

Aislamiento, purificación y elucidación de productos naturales con actividad antitumoral a partir de organismos marinos. Axinyssmide A y Axinyssmide C

Antonio García Centeno^{1,2*}, Laura Coello Molinero²

1 Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología de Sistemas, Facultad de Medicina, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España. **2** PharmaMar, Avenida de los Reyes, 1, Polígono Industrial La Mina Norte, 28770, Colmenar Viejo, Madrid, España.

Resumen

PharmaMar es una compañía biofarmacéutica dedicada a la investigación y desarrollo de medicamentos innovadores de origen marino para el área terapéutica de oncología. Concretamente el departamento de Productos Naturales es el encargado del aislamiento y la elucidación de moléculas con actividad citotóxica. En esta memoria se va a exponer todo el proceso de aislamiento de estas moléculas. Partiendo del organismo marino se va a detallar la extracción del mismo, el fraccionamiento y purificación por técnicas cromatográficas, así como la caracterización de dichas moléculas por resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas. Concretamente se expondrá todo el proceso basándose en el ejemplo de dos moléculas, la Axinyssmide A y la Axinyssmide C extraídas de la esponja Axinyssa que se recogió en Dili y que poseen una citotoxicidad moderada.

Palabras clave: aislamiento; Axinyssmide; cáncer; citotoxicidad; cromatografía; resonancia magnética nuclear; productos naturales.

Cita: García A, Coello L (2013) Aislamiento, purificación y elucidación de productos naturales con actividad antitumoral a partir de organismos marinos. Axinyssmide A y Anixyssmide C.. *Dianas* 2(2): e20130903. ISSN 1886-8746 journal.dianas.20130903 URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

Editores: María José Carmena y Alberto Domingo, Departamento de Biología de Sistemas, Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, España.

Recibido: 27 de junio de 2013

Copyright: © 2013 García y Coello. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported. http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/deed.es_ES

*E-mail: antonio.garcen@hotmail.com



Introducción

El cáncer es una enfermedad que se caracteriza por una proliferación celular anormal y una capacidad de estas células para invadir órganos y tejidos y diseminarse a distancia. Es una de las principales causas de muerte, a día de hoy se calcula que hay más de 30 millones de enfermos de cáncer en todo el mundo y su incidencia se espera que se incremente un 60% la próxima década. Existen cientos de tipos distintos de cáncer y es esta diversidad la que hace más difícil la búsqueda de una cura. Cada cáncer es muy distinto en cuanto a su pronóstico y tratamiento, dependiendo de donde se origine y las partes del organismo que invada y afecte. Se hace por tanto necesario la búsqueda de tratamientos que eliminen o frenen esta enfermedad [1,2].

Más del 70% de la Tierra está ocupada por mares y océanos en los que viven más de 200.000 especies de invertebrados y algas. Existen lugares marinos en los que cientos de macroorganismos y microorganismos cohabitan siendo en muchos casos amenazas los unos para los otros y es por ello que algunos han desarrollado mecanismos químicos de defensa contra otras especies, produciendo moléculas derivadas de su propia dieta o sintetizándolas *de novo* [3-6]. Por lo tanto, es posible encontrar en estos organismos moléculas con actividad biológica antitumoral muy potente que pueden ser utilizadas para combatir el cáncer. Evidentemente es necesario aislar esas moléculas y purificarlas para poder caracterizarlas y, posteriormente, sintetizarlas a gran escala [7,8].

Materiales y métodos.

Extracción del organismo con disolventes.

Se divide el organismo en porciones lo más pequeñas posibles y se añade a un vaso de precipitados con una mezcla de diclorometano y metanol (1:1). Se mantiene en agitación durante 20 minutos. Se detiene la agitación y se deja reposar 30 minutos. Se filtra en un Buchner a vacío y se evapora el disolvente. Este proceso se realiza dos veces más, con la mezcla de diclorometano y metanol, uniendo los tres extractos orgánicos y una vez con agua, obteniendo así un extracto orgánico y uno acuoso.

