

ESTUDIO DE UN TETRAPRENILTOLUQUINOL
MERODITERPENOID AISLADO DEL ALGA SARGASSUM
MUTICUM

ESTUDO DUN TETRAPRENILTOLUQUINOL MERODITERPENOID
AISLADO DA ALGA SARGASSUM MUTICUM

STUDY OF A TETRAPRENYLTOLUQUINOL MERODITERPENOID
ISOLATED FROM THE ALGAE SARGASSUM MUTICUM



UNIVERSIDADE DA CORUÑA



Marcos Zamora Amengual
Junio 2021



Facultad de Ciencias de la Universidad de A Coruña

Estudio de un tetraprenyltoluquinol meroditerpeno aislado del alga *Sargassum muticum*

Estudo dun tetraprenyltoluquinol meroditerpeno aislado da alga *Sargassum muticum*

Study of a tetraprenyltoluquinol meroditerpenoid isolated from the algae *Sargassum muticum*

El presente trabajo de final de Máster, presentado por el graduado en biología MARCOS ZAMORA AMENGUAL, ha sido realizado en el laboratorio de química orgánica QUIMOLMAT del Centro de Investigaciones Científicas Avanzadas (CICA) de la Universidade da Coruña bajo la dirección de los abajo firmantes, que autorizan su presentación ante el Tribunal Evaluador y por tanto y para que así conste firman la presente.

Firmado en A Coruña el 2 de julio de 2021:

Jaime Rodríguez González	Carlos Jiménez González	 Marcos Zamora Amengual
--------------------------	-------------------------	---

1. Contenido

2. RESUMEN	IV
• 2.1. CASTELLANO.....	IV
• 2.2. GALEGO.....	IV
• 2.3. ENGLISH	V
3. INTRODUCCIÓN	1
• 3.1. <i>SARGASSUM MUTICUM</i>	1
• 3.2. TERPENOS	5
3.2.1. <i>Diterpenos y Meroterpenos</i>	7
• 3.3. ESTUDIOS PREVIOS.....	7
• 3.4. ESTUDIO DE UN MERODITERPENOS POR BALBOA ET AL. (2015)	9
4. OBJETIVOS	10
5. MATERIALES Y MÉTODOS	11
• 5.1. OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.....	11
• 5.2. EXTRACCIÓN	12
• 5.3. FRACCIONAMIENTO	12
• 5.4. FRACCIONAMIENTO DE LA FDCM Y FHEX POR POLARIDAD	14
• 5.5. PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA EN HPLC	15
6. RESULTADOS	16
7. DISCUSIÓN.....	27
8. CONCLUSIONES	29
9. BIBLIOGRAFÍA	29

2. Resumen

2.1. Castellano

El alga parda *Sargassum muticum* es una especie invasora que puebla gran parte de las costas europeas. Esto la convierte en un problema medioambiental difícil de solucionar, sin embargo, su análisis bioquímico podría descubrirnos metabolitos secundarios comercializables que la convertirían en una fuente de ingresos y que ayudarían a su control en las costas en las que se la considera una especie invasora. En este trabajo, se ha recolectado el alga que fue extraída con un disolvente orgánico para dar un extracto. El fraccionamiento de dicho extracto permitió detectar la presencia de un meroditerpeno cuya estructura química se conoce parcialmente y que se ha estudiado previamente presentando propiedades fotoprotectoras. Se realizaron intentos de aislamiento con el fin de estudiar su estructura mediante técnicas de RMN.

Palabras Clave:

Sargassum muticum, resonancia magnética nuclear, meroditerpeno, TLC-MS, espectrometría de masas.

2.2. Galego

O alga parda *Sargassum muticum* é unha especie invasora que poboa gran parte das costas europeas. Isto convérteas nun problema ambiental difícil de solucionar, con todo, a súa análise bioquímica podería descubrirnos metabolitos secundarios comercializables que a converterían nunha fonte de ingresos e que axudarían ao seu control nas costas nas que lla considera unha especie invasora. Neste traballo, colleitouse o alga que foi extraída cun disolvente orgánico para dar un extracto. O fraccionamento do devandito extracto permitiu detectar a presenza dun meroditerpeno cuxa estrutura química coñécese parcialmente e que se estudou previamente presentando propiedades fotoprotectoras. Realizáronse intentos de illamento co fin de estudar a súa estrutura mediante técnicas de RMN.

Palabras Clave:

Sargassum muticum, resonancia magnética nuclear, meroditerpeno, TLC-MS, espectrometría de masas.

2.3. English

The brown seaweed *Sargassum muticum* is an invasive species that inhabits a large part of the European coasts. This makes it a difficult environmental problem to solve, however, its biochemical analysis could reveal valuable secondary metabolites that would make it a source of income, and that would help to control its growth on the coasts where it is considered an invasive species. In this study, the collected alga was extracted with an organic solvent, and further fractionation and chromatographic purification made possible the detection of a meroditerpene whose chemical structure is partially known, and that has been previously studied showing photoprotective properties. Isolation attempts were made in order to study its structure by NMR techniques.

Key Words:

Sargassum muticum, nuclear magnetic resonance, meroditerpenoid, TLC-MS, mass spectrometry.

3. Introducción

3.1. *Sargassum muticum*

Sargassum muticum es un alga parda originaria de Japón, descrita por Yendo en 1907 (Norton et al. 1977) como *Sargassum kjellmanianum* forma *muticum* en base a diferencias morfológicas y ecológicas presentes con respecto a *S. kjellmanianum*. Posteriormente, en 1955, Fensholt reconsideró esta forma como suficientemente diferenciada de *S. kjellmanianum* separándola en una especie propia y denominándola finalmente como *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt. (Critchley 1983, Davison 2009)



Figura 1 *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt en un fondo rocoso; donde se pueden observar las láminas y las vesículas de aire del alga. Imagen tomada por Judith Oakley y extraída de <https://www.marlin.ac.uk/species/detail/1477>

S. muticum es un miembro de la clase Phaeophyceae o algas pardas, del orden de las algas fucales. Es de color marrón pálido que puede virar hacia el naranja o incluso al amarillo, si el alga está expuesta a excesiva luz solar o a temperaturas elevadas. El alga se subdivide en dos estructuras principales; un tallo o eje central y una serie de hojas o láminas que nacen a partir del meristemo apical del tallo. El tallo, que tiene unos 5 centímetros de longitud y de diámetro, es la estructura perenne de la planta y es con la que el alga se adhiere al sustrato. Las hojas o láminas, que conforman el 95% de la biomasa del alga, nacen desde el ápice del tallo y son una estructura estacional que se pierde al final del verano. Como estructuras secundarias, *S. muticum* presenta una serie de vesículas de aire que le proporcionan flotabilidad y que elevan las láminas del alga hacia la superficie. También presenta unos receptáculos reproductivos que aparecen en los ejes de las láminas del alga, miden entre 0.5

y 2 centímetros, y se vuelven de un marrón oscuro a medida que maduran. (Davison 2009, Fernández 2020)

En la actualidad, existen 70 especies diferentes del género *Sargassum* y el hábitat de todas ellas se encuentra en las costas asiáticas del Océano Pacífico. El hábitat natural de *S. muticum* se extiende desde el sudeste asiático hasta Rusia, incluyendo Japón y recorriendo todas las costas del pacífico chino y ruso. Dentro de esta región, la especie *S. muticum* es un alga inocua y poco común, que está entre las más pequeñas de su género, midiendo entre 75 y 150 centímetros de largo. (Davison 2009)

Sin embargo, en las últimas décadas, *S. muticum* se ha convertido en un alga de interés mundial a raíz de su introducción accidental en las costas del Pacífico norteamericanas, donde fue descubierta por primera vez por Fensholt en la Columbia Británica en 1955 y desde donde se ha extendido hasta cubrir un área de costa de más de 1500 km. (Norton et al. 1977) El 17 de febrero de 1973, también se descubrió en las costas de Inglaterra, en la Isla de Wight, desde donde se ha extendido al resto de Europa. Esta rápida expansión ha supuesto que se formen una gran cantidad de colonias permanentes de *S. muticum* en las costas europeas, tanto en el Océano Atlántico como en el Mar Mediterráneo (Ilustración 2). (Rueness 1989, Norton et al. 1977) La primera aparición del alga en aguas españolas se recogió en Guetaria (Guipúzcoa, País Vasco) y poco después, fue encontrada en la Ría de Arousa (Pontevedra, Galicia). Su expansión en los años siguientes, por las costas



Figura 2 Distribución actual de *Sargassum muticum* en las costas europeas. Datos e ilustración obtenidos del Ocean Biodiversity Information System <https://obis.org/taxon/494791>

españolas, siguió la misma tendencia y agresividad que la observada en otros países europeos. (Fernández et al. 1990)

Esta expansión se puede dividir en dos etapas principales, una primera en la que la población se asienta y se desarrolla lentamente y un segundo periodo de rápida expansión. (Fernández et al. 1990) Las áreas potencialmente colonizables por *S. muticum* están limitadas por la fragilidad del alga frente a la exposición al aire, la desecación e insolación en verano y a la congelación en invierno. (Davison 2009) Esto propició que las primeras zonas colonizadas por *S. muticum* fuesen pozas de marea altas y que una vez asentada en estas, colonizase también pozas de marea bajas e intermedias. (Fernández et al. 1990, Fernández 2020, Davison 2009)

Esta dispersión de *Sargassum muticum* a nivel mundial ha sido propiciada por el ser humano mediante su introducción en nuevos territorios, a través de la importación de especies marinas de interés comercial, en especial por la trasplatación de la ostra japonesa *Crassostrea gigas*. Algunas algas podrían haber sido introducidas ancladas a las conchas de estas ostras o también se cree que podrían haber sido utilizadas como material de embalaje en los cargamentos de *C. gigas* (Rueness 1989). Otras posibles vías de importación involuntaria pudieron ser, adherida al fondo de buques de carga o en el interior de las cámaras de agua de lastre de buques mercantes. (Wallentinus 2000)

Una vez introducida, *Sargassum muticum* ha demostrado tener una gran capacidad de adaptación y unas cualidades muy agresivas que la han ayudado a proliferar en estos nuevos ecosistemas. Entre las características que presenta como alga invasiva están; su elevada velocidad de crecimiento (hasta 4 cm al día), su elevada tolerancia a un rango muy variado de temperaturas, que descienden hasta los -1°C en los tallos perennes y que rondan entre los 5 y 25°C para las láminas estacionales del alga, y de salinidades, desde el 20‰ hasta el 9‰. (Norton et al. 1977) También es capaz de vivir en una gran variedad de sustratos, desde suelos arenosos hasta zonas rocosas o fondos de piedras pequeñas donde otros macrófitos no son capaces de anclarse, lo que le permite colonizar y explotar rápidamente cualquier espacio abierto que no esté cubierto por otras especies. (Davidson 2009, Fernández 2020)

