



**UADY**

POSGRADO  
INSTITUCIONAL  
EN CIENCIAS  
QUÍMICAS Y  
BIOQUÍMICAS

**ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE COMPUESTOS  
OBTENIDOS DE LA ESPONJA *Haliclona (Reniera)  
tubifera* POR MEDIO DE RESONANCIA MAGNÉTICA  
NUCLEAR**

**TESIS**

**PRESENTADA POR**

**SARA MEDINA GÓMEZ**

**EN OPCIÓN AL GRADO DE**

**MAESTRA EN CIENCIAS  
QUÍMICAS Y BIOQUÍMICAS**

**MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO**

**2018**





**UADY**

POSGRADO  
INSTITUCIONAL  
EN CIENCIAS  
QUÍMICAS Y  
BIOQUÍMICAS

**ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE  
COMPUESTOS OBTENIDOS DE LA  
ESPONJA *Haliclona (Reniera) tubifera*  
POR MEDIO DE RESONANCIA  
MAGNÉTICA NUCLEAR.**

**TESIS**

**PRESENTADA POR**

**Sara Medina Gómez**

**EN OPCIÓN AL GRADO DE**

**MAESTRA EN CIENCIAS  
QUÍMICAS Y BIOQUÍMICAS**





Mérida, Yuc., 9 de septiembre de 2018  
Oficio Num.: PICQB/321/2018

**Asunto:** Autorización de digitalización de tesis

La tesis "Elucidación estructural de compuestos obtenidos de la esponja *Haliclona (Reniera) tubifera* por medio de resonancia magnética" presentada por Sara Medina Gómez, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar por el grado de Maestra en Ciencias Químicas y Bioquímicas, ha sido aprobada en cuanto a su contenido científico y en cuanto a lo establecido en el Manual de Procedimientos del Posgrado Institucional en Ciencias Químicas y Bioquímicas, por lo que se le autoriza la impresión de los ejemplares correspondientes.

**Directores de la tesis**

Dr. Gumerindo Mirón López

Dr. Ramiro F. Quijano Quiñones

**Sinodales:**

**Firmas**

Dr. Rolando David Cáceres Castillo

Dr. Gonzalo Joaquín Mena Rejón

Dr. Gabriel Eduardo Cuevas González Bravo

**ATENTAMENTE**  
**"LUZ, CIENCIA Y VERDAD"**

**DRA. MAIRA RUBI SEGURA CAMPOS**  
**COORDINADORA DEL POSGRADO INSTITUCIONAL**  
**EN CIENCIAS QUÍMICAS Y BIOQUÍMICAS**





## AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Gumersindo Mirón López** por darme la oportunidad de trabajar nuevamente en su grupo, por su apoyo en el proceso de aprendizaje y su disposición para enseñarme y ayudarme a crecer académica y personalmente; así como por su paciencia y consejos para lograr la culminación de este trabajo de manera satisfactoria.

Al **Dr. Ramiro F. Quijano Quiñones** por darme la oportunidad de trabajar con él, por su paciencia y disposición a enseñarme lo necesario para realizar este trabajo y más, así como por los consejos de vida profesional tan valiosos y su cuidado para terminar este trabajo.

A los miembros del honorable sínodo y suplentes, **Dr. Rolando David Cáceres Castillo, Dr. Gonzalo Joaquín Mena Rejón, Dr. Gabriel Eduardo Cuevas González Bravo, Dra. Lorena Violeta León Deniz** por dedicar parte de su invaluable tiempo y sus valiosos conocimientos en las revisiones de este trabajo, así como por sus aportaciones durante el transcurso de la maestría.

Al **Dr. Rubén Marrero Carballo**, por su invaluable apoyo en la organización del laboratorio y sus consejos en relación al trabajo experimental, así como por su disposición para escuchar las necesidades de los estudiantes.

Al **M. en C. Manlio Joaquín Graniel Sabido** por la realización de los experimentos de EM que permitieron concluir este trabajo.

A la **Q. Carolina Stephanía Castro** y el **Q. Fernando Tun** por su apoyo en el aprendizaje del manejo de los programas computacionales en el laboratorio de Química Teórica.

Al **M. en C. Fernando Moguel Pardío** por su apoyo durante el proceso de trabajo experimental, así como por sus consejos en el trabajo de aislamiento de productos naturales y su valiosa amistad.

A mis compañeros, **Q. Jessica Alejandra Carrillo, Q. Mario Noh, Br. Jesús Aguilera** por su valiosa amistad y su apoyo incondicional durante la fase experimental y de escritura de este trabajo.

A mi **madre, padre y hermanos** por su apoyo incondicional durante todo mi trayecto académico, por ser pilares fuertes en mi crecimiento personal y por su amor en los momentos buenos y malos.



Este trabajo fue realizado en los Laboratorios de Química Farmacéutica, Resonancia Magnética Nuclear y Química Teórica de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Yucatán, bajo la dirección del Dr. Gumersindo Mirón López y el Dr. Ramiro Felipe Quijano Quiñones y formó parte del Proyecto “Evaluación de organismos marinos del litoral del estado de Yucatán como fuente de compuestos con aplicación en química farmacéutica.” Con clave SISTPROY: FQUI-2016-0008, financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACY) y con el apoyo de una beca concedida por el mismo.



## RESUMEN

El estudio de productos naturales de origen marino ha tomado gran importancia pues los organismos marinos han mostrado ser fuente importante de nuevos agentes terapéuticos y agroquímicos. Las esponjas de mar han atraído la atención de investigadores debido a la gran diversidad de compuestos bioactivos que producen convirtiéndose en una de las principales fuentes de estructuras novedosas y complejas. Debido a la complejidad observada en compuestos aislados de esponja de mar es necesario recurrir a técnicas analíticas como RMN para poder resolver y determinar dichas estructuras; sin embargo, el proceso puede resultar complicado para los analistas debido a superposición de señales que se pueden presentar, una herramienta auxiliar para la resolución de estos problemas es el uso de cálculos computacionales. Se estableció como objetivo del estudio el aislamiento y purificación de metabolitos secundarios a partir de esponja de mar, así como su completa caracterización estructural empleando RMN y cálculos teóricos. Debido a que las metodologías disponibles para el cálculo computacional no han sido validadas para su empleo en productos obtenidos de esponja de mar, se llevó a cabo la validación de la metodología de corrección empírica en un conjunto de 25 moléculas de prueba tanto para  $^1\text{H}$  como para  $^{13}\text{C}$ , la cual mostró la disminución del error de manera significativa para el núcleo de  $^{13}\text{C}$ ; mientras que el núcleo de  $^1\text{H}$  no mostró mejoría significativa. El aislamiento de metabolitos secundarios se realizó a partir de la esponja de mar *Haliclona (Reniera) tubifera*, la cual se llevó a cabo mediante maceración en metanol, con posteriores extracciones líquido-líquido empleando diclorometano, acetato de etilo y butanol. La purificación de los compuestos se llevó a cabo mediante cromatografía, para posteriormente ser analizados por RMN y EM. Se obtuvieron 11 compuestos a partir de los extractos trabajados, los cuales fueron identificados mediante RMN; entre ellos destacan el ácido 3-hidroxi-colest-5,6-en-22-oico y el 6-(14-hidroxi-15-metilpenta-12,14-dien-12-il) uridilato, los cuales corresponden a estructuras no reportadas en la literatura. El aislamiento de los metabolitos secundarios obtenidos nos permite concluir que los especímenes colectados se encontraban sometidos a estrés por depredación y comenzaban la producción de mecanismos de defensa.



## ABSTRACT

The study of marine natural products has become important since marine organisms have shown to be an important source of new therapeutic and agrochemical agents. Sea sponges have attracted the attention of researchers due to the wide diversity of bioactive compounds that they produce, becoming one of the main sources of novel and complex structures. Due to the complexity observed in isolated compounds of sea sponge, it is necessary to draw upon analytical techniques such as NMR to be able to resolve and determine those structures; However, the process can be complicated for analysts due to superposition of signals that can be presented; an auxiliary tool for the resolution of these problems is the use of computational calculations. The objective of the study was the isolation and purification of secondary metabolites from sea sponge, as well as its complete structural characterization using NMR and theoretical calculations. Because the methodologies available for computational calculation have not been validated for use in products obtained from sea sponge, validation of the empirical correction methodology was carried out in a set of 25 molecules so much for  $^1\text{H}$  and for  $^{13}\text{C}$ , which showed the decrease of the error significantly for  $^{13}\text{C}$ ; while the  $^1\text{H}$  showed no significant improvement. The isolation of secondary metabolites was carried out from the sea sponge *Haliclona (Reniera) tubifera*, which was carried out by maceration in methanol, with subsequent liquid-liquid extractions using dichloromethane, ethyl acetate and butanol. The purification of the compounds was carried out by chromatography, to be subsequently analyzed by NMR and MS. Eleven compounds were obtained from the extracted extracts, which were identified by NMR; These include 3-hydroxy-cholest-5,6-en-22-oic acid and 6- (14-hydroxy-15-methylpenta-12,14-dien-12-yl) uridylate, which correspond to structures not reported in the literature. The isolation of the secondary metabolites obtained allows us to conclude that the collected specimens were under stress due to predation and began the production of defense mechanisms.



## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN .....	1
ANTECEDENTES .....	3
Productos Naturales Marinos .....	3
<i>Alcaloides</i> .....	4
<i>Péptidos</i> .....	7
<i>Terpenos</i> .....	7
<i>Policétidos</i> .....	8
<i>Macrólidos</i> .....	9
<i>Nucleósidos</i> .....	11
Caracterización Estructural .....	13
OBJETIVO.....	19
METODOLOGÍA.....	21
Materiales y equipo de laboratorio.....	21
Material animal.....	21
Preparación de material animal y extractos.....	22
Purificación de compuestos aislados.....	22
Predicción del desplazamiento químico.....	27
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	41
Predicción del desplazamiento químico.....	41
Caracterización estructural.....	46
<i>Compuesto 1</i> .....	46
<i>Compuesto 2</i> .....	53
<i>Compuesto 3</i> .....	56
<i>Compuesto 4</i> .....	59
<i>Compuesto 5</i> .....	60
<i>Compuesto 6</i> .....	63
<i>Compuesto 7</i> .....	67
<i>Compuesto 8</i> .....	71
<i>Compuesto 9</i> .....	74
<i>Compuesto 10</i> .....	77
<i>Compuesto 11</i> .....	84
CONCLUSIONES .....	87
REFERENCIAS .....	89



## INTRODUCCIÓN

El ambiente marino posee una gran diversidad de organismos que han probado ser una fuente rica de nuevas estructuras de metabolitos secundarios biológicamente activos los cuales han tomado gran importancia como prototipos en el descubrimiento de nuevos agentes terapéuticos y agroquímicos, es por ello que en los últimos años se ha prestado especial atención al estudio de los productos naturales de origen marino.<sup>1,2</sup>

Aunque los océanos contienen una biodiversidad muy superior a la de la tierra, su exploración para la búsqueda de nuevos compuestos químicos ha comenzado hace relativamente poco tiempo en comparación con el estudio químico del entorno terrestre. Un gran número de metabolitos biológicamente activos se han aislado a partir de bacterias, plantas o animales marinos, dentro de los cuales el grupo más importante es el de los invertebrados, dentro del que encontramos a las esponjas de mar, las cuales han provisto un gran número de metabolitos secundarios.<sup>3,4</sup>

Las esponjas poseen una gran diversidad química que incluye: alcaloides, péptidos, terpenos, policétidos, ácidos grasos, amidas, macrólidos, esteroides y lípidos poliinsaturados. Muchos de estos metabolitos secundarios muestran diversas actividades biológicas como anticancerígena, anti-incrustante, anti-plasmódica, antioxidante y antimicrobiana; y suelen mostrar un alto grado de complejidad molecular.<sup>3,5,6</sup>

Esta amplia diversidad y complejidad presente en muchos de los compuestos obtenidos a partir de esponja de mar plantea un nuevo problema en el proceso de caracterización estructural mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN), una de las técnicas más importante en dicho proceso debido a que algunos de los compuestos o parte de ellos pueden mostrar superposición de señales en los espectros en una y dos dimensiones. Dicha superposición de señales representa un reto para el analista, lo cual en algunos casos retrasa o impide llevar a cabo la asignación átomo por átomo de manera completa e inequívoca. Actualmente, gracias a los múltiples avances computacionales es posible recurrir al uso de la Teoría del Funcional de la Densidad (*Density Functional Theory*, DFT) como una herramienta auxiliar en la asignación de los desplazamientos químicos de RMN en moléculas complejas, lo cual nos permite llevar a cabo la caracterización estructural de las mismas de manera más rápida, eficiente e inequívoca.<sup>7</sup>



## ANTECEDENTES

### Productos Naturales Marinos

Los productos naturales han sido, y siguen siendo, la mayor fuente de agentes terapéuticos en el desarrollo de medicamentos. México posee un alto porcentaje de endemismos y una gran cantidad y diversidad de animales y plantas a partir de los cuales se han aislado un gran número de agentes terapéuticos. Pese a que los ecosistemas acuáticos de todo el mundo presentan mayor diversidad que los ecosistemas terrestres el grado de conocimiento del entorno marino es inferior al del entorno terrestre. El ambiente marino ha mostrado ser una fuente rica de compuestos que han tomado gran importancia como prototipos en el descubrimiento de nuevos agentes terapéuticos y agroquímicos.<sup>1, 2, 8-11</sup>

Si pensamos en el ambiente terrestre, las plantas son la mayor fuente de productos naturales, mientras que en el océano esta posición se encuentra ocupada por invertebrados, como las esponjas, briozoos o moluscos; siendo las esponjas la mayor fuente de productos naturales. En México el estudio de los productos naturales marinos derivados de esponjas se inició entre la década de los 70's y 80's en el Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM y en los últimos 60 años de investigación en productos naturales de animales marinos se han diferenciado más de 10,000 diferentes tipos de moléculas.<sup>3, 8</sup>

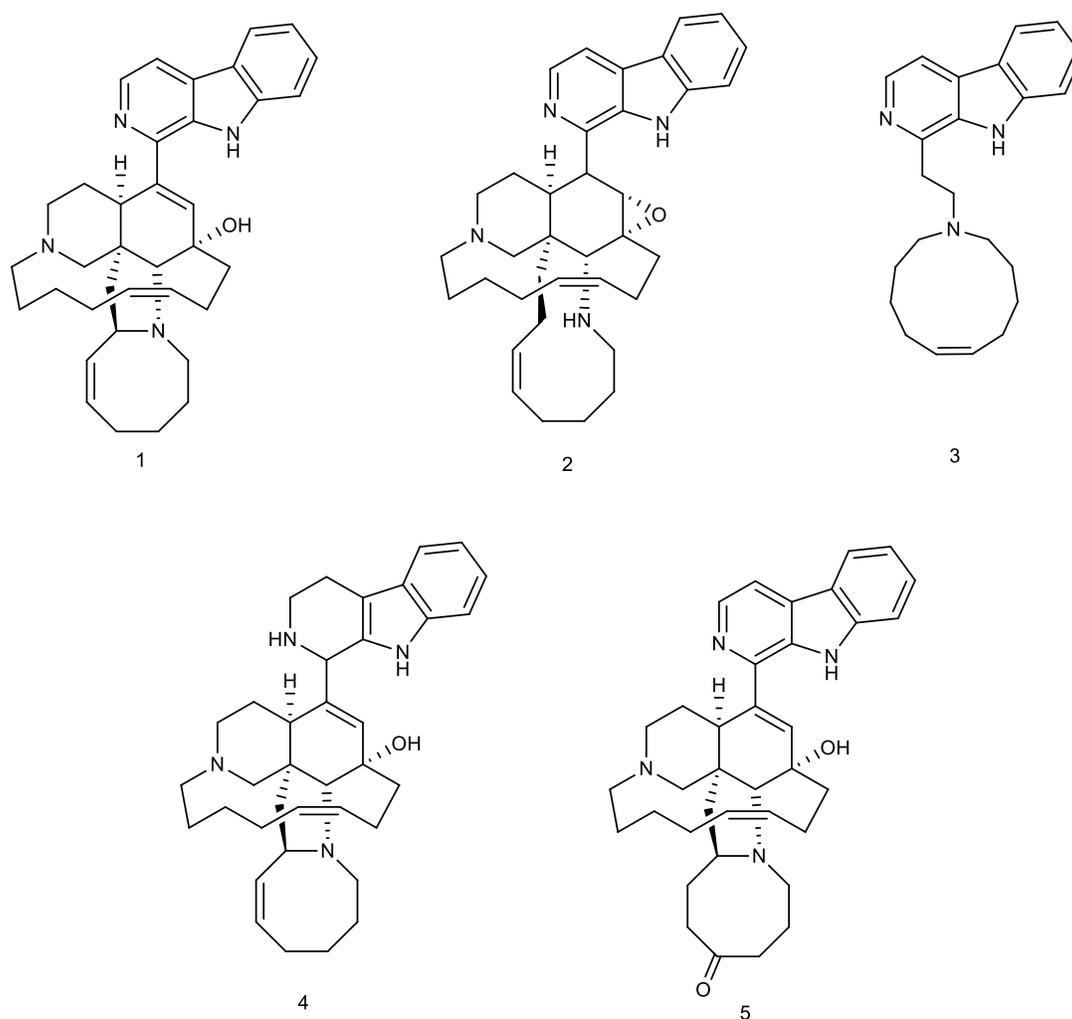
Las esponjas de mar, que constituyen el phylum Porifera, son los organismos acuáticos multicelulares más primitivos y simples que se conocen. En esencia, una esponja es una agrupación de células que funcionan juntas, pero con poca integración y control de sus actividades celulares.<sup>8</sup> Los adultos son sésiles e inmóviles, presentan diversas formas (globosas, incrustantes, ramificadas, en copa, etc.) según el sustrato y profundidad en que viven, espacio, tipo de agua, etc.; muestran coloraciones muy variadas y su tamaño oscila entre 1 cm a 2 m de longitud; carecen de tejidos y órganos bien definidos. Una de las principales características de las esponjas es su estructura porosa, la cual permite la circulación de la corriente de agua a través de sus poros y una red canalicular. Particularmente las esponjas de mar del género *Haliclona* poseen una línea secundaria unispicular que las caracteriza, las esponjas de la especie *Haliclona (Reniera) tubifera* presentan una coloración púrpura-violeta, muestran una morfología tubular y presentan una consistencia suave.<sup>5,12</sup>

Las esponjas han atraído la atención de químicos y farmacólogos debido a la gran diversidad de compuestos bioactivos que producen y se han destacado por el gran número de nuevos metabolitos aislados a partir de ellas cada año. Entre los diferentes tipos de productos naturales reportados a partir de esponja de mar, los alcaloides, péptidos, terpenoides, macrólidos y nucleósidos han atraído la atención debido a sus características estructurales y su intensa actividad farmacológica.<sup>3, 5, 6, 9</sup>