Fraccionamiento del extracto orgánico por VLC (Vacuum liquid chromatography)

Se fracciona el extracto orgánico por cromatografía líquida en fase reversa a vacío utilizando sílice RP18. Primero se toma el extracto orgánico, se disuelve en metanol y se añade sílice RP18 para formar la cabeza de columna. En caso de no disolverse en metanol se puede usar agua o diclorometano. Se evapora el disolvente. Se monta la placa filtrante, se le añade sílice RP18 y se acondiciona con el primer disolvente a utilizar. El extracto seco se traspasa del matraz a la columna. Como fase móvil se utilizan diferentes mezclas de disolventes de mayor a menor polaridad, se recogen las fracciones por separado y se evapora el disolvente de cada una de ellas.

Fracciones	RP1	RP2	RP3	RP4	RP5	RP6	RP7
Disolventes	H ₂ O	H ₂ O/MeOH (3:1)	H ₂ O/MeOH (1:1)	H ₂ O/MeOH (1:3)	MeOH	MeOH/CH ₂ Cl ₂ (1:1)	CH ₂ Cl ₂

Tabla 1: Fracciones obtenidas y disolventes utilizados.

Habitualmente se fracciona el extracto orgánico porque es el que suele contener las moléculas con actividad citotóxica pero es posible que se encuentren el extracto acuoso en cuyo caso se realiza un fraccionamiento de éste siguiendo los mismos pasos.

Ensayos de citotoxicidad.

En este punto se comprueba la citotoxicidad de cada fracción, para ello se toma una pequeña porción (0,15 mg) de cada una de las fracciones RP y del extracto acuoso y se mandan al departamento de screening. Se comprueba la actividad frente a 4 líneas celulares (hígado: A549, colon: HT29, mama: MDA-MB-231 y páncreas: PSN1) en tres niveles de dilución (25 µg/mL, 5 µg/mL y 1 µg/mL), un blanco y un control. Para determinar la actividad se utiliza un colorante (sulforodamina) y los porcentajes que se obtienen como resultado están basados en la intensidad de color.

Criterio de selección de fracciones activas:

Al menos 3 líneas celulares: < -25%; < 25%; < 100% (para las tres diluciones respectivamente).

Una línea celular: < -50% a todas las concentraciones.

Análisis por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y espectrometría de masas (MS) de las fracciones activas.

Una vez obtenidos los resultados de citotoxicidad, procedemos a la separación por HPLC de las fracciones activas. Como punto de partida se analiza una pequeña porción de muestra con un método general. En este método general la fase móvil es una mezcla de acetonitrilo y agua, se empieza con un isocrático de 5 minutos con un 5% de acetonitrilo, seguido de un gradiente de 30 minutos desde el 5% al 100% y se termina con un isocrático de 5 minutos con un 100% de acetonitrilo con lo que nos aseguramos de abarcar el mayor rango de polaridad posible. Tanto el acetonitrilo como el agua tienen un 0,04% de ácido trifluoroacético (TFA). Las longitudes de onda utilizadas son 215 nm y 254 nm. A partir del espectro de HPLC-MS, se analizan las masas de cada pico del cromatograma y se comparan con las encontradas en la base de datos de la empresa, por si ya contiene moléculas conocidas.

Búsqueda de método de separación y purificación por HPLC.

En el caso de no contener moléculas conocidas, se busca un método de separación. Se emplean en principio cuatro longitudes de onda (215 nm, 254 nm, 350 nm y 450 nm) que abarcan un rango del UV al Visible. Se van ajustando las proporciones de acetonitrilo y agua, ya sea en isocrático o en gradiente, utilizando una columna analítica apropiada para la polaridad de la muestra, de forma que inicialmente haya una separación de picos adecuada para poder recoger cada pico por separado. Aquí los disolventes se preparan con un 0,1% de TFA, aunque siempre se realiza una prueba sin ácido porque en ocasiones puede producir degradación de los compuestos aislados.

Una vez hemos ajustado el método, es decir, cuando los tiempos de retención entre las señales se considera que tienen una separación suficiente como para permitir recoger cada pico de forma independiente, se comprueba que se obtienen los mismos resultados con la columna preparativa o semipreparativa que con la columna analítica. Estas columnas tienen mayor diámetro por lo que soportan un flujo mayor y más cantidad de muestra. Habitualmente se disuelve la muestra en metanol, aunque puede disolverse en otros disolventes compatibles con el HPLC como pueden ser acetonitrilo, H₂O o DMSO, a una concentración de 25 mg/mL. Se inyecta, se pone en marcha el método y se va recogiendo cada pico que teóricamente corresponderá a una molécula. Se continúa inyectando toda la muestra para fraccionarla del todo.