Además, el alga es monoica y autofértil lo que le permite colonizar áreas remotas de manera mucho más eficiente. Por otro lado, las vesículas de aire que presenta *S. muticum* para mejorar su flotabilidad, también podrían ayudar a que fragmentos del alga se dispersasen,

flotando a la deriva, colonizando así nuevos ambientes muy alejados. Todas estas características son las que han hecho que *Sargassum muticum*, una vez introducida en América y Europa, haya conseguido colonizar territorios muy amplios en muy poco tiempo. (Rueness 1989)

Esta gran adaptabilidad y capacidad de colonización han hecho que se considere a *Sargassum muticum* como una especie activamente invasora, con un elevado potencial de causar un impacto negativo en la biodiversidad de los ecosistemas colonizados. Y, aunque se ha visto, en estudios más recientes, que la llegada de *S. muticum* ha repercutido en una pequeña reducción de la abundancia de otras especies nativas que comparten su mismo hábitat como *Gelidium spinosum* y *Bifurcaria bifurcata* (Fernández 2020), también se ha argumentado que el ciclo de colonización de *S. muticum* presenta dos etapas bien diferenciadas, una inicial de gran explosividad y una segunda en la que el alga se asienta dentro del hábitat, (Fernández et al. 1990) tras la cual el daño causado por el alga en el ecosistema se vuelve despreciable. (Fernández 2020)

Aun así, *S. muticum* está clasificada en la demarcación Sud-Atlántica como una especie invasora (Mapama 2013) y, por ello, se han llevado a cabo programas para su control y erradicación, aunque sin obtener resultados debido a su elevado coste. Una alternativa a estos planes de erradicación podría ser la explotación de *S. muticum*, tanto como fuente de biomasa, como materia prima para productos farmacéuticos, lo que promovería su recolección y, por lo tanto, su control. (Milledge et al. 2016, Pereira et al. 2021)

La explotación de *Sargassum muticum* para su utilización en la fabricación de productos farmacéuticos parece la opción más factible, ya que las macroalgas son una fuente natural de antioxidantes, carotenoides, fenoles y anticancerígenos. Todos estos compuestos provienen del metabolismo secundario de las algas y se ha demostrado que muchos de ellos presentan actividades con potencial de aplicación terapéutica. (Milledge et al. 2016) El 53% de los metabolitos secundarios de las algas con interés para la industria farmacéutica pertenecen al grupo de los terpenos, al ser estos unos compuestos con una gran variedad de bioactividades y funciones biológicas, que presentan un gran potencial en el descubrimiento de nuevos fármacos. (Leal et al. 2013)

3.2. Terpenos

Los terpenos o terpenoides son un grupo de metabolitos secundarios que se encuentran en todos los organismos vivos en particular en las plantas superiores. Aunque los animales también contienen terpenos incorporados al consumir plantas. (Eggersdorfer 2000) Por ello, casi todos los alimentos naturales contienen terpenos y terpenoides. (Wagner et al. 2003) Los terpenos se descubrieron por primera vez como hidrocarburos con dobles enlaces en la trementina y es de esta planta de donde deriva su nombre (en inglés, turpentine), aunque también se les conoce como isoprenoides, al estar formados por unidades de 5 átomos de carbono o isoprenos. (Dev 1989, Eggersdorfer 2000, Ibáñez 2013, Ludwiczuk et al. 2017)

La abundancia y ubicuidad de los terpenos radica en la gran variedad de estructuras distintas que aunque normalmente suelen ser hidrocarburos cíclicos insaturados (Wagner et al. 2003), pueden aparecer como compuestos acíclicos, heterocíclicos, o como mono-, bi-, tri-, tetra- o pentacíclicos. (Eggersdorfer 2000) En la naturaleza, los terpenos además pueden aparecer tanto libres como subestructuras formando parte de otros compuestos más complejos, siendo estos últimos los que presentan mayor funcionalidad. (Dev 1983)

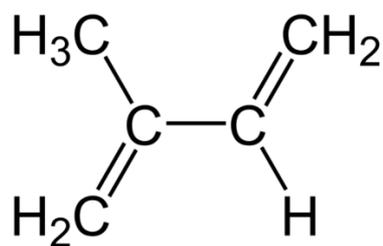


Figura 3 Estructura del isopreno, subunidad básica de los terpenos. ilustración obtenida del artículo, Isopreno: estructura, propiedades, aplicaciones de Gabriel Bolívar <https://www.lifeder.com/isopreno/>

A pesar de su gran variedad, la biosíntesis de los terpenos sigue siempre el mismo patrón, basado en la descarboxilación e isomerización de subunidades de isopreno (C5). (Eggersdorfer 2000) Esta síntesis sigue la regla del isopreno que se basa en la estructura del ácido abiético para inferir que la biosíntesis de los terpenos ocurriría mediante la unión de isoprenos cabeza-cola. (Ruzicka 1953) Desde entonces, se han observado terpenos que rompen esta regla por tener un número de carbonos que no es múltiplo de 5 y que se conocen como no derivados si tienen menos carbonos de los que deberían o homo derivados si

tienen más átomos de carbono. Estos terpenos parecen surgir a partir de terpenos completos que se modifican en diversas rutas y procesos metabólicos. (Dev 1989)

Esta variabilidad hace que los terpenos sean posiblemente el grupo más grande de metabolitos secundarios, que cuenta con más de 7500 estructuras bien definidas, pero que en total podría contar con entre 15000 y 20000 estructuras distintas. (Dev 1989, Wagner et al. 2003) Dentro de este grupo tan amplio y diverso, los terpenos se dividen de acuerdo con su estructura, definida por el número de unidades de isopreno que contiene (Eggersdorfer 2000).

Clasificación	Nº de átomos de carbono	Nº de unidades de isopreno
Hemiterpenoides	5	1
Monoterpenoides	10	2
Sesquiterpenoides	15	3
Diterpenoides	20	4
Sesterpenoides	25	5
Triterpenoides	30	6
Tetraterpenoides	40	8
Politerpenoides	> 40	> 8

Figura 4 Clasificación de los terpenos según el número de átomos de carbono o unidades de isopreno que los conforman

Estos compuestos, han suscitado siempre un gran interés y se han estudiado en profundidad debido a la gran cantidad de procesos naturales en los que intervienen y a su gran diversidad funcional que se puede traducir en una gran posibilidad de aplicaciones industriales y farmacéuticas. (Eggersdorfer 2000, Ludwiczuk et al. 2017) En la naturaleza, los terpenos están implicados en muchos procesos biológicos, como la interacción entre plantas, animales y microorganismos como agentes de defensa, feromonas, filotaxinas o señales moleculares. (Wagner et al. 2003) Existen también terpenos implicados en procesos esenciales como la cadena lateral de la clorofila en plantas que consiste en un diterpeno. (Dev 1989)

En cuanto a sus aplicaciones industriales, los terpenos se utilizan en la producción de resinas y como disolventes, aunque su principal uso es la fabricación de perfumes. (Eggersdorfer 2000) Aunque su mayor potencial se encuentra en la farmacología, donde se han investigado muchas aplicaciones terapéuticas de los terpenos en enfermedades como el cáncer de piel, la psoriasis, como antimicrobianos, y como supresores del crecimiento de células cancerígenas. (Wagner et al. 2003, Ludwiczuk et al. 2017)

3.2.1. Diterpenos y Meroterpenos

De entre los terpenos, los diterpenos son uno de los grupos más estudiados ya que muchos de ellos poseen efectos beneficiosos para la salud, como los retinoides, que son terpenos derivados de la vitamina A. (Wagner et al. 2003)

Los diterpenos son un subgrupo heterogéneo de terpenos formados por 4 subunidades de isopreno que contienen 20 átomos de carbonos. Todos ellos se biosintetizan a partir del precursor geranilgeraniol. Se pueden subclasificar como lineales, bicíclicos, tricíclicos, tetracíclicos, pentacíclicos o macrocíclicos dependiendo de la estructura que conforme su esqueleto hidrocarbonado. También pueden sufrir modificaciones en las etapas tardías de la síntesis dando lugar a estructuras químicas más complejas (Wagner et al. 2003, Ludwiczuk et al. 2017).

Por otro lado, los meroterpenos son compuestos que presentan un terpeno como parte de su estructura, sirviendo como esqueleto hidrocarbonado del compuesto. Estos terpenos se forman mediante una biogénesis mixta que une este terpeno con otras unidades procedente de otras rutas biogénicas, generalmente con un fragmento aromático alquilado (Dev 1989).

3.3. Estudios Previos

Recientemente, se han realizado varios estudios previos sobre distintos compuestos químicos de las algas pardas y sus funciones biológicas. Estos estudios se han centrado principalmente en la aplicación de estas algas o bien de una forma terapéutica, o como alimento funcional (Alves et al. 2018). Esto persigue, tanto el control de estas algas en las zonas en las que se las considera especies invasoras, como el descubrimiento de nuevos compuestos con potencial para convertirse en fármacos (Pinteus et al. 2018).

Las algas son organismos ideales a la hora de buscar nuevos fármacos en parte gracias a su gran plasticidad fisiológica y morfológica, que las ayuda a adaptarse muy bien a una gran diversidad de ambientes. Esto tiene como consecuencia que los metabolitos secundarios que producen son muy diversos y varían no solo entre especies sino también entre individuos dependiendo de las condiciones del medio. Esta gran variabilidad de metabolitos secundarios y compuestos con potencial bioactivo es lo que hace de las algas organismos ideales a la hora de buscar nuevos fármacos (Pinteus et al. 2018).

Varios de estos estudios se han centrado en las algas pardas, en concreto las especies pertenecientes al género *Sargassum* spp., al ser este un género de algas pardas que ya se utilizaba en la Medicina Tradicional China hace más de 2000 años (Rushdi et al. 2020). Estudios modernos han demostrado que este género produce una multitud de metabolitos secundarios, como terpenos, esterol o polifenoles, que presentan una gran variedad de actividades biológicas, siendo las principales, la antioxidante, la antimicrobiana y la antitumoral (Pinteus et al. 2018, Rushdi et al. 2020).

En cuanto a la especie *Sargassum muticum*, se han realizado varios estudios sobre esta especie en particular con diversos enfoques. En 2017, en un trabajo de Balboa y el grupo de investigación en donde se ha realizado el presente trabajo de fin master, se estudió la utilización del potencial antioxidante de *S. muticum* como un posible conservante en la preparación de cosméticos. Otros trabajos, como el de Park et al. de 2015, han investigado la viabilidad de utilizar *S. muticum* como un suplemento alimenticio o como un alimento funcional bioactivo. Este estudio concluyó que la adición de pastillas de *S. muticum* a la dieta normal mostraba beneficios hepáticos además de disminuir la fatiga y el estrés. Estos efectos se relacionaron con ciertos compuestos bioactivos del alga como los meroterpenos o las floroxantinas.