## Alcaloides

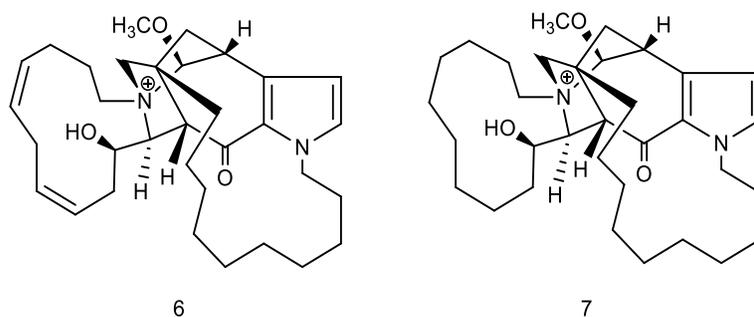
Un gran número de alcaloides aislados a partir de esponja de mar son biogenéticamente derivados de la 3-alkilpiridina o reducidos de misma. Estos metabolitos pueden ser subdivididos según el número de anillos presentes como tricíclicos, pentacíclicos o de acuerdo a la presencia o ausencia de oxígeno.<sup>13, 14</sup>

Uno de los grupos de alcaloides obtenidos a partir de los extractos metanólicos de esponjas de mar del género *Haliclona* (*Haliclona* sp) es el de las manzaminas (**Figura 1**), alcaloides  $\beta$ -carbolínicos. El primer compuesto aislado de este grupo fue la manzamina A (1) como el principal constituyente citotóxico de la esponja *Haliclona* sp. Posteriormente fueron aisladas las manzaminas B (2), C (3), D (4) y E (5) (**Figura 1**); estos alcaloides han sido aislados de diferentes especies de esponja de mar y han mostrado importantes actividades como antimaláricos.<sup>15</sup>

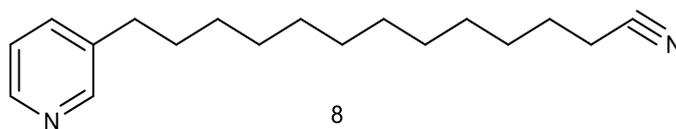


**Figura 1.** Estructuras de las manzaminas A-E

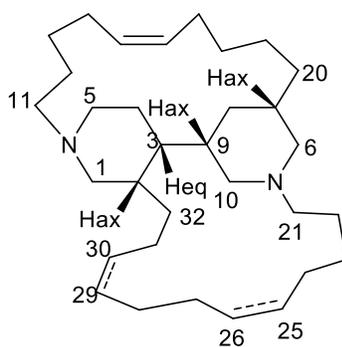
Se considera que el género *Haliclona* es una fuente rica de metabolitos secundarios, ya que partir de él se han logrado aislar diversos tipos de alcaloides como las Densaninas A (6) y B (7) (**Figura 2**), la 3-dodecilpiridina (8) (**Figura 3**), Haliclonaciclaminas A (9) y B (10) (**Figura 4**) y la Haliciclamina A (11) (**Figura 5**). A partir de esponjas pertenecientes a otros géneros se han logrado aislar Haliclonadiaminas A (12) (**Figura 6**), diaminas policíclicas como las Neopetrociclaminas A (13) y B (14) (**Figura 7**), entre otros. <sup>4, 7, 16-21</sup>



**Figura 2.** Estructura de las Densaninas A y B



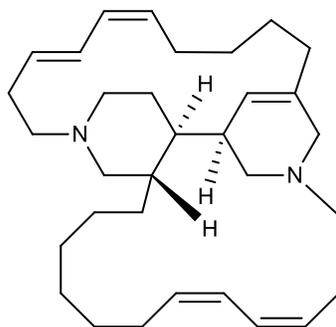
**Figura 3.** Estructura de la 3-dodecilpiridina



**9)** Haliclonaciclamina A, D=25,26

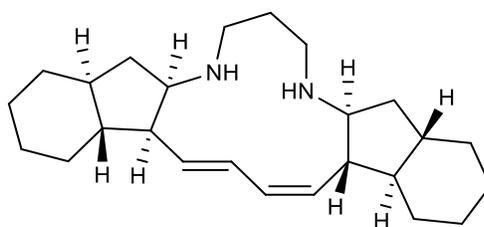
**10)** Haliclonacilamina B, D=29,30

**Figura 4.** Estructura de los alcaloides de tipo Haliclonaciclamina



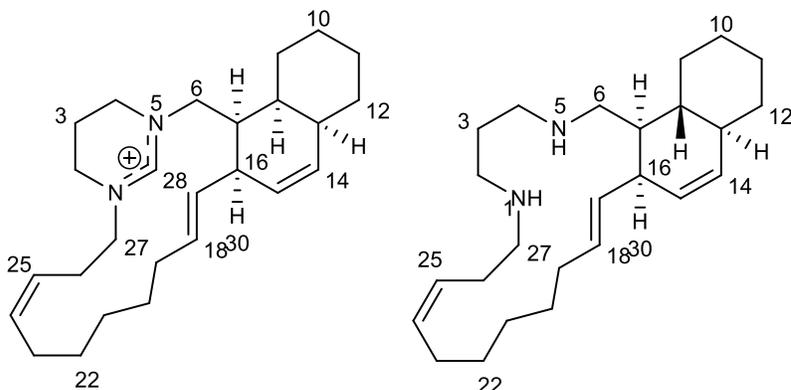
11

**Figura 5.** Estructura de la Haliciclamina A



12

**Figura 6.** Estructura de la Haliclonadamina



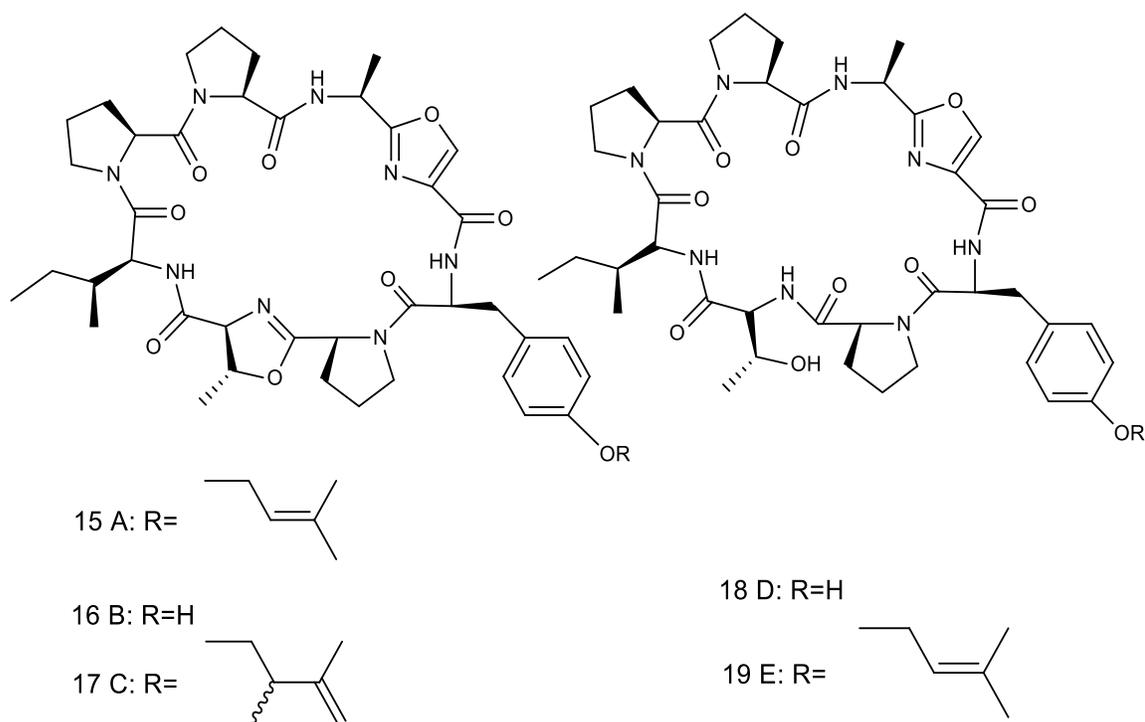
13

14

**Figura 7.** Estructura de las Neopetrociclaminas

## Péptidos

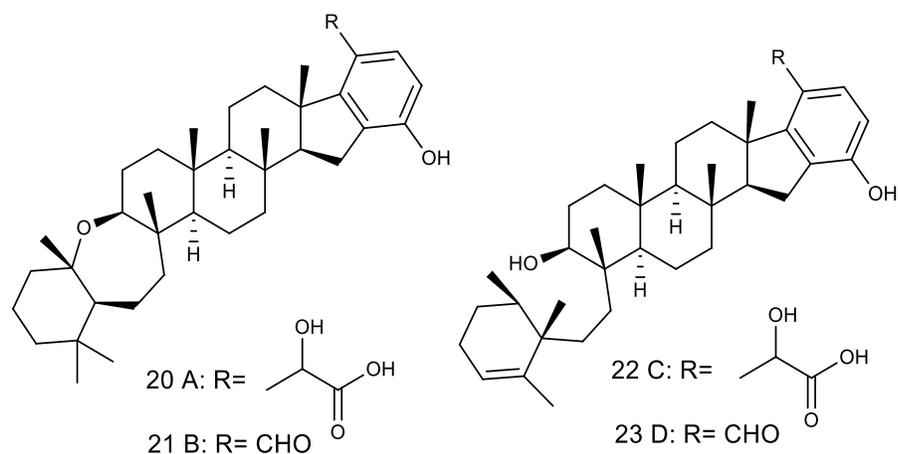
La mayoría de los péptidos aislados de esponja muestran estructuras sin precedentes al ser comparados con péptidos aislados de otras fuentes y con modificaciones en las unidades de aminoácidos. Pueden llegar a presentar aminoácidos poco comunes en sistemas terrestres y microbianos e incluso algunos de ellos son totalmente nuevos. Dentro de los péptidos aislados a partir de extractos metanólicos de esponjas del género *Haliclona* (*Haliclona* sp) destacan los péptidos cíclicos de bajo peso molecular como las Haliclonamidas A (15), B (16), C (17), D (18) y E (19) (**Figura 8**).<sup>22, 23</sup>



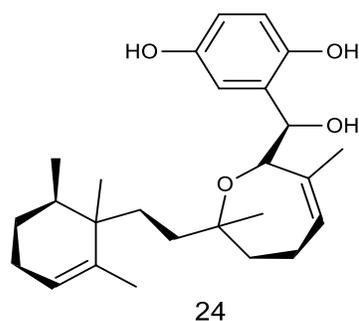
**Figura 8.** Estructura de los péptidos denominados Haliclonamidas

## Terpenos

De diferentes variedades de poríferos se han aislado compuestos de tipo terpénico; particularmente del género *Haliclona*. A partir del extracto metanólico y de Acetato de etilo (AcOEt) de la especie *Haliclona* (*Halichoelona*.) sp. se obtuvieron los Ácidos Haliclónicos (20-23) (**Figura 9**). Mientras que del extracto de AcOEt proveniente del macerado de la esponja *Haliclona* sp. se aisló la Halioxepina (24) (**Figura 10**). Los cuales mostraron una actividad importante como anticancerígenos.<sup>24, 25</sup>



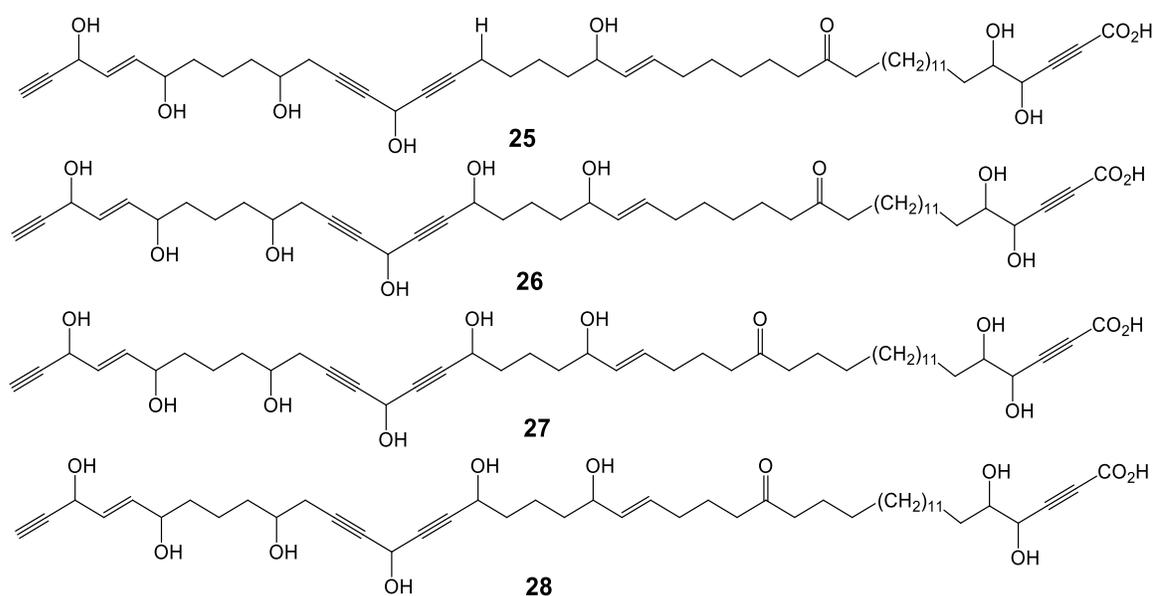
**Figura 9.** Estructuras de los ácidos Haliclónicos



**Figura 10.** Estructura de la molécula Halioxepina

### *Policétidos*

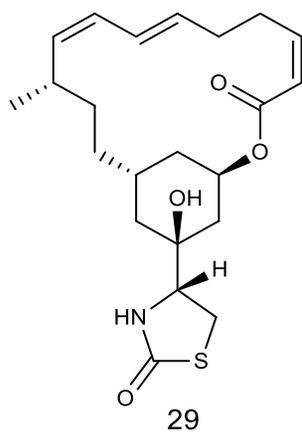
Los poliacetilenos lineales y compuestos similares son un grupo creciente de metabolitos obtenidos de las esponjas de mar. Sin embargo, estos compuestos son encontrados solo en algunas familias de esponjas, por ejemplo, de la esponja *Haliclona osiris*, se han aislado los poliacetilenos Osirina A (25), B (26), C (27) y D (28) (**Figura 11**). Los policétidos aislados a partir de esponja de mar han mostrado actividades antimicrobianas, citotóxicas y antivirales.<sup>26</sup>



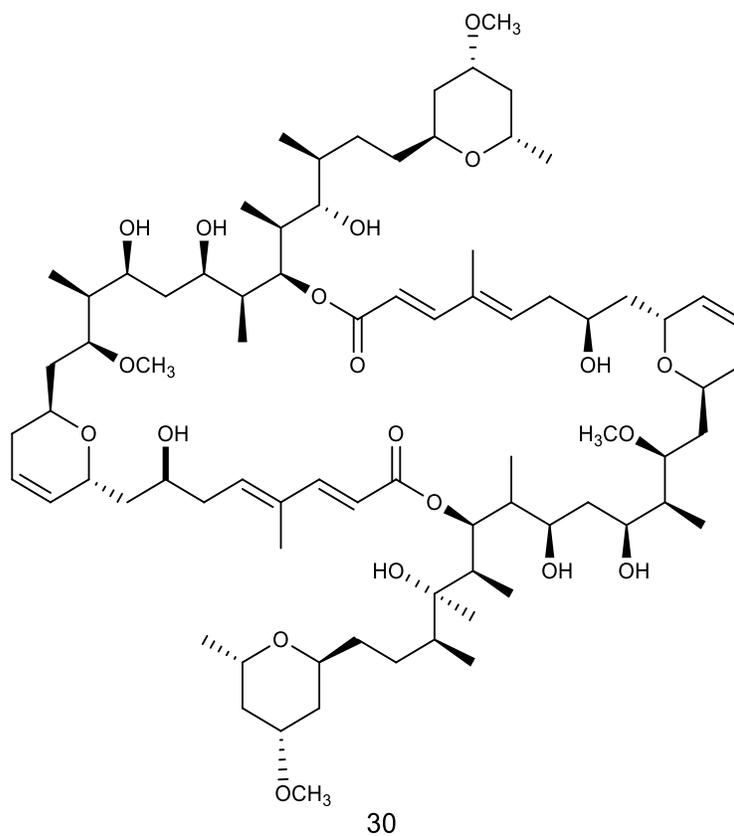
**Figura 11.** Estructuras de poliacetilenos aislados a partir de esponja de mar

### Macrólidos

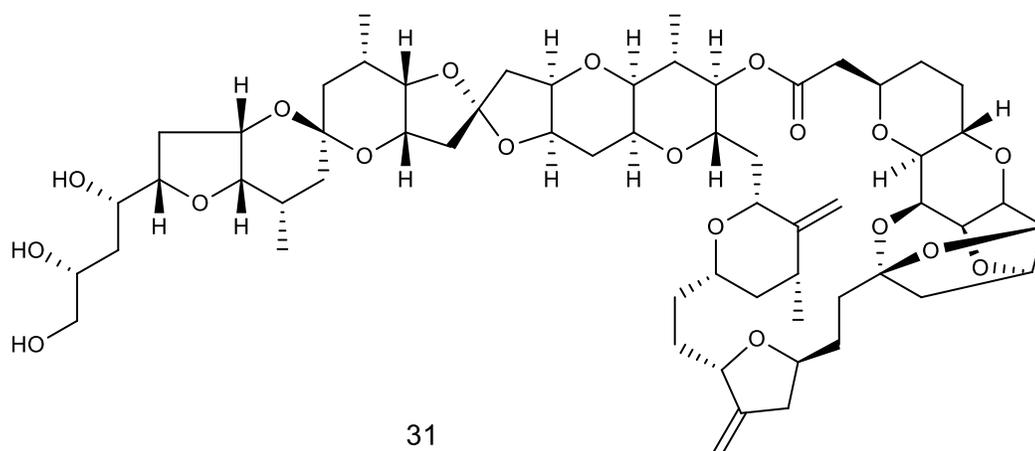
Las esponjas contienen una diversa gama de macrólidos que presentan una gran variedad de actividades biológicas: el primer macrólido aislado de una esponja fue la Latrunculina A (29) (**Figura 12**), la cual fue aislada de *Latrunculia magnifica* como un compuesto ictiotóxico que además mostró ser inhibidor de la polimerización de la actina. Dentro de la variedad de macrólidos aislados de esponja de mar se encuentra el Swinholido A (30) (**Figura 13**) aislado originalmente de la esponja de mar roja *Theonella swinhoei*. Algunos de estos compuestos se encuentran aprobados para su estudio clínico como tratamiento para el cáncer de mama, un ejemplo es la Halicondrina B (31) (**Figura 14**), la cual fue aislada de la esponja de mar *Halichondria okadai* y pertenece al grupo de macrólidos conocidos como Halicondrinas. <sup>4, 13, 27, 28</sup>



**Figura 12.** Estructura de la molécula de Latrunculina A



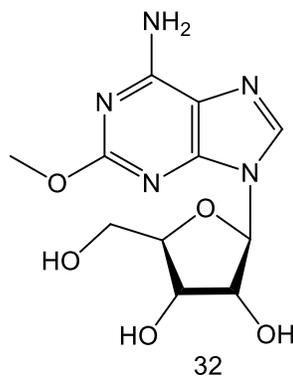
**Figura 13.** Estructura del Swinholido A aislado de la esponja de mar roja