Ensayos de citotoxicidad

Cada una de las fracciones obtenidas en el HPLC se manda al departamento de screening para comprobar cuál de ellas contiene la molécula o moléculas con actividad citotóxica. De nuevo se ensaya frente a las 4 líneas celulares de tumores con 3 niveles de dilución y con los mismos criterios de actividad ya mencionados.

Resonancia magnética nuclear (RMN) y espectrometría de masas (MS). Elucidación de las moléculas.

Para poder elucidar la molécula es necesario saber su peso molecular, determinado por espectrometría de masas y obtener los espectros de resonancia magnética nuclear de protón y de carbono [9,10]. Primero a cada una de las fracciones obtenidas del HPLC se disuelven en 600 µL de metanol deuterado y se meten en tubos de resonancia para obtener los espectros. Teóricamente cada pico recogido debe corresponder con un compuesto puro.

Con los espectros de masas y los de resonancia se busca en bases de datos si la molécula ya existe, si existe una molécula semejante o si se trata de una molécula nueva. Si ya existe simplemente se busca en los artículos publicados los espectros y se comparan para corroborar que es esa molécula. Si no existe, se procede a la elucidación de la molécula apoyándose en espectros de resonancia en dos dimensiones (COSY, HSQC, HMBC y ROESY) con los que es posible sacar las relaciones entre los átomos.

Ensayos de citotoxicidad

Por último se realiza un ensayo de citotoxicidad de los compuestos puros de interés. Se ensaya frente a las mismas 4 líneas celulares que las fracciones pero usando diez concentraciones en lugar de tres preparadas como diluciones seriadas, además de un blanco y un control. Se construye una curva de dosis respuesta y se obtienen los parámetros GI50 (índice de crecimiento), TGI (inhibición de crecimiento) y LC50 (dosis letal) en mg/mL y, en caso de conocer el peso molecular, en concentración molar. Se considera que a partir de una concentración de 10⁻⁷ M el compuesto tiene una citotoxicidad interesante.

Resultados y discusión.

Estos resultados corresponden al ORMA 113481, la esponja *Axinyssa*.

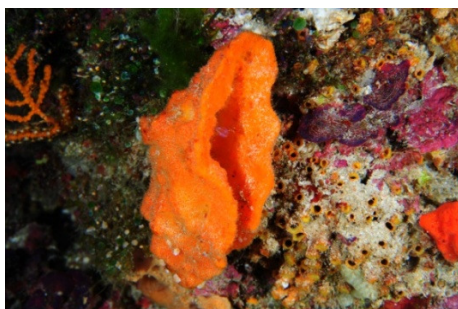


Figura 1: Imagen del organismo marino de partida, *Axinyssa*.

Muestras	Origen	Phylum	Organismo	Peso total
ORMA113481	Dili 03/2012	Porifera	Demospongiae	96 g

Tabla 2: Información del organismo.

Extracción

Para la extracción de este organismo se utilizó un volumen de mezcla de diclorometano y metanol (1:1) de 200 mL y se obtuvieron 3,35g de extracto orgánico y 350 mg de extracto acuoso.

Fraccionamiento

El extracto orgánico se fracciona siguiendo el procedimiento descrito en el apartado de materiales y métodos con una placa filtrante de diámetro interno de 6 cm y con gel de sílice RP18 a 4 cm de altura. El volumen utilizado de cada disolvente o mezcla de disolventes fue de 160 mL. Se obtuvieron 7 fracciones:

Fracción	RP1	RP2	RP3	RP4	RP5	RP6	RP7
Disolvente	H ₂ O	H ₂ O/MeOH (3:1)	H ₂ O/MeOH (1:1)	H ₂ O/MeOH (1:3)	MeOH	MeOH/CH ₂ Cl ₂ (1:1)	CH ₂ Cl ₂
Masa (mg)	2804,4	115,0	23,5	6,7	165,5	76,3	29,1

Tabla 3: Masa de cada fracción obtenida mediante fraccionamiento por cromatografía.