Por último, dos estudios, se centran en los terpenos y en concreto en un tetraprenyltoluquinol meroterpeno del alga *S. muticum* como un fármaco potencialmente efectivo contra distintas patologías, gracias a sus propiedades antioxidantes. En un estudio de Ferdous et al. de 2021, se habla de la utilización de este compuesto en varias terapias contra el cáncer basándose en la capacidad de este compuesto de proteger frente al daño oxidativo. En otro estudio que se ha realizado sobre este compuesto por Balboa et al. en 2015, propone su utilización como agente fotoprotector para mitigar el daño causado en la piel por la exposición a los rayos UV.

3.4. Estudio de un meroditerpeno por Balboa et al. (2015)

El artículo publicado por Balboa et al. en 2015 fue el punto de partida del presente trabajo para realizar este estudio, ya que en él se describe el aislamiento del tetrapreniltoluquinol meroditerpeno que queremos extraer del alga *Sargassum muticum*.

En esa publicación, se detallan las técnicas de fraccionamiento junto con espectrometría de masas y RMN necesarias para aislar, purificar e identificar del tetrapreniltoluquinol meroditerpeno objetivo de este trabajo. Ese estudio incluye, además, la actividad fotoprotectora del compuesto in vitro e in vivo, su viabilidad a la hora de ser utilizado en la industria cosmética y farmacéutica y la toxicidad del meroditerpeno en células en cultivo.

La separación de los compuestos del extracto de las algas de la especie *S. muticum* recogidas en la costa norte de Galicia (España) trae consigo el aislamiento de una mezcla epimérica de un tetrapreniltoluquinol meroditerpeno en la fracción de diclorometano. Una vez obtenido este compuesto, se estudia su estructura utilizando espectroscopía de RMN y espectroscopia de masas. También se estudió su capacidad fotoprotectora en células en cultivo irradiadas con luz UV, se observó que este meroditerpeno conseguía disminuir entre un 9.1% y un 20.6% la generación intracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas por esta irradiación de luz UV. Por último, se estudió la toxicidad de este compuesto en células humanas, y se concluyó que no generaba ningún tipo de toxicidad en fibroblastos en cultivo.

Las conclusiones del estudio fueron que *Sargassum muticum* es una posible fuente de compuestos antioxidantes y fotoprotectores capaces de reducir el estrés oxidativo inducido por la radiación ultravioleta, y que al ser estos compuestos no tóxicos para las células humanas, pueden presentar un uso potencial en la creación de productos cosméticos anti edad y fotoprotectores.

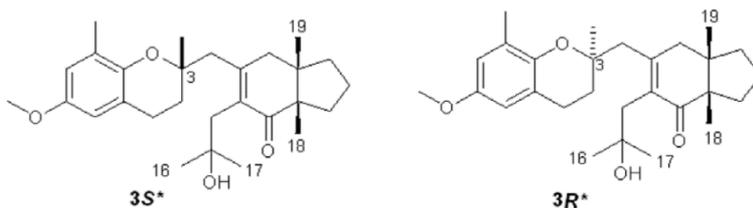
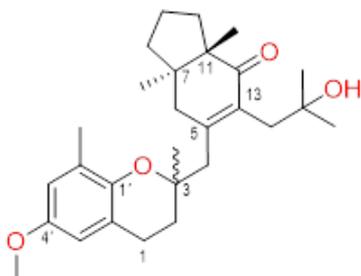


Figura 5 Estructuras bidimensionales del meroditerpeno estudiado en el trabajo de Balboa et al. de 2015 (Balboa et al. 2015)

4. Objetivos

Reaislar el meroditerpeno **1** de *Sargassum muticum* para poder determinar su estructura bidimensional mediante estudios de RMN y espectrometría de masas. Para ello se propusieron varios objetivos específicos.



1

1. Recolección del alga en época de máxima producción de este tipo de metabolitos
2. Preparar los extractos secos para el aislamiento de los meroditerpenos
3. Fraccionamiento de los extractos con sistemas de disolventes de diferentes polaridades
4. Detección mediante LC-MS y espectroscopia de RMN del meroditerpeno objetivo
5. Purificación de las fracciones ricas en meroditerpenos y localizar el compuesto **1**
6. Estudio de los espectros de RMN del compuesto **1**

5. Materiales y Métodos

Este Trabajo de fin Master está basado en el trabajo realizado por miembros del grupo de investigación y descrito por E.M. Balboa et al. en 2015, en el que se aísla un tetraprenyltoluquinol meroditerpeno a partir del alga parda *Sargassum muticum* y se estudia su actividad fotoprotectora en células irradiadas con luz ultravioleta.

Se realizaron estudios de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) a lo largo de las distintas etapas de fraccionamiento, para poder guiarnos en el aislamiento del meroditerpeno que estábamos buscando. Todos los espectros de RMN se realizaron en un equipo de 300 MHz Bruker (AVANCE 300, Bruker, Massachusetts, EEUU) y otro equipo de 500 MHz con criosonda dual $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ ó con sonda de banda ancha BBI (AVANCE 500, Bruker, Massachusetts, EEUU).

Para la determinación de los pesos moleculares de los compuestos se utilizó la técnica de espectrometrías de masas (MS) acoplada a un HPLC (LC-MS) o sobre un cromatofolio de capa fina (TLC-MS). El sistema LC/MS consistió en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo unido a un HPLC Agilent 1200 con bomba binaria, inyector automático, horno de columnas termostatazado e ionización ESI y APCI (API 3200 (MSQ PLUS, Thermo Scientific, Massachusetts, EEUU). El sistema TLC-MS estaba constituido por un CAMAG INTERFACE 2 conectado a un espectrómetro Bruker Amazon Toxtyper.

5.1. Obtención y Preparación de la Muestra

Durante todas las etapas del trabajo, se utiliza el alga parda *Sargassum muticum* que se recolectó, en agosto de 2020 en una playa rocosa del norte de Galicia, España. (Playa de Bastiagueiro Pequeño, Oleiros, A Coruña // 43° 20' 37.2'' N, 8° 21' 19.4'' W)

Todos los especímenes recolectados se lavaron con agua dulce y se secaron al sol antes de proceder a su secado en horno a 50°C durante 72 horas. Para incrementar la superficie de contacto de las muestras, las algas secas se trituraron hasta conseguir un polvo grueso similar al café molido. Este alga pulverizada se preservó en frío a 5°C hasta su utilización.

5.2. Extracción

El pulverizado seco de *S. muticum* se extrajo con diversos disolventes orgánicos con el fin de extraer los compuestos presentes en el alga. Este proceso de extracción se realizó en dos veces, una inicial, partiendo de 100 g de pulverizado de *S. muticum* y una segunda extracción, para la cual se utilizaron 500 g de alga pulverizada. Esta repetición se realizó, al observar que las cantidades de extracto obtenidas en la primera extracción de 100 g eran demasiado pequeñas. En ambos casos, los procesos de extracción y fraccionamiento fueron idénticos y solo varió la escala de los experimentos.

Los procesos de extracción comenzaron con la introducción del pulverizado de *S. muticum* en un balón de 1 litro, al que se le añadió metanol en una relación sólido/líquido 1:10 (p/v) con respecto al pulverizado del alga. Esta mezcla se extrajo tres veces a 65°C en agitación durante 3 horas empleando un agitador magnético con calefacción (ARE, VELP Scientifica, Italia). Una vez transcurridas las 3 horas de cada una de las extracciones, se separaron las fases líquida y sólida mediante filtración con algodón natural y el extracto líquido se concentró, evaporando el metanol utilizando un rotavapor (BUCHI Labortechnik, Suiza) bajo en vacío a 45°C. El extracto seco obtenido a partir de estas dos extracciones fue de 16.158 g y 37.971 g respectivamente, dando como resultado total 54,129 g de extracto seco.

Este extracto seco de *S. muticum* se disolvió, para poder continuar con el proceso de extracción, añadiéndole una mezcla de metanol//agua en proporción 1:10 y manteniendo esta mezcla en agitación, en un agitador magnético con calefacción (ARE, VELP Scientifica, Italia), a 36° C durante 24 horas.

Esta dilución del extracto seco se realizó de dos maneras distintas para la primera y la segunda extracción. En la primera extracción, se diluyeron los 16.158 g de extracto seco obtenidos, en 2 L de solución de metanol/agua. Este volumen final resultó ser demasiado elevado y por ello se redujo mediante la evaporación en vacío del disolvente utilizando un rotavapor (BUCHI Labortechnik, Suiza) hasta obtener un volumen final de 450 ml. En la segunda extracción, los 37.971 g de extracto seco obtenidos se diluyeron en 1 L de diluyente metanol/agua (1:10).

5.3. Fraccionamiento

Este extracto de la fracción de metanol diluido en metanol//agua (1:10) se extrajo cuatro veces más con disolventes orgánicos de polaridad ascendente. Los disolventes utilizados fueron, hexano (Hex), diclorometano (DCM), acetato de etilo (AcEt) y n-butanol (n-But). Se realizaron tres extracciones con un volumen de 400ml de cada uno de los disolventes, obteniendo un total de 1,2L de extracto de cada una de las fracciones. Tras cada una de estas extracciones, el disolvente se evaporó mediante vacío a 40°C en un rotavapor (BUCHI Labortechnik, Suiza).

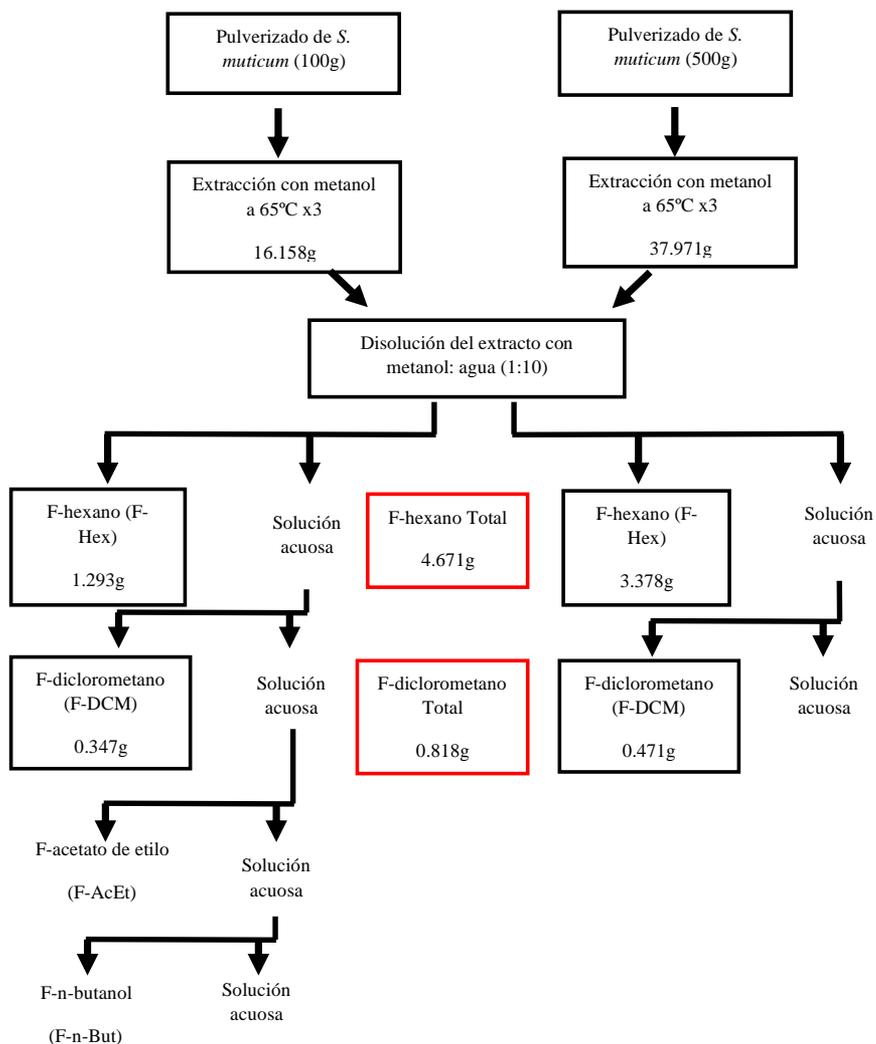


Figura 6 Esquema de las etapas de los fraccionamientos realizados sobre las dos muestras de *Sargassum muticum* pulverizada

