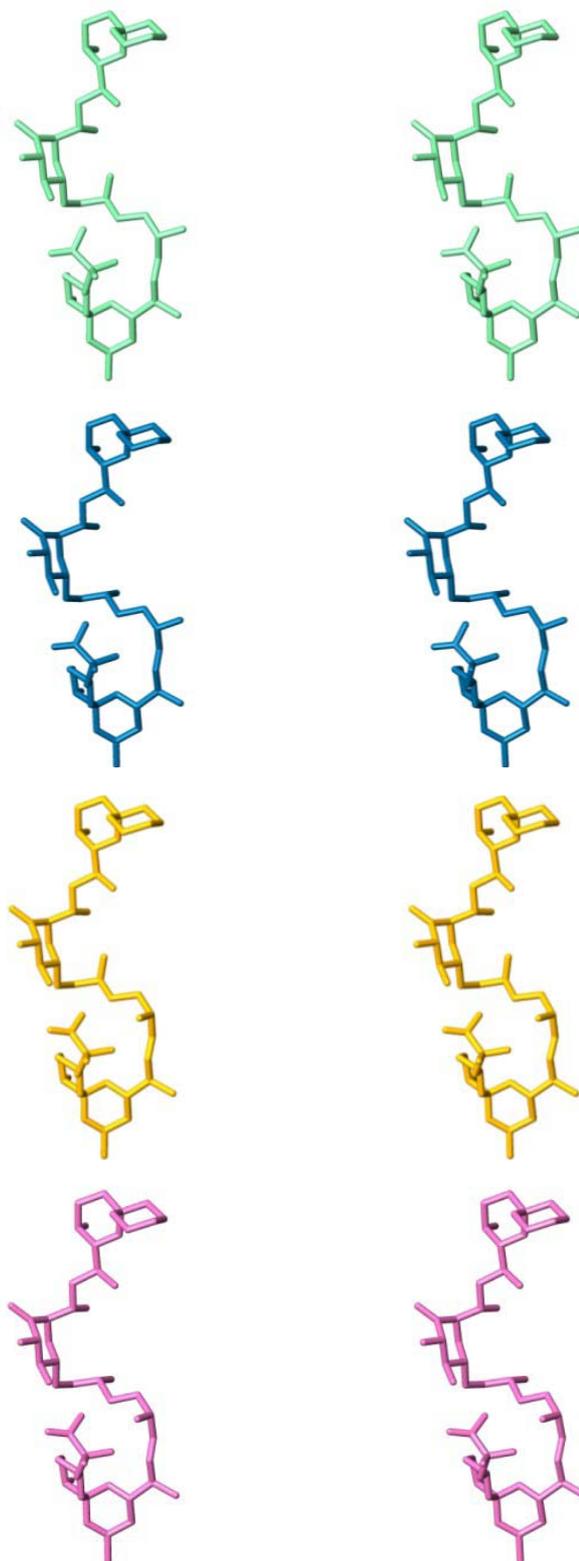


Figura 1.- Representación estereoscópica del conformero que mejor se ajustó para cada isómero. La estructura verde es el $16S^*19S^*$, la azul el $16S^*19R^*$, la naranja se corresponde con el $16R^*19S^*$ y la rosada con el $16R^*19R^*$.