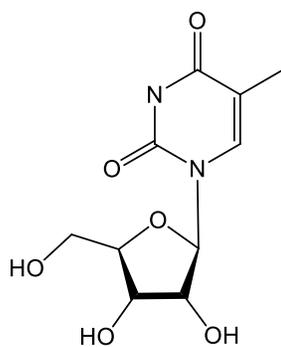
**Figura 14.** Estructura química de la Halicondrina B

### Nucleósidos

Los nucleósidos se encuentran conformados por una base nitrogenada unida a una unidad de azúcar de tipo pentosa. Este grupo de compuestos forma parte de los bloques de ADN y ARN. Algunos miembros del mismo se han aislado a partir de organismos marinos, tal es el ejemplo de la Esponjocina (32) (**Figura 15**), aislada a partir de la esponja *Cryptotethia crypta* y de la esponja *Haliclona* sp. A partir del extracto de acetona de la esponja *C. cripta* se aisló por primera vez el compuesto Esponjotimidina (Ara-T) (33) (**Figura 16**) el cual dio lugar a la síntesis de nuevos fármacos derivados de nucleósidos como la Vidarabina y la Citarabina, fármacos empleados para el tratamiento de varicela y leucemia mieloide aguda, respectivamente. <sup>29-31</sup>



**Figura 15.** Estructura del nucleósido Esponjosina

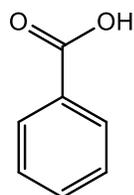


33

**Figura 16.** Estructura del nucleósido Esponjotimidina (Ara-T)

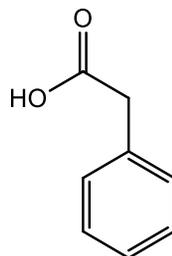
La diversidad de metabolitos aislados a partir de esponja de mar no se limita únicamente a los alcaloides, terpenos, nucleósidos o péptidos. Un gran número de esteroides se ha aislado a partir de esponja de mar, así como moléculas de bajo peso molecular como el ácido benzoico (34) (**Figura 17**) aislado a partir de la esponja *Xestospongia sp*, el ácido fenilacético (35) (**Figura 18**) aislado a partir de la esponja *Latrochota sp*, entre otros. Esta diversidad de estructuras no se limita a una familia específica de esponjas, pues algunos de ellos han sido aislados de esponjas pertenecientes a diferentes familias. Sin embargo, se desconoce si estos son productos de degradación de metabolitos secundarios o participan en la síntesis de los mismos. <sup>32,</sup>

33



34

**Figura 17.** Estructura del ácido benzoico



35

**Figura 18.** Estructura del ácido fenilacético

## Caracterización estructural

En estudios de caracterización previos de compuestos obtenidos a partir de esponja de mar realizados por RMN se encuentra ampliamente reportado el uso de experimentos de RMN-<sup>1</sup>H, RMN-<sup>13</sup>C, DEPT (*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*), COSY (*Correlation Spectroscopy*), TOCSY (*Total Correlation Spectroscopy*), NOESY (*Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy*), HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*) y HSQC (*Heteronuclear Single-Quantum Correlation*) o HMQC (*Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation*) como batería de experimentos básicos, con los cuales se busca cubrir todas las necesidades en la búsqueda de información para la completa elucidación estructural.<sup>2,10,13</sup>

La técnica de RMN depende de la sensibilidad de la frecuencia de resonancia en un núcleo atómico y su ambiente químico cuando un campo magnético es aplicado. Tanto el desplazamiento químico como las constantes de acoplamiento,  $J$ , dependen del apantallamiento magnético de los núcleos, el cual es un número asociado con cada núcleo resonante, y debido a que el cribado del campo magnético externo por la densidad electrónica de la molécula, depende de la orientación relativa del campo magnético externo, este es en realidad un tensor. Se debe considerar que los términos “desplazamiento químico” y “apantallamiento” no son lo mismo. El desplazamiento químico hace referencia a los valores numéricos asignados en partes por millón para una señal determinada tomando un valor de referencia para la calibración de dichas señales. Por su parte, el apantallamiento (o más propiamente, el apantallamiento magnético) describe el cambio relativo en el campo magnético local a núcleos con posición relativa al campo magnético externo. Este cambio en el campo magnético local, el cual se origina en la interacción de la nube de electrones con el campo magnético externo, puede producir apantallamiento o desapantallamiento de los núcleos. Cabe destacar que es, justamente, el valor del tensor de apantallamiento magnético el cual es empleado en los cálculos teóricos del desplazamiento químico.<sup>34-37</sup>

Existen varias razones por las que la espectroscopía de RMN es una de las técnicas analíticas más importantes para la caracterización estructural de moléculas orgánicas, entre ellas, se encuentra que los espectros se pueden realizar en poco tiempo y, en algunos casos, son sencillos; es una técnica que requiere poca cantidad de muestra (5-90 mg) y no es una técnica destructiva. Sin embargo, el estudio y caracterización estructural de metabolitos aislado a partir productos naturales puede representar un reto para el investigador puesto que las cantidades de metabolito obtenidas pueden llegar a ser muy bajas, alrededor de 1-10 mg; y las estructuras resultantes pueden llegar a mostrar superposición de señales debido a la complejidad de las moléculas obtenidas o la movilidad molecular de las mismas; complicando de esta manera la obtención de espectros de buena calidad, razón por la cual, realizar la asignación átomo por átomo puede ser de gran dificultad aún con los avances en experimentos multidimensionales

existentes, tendiendo que considerar el tiempo de equipo disponible para la adquisición de espectros de una calidad que puedan proporcionar toda la información necesaria.<sup>38</sup>

En el estudio de metabolitos secundarios obtenidos de productos naturales marinos se presentan estos y otros retos, puesto que las moléculas obtenidas suelen ser más complejas que aquellas aisladas de productos naturales terrestres y al haber pocos estudios en relación con estos, no hay puntos de comparación precisos para los nuevos metabolitos encontrados. Un desafío importante es la obtención de cantidades suficientes de muestra para realizar el aislamiento ya que la mayoría de las especies marinas a estudiar se encuentran bajo estrictas regulaciones para su manipulación, lo que ocasiona que no se logre obtener cantidades suficientes de muestra para realizar la caracterización estructural inequívoca de los metabolitos secundarios minoritarios obtenidos. Una alternativa para lograr la completa caracterización estructural de metabolitos en casos complejos es la predicción del desplazamiento químico y otras propiedades de RMN utilizando la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT, *Density Functional Theory*) y el método GIAO (*Gauge-Including Atomic Orbitals*).<sup>37, 39</sup>

Empleando estos métodos teóricos se puede obtener información del desplazamiento químico de RMN con suficiente exactitud para lograr diferenciar estereoisómeros, identificar intermediarios reactivos, estudiar conceptos fundamentales como la aromaticidad y conformación molecular de: moléculas orgánicas, moléculas biológicas, sistemas desordenados y nano estructuras; así como estudios en carbonos, y cristalografía de RMN.<sup>34,37,39</sup>

Mientras la técnica de RMN experimental tradicional ha sido accesible para muchos grupos de investigación alrededor del mundo por un largo tiempo, los cálculos químico-cuánticos de desplazamiento químico han ido ganando popularidad como un instrumento suplementario a los experimentos en las últimas décadas. Además, como el apantallamiento magnético nuclear junto con acoplamiento de espín-espín constituyen una medida absoluta de la contribución electrónica al campo magnético local sentido por el momento dipolar magnético nuclear, los cálculos teóricos de esta propiedad posibilitan sondear sitios nucleares únicos dentro del sistema molecular en oposición a otras propiedades moleculares de segundo orden, por ejemplo: la polarizabilidad dipolo eléctrico, o la constante de apantallamiento.<sup>37</sup>

Las áreas de química teórica y computacional que tratan con propiedades de RMN se ha desarrollado con el paso de los años y ahora existe un arsenal diverso de métodos que permiten el cálculo de estos parámetros a partir de métodos de primeros principios. La mayoría de los avances se han logrado durante la última década en el cálculo del desplazamiento químico de RMN. El establecimiento de variantes en el método Hartree-Fock acoplado con aproximaciones que corrigen el origen, han marcado un antes y un después en el campo de los cálculos del desplazamiento químico de RMN, puesto que al ser un sistema de tamaño químicamente significativo se ha vuelto accesible a tratamiento cuantitativo. Durante los últimos años se han desarrollado

poderosas aproximaciones post-Hartree-Fock que incluyen la correlación electrónica en el cálculo de desplazamientos químicos. Desafortunadamente, el costo computacional de estos métodos correlacionados impide su aplicación rutinaria en algunos problemas de interés químico.<sup>37</sup>

La DFT es una alternativa más rápida y económica computacionalmente, que difiere de la teoría de Hartree-Fock en el uso de funcionales aproximados llamados potenciales de intercambio y correlación en lugar de las integrales ordinarias. Estos potenciales permiten a la DFT incluir efectos de correlación electrónica con menos recursos y esfuerzo computacional convirtiéndolo en un procedimiento variacional alternativo a la solución de la ecuación de Schrödinger, donde el funcional de la energía electrónica es minimizado con respecto a la densidad electrónica aplicada a sistemas electrónicos.<sup>39,40</sup>

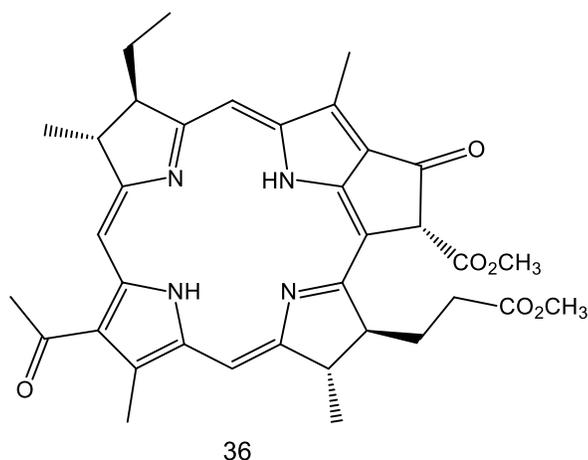
El desarrollo de métodos DFT efectivos que incluyan los efectos de correlación electrónica han sido probados para ser una herramienta importante en el campo de los cálculos de apantallamiento. Una de las principales aspiraciones era incorporar los efectos no locales perdidos en las aproximaciones semilocales en los métodos DFT híbridos, como el anteriormente propuesto por Becke (B3LYP), con la idea de reducir errores y aumentar los alcances prácticos de DFT. Como respuesta a estas necesidades surge el funcional  $\omega$ B97X-D creado por Head-Gordon y colaboradores,<sup>45</sup> el cual muestra mejoras importantes para las interacciones no covalentes y similar efectividad y exactitud para las interacciones covalentes.<sup>41-45</sup>

Uno de los métodos más notables para calcular espectros RMN es el método GIAO ya que proporciona mejores resultados con un menor tamaño en el conjunto de funciones bases.<sup>39, 46, 47</sup> Diversos grupos de trabajo han incorporado este método en paquetes comerciales de software y esto ha contribuido a seleccionar dicho método como primera elección para la mayoría de los cálculos de RMN. Pese a los beneficios del empleo de estas técnicas computacionales existen errores inherentes asociados al cálculo de los desplazamientos químicos y otras constantes de RMN. Estos errores, en algunos casos, pueden tener una desviación de hasta 0.4 ppm para  $^1\text{H}$  y cerca de 10 ppm o más para  $^{13}\text{C}$ , los cuales son claramente muy grandes para diferenciar estereoisómeros en productos naturales o identificar intermediarios reactivos. Las fuentes de error sistemáticos pueden estar asociadas a la correlación de electrones, las interacciones intermoleculares e interacciones con el solvente, la movilidad conformacional, el efecto de átomos pesados y los efectos rota-vibratorios. Estas fuentes de error se hacen más importantes cuando las moléculas presentan estructuras complejas con una alta movilidad. Una de las formas más efectivas de reducir la mayoría de estos errores sin emplear metodologías más complejas, es el empleo de métodos de escalamiento empírico. Estas técnicas se usan para lograr cálculos de gran precisión de desplazamientos químicos con recursos computacionales pequeños o moderados. En este enfoque todas las fuentes de error sistemático se reducen por medio de factores de escalamiento determinados mediante el análisis de regresión lineal de datos

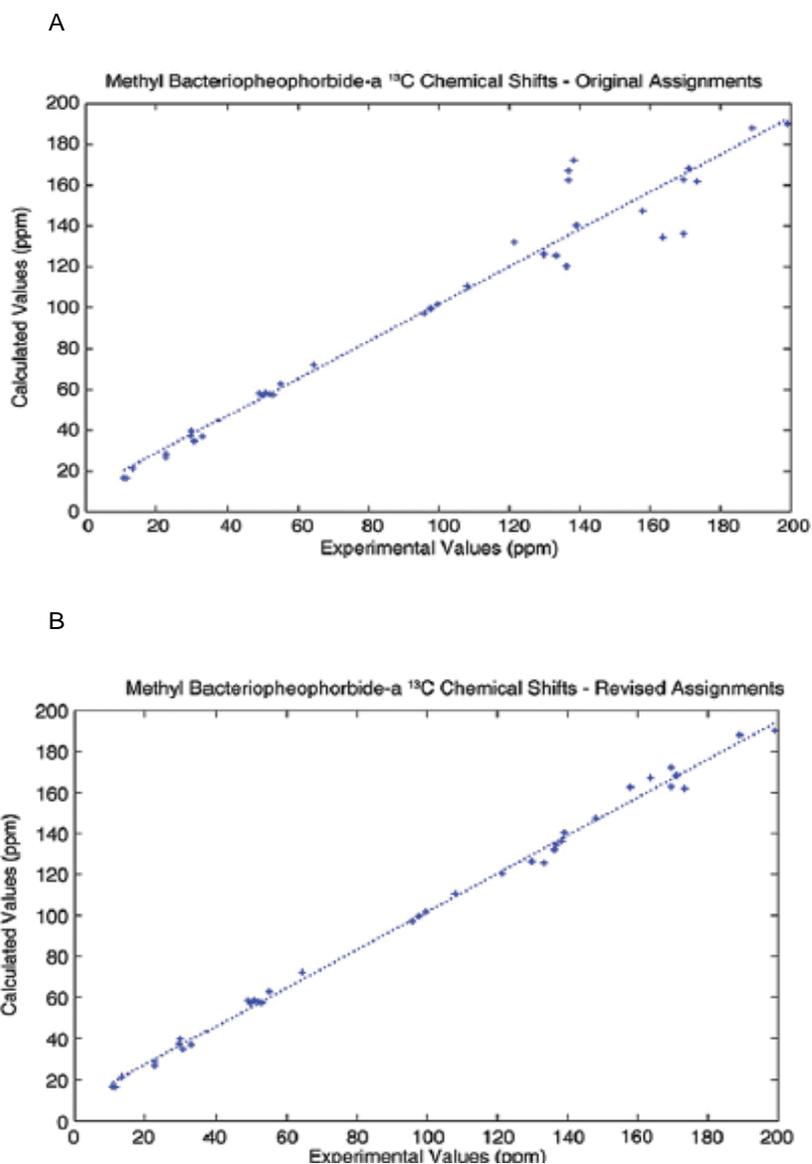
experimentales de desplazamientos químicos y sus respectivos resultados teóricos.<sup>41, 48, 50</sup>

En particular, modelos basados en procedimientos de regresión lineal han sido desarrollados para el nivel de cálculo  $\omega$ B97X-D/6-31G(d). Dicho modelo ha sido desarrollado y ampliamente validado usando una colección considerable de moléculas de los cuales existe información experimental confiable y disponible. Dicho modelo se encuentra implementado en el código Spartan<sup>16</sup>.<sup>49</sup>

A medida que los estudios en química orgánica avanzan, las moléculas de interés se vuelven cada vez más grandes y con ellas el desarrollo de métodos computacionales que puedan tratar estos sistemas crece rápidamente.<sup>40</sup> Una de las aplicaciones básicas del cálculo teórico del desplazamiento químico es ayudar a asignar espectros de difícil análisis que presentan sobreposición de señales, esto debido a la claridad en los espectros obtenidos teóricamente, donde se observa de manera precisa la correspondencia entre los desplazamientos químicos y el núcleo respectivo. Un ejemplo representativo del uso de técnicas computacionales para la corrección de la asignación en espectros complejos es el reportado por Facelli;<sup>50</sup> en el cual mediante la comparación de los desplazamientos químicos teóricos se corrigió la asignación de las señales observadas para la metil-bacteriofeoforbida A y la metil-bacterioclorofila. En la **Figura 19** se muestra la estructura de la metil-bacteriofeoforbida A (36), mientras que en la **Figura 20** se muestran las gráficas de regresión lineal que muestran la mejoría de la correlación entre los valores computacionales y experimentales luego del ajuste con ayuda de los cálculos teóricos.<sup>50</sup>



**Figura 19.** Estructura de la metil-bacteriofeoforbida A

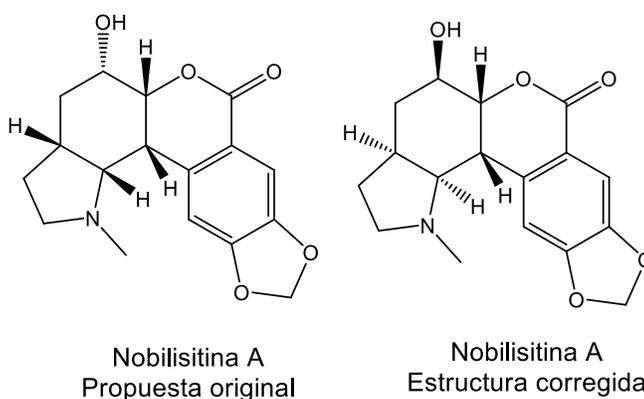


**Figura 20.** Graficas de regresión que muestran la correlación de las asignaciones original y revisada de la Metil-bacteriofeoforbida A. Imagen tomada de la referencia 50.

En la gráfica A (**Figura 20A**) se muestra la correlación entre el desplazamiento químico teórico contra el experimental de la asignación original; en la gráfica B (**Figura 20B**) se observa la misma correlación luego de la revisión en la asignación con ayuda de métodos computacionales.<sup>50</sup>

Otro problema significativo en la elucidación estructural de productos naturales es la determinación de la estereoquímica. Los cálculos computacionales del desplazamiento químico permiten distinguir estructuras relacionadas. Un ejemplo de esta aplicación es el trabajo realizado con el Vanusal B, cuya estructura fue propuesta y

posteriormente asignada a un diastereómero diferente basado en la información experimental obtenida por RMN.<sup>51</sup> Luego de la revisión de la estructura se obtuvieron los valores teóricos de desplazamientos químicos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de todos los posibles diastereómeros, los resultados mostraron que los cálculos teóricos fueron capaces de proporcionar información para la resolución de la estructura de una manera más rápida y eficiente. Otro ejemplo claro de la ayuda de los cálculos computacionales en la resolución de problemas de diastereómeros en productos naturales es el caso de la Nobilisitina A, la cual fue aislada y caracterizada por Evidente y colaboradores en 1999;<sup>52</sup> la estructura originalmente propuesta presentó problemas de coincidencia cuando se llevó a cabo el proceso de síntesis total de la misma. El estudio computacional permitió determinar la estructura correcta de la Nobilisitina A (**Figura 21**).<sup>53, 54</sup>



**Figura 21.** Estructura original propuesta de la Nobilisitina A y estructura corregida con el empleo de cálculos computacionales de la Nobilisitina A.