Realizamos este proceso de fraccionamiento seriado, con disolventes de polaridades distintas, para cada una de las dos extracciones iniciales con metanol, pero para el segundo

extracto solo realizamos los fraccionamientos con los dos primeros disolventes, hexano (Hex) y diclorometano (DCM), ya que era en estas dos fracciones iniciales donde esperábamos encontrar nuestro meroditerpeno de interés. Una vez realizados los fraccionamientos para cada una de las extracciones iniciales, se juntaron los fraccionamientos de ambos lotes para formar un solo conjunto de muestras.

Tras todo este proceso, obtuvimos un total de 5.489g de extracto total dividido en 4.671g extraídos en la fracción de hexano (F-Hex) y 0.818g extraídos en la fracción de diclorometano (F-DCM), tal y como se puede observar en la ilustración 5. Los extractos obtenidos en las fracciones de acetato de etilo (F-AcEt) y de n-butanol (F-n-But) no fueron utilizados en este estudio.

Estas fracciones totales de hexano y diclorometano son las que se utilizaron para continuar con los procesos de fraccionamiento posteriores para continuar con la búsqueda y el aislamiento del tetrapreniltoluquinol meroditerpeno.

5.4. Fraccionamiento de la FDCM y FHex por polaridad

Se continuó fraccionando las dos primeras fracciones, la de hexano (F-Hex) de 4.691g y la de diclorometano (F-DCM) de 0.818g. Ambas se cromatografiaron en una columna de sílica gel 60 (230–400 MESH, Merck, Alemania) usando como diluyente una serie de disoluciones compuestas por una mezcla de hexano y acetato de etilo (Hex:AcEt) con polaridades ascendentes.

En el caso de la fracción de diclorometano, se utilizó una serie de concentraciones de (Hex:AcEt), con proporciones 1:9, 1:4, 1:2, 1:1 y 1:0 y al final de la cromatografía se lavó la columna con una disolución de metanol y diclorometano (Met:DCM) con una proporción de 1:4, para extraer todos los compuestos que estaban todavía retenidos en la columna. En cuanto a la fracción de hexano, las concentraciones de disolución Hex:AcEt que se utilizaron fueron 1:9, 1:4, 1:2, 1:1, 7:3 y 1:0 y al final de la cromatografía se volvió a lavar la columna con una disolución de metanol y diclorometano al 1:4.

Los eluyentes de estas columnas se juntaron en fracciones según los datos obtenidos en mediciones realizadas en una cromatografía de capa fina en gel de sílica (TLC) (Kieselgel 60F, 254, 0.25 mm, Merck, Alemania), medidas a 254 nm con una lámpara de luz

ultravioleta (VL-4-LC, Vilber Lourmat, France). Las cromatografías de capa fina (TLC) se realizaron utilizando como disolventes, diferentes mezclas de hexano y acetato de etilo en proporciones 5:1, 1:1 y de diclorometano y metanol en proporción 10:1.

El resultado final de este fraccionamiento fue, en el caso de la fracción de diclorometano, un total de 10 fracciones, DCM-F1 / DCM-F10, mientras que la fracción de hexano se subdividió en 14 fracciones, Hex-F1 / Hex-F14.



Figura 7 Fraccionamiento por polaridad mediante una columna de gel de sílice 60F

5.5. Purificación de la proteína en HPLC

Todas estas fracciones obtenidas en la cromatografía se estudiaron mediante varias técnicas de espectrometría, principalmente RMN, MS-MS y TLC-MS. Tras este estudio, se concluyó que nuestro meroditerpeno de interés se encontraba en la fracción de diclorometano número 7 (F-DCM-C7) y en menor medida en la fracción de diclorometano número 8 (F-DCM-C8). Por ello, se procedió a la purificación del compuesto mediante HPLC a partir de la fracción F-DCM-C7.

De los 31mg de F-DCM-C7 que habíamos obtenido de la cromatografía, utilizamos 29.5mg para realizar el HPLC. La muestra se disolvió, a una concentración de 5mg/ml, en una disolución de acetonitrilo y agua 1:9, que se introdujo en un equipo de HPLC (1200 Infinity Series, Agilent Technologies, California, EEUU), con una columna de separación de fase reversa (X-Terra MS C18, Phenomenex, California, EEUU). Las condiciones del HPLC que utilizamos fueron una rampa de gradientes de una solución de acetato de nitrilo y agua desde una concentración 1:9 hasta una concentración de 3:1 en un tiempo total de 20 minutos. Las mediciones se realizaron a 3 longitudes de onda distintas, a 214, 254 y 320, obteniendo finalmente 12 fracciones, desde la F-DCM-C7-H0 hasta la F-DCM-C7-H11.

6. Resultados

El extracto de metanol, obtenido a partir del alga seca y pulverizada *Sargassum muticum*, recogida en la costa norte de Galicia (Bastiagueiro Pequeño, España), se distribuyó en varias fracciones, tanto acuosas como de disolventes con polaridades crecientes. Estas fracciones se estudiaron mediante espectrometría de RMN de protón y carbono-13 y de espectrometría de masas con el fin de determinar en que fracciones se encontraba el meroditerpeno que estábamos buscando. Estos experimentos se centraron principalmente en las fracciones de hexano (F-Hex) y de diclorometano (F-DCM), ya que en el trabajo de Balboa et al. de 2015 se describe que es la fracción de diclorometano, y en menor medida en la de hexano donde se localizan el tetrapreniltoluquinol meroditerpeno objeto de estudio.

Los espectros de RMN de protón y de carbono (^{13}C) y DEPT-135 (para poder reconocer la multiplicidad de los carbonos) se realizaron todos ellos en un equipo de 500 MHz utilizando diclorometano deuterado como disolvente. Realizamos estas primeras mediciones para las fracciones de hexano y de diclorometano de cada una de las dos extracciones iniciales y posteriormente, realizamos estos mismos experimentos de RMN en un equipo de 500 MHz en diclorometano deuterado, para las fracciones de hexano y de diclorometano de la segunda extracción.

Centramos el estudio de RMN en los espectros de carbono (^{13}C) ya que es en estos en donde se podría localizar más fácilmente las señales de RMN que nos indicasen la presencia de nuestro meroditerpeno en estas fracciones. Mas concretamente, la búsqueda se centró en la detección de carbonos entre 205 y 210 ppm característicos del grupo cetona del meroterpeno. Como se muestra en la Figura 9, estas señales se localizaron en la primera fracción de diclorometano.

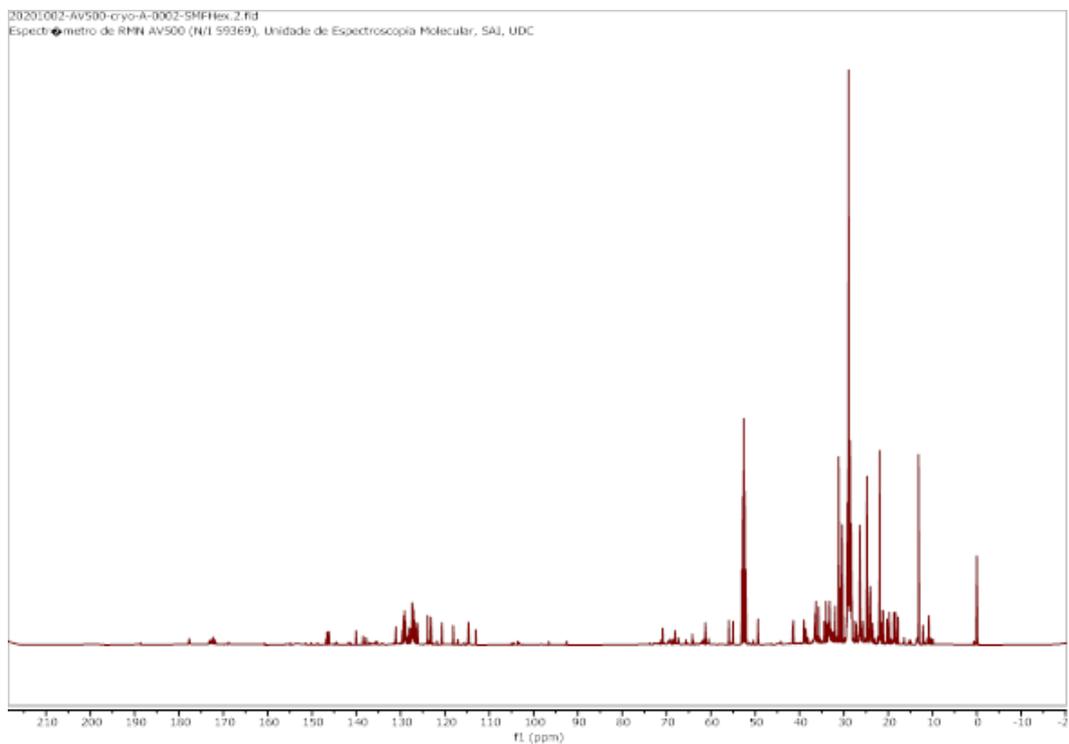


Figura 8 Espectro de RMN (500 MHz, CD_2Cl_2) de ^{13}C de la primera fracción de hexano (F-Hex)