Ensayos de citotoxicidad.

Se enviaron a screening todas las fracciones orgánicas (RP) y el extracto acuoso (A) y se obtuvieron los siguientes resultados:

Pos	Sample	Extr	Description	Aliquot	Organism	Assay	Sel	Colon			Lung-NSCLC			Breast			Pancreas		
								HT29			A549			MDA-MB-231			PSN1		
								25	5	1	25	5	1	25	5	1	25	5	1
DP1FR/002418																			
19	ORMA113481	A	DILU-333	ORMA113481-QJ1-01/V001	Demospongiae	AT-SC 29/01/2013													
20	ORMA113481	RP	DILU-333	ORMA113481-QJ1-01/DM/ 001RP001	Demospongiae	AT-SC 29/01/2013													
21	ORMA113481	RP	DILU-333	ORMA113481-QJ1-01/DM/ 001RP002	Demospongiae	AT-SC 29/01/2013													
22	ORMA113481	RP	DILU-333	ORMA113481-QJ1-01/DM/ 001RP003	Demospongiae	AT-SC 29/01/2013													
23	ORMA113481	RP	DILU-333	ORMA113481-QJ1-01/DM/ 001RP004	Demospongiae	AT-SC 29/01/2013													
24	ORMA113481	RP	DILU-333	ORMA113481-QJ1-01/DM/ 001RP005	Demospongiae	AT-SC 29/01/2013	Active	-79.3	-24.9	18.3	-93.9	0.1	17.9	-95	-54.1	-21.9	-90.5	-74.9	-17.3
25	ORMA113481	RP	DILU-333	ORMA113481-QJ1-01/DM/ 001RP006	Demospongiae	AT-SC 29/01/2013		37.2	72.9	78.7	38.2	47.5	84.6	-0.5	89	69.2	18.3	59.2	77
26	ORMA113481	RP	DILU-333	ORMA113481-QJ1-01/DM/ 001RP007	Demospongiae	AT-SC 29/01/2013		106.2	92.9	90.1	114.3	118.4	101.1	67.4	103.8	86.4	101.5	100.3	101.8

Figura 2: Citotoxicidad de las fracciones orgánicas y del extracto acuoso.

La fracción activa según los criterios ya mencionados y la que se continuará purificando es la RP5.

Análisis por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y espectrometría de masas (MS) de las fracciones activas

En el método general se obtuvo el siguiente cromatograma del cual se comprueba que no tiene ninguna molécula que se encuentre en la base de datos de PharmaMar.

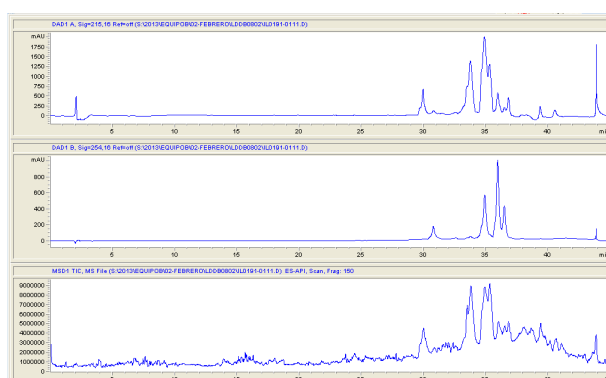


Figura 3: Espectros de HPLC-MS de la fracción activa, RP5.

A partir de éste, se busca el método de separación. Finalmente el método utilizado es un isocrático con un 65% de acetonitrilo durante 30 minutos, utilizando las longitudes de onda a las que absorben los compuestos: 215 nm y 254nm.