En los últimos años se ha prestado especial atención al estudio de las proteínas, particularmente en la conformación sobre la cadena de péptidos; en estudios realizados mediante la comparación de parámetros obtenidos experimentalmente y valores de desplazamiento químico obtenidos empleando DFT, se ha observado mayor facilidad en la caracterización de las mismas empleando métodos computacionales como auxiliares.<sup>55</sup> Otro ejemplo de las aplicaciones es el reportado por Pierens y colaboradores,<sup>56</sup> en el cual se realiza el cálculo teóricos de la molécula de Colchicina y mediante la comparaciones de los valores teóricos y experimentales es posible determinar las estructuras monoméricas y diméricas al variar las disoluciones.<sup>56</sup>

## OBJETIVO GENERAL

Obtención de metabolitos secundarios de *Haliclona (Reniera) tubifera* y su caracterización estructural por medio de experimentos en 1 y 2D de RMN y teoría del funcional de la densidad.

### Objetivos específicos

- Aislamiento y purificación de metabolitos secundarios de *H. (Reniera) tubifera*, a partir de los extractos con metanol, diclorometano y de acetato de etilo, empleando métodos cromatográficos.
- Caracterización estructural de los metabolitos aislados empleando experimentos de RMN en una y dos dimensiones, homo y heteronucleares; y espectrometría de masas.
- Optimización de la geometría y cálculo de modos normales de vibración empleando la Teoría del Funcional de la Densidad;
- Determinación del tensor de apantallamiento a través del método GIAO. Validación estadística del modelo y predicción teórica del desplazamiento químico de las moléculas aisladas, para su correcta elucidación estructural.



## METODOLOGÍA

### Material y equipo de laboratorio

Los disolventes empleados para las separaciones y purificaciones fueron de grado industrial y destilados en el laboratorio previamente a su uso.

Los análisis por cromatografía en capa delgada (CCD) y capa delgada preparativa (CCDP) se realizaron en cromatofólios de aluminio impregnados con sílice 60 de grosor de película de 200  $\mu\text{m}$  e indicador de fluorescencia a 254 nm, de la marca Merck®; mientras que los fraccionamientos y la purificación de los metabolitos se realizó por cromatografía en columna (CC) con gel de sílice de tamaño de partícula de 63-200  $\mu\text{m}$  (70-230 tamaño de malla) y gel de sílice 60 (2-25  $\mu\text{m}$ ) para CCD.

Los compuestos purificados fueron analizados mediante Resonancia Magnética Nuclear; en un equipo RMN Bruker modelo Avance III HD 400 con una sonda BBO de 5mm con un gradiente protegido en z, para los experimentos homonucleares y heteronucleares en una y dos dimensiones, empleando disolventes deuterados de acuerdo a la polaridad del compuesto y tomando como referencia la señal residual de los mismos.

El análisis mediante Cromatografía de Gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM) se llevó a cabo en un cromatógrafo Agilent Technology 6890N, empleando una columna DB-5 de 30 m de longitud y 0.32  $\mu\text{m}$  de grosor de recubrimiento; empleando Helio como fase móvil a un flujo de 1 mL/min con una temperatura de inyección inicial de 80° e incrementos de 15°/min hasta llegar a la temperatura final de 300°C en un tiempo de 15 min, con un detector de masas 5973N.

El análisis de masas se realizó en un espectrómetro de masas JEOL GCMate II con métodos de ionización: Impacto Electrónico a 70 eV a una temperatura de 300°C y FAB (*Fast atom bombardment*) en modo positivo y negativo; utilizando DMSO con ultramark® como marcador de peso molecular.

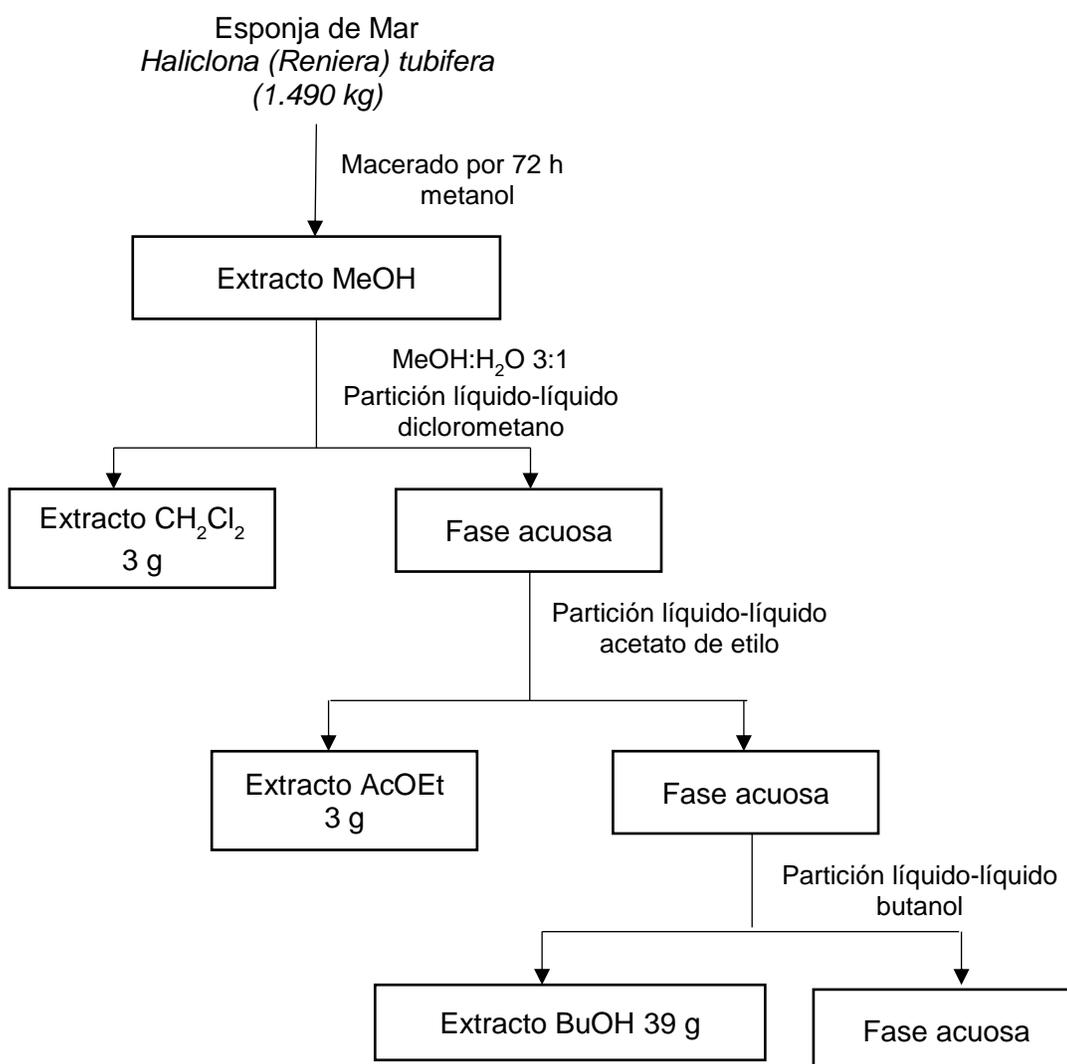
Los cálculos computacionales se llevaron a cabo en una computadora de escritorio con sistema operativo Windows 7® con un procesador Intel Xeon Inside de 4 núcleos y 8 Gb de memoria RAM.

### Material animal

Las muestras de esponja de mar *Haliclona (Reniera) tubifera* fueron colectadas en las costas del estado de Yucatán, México a una profundidad de 0.5-1 m el 2 de noviembre de 2015 en las coordenadas 21°12'-21°22' latitud norte 81°69'-89°64' longitud oeste. La recolecta de los organismos se realizó por medio de buceo libre, obteniéndose una biomasa total de 8.145 Kg. Los organismos recolectados fueron colocados inmediatamente en hieleras y transportados al laboratorio, donde se llevó a cabo la limpieza.

## Preparación del material y obtención de extractos

Las muestras de esponja de mar se limpiaron de todo material extraño y se congelaron hasta su procesamiento. El procesamiento de las muestras congeladas se realizó triturando y congelando nuevamente para ser sometidas a liofilización. La extracción de los compuestos se llevó a cabo mediante macerado de metanol (MeOH) durante 72 h y cuidando en todo momento la exposición a la luz. El extracto metanólico seco fue resuspendido en una mezcla MeOH:H<sub>2</sub>O en proporciones 3:1. A partir de esta suspensión se realizaron particiones con diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), acetato de etilo (AcOEt) y butanol (BuOH) y se obtuvieron los siguientes los extractos: diclorometano (3 g), acetato de etilo (3.5 g) y butanol (39 g), **Figura 22**.



**Figura 22.** Esquema de obtención de los extractos a partir de la esponja de mar *Haliclona (Reniera) tubifera*.

## Purificación de compuestos aislados

### *Columna primaria partición con diclorometano*

A partir del extracto de diclorometano se realizó una columna primaria de 6 cm de diámetro empacada con gel de sílice de tamaño de partícula de 63-200  $\mu\text{m}$  (70-230 tamaño de malla), y eluída con una fase móvil de la mezcla hexano (Hex): $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  en proporciones 90:10, 70:30, 50:50, 30:70, 10:90 y 0:100 para continuar con el sistema  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :AcOEt en proporciones 90:10, 70:30, 50:50, 30:70 y 10:90 (**Figura 23**). De dicha columna se obtuvieron 111 fracciones las cuales fueron analizadas por CCD y posteriormente reunidas por similitud en 26 fracciones primarias etiquetadas tDCM de A-Z.

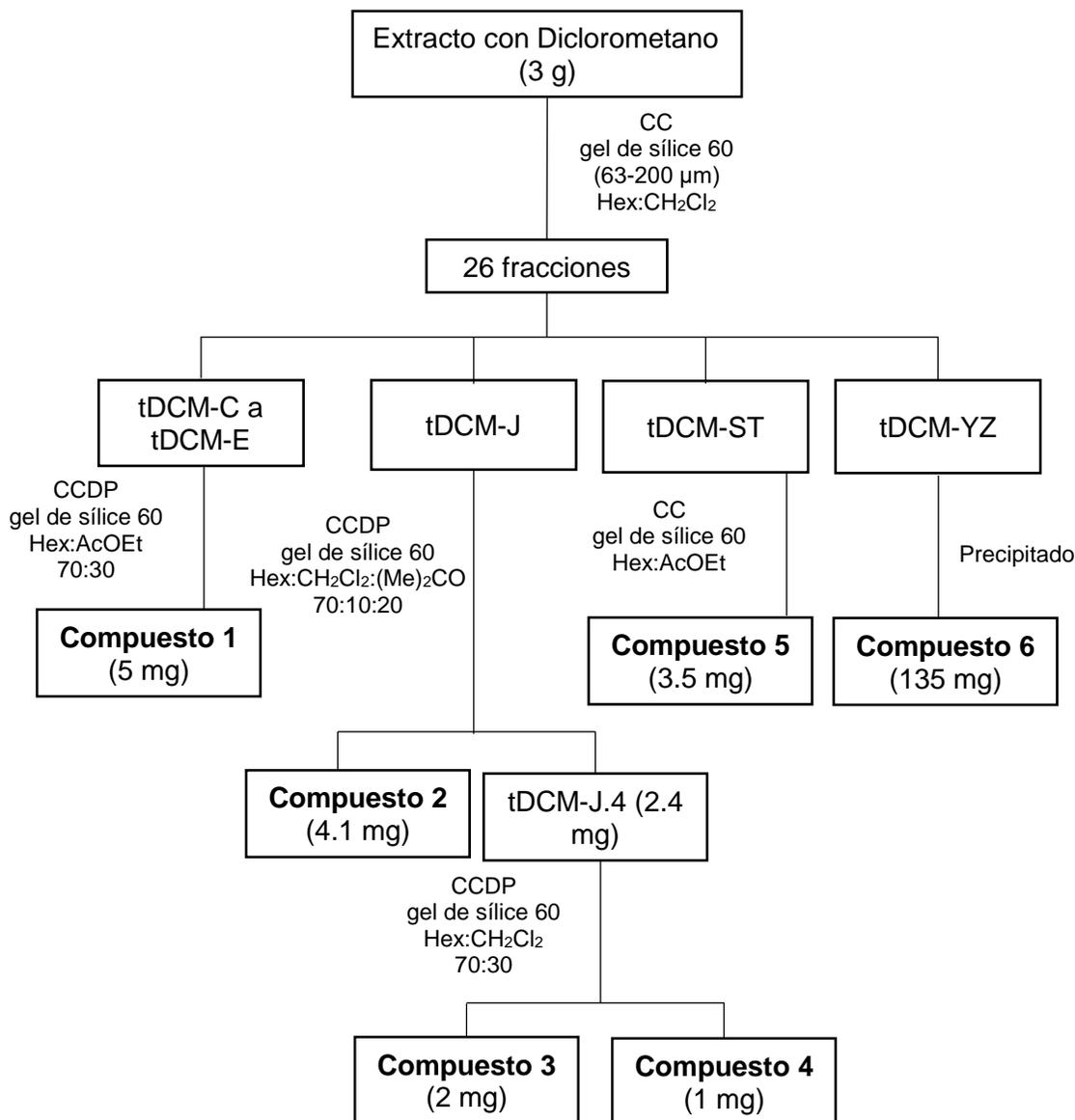
### *Fraccionamiento secundario y separación de compuestos*

La fracción tDCM-C fue separada por CCD en el sistema Hex:AcOEt en proporciones 70:30, separándose dos fracciones etiquetadas como tDCM-C1 y tDCM-C2, las cuales se analizaron por RMN- $^1\text{H}$  y a partir de la fracción tDCM-C1 se obtuvieron 2.3 mg del **compuesto 1**. Así mismo las fracciones tDCM-D y tDCM-E fueron sometidas a CCDP empleando el mismo sistema, de donde se obtuvieron 2.7 mg del **compuesto 1**.

La fracción tDCM-J fue separada por CCDP con un sistema Hex: $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :Acetona ( $\text{Me}_2\text{CO}$ ) en proporciones 70:10:20 y se obtuvieron siete bandas etiquetadas como tDCM-J.1- tDCM-J.7. Se analizaron por RMN- $^1\text{H}$  a las fracciones tDCM-J.4 y tDCM-J.6, esta última resultó en 4.1 mg de una mezcla de compuestos, de la cual se pudo identificar un compuesto mayoritario etiquetado como **compuesto 2**, al cual se le realizaron experimentos de CG-EM y RMN en 1 y 2D. La fracción tDCM-J.4 fue purificada empleando CCDP en el sistema Hex:DCM en proporción 70:30; obteniéndose tres fracciones etiquetadas como tDCM-J.4.1, tDCM-J.4.2 y tDCM-J.4.3; la fracción tDCM-J.4.2 fue identificada como el **compuesto 3** (2 mg) y la fracción tDCM-J.4.3 se identificó como el **compuesto 4** (0.1 mg).

Las fracciones tDCM-S y tDCM-T se reunieron y se separaron por cromatografía en columna empleando una columna de 1 cm de diámetro con gel de sílice 60 con fase móvil Hex:AcOEt en proporciones 100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, y 40:60. De dicha columna obtuvieron 30 fracciones las cuales fueron reunidas en 4 fracciones (tDCM-ST.A - tDCM-ST.D). Se trabajó con la fracción tDCM-ST.A, a la cual se le realizó una CCDP en con el sistema Hex:AcOEt en proporciones 30:70, de ésta la fracción de mayor polaridad se identificó el **compuesto 5** (3.5 mg).

En las fracciones tDCM-Y y tDCM-Z se observó un precipitado, estos fueron filtrados, etiquetados como tDCM-Y.1 y tDCM-Z.1 y se analizaron por RMN- $^1\text{H}$  identificándose el **compuesto 6** (135 mg) en ambos casos. En la **Figura 23** se muestra un esquema de la purificación de los productos ahora mencionados.



**Figura 23.** Esquema de purificación de los compuestos obtenidos a partir del extracto de diclorometano del macerado en metanol

*Columna primaria, partición con acetato de etilo*

A partir del extracto de diclorometano se realizó una columna primaria de 6 cm de diámetro empacada con gel de sílice (63-200  $\mu\text{m}$ ), y eluida con una fase móvil de la mezcla Hex:AcOEt en proporciones 90:10, 70:30, 60:40, 50:50, 30:70, 10:90 y 0:100 para continuar con el sistema AcOEt:MeOH en proporciones 90:10, 70:30, 50:50, 30:70 hasta llegar al 100% de MeOH. De dicha columna se obtuvieron 80 fracciones las cuales fueron analizadas por CCD y posteriormente reunidas por similitud en 6 fracciones primarias etiquetadas tAc de A-F.