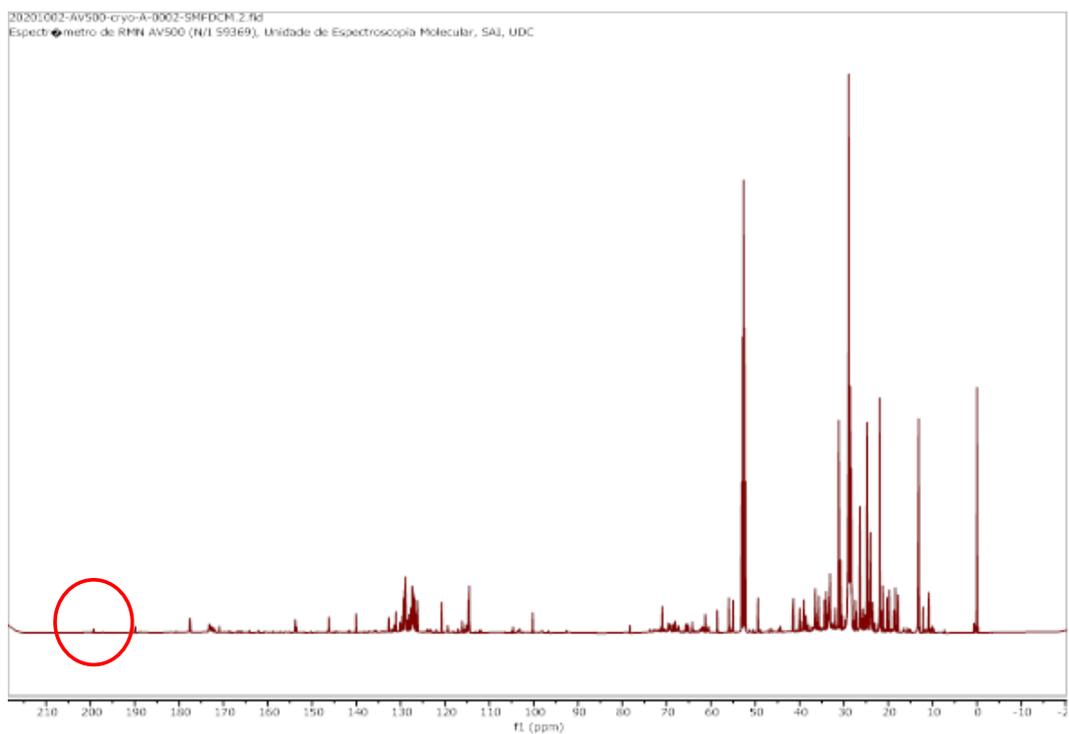


Figura 9 Espectro de RMN (500 MHz, CD_2Cl_2) de ^{13}C de la primera fracción de diclorometano (F-DCM)

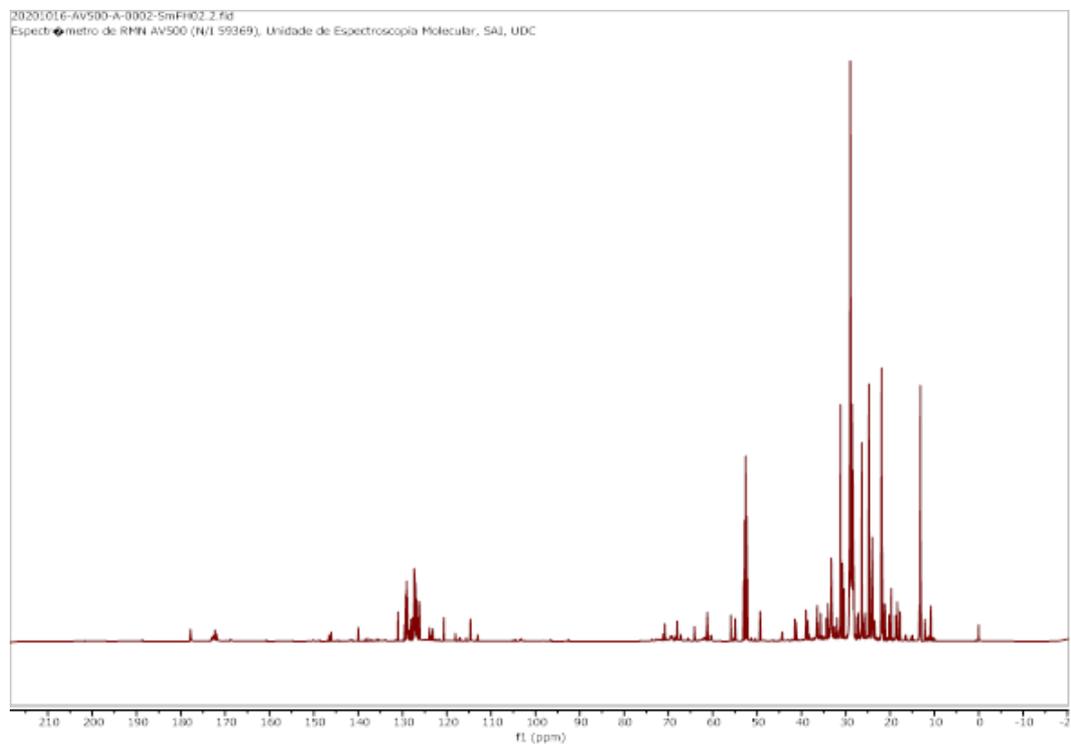


Figura 10 Espectro de RMN (500 MHz, CD₂Cl₂) de ¹³C de la segunda fracción de hexano (F-Hex)

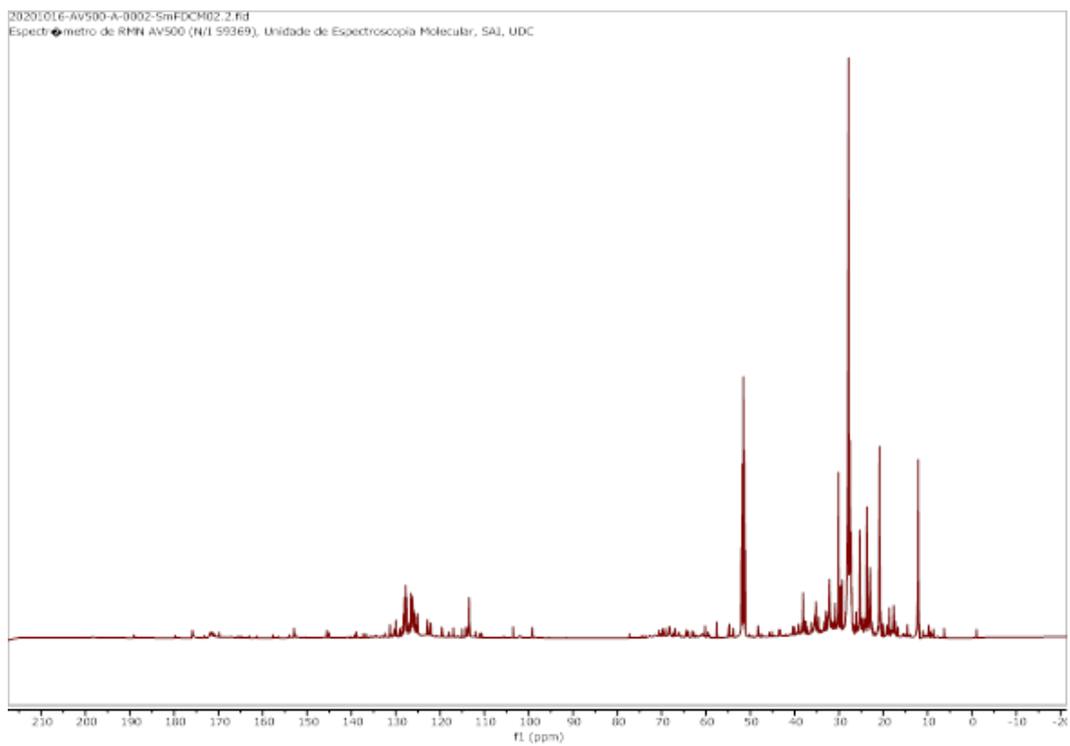


Figura 11 Espectro de RMN (500 MHz, CD₂Cl₂) de ¹³C de la segunda fracción de diclorometano (F-DCM)

Una vez que se habían encontrado indicios de que nuestro meroditerpeno se encontraba en estas dos fracciones, tanto la F-Hex como la F-DCM pero, sobre todo en la fracción de diclorometano, se sometieron ambas a separación por cromatografía en una columna Sephadex LH-20. Durante estos fraccionamientos secundarios, también se realizaron espectros de RMN así como varias cromatografías de capa fina unidas a espectrometría de masas (TLC-MS). La cromatografía en capa fina se empleó tanto para reunir las distintas fracciones de composición similar obtenidas en la cromatografía con la columna Sephadex, como para guiarnos a la hora de buscar el meroditerpeno, empleando para ello una muestra real del meroditerpeno aislado que teníamos en el laboratorio. Esto fue muy útil en la elección de las fracciones del alga que podían contener nuestro meroditerpeno. El factor de retención (R_f) de este testigo era de 0.71 en una cromatografía de capa fina utilizando como eluyente una disolución de hexano y diclorometano al 50%.

Las fracciones obtenidas de la separación cromatográfica de F-Hex y F-DCM, que tenían un R_f similar al de nuestro testigo, fueron las fracciones de hexano número 4, 5 y 6 y las fracciones de diclorometano 7 y 8. A continuación, se analizaron por TLC-MS para localizar aquellas que poseían el ion molecular $[M+Na]^+$ a m/z de 463 y/o su dímero $[2M+Na]^+$ a m/z 903 correspondientes a la masa del meroditerpeno en cuestión. De esta forma, se lograron detectar la presencia de esos iones en las fracciones C5 y C6 de hexano y en las fracciones C7 y C8 de diclorometano, pero no se detectó en la fracción C4 de hexano