Una particularidad que tenía esta fracción es que disuelta en metanol se degradaba con el tiempo por lo que hubo que disolverla en acetonitrilo para poder separarla por HPLC. En la siguiente figura se puede ver que los espectros de acetonitrilo y de metanol no son iguales:

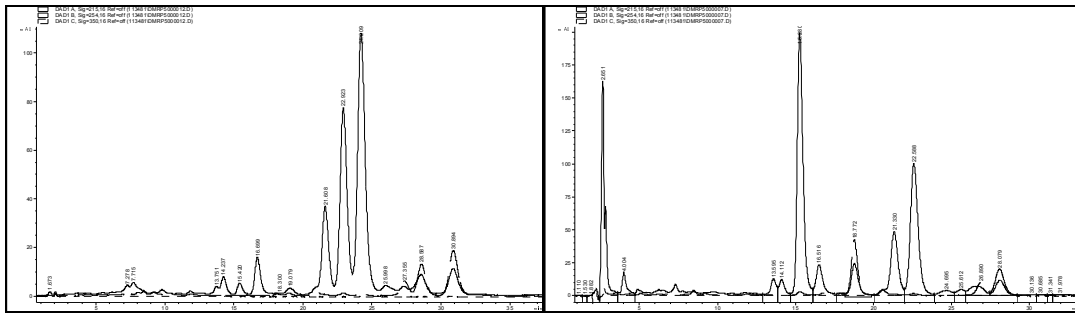


Figura 4: Cromatogramas con la muestra disuelta en acetonitrilo (izquierda) y en metanol (derecha).

Purificación por HPLC

Para purificar esta fracción se utilizó una columna XBridge preparativa, C18, 5 µm, con 19mm de diámetro y 150 mm de longitud. El flujo fue de 15 mL/min. Como fase móvil se utilizó CH₃CN (65%) /H₂O (35%) isocrático durante 30 minutos.

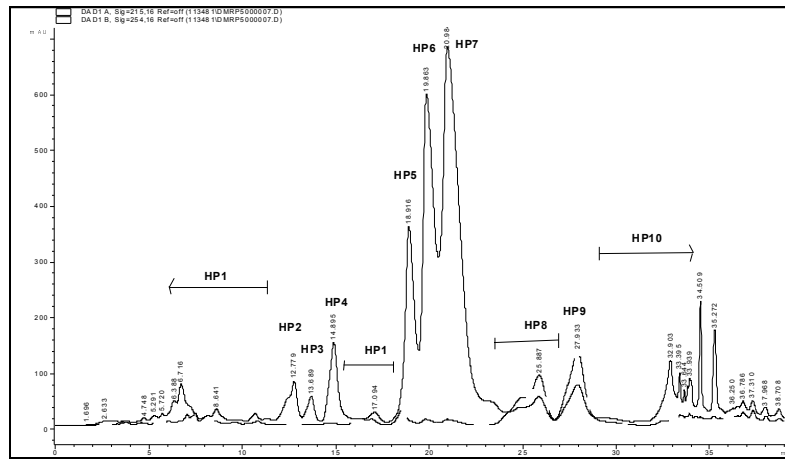


Figura 5: Cromatograma con un esquema de las distintas fracciones tomadas.

Fracciones	HP1	HP2	HP3	HP4	HP5	HP6	HP7	HP8	HP9	HP10
Masa (mg)	15.2	2.5	2.0	3.4	8.6	16.6	25.6	3.2	4.0	14.5

Tabla 5: Masa de las fracciones obtenidas por HPLC.

Ensayos de citotoxicidad.

Las diez fracciones de HPLC se envían al departamento de screening para determinar su actividad citotóxica, obteniendo los siguientes resultados.