### *Fraccionamiento secundario y separación de compuestos*

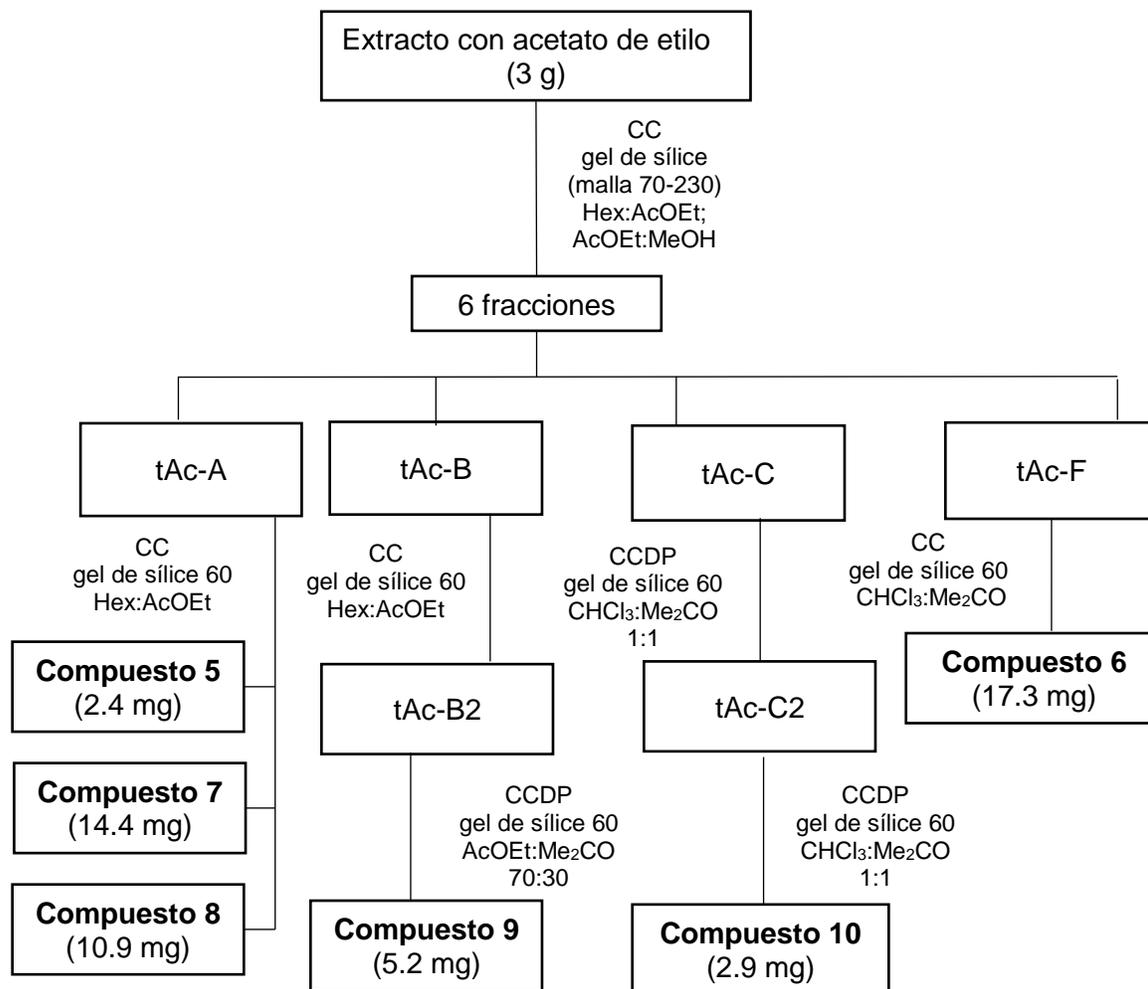
La fracción tAc-A fue separada mediante CC, empleando una columna de 1 cm de diámetro empacada con gel de sílice 60 y con fase móvil Hex:AcOEt en gradiente, incrementando la polaridad en proporciones 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80 y 10:90. Se obtuvieron 45 fracciones reunidas por similitud en 5 fracciones etiquetadas tAc-Aa - tAc-Ae . Dichas fracciones fueron analizadas por RMN-<sup>1</sup>H y de las fracciones tAc-Aa (2.4 mg), tAc-Ab (14.4 mg) y tAc-Ab (10.9 mg) se obtuvieron los **compuestos 5, 7 y 8** respectivamente.

La fracción tAc-B fue separada mediante cromatografía en columna, empleando una columna de 1 cm de diámetro empacada en gel de sílice con tamaño de partícula de 2-25 µm y con fase móvil Hex:AcEt en gradiente, incrementando la polaridad en proporciones 90:10, 80:20, 70:30 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90. Se obtuvieron 60 fracciones que fueron reunidas en tres fracciones etiquetadas como tAc-B1 - tAc-B3. Se obtuvieron 6.9 mg de la fracción tAc-B2 la cual fue purificada empleando CCDP con fase móvil 70:30 y fue identificada como el **compuesto 9** del cual se obtuvieron 5.2 mg.

La fracción tAc-C fue separada mediante CC, empleando una columna de 1 cm de diámetro con fase móvil CHCl<sub>3</sub>:Me<sub>2</sub>CO 1:1. Se obtuvieron 38 fracciones que fueron reunidas por similitud por CCD en cuatro fracciones etiquetadas como tAc-C1 a tAc-C4.

La fracción tAc-C2 se separó por CCDP con fase móvil CHCl<sub>3</sub>:Me<sub>2</sub>CO 1:1 de la cual se obtuvo la fracción tAc-C2 de 2.9 mg que fue analizada por RMN-<sup>1</sup>H y se identificó como el **compuesto 10** (3.2 mg).

La fracción tAc-F fue disuelta en MeOH, de ella se obtuvo un precipitado que fue separado por decantación. La fracción sin el precipitado fue separada empleando cromatografía en columna con gel de sílice con tamaño de partícula de 2-25 µm en una columna de 2 cm de diámetro empleando como fase móvil CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:Me<sub>2</sub>CO con gradiente, incrementando la polaridad en proporciones 90:10, 70:30, 50:50, 30:70, 10:90 y 00:100. Se obtuvieron 60 fracciones reunidas por similitud en cuatro fracciones etiquetadas como tAc-F1 a tAcF4. La fracción tAc-F1 fue analizada por RMN-<sup>1</sup>H y se identificó el **compuesto 6** (17.3 mg). Esto se muestra en la **Figura 24**.



**Figura 24.** Esquema de purificación de los compuestos obtenidos a partir de la fracción de acetato de etilo del extracto metanólico

#### *Partición del extracto con butanol*

Se realizó una extracción líquido-líquido empleando  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y AcOEt. El extracto de BuOH se resuspendió en MeOH:H<sub>2</sub>O en proporciones 3:1, a partir de dicha extracción se obtuvieron 1.5 g de extracto con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y 19.5 g de extracto de AcOEt.

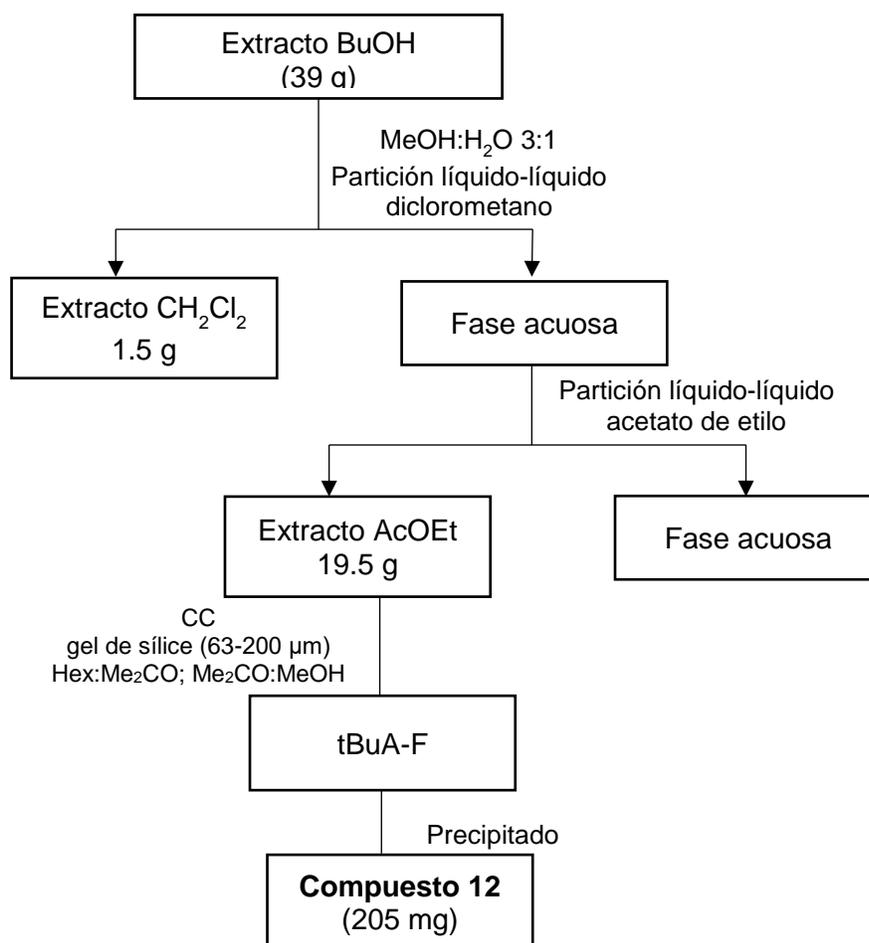
#### *Columna primaria de la fracción con AcOEt del extracto butanólico*

A partir de la partición con AcOEt del extracto butanólico se realizó una columna primaria de 6 cm de diámetro empleando como fase estacionaria sílica gel (63-200  $\mu\text{m}$ ) y como fase móvil primeramente un sistema en gradiente con Hx:Me<sub>2</sub>CO incrementando la polaridad en proporciones 90:10, 70:30, 50:50, 30:70, 10:90 y 00:100, para continuar con un sistema de gradiente con Me<sub>2</sub>CO:MeOH incrementando la polaridad en proporciones de 90:10, 70:30 y 50:50. A partir de dicha columna se obtuvieron 38

fracciones, las cuales fueron analizadas mediante CCD y reunidas en 7 fracciones etiquetadas como tBuA-A a tBuA-G.

#### *Separación de compuestos*

La fracción tBuA-F mostró la presencia de un precipitado blanco luego de ser resuspendida en MeOH; dicho precipitado fue separado del líquido disuelto mediante filtrado al vacío, el precipitado se identificó como el **compuesto 11**, del cual se obtuvieron 205 mg, **Figura 25**.

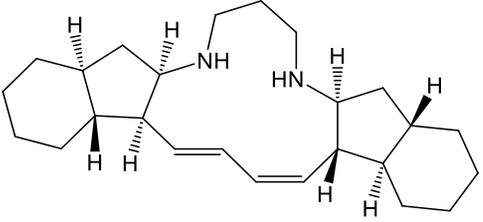
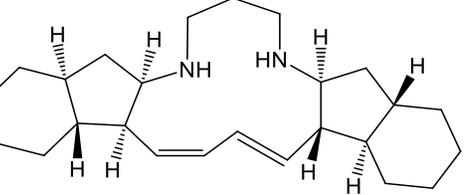
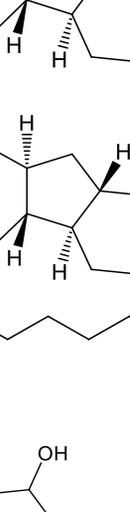
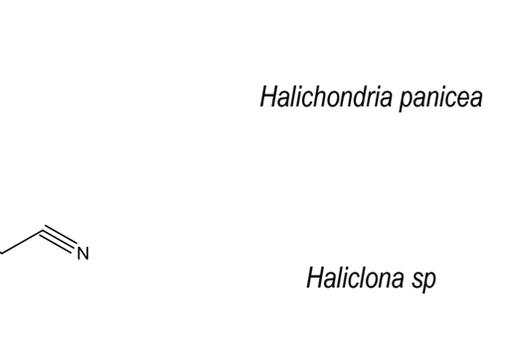


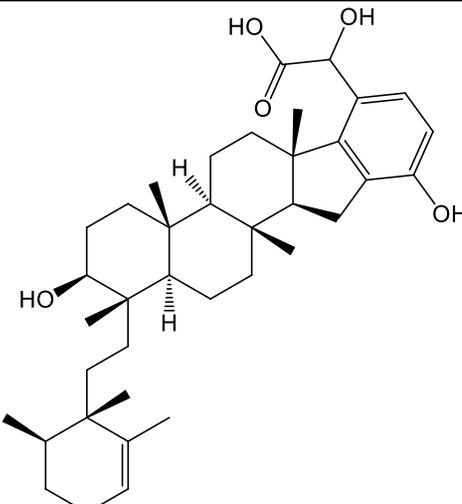
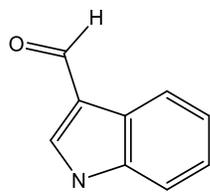
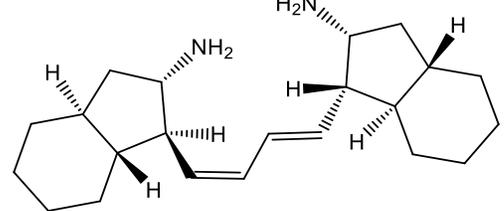
**Figura 25.** Esquema de purificación de los compuestos obtenidos a partir de la fracción de butanol del extracto metanólico

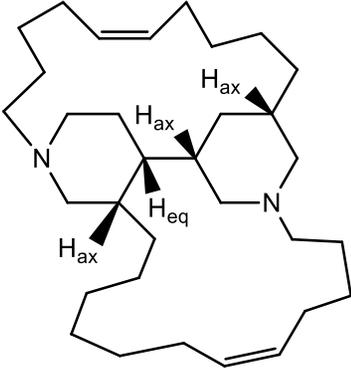
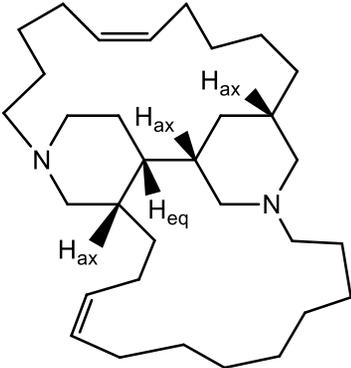
## Predicción del desplazamiento químico

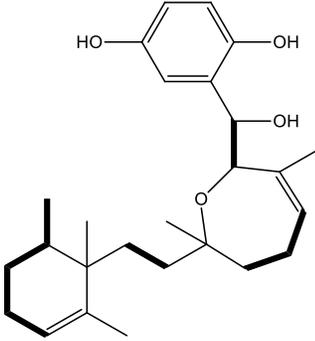
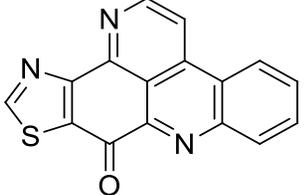
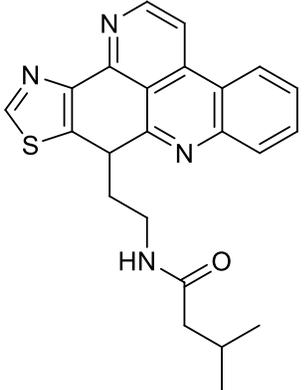
De la literatura se seleccionó un conjunto de 25 moléculas de prueba, del cual se realizó la validación externa del modelo de corrección empírica para el núcleo de  $^{13}\text{C}$ . El conjunto de prueba fue seleccionado considerando moléculas aisladas a partir de esponja de mar con distintos tipos de entornos químico para grupos de  $^{13}\text{C}$  y  $^1\text{H}$ , así como diversidad en las hibridaciones para los núcleos de  $^{13}\text{C}$ , diversidad en movilidad molecular y peso molecular. Se consideraron 585 datos teóricos y experimentales para el núcleo de  $^{13}\text{C}$  y 588 datos teóricos y experimentales para el núcleo de  $^1\text{H}$ ; de los cuales para el núcleo de  $^{13}\text{C}$  se consideraron 145 carbonos cuaternarios, 209 metinos, 194 metilos y 37 metilenos. En la **Tabla 1** se muestran las estructuras y procedencia de las moléculas del conjunto prueba.

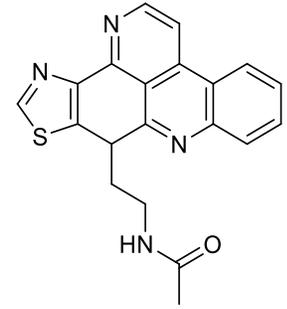
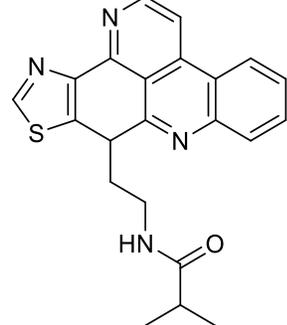
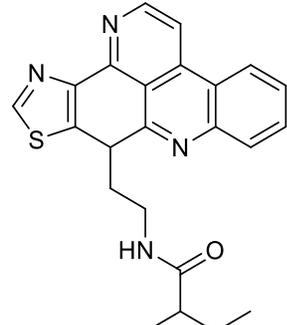
**Tabla 1.** Moléculas del conjunto de prueba para la validación de la metodología del cálculo teórico del desplazamiento químico.

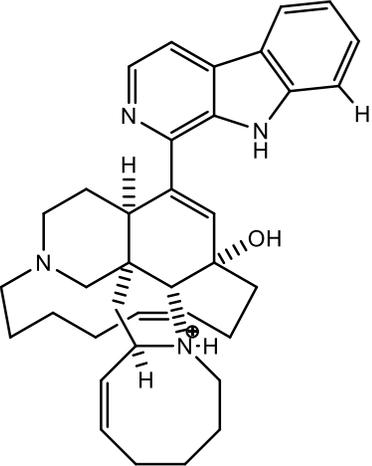
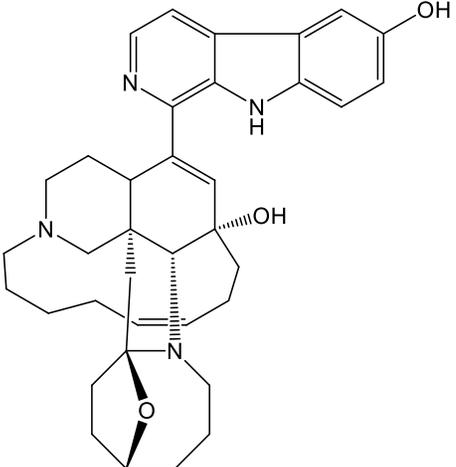
Compuesto	Estructura	Fuente de obtención
1 (10E,12Z)-Halicondiamina		<i>Halichondria panicea</i>
2 (10Z,12E)-Halicondiamina		<i>Halichondria panicea</i>
3 3-dodecylpiridina		<i>Haliclona sp</i>
4 Ácido haliclónico A		<i>Haliclona (Halichocona) sp</i>

Compuesto	Molécula	Fuente de obtención	
5	Ácido haliclónico B	 <p>The structure of Halichondric acid B is a complex polycyclic molecule. It features a central pentacyclic core with several stereocenters indicated by wedges and dashes. Attached to this core are a cyclohexene ring with two methyl groups, a propyl chain, and a side chain containing a carboxylic acid group and a phenol ring with two hydroxyl groups.</p>	<i>Haliclona (Halichocona) sp</i>
6	Formilindol	 <p>The structure of Formilindole is a benzimidazole derivative. It consists of a benzene ring fused to an imidazole ring. A formyl group (-CHO) is attached to the 2-position of the imidazole ring.</p>	<i>Oceanapia Sagittaria (Sollas)</i>
7	Halichondriamina A	 <p>The structure of Halichondriamine A is a complex polycyclic alkaloid. It features a pentacyclic core with a decahydroquinoline-like system. It has multiple stereocenters and is substituted with an amino group (-NH<sub>2</sub>) and a long chain containing a double bond and another amino group.</p>	<i>Halichondria sp</i>