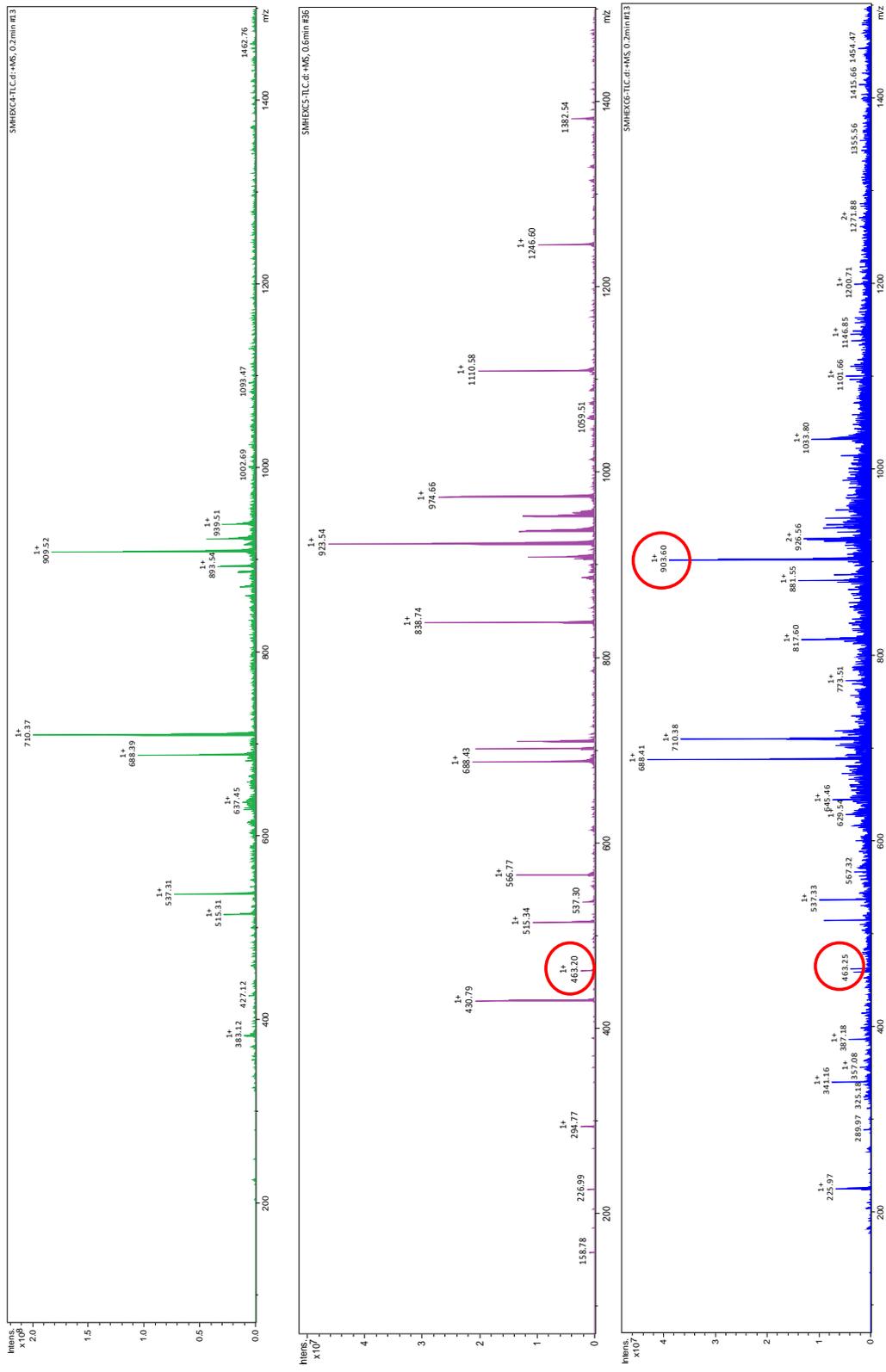


Figura 12 Resultado del TLC-MS de las fracciones C4 (superior), C5 (intermedia) y C6(inferior) pertenecientes a la fracción de hexano (F-Hex)

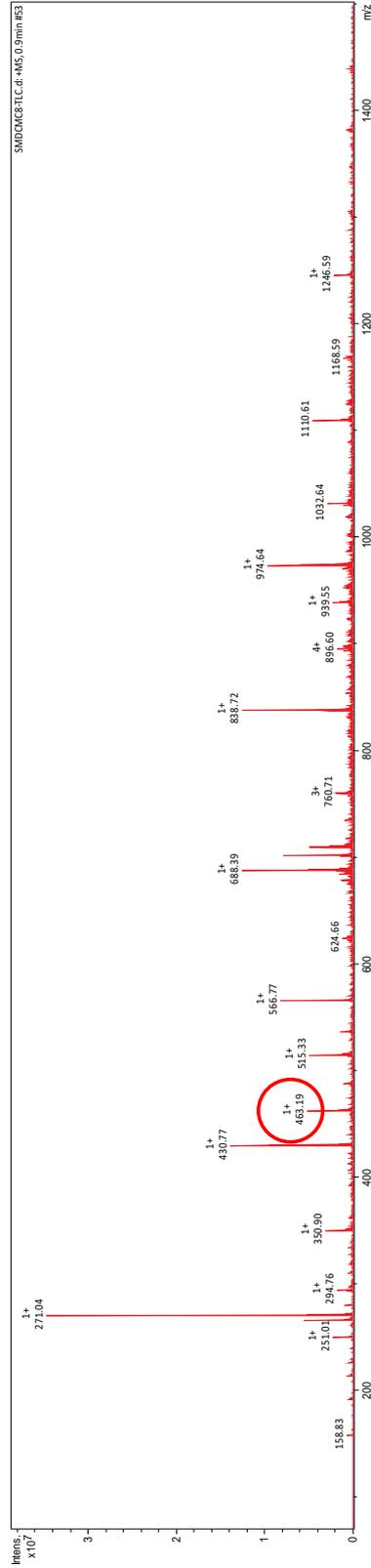
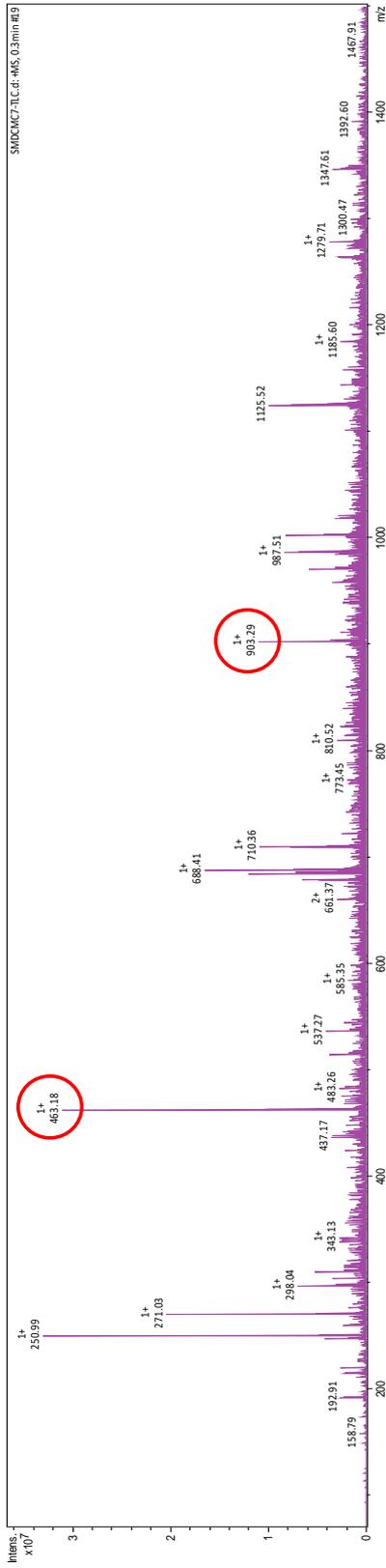


Figura 13 Resultado del TLC-MS de las fracciones C7 (superior) y C8 (inferior) de la fracción de diclorometano (F-DCM)

Una vez que estos resultados nos indicaban que el meroditerpeno podía encontrarse en estas fracciones (fracciones C5 y C6 de hexano y fracciones C7 y C8 de diclorometano), decidimos realizar los espectros de RMN de las fracciones C7 y C8 de diclorometano para confirmar su presencia. Se realizaron RMN de carbono (^{13}C) y de protón (^1H) en un equipo de 500 MHz, utilizándose como disolvente diclorometano deuterado.

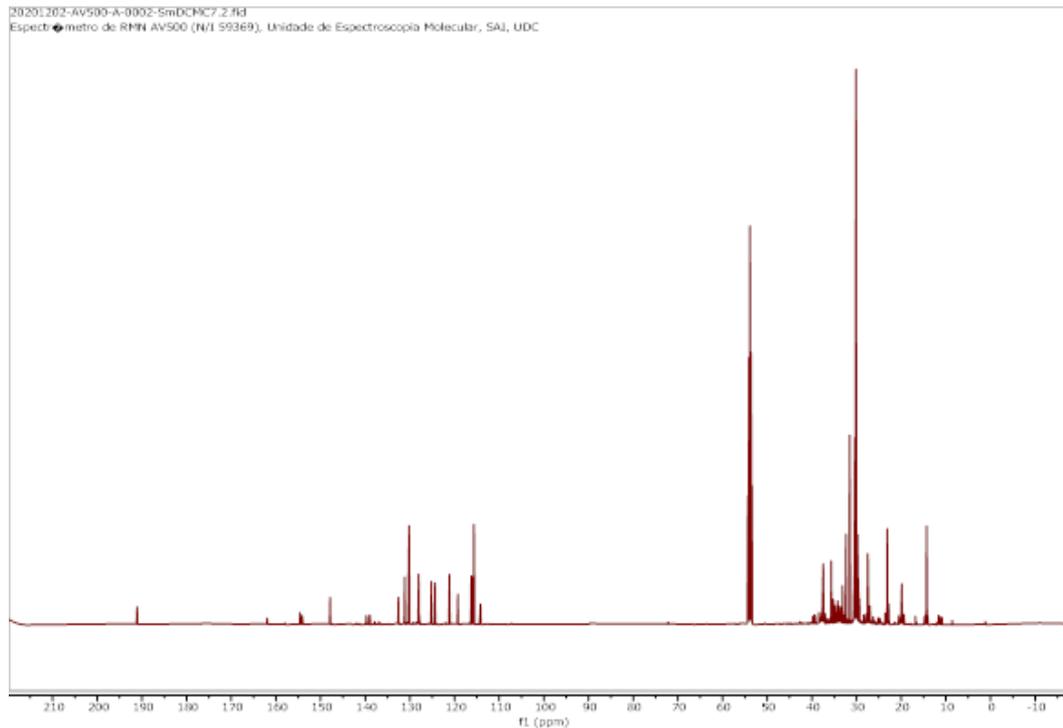


Figura 14 Espectro de RMN (500 MHz, CD_2Cl_2) de carbono ^{13}C de la fracción C7 de diclorometano (F-DCM)