Pos	Sample	Extr	Description	Aliquot	Organism	Assay	Sol	Colon		Lung-NSCLC		Breast		Pancreas					
								HT29	5	A549	5	MDA-MB-231	5	PSM1	5				
DPIFR/002445																			
68	ORMA113481	HPLC	DILU-333	ORMA113481-QUI-0101DM 001.RP0505HPLC001	Demospogiae	AT-SC 27/02/2013		37.8	87.7	110.2	69.3	113.9	104.1	87.1	119.2	114	22.4	99.6	104.1
69	ORMA113481	HPLC	DILU-333	ORMA113481-QUI-0101DM 001.RP0505HPLC002	Demospogiae	AT-SC 27/02/2013		30.9	86.2	94.6	75.3	116.3	113.3	76.9	104.6	96.5	6.2	101.3	108.3
70	ORMA113481	HPLC	DILU-333	ORMA113481-QUI-0101DM 001.RP0505HPLC003	Demospogiae	AT-SC 27/02/2013		119.3	103.6	114.9	99.4	125.3	111.4	118.5	116.9	105.6	84.3	100.8	100.8
71	ORMA113481	HPLC	DILU-333	ORMA113481-QUI-0101DM 001.RP0505HPLC004	Demospogiae	AT-SC 27/02/2013		3	66.1	85.8	16.6	83.3	100.3	11.3	93.9	97.2	-27.2	46	70.7
72	ORMA113481	HPLC	DILU-333	ORMA113481-QUI-0101DM 001.RP0505HPLC005	Demospogiae	AT-SC 27/02/2013		13.8	59.5	85.3	17.7	49.2	78	-42.8	78.5	102.8	-82.7	35.4	54.7
73	ORMA113481	HPLC	DILU-333	ORMA113481-QUI-0101DM 001.RP0505HPLC006	Demospogiae	AT-SC 27/02/2013		118.6	89.2	86.9	103.1	72.7	60.3	148.1	98.5	87.4	111.1	88.6	86.8
74	ORMA113481	HPLC	DILU-333	ORMA113481-QUI-0101DM 001.RP0505HPLC007	Demospogiae	AT-SC 27/02/2013		142.5	110.3	102.4	121.3	99.2	87.6	155.5	115.4	101.4	117.7	105.9	89.7
75	ORMA113481	HPLC	DILU-333	ORMA113481-QUI-0101DM 001.RP0505HPLC008	Demospogiae	AT-SC 27/02/2013		134.5	108.2	116.9	134.7	117.5	110.6	161	114.6	114	116.8	98.3	91.3
76	ORMA113481	HPLC	DILU-333	ORMA113481-QUI-0101DM 001.RP0505HPLC009	Demospogiae	AT-SC 27/02/2013		141.2	114.4	115.4	133.2	123.7	107.6	174.9	137.7	117.6	137	124.9	114.8
77	ORMA113481	HPLC	DILU-333	ORMA113481-QUI-0101DM 001.RP0505HPLC010	Demospogiae	AT-SC 27/02/2013		140.5	106.2	101.4	135	127.7	116.4	171.2	138.4	117.6	136.2	124.9	111.1

Figura 6: Citotoxicidad de las fracciones obtenidas por HPLC.

La actividad de estas fracciones es baja pero aún así se hicieron los espectros de resonancia magnética nuclear y de espectrometría de masas para determinar de qué moléculas se trata.

Resonancia magnética nuclear (RMN) y espectrometría de masas (MS). Elucidación de las moléculas.

Se obtienen los espectros de resonancia magnética nuclear y de espectrometría masas y se observa que los pesos moleculares de las fracciones HP5 y HP7 son 352,73 y 370, 74 respectivamente y al buscar con ChemBioFinder en la base de datos “antimarin” se determinó que corresponden a la Axinyssmide A y la Axinyssmide C por lo que se comparan los datos con el artículo original [11]. Como se trata de moléculas cloradas poseen una distribución isotópica muy característica debido a los isótopos Cl^{35} y Cl^{37} [12].

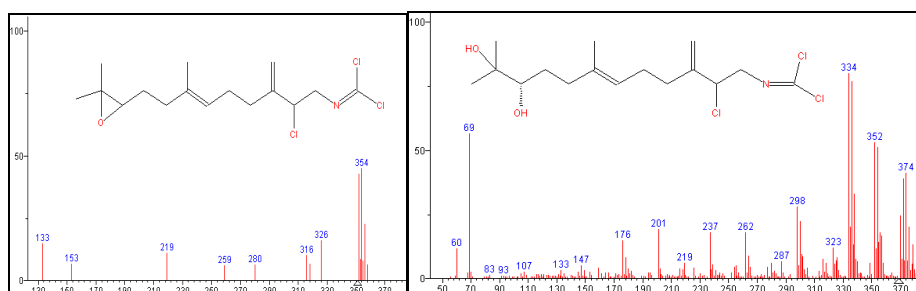


Figura 7: Espectros de Masas de la Axinyssmide A (izquierda) y la Axinyssmide C (derecha).