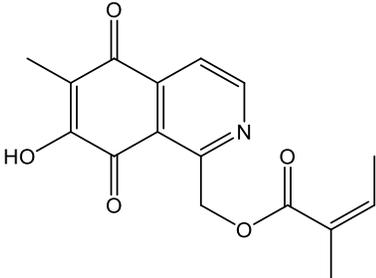
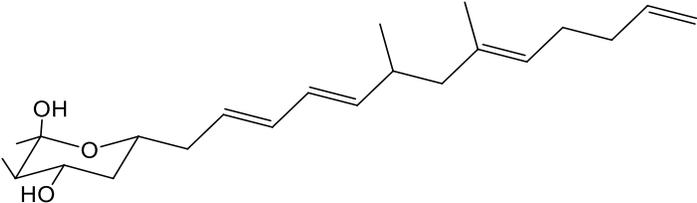
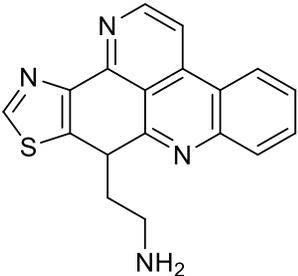
	Compuesto	Molécula	Fuente de obtención
8	Haliconaciclamina A	 <p>The structure of Haliconaciclamina A is a complex polycyclic alkaloid. It features a central core with two nitrogen atoms (N) and a central carbon atom bonded to four other carbons. The stereochemistry is indicated with wedged and dashed bonds. The central carbon is bonded to two axial hydrogens (H<sub>ax</sub>) and one equatorial hydrogen (H<sub>eq</sub>). The axial hydrogens are on the same side of the ring system, while the equatorial hydrogen is on the opposite side. The ring system is highly fused and contains several double bonds, including a terminal double bond on the right side.</p>	<i>Haliclona sp</i>
9	Haliconaciclamina B	 <p>The structure of Haliconaciclamina B is very similar to Haliconaciclamina A. It has the same core polycyclic alkaloid structure with two nitrogen atoms and a central carbon atom. The stereochemistry is also indicated with wedged and dashed bonds. The central carbon is bonded to two axial hydrogens (H<sub>ax</sub>) and one equatorial hydrogen (H<sub>eq</sub>). The axial hydrogens are on the same side of the ring system, while the equatorial hydrogen is on the opposite side. The ring system is highly fused and contains several double bonds, including a terminal double bond on the left side.</p>	<i>Haliclona sp</i>

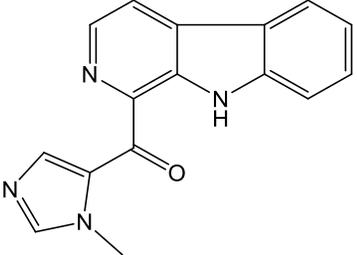
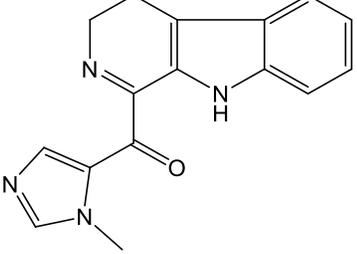
Compuesto	Molécula	Fuente de obtención
10	 <chem>CC1=CC=C(C=C1)C(O)C(O)C1CC2C(C)C=CC=C2O1</chem>	<i>Haliclona sp</i>
11	 <chem>O=C1C2=NC3=CC=CC=C3N=C2N1S</chem>	<i>Oceanapia sagittaria</i>
12	 <chem>CC(C)CC(=O)NCC1C2=NC3=CC=CC=C3N=C2N1S</chem>	<i>Oceanapia sagittaria</i>

	Compuesto	Molécula	Fuente de obtención
13	Kuanoniamina D		<i>Oceanapia sagittaria</i>
14	Kuanoniamina E		<i>Oceanapia sagittaria</i>
15	Kuanoniamina F		<i>Oceanapia sagittaria</i>

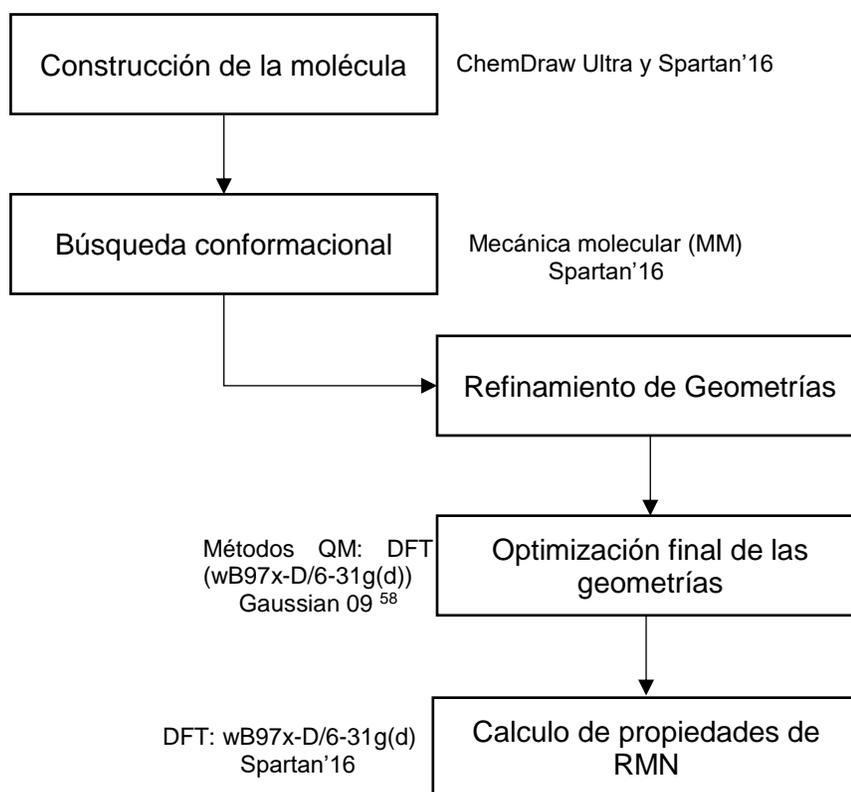
Compuesto	Molécula	Fuente de obtención
16	<p data-bbox="394 548 541 581">Manzamina A</p>  <p>The structure of Manzamina A is a complex polycyclic alkaloid. It features a central piperidine ring fused to a decalin system. Attached to this system are a piperazine ring, a piperidine ring, and a decalin ring. A 2,3-dihydro-1H-indole-5-yl group is attached to the decalin system via a double bond. A hydroxyl group (OH) is attached to the decalin system. The decalin ring also has a hydrogen atom (H) attached to it.</p>	<i>Haliclona sp</i>
17	<p data-bbox="394 1060 541 1092">Manzamina X</p>  <p>The structure of Manzamina X is a complex polycyclic alkaloid. It features a central piperidine ring fused to a decalin system. Attached to this system are a piperazine ring, a piperidine ring, and a decalin ring. A 2,3-dihydro-1H-indole-5-yl group is attached to the decalin system via a double bond. A hydroxyl group (OH) is attached to the decalin system. The decalin ring also has a hydrogen atom (H) attached to it.</p>	<i>Xestospongia sp</i>

Compuesto	Molécula	Fuente de obtención
18	Manzamina Y	<i>Haliclona sp</i>
19	Mimosamicina	<i>Halichondria sp</i>
20	Neopetroclamina B	<i>Neopetrosia cf exigua</i>

Compuesto	Molécula	Fuente de obtención
21	O-dimetil-renierona	 <i>Halichondria sp</i>
22	Rottnestol	 <i>Haliclona sp</i>
23	Subarina	 <i>Oceanapia sagittaria</i>

	Compuesto	Molécula	Fuente de obtención
24	Xestomanzamina A		<i>Xestospongia sp</i>
25	Xestomanzamina B		<i>Xestospongia sp</i>

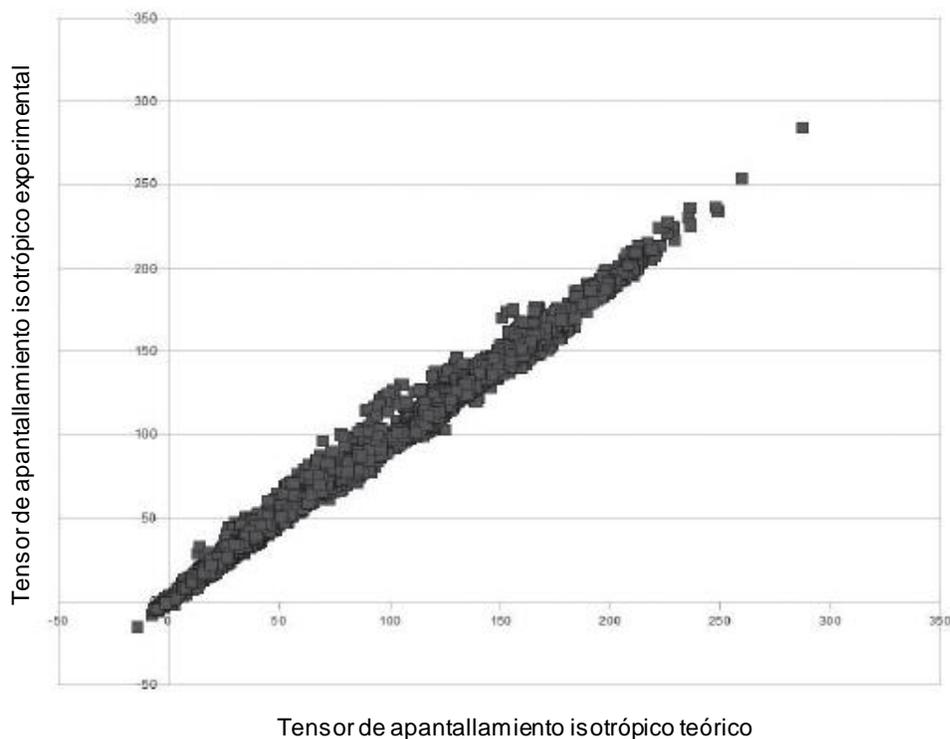
Para llevar a cabo la validación del modelo se calculó el desplazamiento químico teórico empleando el conformero de menor energía de cada molécula, el procedimiento para esto se indica en el esquema de la **Figura 26**.



**Figura 26.** Esquema metodológico para la búsqueda de conformeros de mínima energía y desplazamiento químico teórico.

El cálculo del tensor de apantallamiento se realizó usando la aproximación isotrópica para cada  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de las moléculas del grupo de prueba a través del método GIAO y empleando el modelo teórico  $\omega\text{B97X-D/6-31G(d)}$ . Los parámetros de regresión lineal entre el tensor de apantallamiento isotrópico teórico aplicados en la corrección del cálculo del desplazamiento químico del  $^{13}\text{C}$  fueron determinados usando un conjunto de datos que comprende  $\sim 8000$  carbonos  $\text{sp}^3$ ,  $\sim 620$  carbonos  $\text{sp}^2$  y  $\sim 450$  carbonos  $\text{sp}$  a partir de una biblioteca de  $\sim 3000$  moléculas orgánicas con  $\sim 15,000$  carbonos únicos, pero sin tomar en cuenta la procedencia de las mismas.

A partir del modelo de corrección empleando regresión lineal desarrollado por Spartan'16 (**Figura 27**)<sup>49</sup> se llevó a cabo el cálculo del desplazamiento químico teórico corregido, el cual fue contrastado con los resultados obtenidos sin emplear el modelo de corrección.



**Figura 27.** Gráfica de regresión lineal del núcleo de  $^{13}\text{C}$ . Imagen tomada del Manual de usuario del programa Spartan'16<sup>49</sup>

La corrección del desplazamiento químico de  $^{13}\text{C}$  se llevó a cabo empleando la **Ecuación (1)**

$$^{13}\mathbf{C}_i = ^{13}\mathbf{C}_i \cdot m + \sum_k [X^{(0)}_k + X^{(1)}_k (R_{i,k} - 1) + X^{(2)}_k (R_{i,k} - 1)^2] \quad (1)$$

La cual se encuentra implementada en el código Spartan'16 y en donde  $^{13}\mathbf{C}_i$  es el desplazamiento químico corregido,  $^{13}\text{C}$  es el desplazamiento químico sin corregir y  $m$  es el factor de escalamiento. La sumatoria se lleva a cabo empleando todos los enlaces (1 o 2 para carbonos  $\text{sp}$ , 3 para carbonos  $\text{sp}^2$  y 4 para carbonos  $\text{sp}^3$ );  $X^{(0)}_k$ ,  $X^{(1)}_k$ ,  $X^{(2)}_k$  son parámetros que dependen del átomo enlazado a carbono y  $R_{i,k}$  son las longitudes de enlace a carbono. La optimización geométrica se realizó usando el código Gaussian 09 en su versión Linux<sup>58</sup> y el cálculo de los desplazamientos químicos corregidos fue llevado a cabo con el código Spartan'16.<sup>49</sup>



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Predicción de desplazamiento químico teórico

A partir del conjunto de moléculas prueba se llevó a cabo la validación externa de la metodología propuesta. Tras el cálculo del desplazamiento químico teórico se obtuvo el promedio del error obtenido para  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  el cual corresponde a la diferencia absoluta entre el desplazamiento químico teórico y el desplazamiento químico experimental. Los valores obtenidos del error del conjunto de moléculas de prueba se contrastaron con el error máximo reportado en la literatura, de 0.4 ppm para  $^1\text{H}$  y 10 ppm o más para  $^{13}\text{C}$ .<sup>46</sup> Para el caso del  $^1\text{H}$  se observó que el error obtenido (0.26 ppm) se encuentra por debajo del error reportado para este tipo de cálculos.<sup>46</sup>

En el caso del núcleo de  $^{13}\text{C}$ , para el cálculo del desplazamiento químico teórico se obtuvieron dos resultados, uno el obtenido del modelo sin corregir y el que resulta al aplicar la corrección empírica (**Ecuación 1**). En el análisis del modelo corregido (2.15 ppm) y el modelo sin corregir (3.60 ppm), se aprecia que ambos modelos se encuentran por debajo del error máximo reportado en la literatura para el  $^{13}\text{C}$ .<sup>46</sup> Al comparar ambos valores se observa una mejoría en la predicción del desplazamiento químico al emplear el modelo corregido, el cual muestra un error inferior hasta por 1.45 ppm contra el modelo sin corregir, además de obtenerse con una desviación estándar menor (0.81 contra 1.5). El promedio del error para cada molécula del conjunto de prueba se aprecia en la **Tabla 2**.

Un análisis más detallado del error se llevó a cabo observando el efecto que la corrección empírica tiene en los conjuntos de átomos de carbono con características similares, dichas características agrupan a los núcleos en función del número de  $^1\text{H}$  unidos a ellos; considerando dentro de estos grupos, carbonos de grupos metilo, metileno, metino y carbonos cuaternarios. Los resultados obtenidos se muestran de en la **Tabla 3**, en la cual se observa la disminución del error en el modelo corregido al ser comparado con el modelo sin corregir para la mayoría de las moléculas del conjunto de moléculas prueba, siendo más notoria esta mejoría en el caso de los carbonos agrupados como metinos y carbonos cuaternarios.

Se observó que, para los metilos, metinos y carbonos cuaternarios el promedio del error antes de la corrección es mayor al promedio del error después de la corrección. Los metilenos muestran una tendencia opuesta en la cual el modelo sin corregir presenta un error ligeramente menor al modelo corregido. Cabe destacar el caso de los carbonos cuaternarios en donde la disminución del error es más pronunciada, para este grupo de átomos es claramente apreciable el beneficio de emplear la metodología de corrección del cálculo (**Tabla 4**).

**Tabla 2.** Promedio de error y desviación estándar de cada molécula del conjunto de prueba

	Compuesto	<sup>1</sup> H		<sup>13</sup> C corregido		<sup>13</sup> C sin corregir	
		promedio	D.E*	promedio	D.E*	promedio	D.E*
1	(10E,12Z)-Haliconadamina	0.24	0.21	2.03	1.09	2.32	1.95
2	(10Z,12E)-Haliconadamina	0.28	0.25	3.00	1.73	3.06	2.60
3	3-dodecylpiridina	0.14	0.11	1.91	1.51	2.92	1.99
4	Ácido haliclónico A	0.22	0.21	2.46	3.84	3.03	3.98
5	Ácido haliclónico B	0.22	0.19	1.54	1.40	2.6	2.30
6	Formilindol	0.25	0.18	2.42	3.02	6.98	3.67
7	Halichondriamina A	0.20	0.14	2.09	1.55	2.41	2.18
8	Haliconacilamina A	0.24	0.21	3.30	2.49	3.86	2.84
9	Haliconacilamina B	0.41	0.37	2.27	2.63	2.82	2.69
10	Halióxepina	0.20	0.16	1.58	1.13	4.08	7.68
11	Kuanoniamina A	0.41	0.22	2.14	1.36	3.82	1.81
12	Kuanoniamina B	0.28	0.24	1.88	1.41	2.87	1.80
13	Kuanoniamina D	0.23	0.23	2.09	1.54	3.42	1.87
14	Kuanoniamina E	0.23	0.17	1.87	1.38	3.26	1.78
15	Kuanoniamina F	0.17	0.17	1.31	1.80	3.48	2.29
16	Manzamina A	0.37	0.42	4.62	3.85	5.41	3.01
17	Manzamina X	0.20	0.18	2.06	2.63	3.75	2.71
18	Manzamina Y	0.34	0.25	3.90	3.69	4.82	3.80
19	Mimosamicina	0.21	0.08	1.45	1.25	4.13	2.29
20	Neopetrociclamina B	0.18	0.19	2.20	1.79	4.10	6.49
21	O-dimetil-renierona	0.14	0.08	1.94	2.00	3.16	2.36
22	Rottnestol	0.16	0.18	1.47	1.35	2.28	1.25
23	Subarina	0.10	0.12	1.69	1.61	4.20	2.22
24	Xestomanzamina A	0.18	0.17	1.16	1.08	4.00	1.21
25	Xestomanzamina B	0.31	0.45	1.42	1.38	3.10	1.74
	<b>Promedio</b>	<b>0.26</b>	<b>0.21</b>	<b>2.15</b>	<b>1.94</b>	<b>3.60</b>	<b>2.74</b>
	<b>Desviación estándar</b>	<b>0.08</b>		<b>0.81</b>		<b>1.05</b>	

\*Desviación Estándar

**Tabla 3.** Promedio de errores por grupos de núcleo para cada molécula del conjunto de prueba.

Compuesto	Metilos			Metileno			Metino			Cuaternario	
	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C corregido	<sup>13</sup> C sin corregir	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C corregido	<sup>13</sup> C sin corregir	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C corregido	<sup>13</sup> C sin corregir	<sup>13</sup> C corregido	<sup>13</sup> C sin corregir
(10E,12Z)-Halicionadiamina				0.26	2.32	2.08	0.26	2.27	3.20		
(10Z,12E)-Halicionadiamina				0.16	2.06	2.25	0.32	3.66	4.12		
3-dodecylpiridina				0.22	2.46	2.73	0.13	1.95	3.40	0.89	5.99
Ácido haliclónico A	0.25	5.71	6.21	0.20	1.35	1.77	0.51	3.19	3.44	1.36	3.34
ácido haliclónico B							0.29	1.90	2.76	1.04	3.49
Formilindol				0.51	2.07	1.92	0.25	2.82	7.66	1.66	5.62
Halichondriamina A							0.27	2.10	2.82		
Haliconaciclamina A				0.36	2.57	2.60	0.28	2.39	3.45		
Haliconaciclamina B				0.19	1.68	1.50	0.68	3.26	3.55		
Halioxepina	0.25	1.31	2.01				0.26	1.85	3.45	1.25	7.55
Kuanoniamina A				0.21	2.48	2.06	0.40	2.11	4.57	2.23	2.88
Kuanoniamina B	0.12	0.86	0.34	0.15	3.41	2.81	0.34	1.52	3.53	2.18	3.08
Kuanoniamina D	0.11	0.26	1.07	0.18	2.74	2.17	0.26	1.64	4.43	2.43	3.15
Kuanoniamina E	0.81	1.21	1.17	0.08	1.93	2.12	0.23	1.42	3.38	2.27	3.97
Kuanoniamina F	0.12	1.44	1.49	0.34	6.08	6.03	0.21	1.75	4.09	2.79	4.19
Manzamina A				0.20	4.44	4.55	0.44	4.58	5.11	2.08	4.72
Manzamina X				0.29	3.70	3.34	0.20	1.73	3.07	1.18	3.54
Manzamina Y							0.38	5.58	6.40		
Mimosamicina	0.22	0.9	1.89	0.17	2.05	2.07	0.11	1.90	2.58	1.56	5.54
Neopetrociclamina B							0.23	2.43	3.61		
O-dimetil-renierona	0.11	1.11	1.8	0.15	1.74	1.64	0.15	2.95	3.27	1.84	3.94
Rottnestol							0.13	0.96	2.20	1.71	2.33
Subarina	0.01	0.05	1.93				0.11	1.34	4.87	2.28	3.78
Xestomanzamina A	0.04	2.08	1.63				0.20	0.94	4.17	1.39	4.13
Xestomanzamina B							0.32	0.68	2.61	2.24	3.82
<b>Promedio</b>	<b>0.20</b>	<b>1.49</b>	<b>1.95</b>	<b>0.23</b>	<b>2.64</b>	<b>2.54</b>	<b>0.28</b>	<b>2.28</b>	<b>3.83</b>	<b>1.80</b>	<b>4.17</b>
<b>Desviación estándar</b>	<b>0.23</b>	<b>1.59</b>	<b>1.58</b>	<b>0.10</b>	<b>1.19</b>	<b>1.17</b>	<b>0.13</b>	<b>1.13</b>	<b>1.21</b>	<b>0.54</b>	<b>1.29</b>