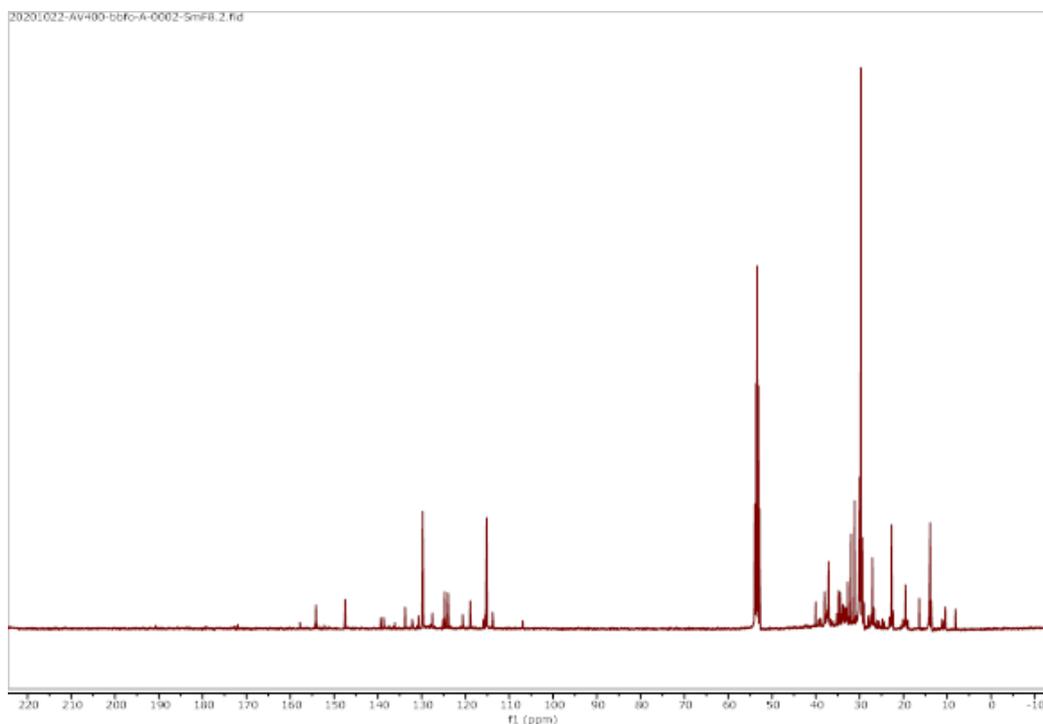


Figura 15 Espectro de RMN (500 MHz, CD_2Cl_2) de carbono ^{13}C de la fracción C8 de diclorometano (F-DCM)

Aunque en estos espectros de RMN no se observó las señales de referencia de nuestro meroditerpeno, dado que, si habíamos detectado su presencia mediante los experimentos de MS, decidimos someter de nuevo a separación cromatográfica por HPLC la fracción F-DCM-C7 porque era la que mostraba el ion molecular en el experimento de MS con más intensidad. De los 31 mg que se disponía de la fracción de F-DCM-C7, se purificaron mediante HPLC 29.5 mg. Se realizaron inyecciones de 2.5 mg de muestra y empleando las longitudes de onda a 214, 254 y 320 nm con el detector de UV. Como resultado de la separación se obtuvo un cromatograma de HPLC que mostró 8 picos cromatográficos que se dividieron en un total de 9 fracciones, desde la F-DCM-C7-H0 hasta la F-DCM-C7-H9, tal y como se muestra en el cromatograma de la figura 16.

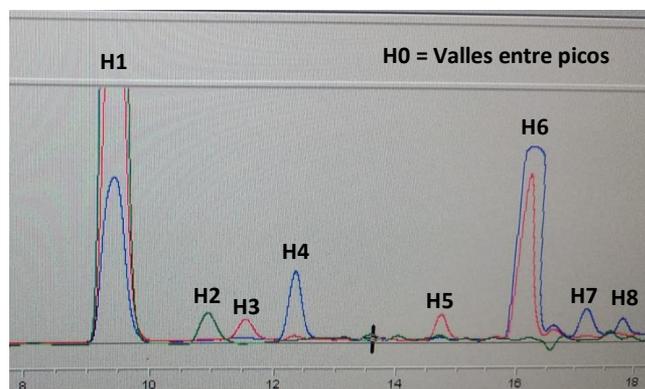


Figura 16 Cromatograma de HPLC de la fracción Sm F-DCM-C7 detectando a unas longitudes de onda de 214, 254 y 320 nm

Este patrón cromatográfico era similar al obtenido en otros artículos en los que se había aislado este meroditerpeno a partir de extractos de *Sargassum muticum* en los que también se obtiene un cromatograma de HPLC muy similar al nuestro, con dos picos muy intensos, uno al comienzo y otro a la mitad de la separación, y una serie de picos más menos intensos. En esos artículos, nuestro meroditerpeno de interés se aislaba del segundo de los dos picos intensos. Basándose en esos resultados, decidimos analizar los dos picos más intensos mediante una cromatografía de capa fina y comparar su Rf con el del testigo, revelándolos bajo luz UV a 260 nm.

Como se puede ver en la figura 17, los compuestos recolectados en las fracciones F-DCM-C7-H1 y F-DCM-C7-H6 absorbían al exponerse a una luz de 260 nm de longitud de onda, observándose con un Rf similar al del testigo. EL Rf del compuesto de la fracción F-DCM-C7-H1 era un poco más elevado que el del testigo, mientras que el de la fracción F-DCM-C7-H6 mostraba un Rf era idéntico al del testigo, aunque se observaba de manera más tenue.

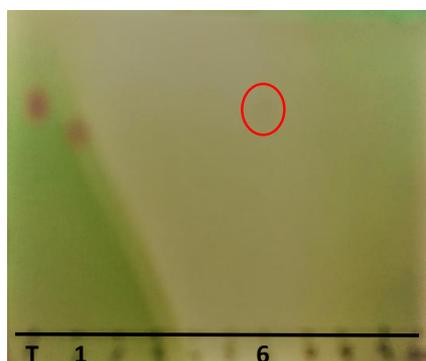


Figura 17 Cromatografía de capa fina, revelada con luz UV a 260 nm, del testigo de meroditerpeno (T), de la fracción F-DCM-C7-H1 (1) y de la fracción F-DCM-C7-H6 (6)

Cuando las dos fracciones F-DCM-C7-H1 y F-DCM-C7-H6 se analizaron por RMN de ^1H en un equipo de 300 MHz (Figuras 18 y Figura 19), se logró identificarlos con los ácidos 4-hidroxibenzoico (**1**) y 4-metoxibenzoico (**2**), respectivamente. Por tanto, se dedujo que ninguno de ellos se correspondía al meroditerpeno que andábamos buscando.

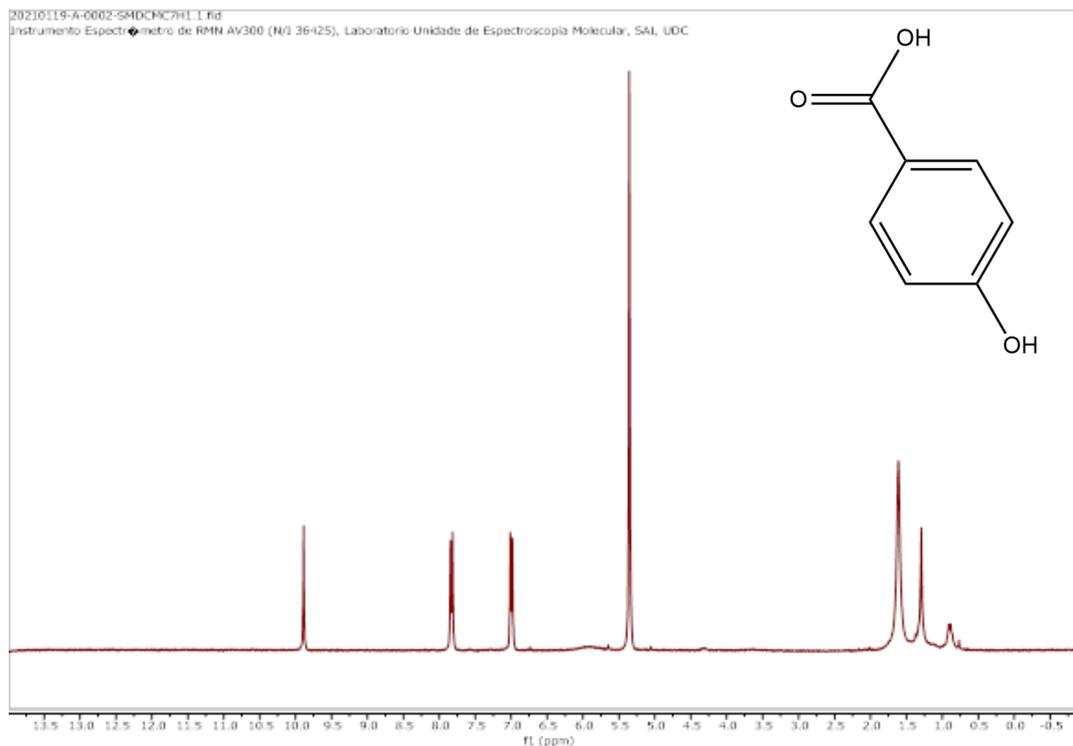


Figura 18 Espectro de RMN (300 MHz) de protón (^1H) del pico H1 del HPLC de la fracción 7 de diclorometano (Fracción Sm F-DCM-C7-H1)

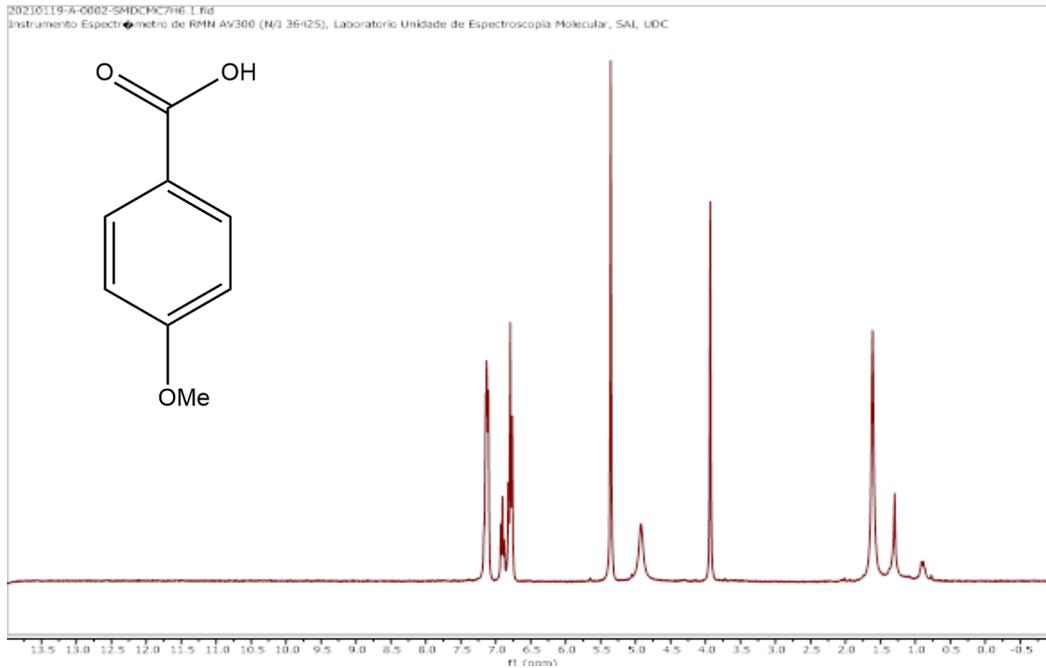


Figura 19 Espectro de RMN (300MHz) de protón (H^+) del pico H6 del HPLC de la fracción 7 de diclorometano (Fracción Sm F-DCM-C7-H6)

Estos resultados muestran que el meroditerpeno debe encontrarse en muy baja concentración que impide aislarlo para que sea identificado por espectroscopía de RMN, a pesar de que por espectrometría de masas muestra claramente su presencia.