Átomo	Axinyssmide A		Axinyssmide C	
	$\delta H(ppm)$, m, J (Hz)	$\delta C(ppm)$	$\delta H(ppm)$, m, J (Hz)	$\delta C(ppm)$
1	3.87 (2H), m	60.18, t	3.86 (2H), m	60.19, t
2	4.72, dd (5.72, 7,88)	63.74, d	4.72, dd (5.93, 7,49)	63.70, d
3	-	147.21, s	-	147.19, s
4	2.22, 2.11, m	32.35, t	2.24, 2,09, m	32.41, t
5	2.22, 2.11, (2H), m	26.99, t	2.24, 2.09 (2H), m	26.95, t
6	5.21, m	124.88, d	5.22, m	125.57, d
7	-	136.17, s	-	135.58, s
8	2.33, 2.11, m	37.02, t	2.09, m	37.82, t
9	1.59 (2H), m	28.19, t	1.58 (2H), m	31.75, t
10	2.64, t	64.42, d	3.72, dd (6,28)	73.27, d
11	-	58.64, s	-	73.18, s
12	1.23 (3H), s	25.07, q	1.24 (3H), s	27.01, q
13	1.25 (3H), s	16.18, q	1.21 (3H), s	25.76, q
14	1.62 (3H), s	18.96, q	1.62 (3H), s	16.07, q
15	5.09, s; 5.23, s	115.18, t	5.10, s; 5.24, s	115.21, t
16	-	127.0, s	-	126.81, s

Tabla 7: Desplazamientos de los espectros de resonancia magnética nuclear de protón y carbono en CD_3CN .

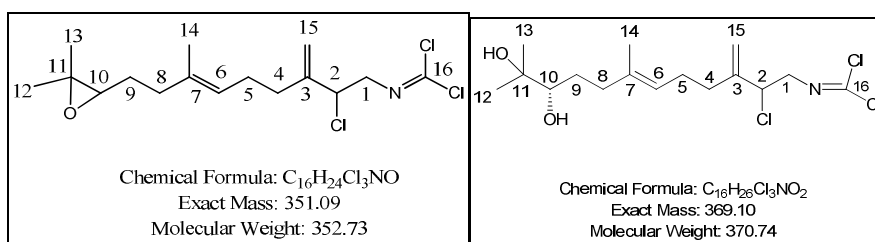


Figura 8: Fórmula química y peso molecular de la Axinyssmide A y la Axinyssmide C.

Ensayos de citotoxicidad

Estas moléculas se registran en la base de datos de PharmaMar y se realizan los últimos ensayos de citotoxicidad. Los valores de los parámetros mencionados en el apartado de materiales y métodos obtenidos a partir de las curvas de dosis-respuesta están en torno a 10^{-6} M. La citotoxicidad de este compuesto es moderada.

Pos	Compound	Shipment	Dil	External Ref	Aliquot	Assay	Lung-NSCLC		Colon		Breast		Pancreas	
							A549	Molar	HT29	Molar	MDA-MB-231	Molar	PSN1	Molar
DP1CP/000887														
57	PM120550 (LA0144) 1785LA120F6	Blak 08-2011	1:1	ORMA106286/ CP02 (Drug Discovery)	DP11264345/12	AT-CP 16/11/2012/4	GI50 6.8E+00	1.93E-05	3.8E+00	1.08E-05	5.5E+00	1.56E-05	6.4E+00	1.81E-05
							TGI 8.4E+00	2.38E-05	1.7E+01	4.82E-05	7.4E+00	2.10E-05	9.9E+00	2.81E-05
							LC50 9.5E+00	2.69E-05	> 1.0E+08	> 2.84E+02	> 1.0E+01	> 2.84E-05	1.2E+01	3.40E-05

Figura 9: Actividad citotóxica de la Axinyssmide A.