**Tabla 4.** Promedio de error obtenido de acuerdo al grupo de átomo analizado.

	<sup>1</sup> H		<sup>13</sup> C corregido		<sup>13</sup> C sin corregir	
	promedio	D.E*	promedio	D.E*	promedio	D.E*
Metilos	0.20	0.22	1.49	1.03	1.95	0.89
Metilenos	0.23	0.17	2.64	1.78	2.54	1.81
Metinos	0.28	0.22	2.28	1.95	3.83	2.13
Cuaternarios			1.80	1.47	4.17	2.99

\*Desviación estándar

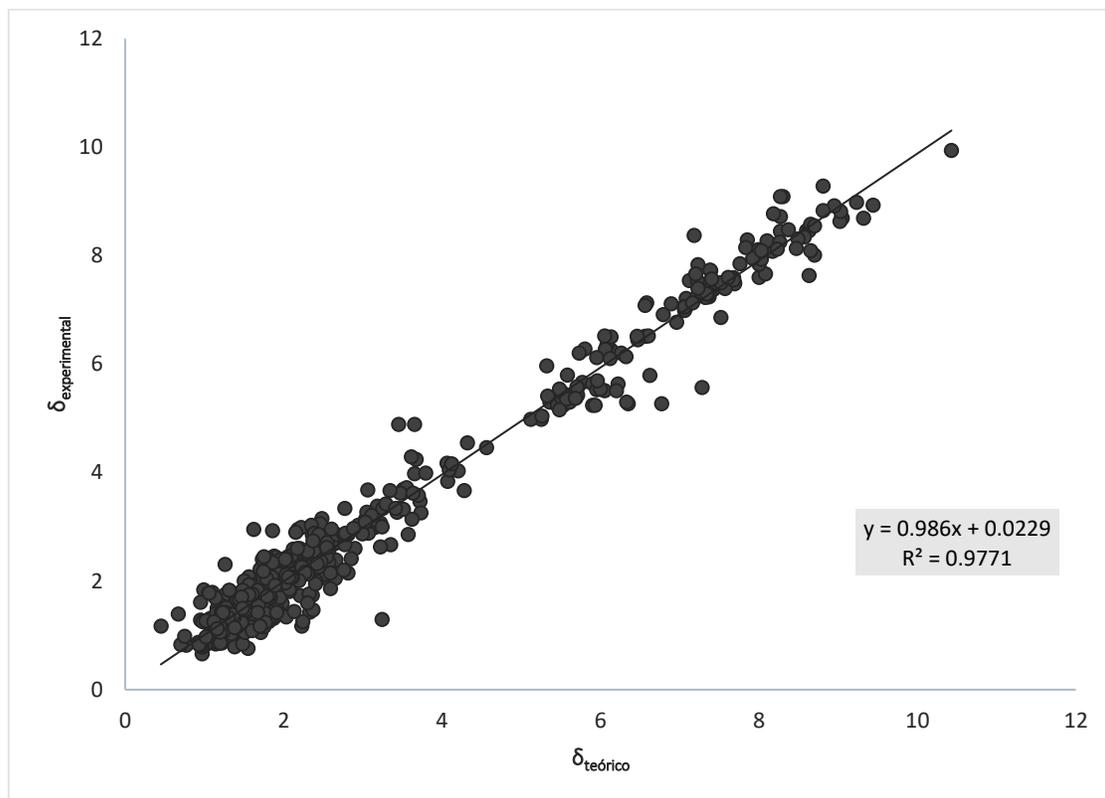
Al observar estos resultados se puede confirmar que la metodología que emplea la corrección del desplazamiento químico teórico mediante el modelo de regresión lineal proporciona resultados más cercanos a los valores experimentales; Sin embargo, es necesario realizar una revisión paralela del modelo sin corregir en el caso en que se presenten carbonos de tipo metileno para poder llevar a cabo una correcta asignación estructural.

En el caso de los núcleos de <sup>1</sup>H, el error obtenido muestra un valor de promedio global de 0.26 ppm. En casos particulares se obtuvieron errores cercanos al error máximo reportado de 0.4 ppm. Partiendo de los resultados obtenidos del modelo corregido para <sup>13</sup>C, se calculó el modelo de regresión lineal empleando 588 datos teóricos y experimentales de <sup>1</sup>H buscando disminuir el error mediante la corrección empírica, **Figura 28**.

A partir de la gráfica de regresión lineal (**Figura 28**), se encontró la **Ecuación (2)** de corrección para el cálculo teórico del  $\delta$  para el <sup>1</sup>H, obteniéndose:

$$y=0.986x + 0.0229 \quad (2)$$

Empleando **Ecuación (2)** se realizó el cálculo de los valores corregidos para <sup>1</sup>H, los cuales fueron comparados con los valores previamente obtenidos sin emplear la corrección. Estos valores se presentan en la **Tabla 5**.



**Figura 28.** Gráfica de regresión lineal del  $\delta$  teórico contra  $\delta$  experimental para el núcleo de  $^1\text{H}$

**Tabla 5.** Promedio de error para  $^1\text{H}$  corregido y sin corregir

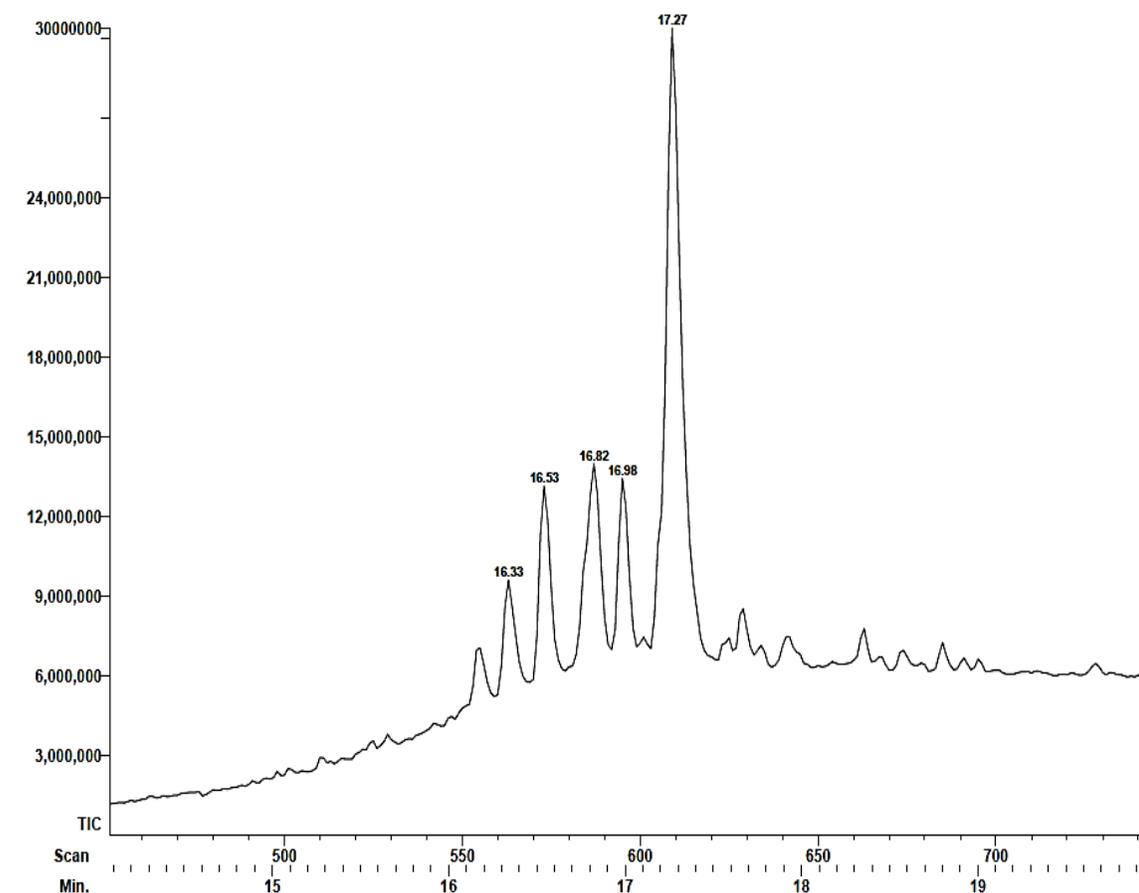
	$^1\text{H}$	
	Sin corregir	Corregido
Promedio	0.2588	0.2566
Desviación estándar	0.2555	0.2539

Los valores obtenidos posteriores a la corrección del desplazamiento químico teórico mostraron diferencias despreciables entre los modelos corregidos y sin corregir. Debido a que se emplearon 588 puntos teóricos y experimentales consideramos que incluir un mayor número de los mismos no representaría un cambio en el promedio de error obtenido. Por ello únicamente se empleó la metodología sin corregir para los  $^1\text{H}$  en el cálculo de las moléculas que necesitaron ayuda del cálculo teórico para su completa asignación.

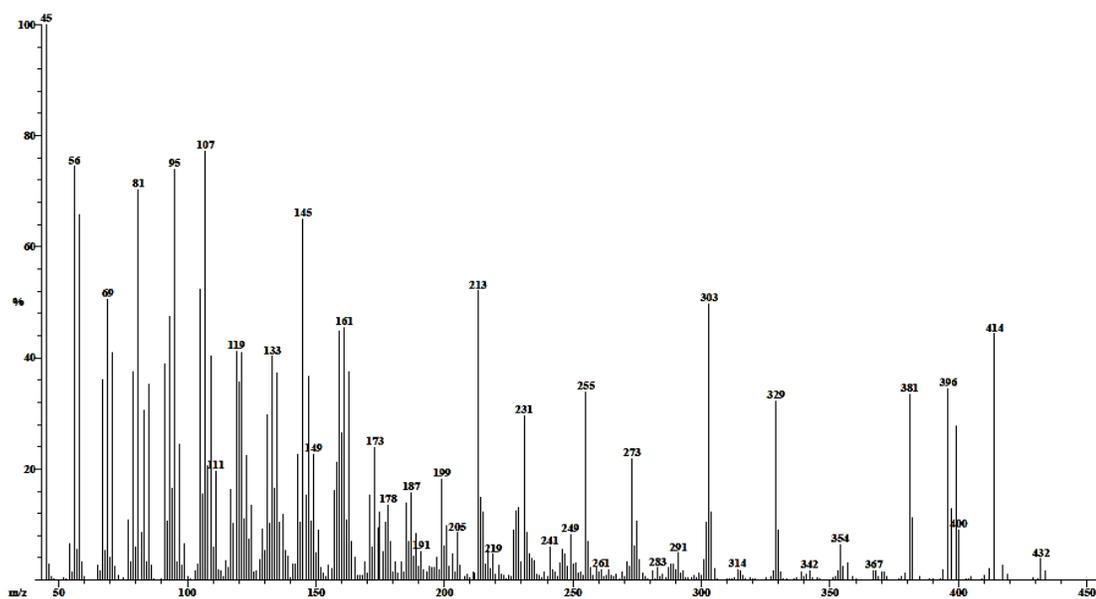
## Caracterización estructural de compuestos aislados

### Compuesto 1

El análisis mediante CG-EM (**Figura 29**) indicó la presencia de una mezcla en la cual se podía apreciar un compuesto mayoritario con un tiempo de retención ( $t_R$ ) de 17.27 min (**Compuesto 1**). El espectro de masas (**Figura 30**) correspondiente al compuesto mayoritario muestra que dicho compuesto posee un ion molecular de 432  $m/z$  para el cual se observa una pérdida de 18 unidades correspondiente a una pérdida de agua, así como una pérdida de 45 unidades correspondiente a un fragmento  $[\text{COOH}]^+$ .

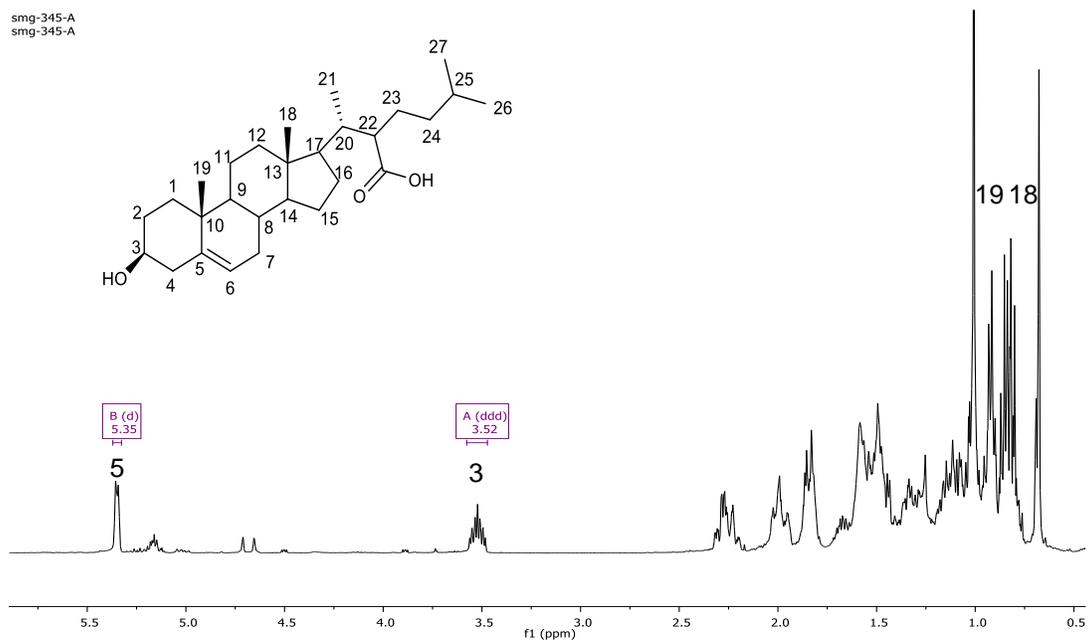


**Figura 29.** Cromatograma de la mezcla obtenida que muestra a un  $t_R$  de 17.27 min el compuesto mayoritario.



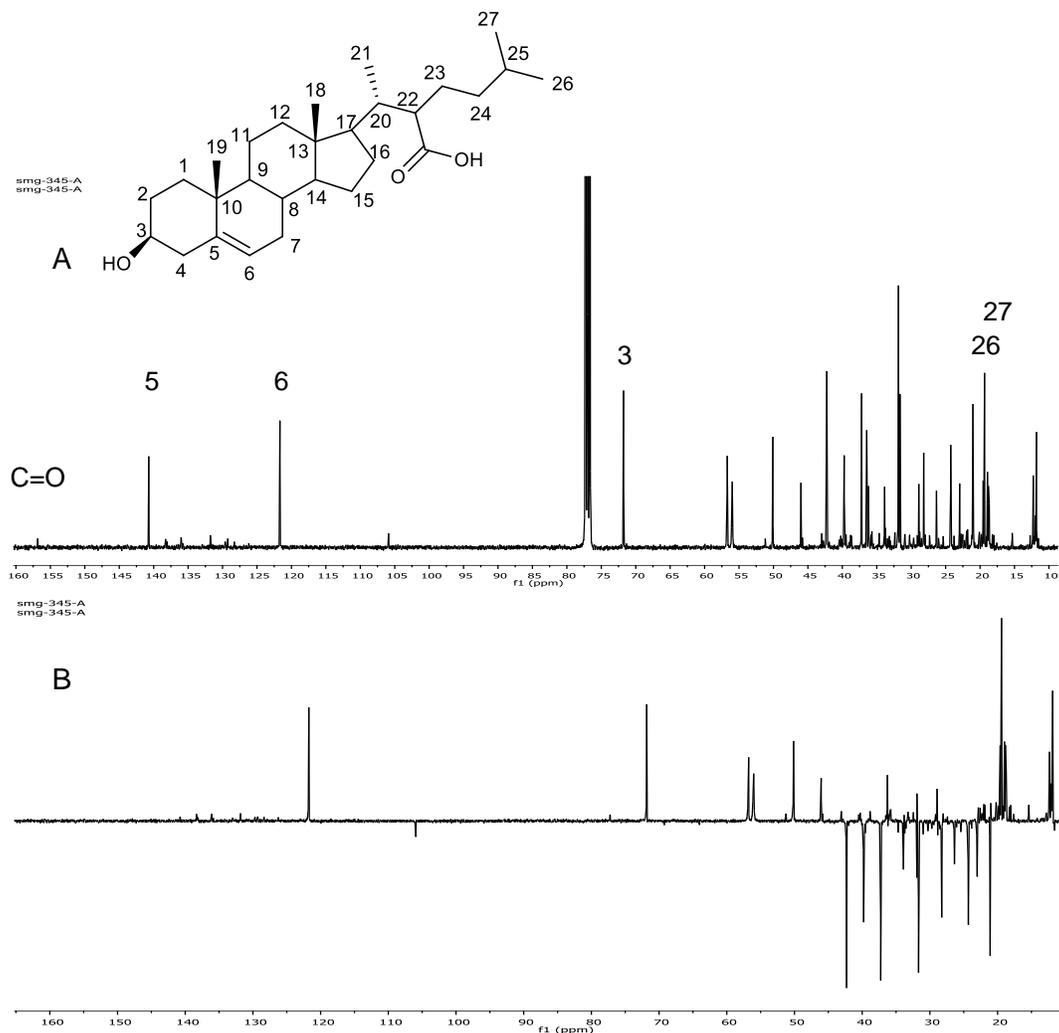
**Figura 30.** Espectro masas del compuesto 1

La mezcla fue analizada mediante RMN- $^1\text{H}$  (**Figura 31**) en la cual se observan señales entre 0.5-2.5 ppm correspondientes a metilos y metilenos, una señal a 3.54 ppm (ddd,  $J = 15.8, 11.0, 4.6$  Hz, 1H) correspondiente a un hidrógeno adyacente a un heteroátomo y una señal doble a 5.35 ppm (d,  $J = 5.1$  Hz, 1H) correspondiente a doble enlace. Dichas señales son características de una molécula de esterol.