7. Discusión

Durante este trabajo se ha realizado el fraccionamiento de un extracto orgánico del alga *Sargassum muticum* con el fin de aislar un meroditerpeno que había sido descrito previamente como un compuesto fotoprotector. La búsqueda de posibles compuestos comercializables de especies de algas invasoras no solo ayudaría económicamente a las zonas afectadas, sino que también sería un incentivo para tratar de controlar la población del alga mediante su recolección comercial.

En este estudio intentábamos aislar de nuevo este meroditerpeno para poder realizar estudios estructurales mediante técnicas de RMN y así comprobar los hallazgos encontrados por los estudios previos. Aunque en última instancia no hemos conseguido aislar el meroditerpeno, y, por lo tanto, tampoco hemos conseguido analizarlo, hemos podido detectarlo en varias fracciones durante los sucesivos fraccionamientos que hemos realizado. Esto nos hace suponer que el alga que habíamos recogido sí que contenía el meroditerpeno pero en muy baja cantidad.

Esto entra dentro de nuestras predicciones iniciales, ya que una gran cantidad de los metabolitos secundarios de las algas se producen de manera estacional y dependiendo de las propiedades del medio en el que se encuentren o de la etapa vital en la que este el alga. Las algas tienen un metabolismo muy dinámico, y los metabolitos que producen varían mucho dependiendo de las condiciones medioambientales. Esto es lo que les permite colonizar de manera efectiva zonas muy dispersas entre sí y con condiciones climáticas muy diferentes (Pinteus et al. 2018). Esta variación en el contenido de metabolitos se puede dar no solo entre especies y épocas del año, sino también entre individuos, lo que hace que la búsqueda de uno de estos metabolitos secundarios sea todavía más complicada.

En el caso concreto de *Sargassum muticum*, es una especie pseudoperenne con un ciclo estacional muy marcado. Al final del periodo estival, el alga pierde todas sus ramas laterales, quedándose con menos del 95% de su biomasa original, después de esta etapa de letargo, el alga presenta dos etapas de crecimiento, una de crecimiento lento de octubre a marzo y otra de crecimiento rápido desde marzo hasta mayo. La reproducción ocurre al final de esta segunda etapa de crecimiento y antes del comienzo de la etapa de senescencia a finales de verano (Fernández 2020). Durante las etapas de crecimiento y sobre todo, durante la segunda etapa de crecimiento más rápida, que coincide con la época reproductiva a mediados y finales

de verano, es cuando se encuentra un mayor contenido de metabolitos secundarios, iones inorgánicos y alginatos en *S. muticum*. Por otro lado, el contenido proteico del alga es mayor en los meses finales de invierno y el inicio de la primavera. Este exceso de proteínas serviría como una reserva de nutrientes para el inicio de las etapas de crecimiento en primavera y verano (Gorham *et al.* 1984).

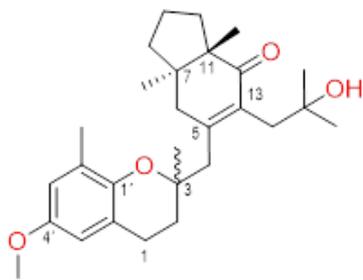
En este estudio, como se quería aislar un meroditerpeno que forma parte del metabolismo secundario del alga, se planteó la recolección del alga en las etapas finales del verano, coincidiendo con el final de la segunda fase de crecimiento rápido y el final de la etapa reproductiva, que como acabamos de comentar sería el momento en el que el alga debería presentar una mayor cantidad de metabolitos secundarios. A pesar de esto, y al no haber encontrado el meroditerpeno que buscábamos en concentraciones suficientemente altas como para aislarlo, pensamos que pudimos retrasar la recolección demasiado y que el alga ya estuviese empezando su fase de senescencia y por lo tanto su producción de metabolitos secundarios estuviese ya disminuyendo.

Al haber pocos estudios detallados sobre las etapas de producción de metabolitos secundarios en *S. muticum*, sería interesante recolectar el alga periódicamente durante un año para poder analizar su contenido metabólico a lo largo de su ciclo vital. Esto sería interesante a la hora de utilizar esta alga con fines comerciales, a la vez que estudiar su comportamiento de cara a intentar controlar su población en las zonas en las que está considerada como una especie invasora.

8. Conclusiones

En este trabajo de fin de master se recolectó el alga *Sargassum muticum* durante el mes de agosto del 2020 con el fin de obtener un tetrahidroprenil meroditerpeno **1**, cuya configuración relativa y absoluta no es todavía conocida. Después de preparar un extracto seco del alga y ser tratado con metanol, particionado con distintos disolventes, y purificado mediante HPLC, sólo se logró detectar el meroditerpeno que buscábamos mediante espectrometría de masas, pero no se pudo obtener una cantidad suficiente para realizar su estudio mediante métodos de RMN. Si que se pudieron aislar dos productos derivados del ácido *para*-hidroxibenzoico.

Se concluye que la época de recolección el alga no fue la adecuada, ya que el meroditerpeno **1** se encontró en muy baja cantidad.



1

9. Bibliografía

1. Balboa E. M., Li, Y.-X., Ahn, B.-N., Eom, S.-H., Domínguez, H., Jiménez, C., & Rodríguez, J. (2015). Photodamage attenuation effect by a tetraprenyltoluquinol chromane meroterpenoid isolated from *Sargassum muticum*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 148, 51-58
2. Balboa, E., Conde, E., Constenla, A., Falqué, E., & Domínguez, H. (2017). Sensory evaluation and oxidative stability of a suncream formulated with thermal spring waters from Ourense (NW Spain) and *Sargassum muticum* extracts. *Cosmetics*, 4(2), 19
3. Bolívar, G. (2020) Isopreno: estructura, propiedades, aplicaciones. Lifeder. Accedido el 11 de mayo de 2021 de <https://www.lifeder.com/isopreno/>
4. Critchley, A. (1983). *Sargassum muticum*: A taxonomic history including world-wide and western Pacific distributions. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 63(3), 617-625
5. Davison, D.M. (2009). *Sargassum muticum* in Scotland 2008: a review of information, issues and implications. Scottish Natural Heritage Commissioned Report No.324 (ROAME No. R07AC707)
6. Dev, S. (1989). Terpenoids. In *Natural products of woody plants*. Springer, Berlin, Heidelberg, 691-807
7. Eggersdorfer, M. (2000). Terpenes. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*.
8. Ferdous, U. T., Yusof, Z. N. B. (2021). Algal terpenoids: a potential source of antioxidants for cancer therapy. In *Terpenes and Terpenoids*. IntechOpen
9. Fernández, C., Gutiérrez, L., Rico, José. (1990). Ecology of *Sargassum muticum* on the North Coast of Spain - Preliminary-Observations. *Botanica Marina*. 33. 423-428
10. Fernández, C., (2020) Boom-bust of *Sargassum muticum* in northern Spain: 30 years of invasion, *European Journal of Phycology*, 55:3, 285-295
11. Gorham, J., Lewey, S.A. (1984). Seasonal changes in the chemical composition of *Sargassum muticum*. *Marine Biology* 80, 103-107
12. Hall, L. D. (1964). Nuclear magnetic resonance. *Advances in carbohydrate chemistry*, 19, 51-93
13. Hore, P. J. (2015). Nuclear magnetic resonance. Oxford University Press, USA
14. Ibáñez, P. M. (2013) Terpenos: Farmacognosia y Medicamentos Herbarios. Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela. Accedido el 10 de mayo de 2021 de <http://saber.ucv.ve/bitstream/123456789/7969/1/9.TERPENOS%202013-2014.pdf>
15. Leal M. C., Munro, M. H., Blunt, J. W., Puga, J., Jesús, B., Calado, R., Rosa, R., & Madeira, C. (2013). Biogeography and biodiversity hotspots of macroalgal marine natural products. *Natural Product Reports*, 30(11), 1380-1390
16. Ludwiczuk, A., Skalicka-Woźniak, K., & Georgiev, M. I. (2017). Terpenoids. In *Pharmacognosy*. Academic Press, 233-266
17. Milledge, J. J., Nielsen, B. V., & Bailey, D. (2016). High-value products from macroalgae: the potential uses of the invasive brown seaweed, *Sargassum muticum*. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 15(1), 67-88
18. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. (2013). Fichas del Catálogo Español de Especies Exóticas Invasoras. RD 630/2013

19. Ocean Biodiversity Information System. *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt, 1995. Accedido el 10 de mayo de 2021 de <https://obis.org/taxon/494791>
20. Park, S. Y., Seo, I. S., Lee, S. J., & Lee, S. P. (2015). Study on the health benefits of brown algae (*Sargassum muticum*) in volunteers. *Journal of Food Nutrition Research*, 3, 126-130
21. Pereira, A. G., Fraga-Corral, M., Garcia-Oliveira, P., Lourenço-Lopes, C., Carpena, M., Prieto, M. A., & Simal-Gandara, J. (2021). The Use of Invasive Algae Species as a Source of Secondary Metabolites and Biological Activities: Spain as Case-Study. *Marine Drugs*, 19(4), 178
22. Pinteus, S., Lemos, M. F., Alves, C., Neugebauer, A., Silva, J., Thomas, O. P., Pedrosa, R. (2018). Marine invasive macroalgae: Turning a real threat into a major opportunity-the biotechnological potential of *Sargassum muticum* and *Asparagopsis armata*. *Algal research*, 34, 217-234
23. Pizzolla, P.F. (2008). *Sargassum muticum* Wireweed. In Tyler-Walters H. and Hiscock K. (eds) Marine Life Information Network: Biology and Sensitivity Key Information Reviews. Plymouth: Marine Biological Association of the United Kingdom. Accedido el 10 de mayo de 2021 de <https://www.marlin.ac.uk/species/detail/1477>
24. Rueness, J. (1989) *Sargassum muticum* and other introduced Japanese macroalgae: Biological pollution of European coasts, *Marine Pollution Bulletin*, 20 (4), 173-176, ISSN 0025-326X
25. Rushdi, M. I., Abdel-Rahman, I. A., Saber, H., Attia, E. Z., Abdelraheem, W. M., Madkour, H. A., Abdelmohsen, U. R. (2020). Pharmacological and natural products diversity of the brown algae genus *Sargassum*. *RSC Advances*, 10(42), 24951-24972
26. Ruzicka, L. (1953). The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. *Experientia*, 9(10), 357-367
27. Wag, K. H., & Elmadfa, I. (2003). Biological relevance of terpenoids. *Annals of Nutrition and metabolism*, 47(3-4), 95-106
28. Wallentinus, I. (2002). Introduced marine algae and vascular plants in European aquatic environments. In *Invasive aquatic species of Europe. Distribution, impacts and management*. Springer, Dordrecht, 27-52