Pos	Compound	Shipment	Dil	External Ref	Aliquot	Assay	Lung-NSCLC		Colon		Breast		Pancreas	
							A549	Molar	HT29	Molar	MDA-MB-231	Molar	PSN1	Molar
DP1CP/000918														
21	PM130151 (LA0151) 1817LA120F5	DIII 03-2012	1:1	ORMA113481/ CP01 (Drug Discovery)	DP1/0198181/13	AT-CP 22/03/2013	GI50 3.6E+00	9.71E-06	2.5E+00	6.74E-06	3.8E+00	1.02E-05	4.0E+00	1.08E-05
							TGI 4.9E+00	1.32E-05	3.5E+00	9.44E-06	5.4E+00	1.46E-05	4.2E+00	1.13E-05
							LC50 7.0E+00	1.88E-05	5.1E+00	1.38E-05	7.7E+00	2.08E-05	4.5E+00	1.21E-05

Figura 10: Actividad citotóxica de la Axinyssmide C.

Discusión

Aquí se ha ilustrado un ejemplo de aislamiento, fraccionamiento y purificación de productos naturales marinos llegando hasta la elucidación de dos moléculas con actividad citotóxica. A lo largo de este proceso puede ocurrir que las fracciones pierdan actividad al purificarse o que sean moléculas conocidas como es el caso de las Axinyssmide A y C que además poseen una actividad moderada por lo que llegados a este punto se concluye el estudio de las mismas. El objetivo principal del departamento de Productos Naturales es descubrir nuevas moléculas con elevada actividad antitumoral que continuarán estudiándose. Buscando su síntesis para evitar tomar más muestras marinas, determinando el mecanismo de acción, estudiando los efectos de estas moléculas en modelos animales, llegando a ensayos clínicos y finalmente si se obtienen buenos resultados llegará al mercado como fármaco antitumoral.

Agradecimientos

A toda la gente de PharmaMar; en especial a mi tutora Laura Coello y a Elena Gómez, por su ayuda durante las prácticas y en la realización de la presente memoria, y en general a todo el Departamento de Productos Naturales. También a Verónica Guijarro por su apoyo.

Bibliografía

- Robert T. Greenlee, MPH, Taylor Murray, Sherry Bolden, Phyllis A. Wingo, PhD, MS. 2000. Cancer Statistics. CA Cancer J Clin. 50. 7-33.
- Cáncer 2013 (26 Junio). In Organización Mundial de la Salud. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
- John W. Blunt, Brent R. Copp, Murray H.G. Munro, Peter T. Northcote and Michele R. Prinsep. 2003. Marine natural products. Nat. Prod. Rep. 20. 1-48.
- T. Luke Simmons, Eric Andrianasolo, Kerry McPhail, Patricia Flatt, and William H. Gerwick. 2005. Marine natural products as anticancer drugs. Mol Cancer Ther. 4 (2). 333-342.

5. Alan L. Harvey. 2008. Natural products in drug discovery. *Drug Discovery Today*. 13 (19-20). 894-901.
6. Mark S. Butler. 2004. The Role of Natural Product Chemistry in Drug Discovery. *J.Nat. Prod.* 64. 2141-2153.
7. Amy E. Wright. Isolation of Marine Natural Products. 1991. *Methods in Biotechnology*. (4). 365-408.
8. Sherif S. Ebada, Ru Angelie Edrada, Wenhan Lin, Peter Proksch. 2008. Methods for isolation, purification and structural elucidation of bioactive secondary metabolites from marine invertebrates. *Nature Protocols*. 12 (3). 1820-1831.
9. Maja Lambert, Jean-Luc Wolfender, Dan Stark, S. Brogger Christensen, Kurt Hostettmann, and Jerzy W. Jarozewski. 2007. Identification of Natural Products Using HPLC-SPE Combined with CapNMR. *Anal. Chem.* 79. 727-735.
10. Howard L. Constant and Chris W.W. Beecher. 1995. A method for the dereplication of natural product extracts using electrospray HPLC/MS. *Natural Products Letters*. 6. 193-196.
11. Hiroshi Hirota, Tatsufumi Okino, Erina Yoshimura, and Nobuhiro Fusetani. 1998. Five New Antifouling Sesquiterpenes from Two Marine Sponges of the Genus *Axinyssa* and Nudibranch *Phyllidia pustulosa*. *Tetraedron*. 54. 13971-13980.
12. Antonio Herrena Fernández and Roberto Martínez Álvarez. 1998. *Tablas para la Determinación Estructural por Métodos Espectroscópicos*. Barcelona: Springer-Verlag Ibérica. 408 pp.