**Figura 31.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  del compuesto 1 realizado a 400 MHz en  $\text{CDCl}_3$

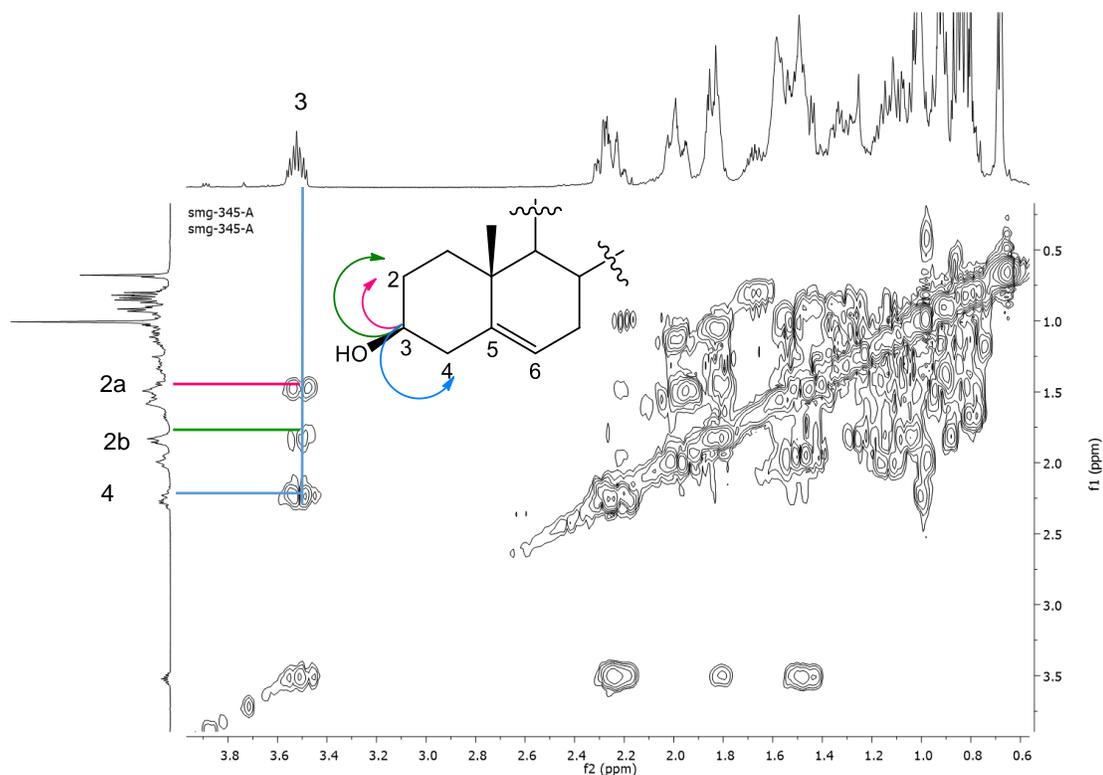
El espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  muestra la presencia de 28 carbonos (**Figura 32A**). Se observa una señal a 157 ppm correspondiente al carbonilo de un ácido carboxílico, se observan dos señales a 121.7 y 140.8 ppm correspondientes a carbonos  $\text{sp}^2$  y una señal a 71.8 ppm correspondiente un carbono unido a heteroátomo. Mediante el experimento DEPT 135° (**Figura 32B**), se determinó la presencia de 10 carbonos que corresponden a metilenos.



**Figura 32.** Espectros de RMN- $^{13}\text{C}$  (A) y DEPT 135 (B) del compuesto 1 realizados a 400 MHz en  $\text{CDCl}_3$

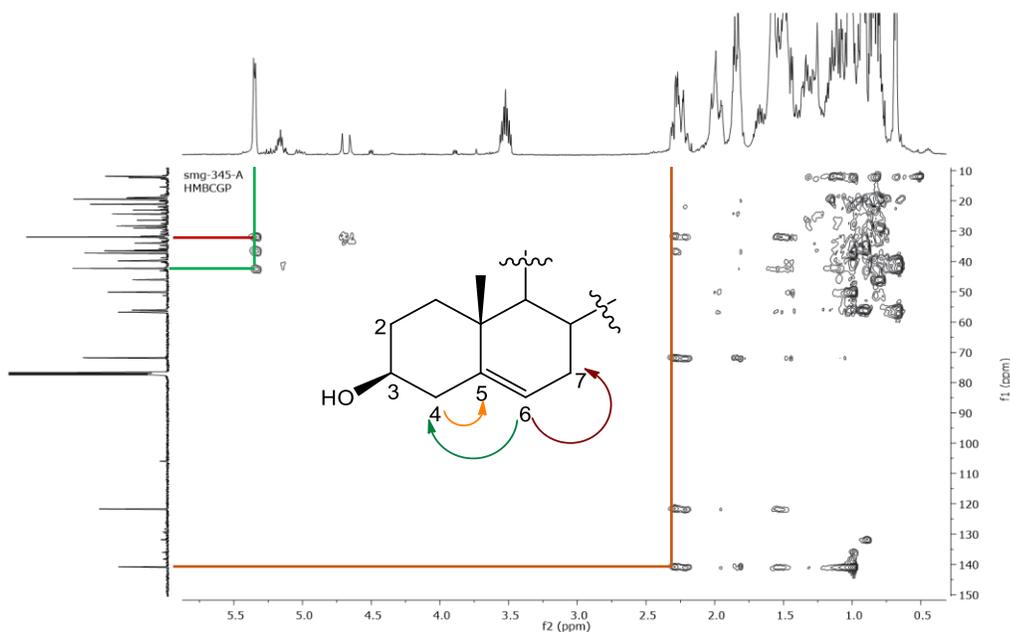
La asignación completa de este compuesto se llevó a cabo con ayuda de los experimentos en 2D homo y heteronucleares y por comparación en la literatura, así, se determinó la estructura base de esterol. En la **Figura 33**, se observan los acoplamientos H-H entre el H3 con H2a, H2b y H4. Estos acoplamientos dan lugar a la multiplicidad de

la señal de H3 a 3.54 ppm (ddd,  $J = 15.8, 11.0, 4.6$  Hz, 1H), la cual es característica de esteroides con núcleos D5- y D7-3-hidroxiandrosteno.



**Figura 33.** Espectro COSY del compuesto 1 que muestra las correlaciones entre H3, H2 y H4 realizado en  $\text{CDCl}_3$  a 400 MHz

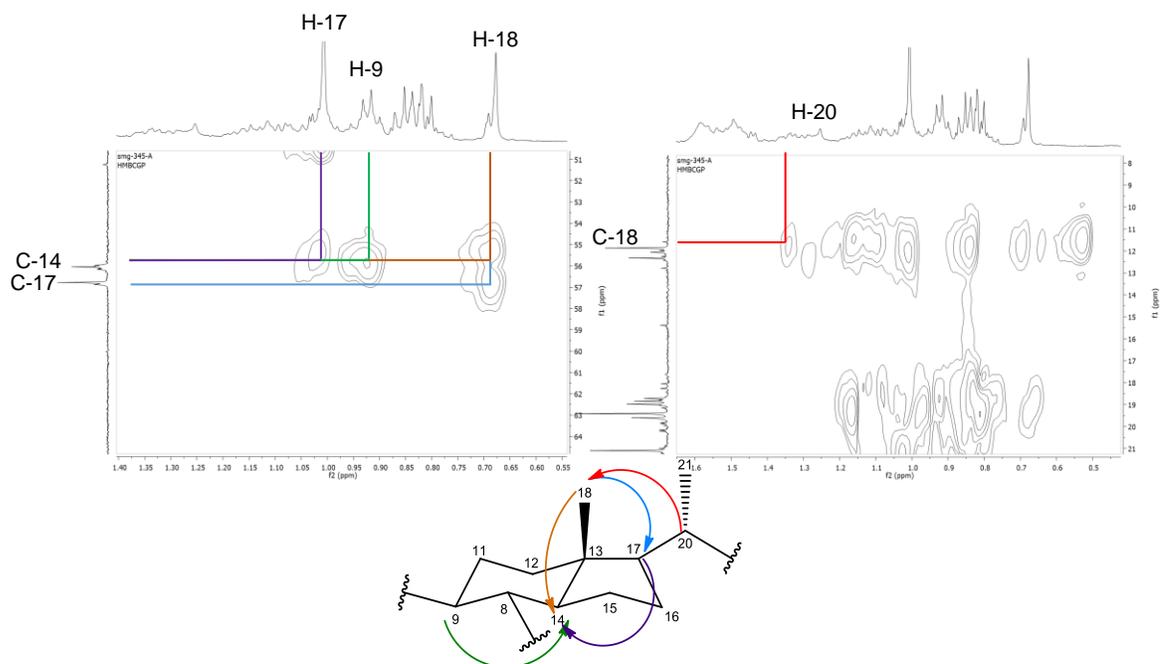
Para poder diferenciar el núcleo base se considera la posición del doble enlace, ya que la ésta puede posicionarse entre C4 y C5 o C5 y C6 y pueden presentarse dos o más dobles enlaces. El núcleo de tipo D5-3-hidroxiandrosteno posee como característica un doble enlace situado entre las posiciones 5 y 6 del anillo B.<sup>59</sup> En el espectro HMBC (**Figura 34**) se pueden observar las correlaciones entre la señal a 5.35 ppm (d,  $J = 5.1$  Hz, 1H) con un carbono a 31.9 ppm correspondiente al carbono de la posición C7 y un carbono a 42.2 ppm perteneciente a C4. A su vez se aprecian las correlaciones ente H4 (2.31 ppm) con un carbono a 140.8 ppm correspondiente a la posición C5 que por su desplazamiento químico confirma la presencia de un doble enlace entre las posiciones C5 y C6 del anillo B, corroborando la presencia de un núcleo de tipo D5-3-hidroxiandrosteno.



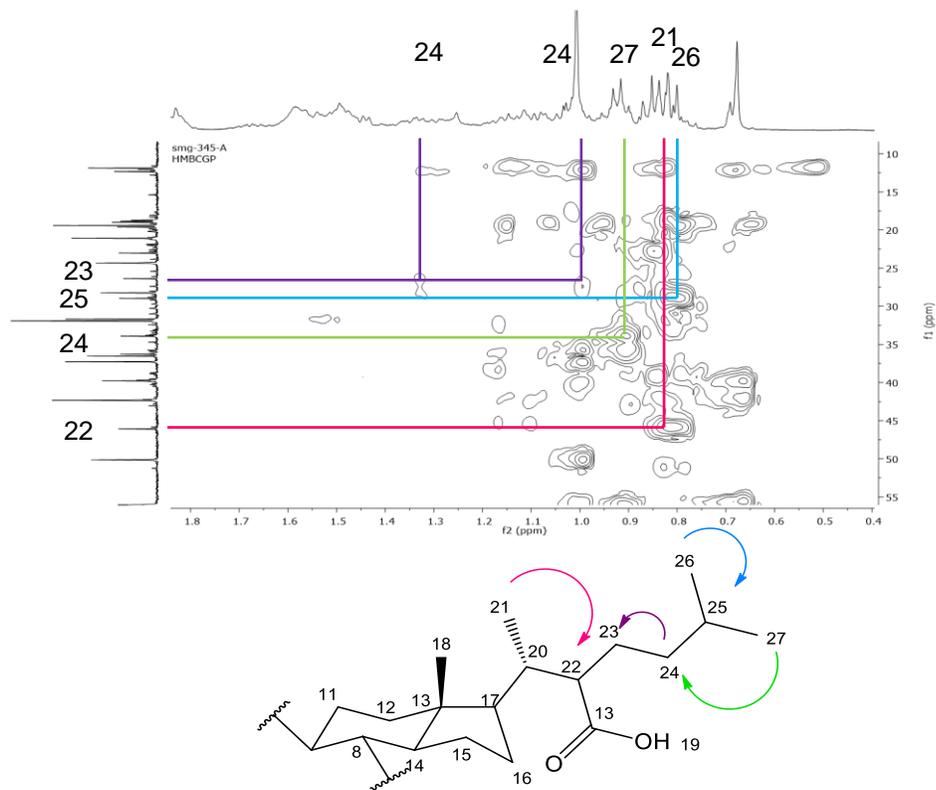
**Figura 34.** Ampliación del espectro HMBC del compuesto 1 en  $\text{CDCl}_3$  a 400 MHz que muestra las correlaciones entre H6 con C7 y C4, así como de H4 con C5.

Con el espectro HMBC (**Figura 35**) se determinó que la posición C17 corresponde a un carbono a 56.7 ppm y que a éste se encuentra unida la cadena lateral. En el espectro se observan las correlaciones entre el hidrógeno de la posición H17 a 1 ppm con el carbono de la posición C14 a 56.1 ppm, así como la correlación entre el metilo H18 (0.68 ppm) con el carbono C14 (56.1). A su vez el hidrógeno de la posición H20 (1.36 ppm) muestra una correlación con el carbono del metilo de la posición C18 a 12.0 ppm, dicha correlación permite establecer el sitio de unión de la cadena lateral.

La cadena lateral consiste en nueve carbonos, de los cuales tres corresponden a metilos, dos a metilenos, tres a metinos y un ácido carboxílico. En el espectro HMBC (**figura 36**) se pueden observar las correlaciones entre el hidrógeno de la posición H26 a 0.80 ppm con el carbono a 28.9 ppm de la posición C25; la correlación entre el hidrógeno de la posición 27 a 0.92 ppm con el carbono a 33.9 ppm de la posición C24; además se observa la correlación entre los hidrógenos de la posición H24 (0.98 ppm y 1.35 ppm) con el carbono de la posición C23 a 26.4 ppm y la correlación del metilo H21 a 0.85 ppm con el carbono de la posición C22 a 46 ppm, dichas correlaciones permitieron establecer parte de la cadena lateral. En la que se puede observar el incremento en el desplazamiento químico del C22 con respecto a los desplazamientos del resto de los metinos y metilenos de la cadena lateral, dicho cambio es ocasionado por la presencia del ácido carboxílico como sustituyente en esta posición.

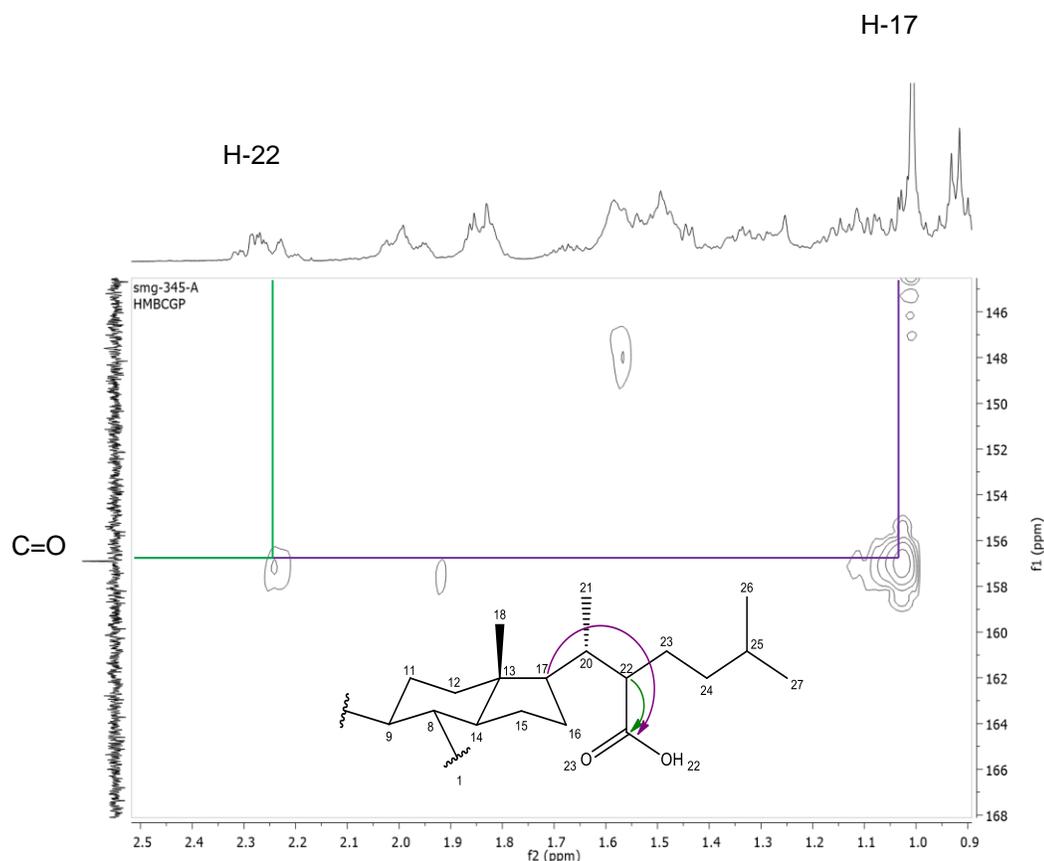


**Figura 35.** Experimento HMBC a 400 MHz. Ampliación que muestra las correlaciones del esqueleto base del esteroil con la cadena lateral.



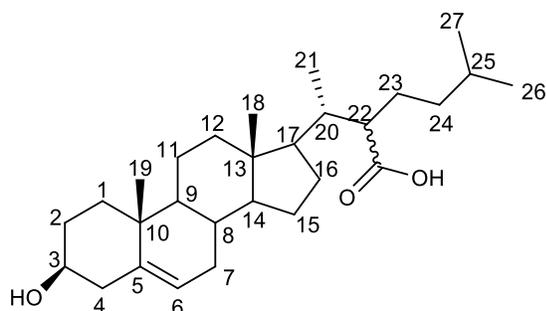
**Figura 36.** Ampliación del espectro HMBC del compuesto 1 en  $CDCl_3$  a 400 MHz

El carbono 22 de la cadena lateral se encuentra sustituido por un ácido carboxílico. Esta sustitución se aprecia en el acoplamiento entre un carbono cuaternario a 157 ppm con los hidrógenos H-17 y un hidrógeno a 2.22 atribuido a C-22 (**Figura 37**)



**Figura 37.** Ampliación del experimento HMBC que muestra los acoplamientos del ácido carboxílico con la cadena lateral y el esqueleto del estero.

Tras el análisis de la mezcla tDCM-C1 empleando RMN y EM se determinó la estructura para el **compuesto 1**, el cual fue identificado como ácido 3-hidroxi-colest-5,6-en-22-oico (**Figura 38**) y se realizó la asignación total de la molécula (**Tabla 6**), la cual corresponde a una estructura no reportada en la literatura. Los esteroides juegan un papel importante en la estructura de la membrana celular, particularmente en esponjas del género *Haliclona* se han aislado esteroides con esqueletos de tipo colestano como esteroides mayoritarios; estudios previos sugieren que las nuevas estructuras encontradas como variantes en el núcleo o las cadenas laterales son originadas por las variantes en la nutrición de la esponja de mar.<sup>59-61</sup>



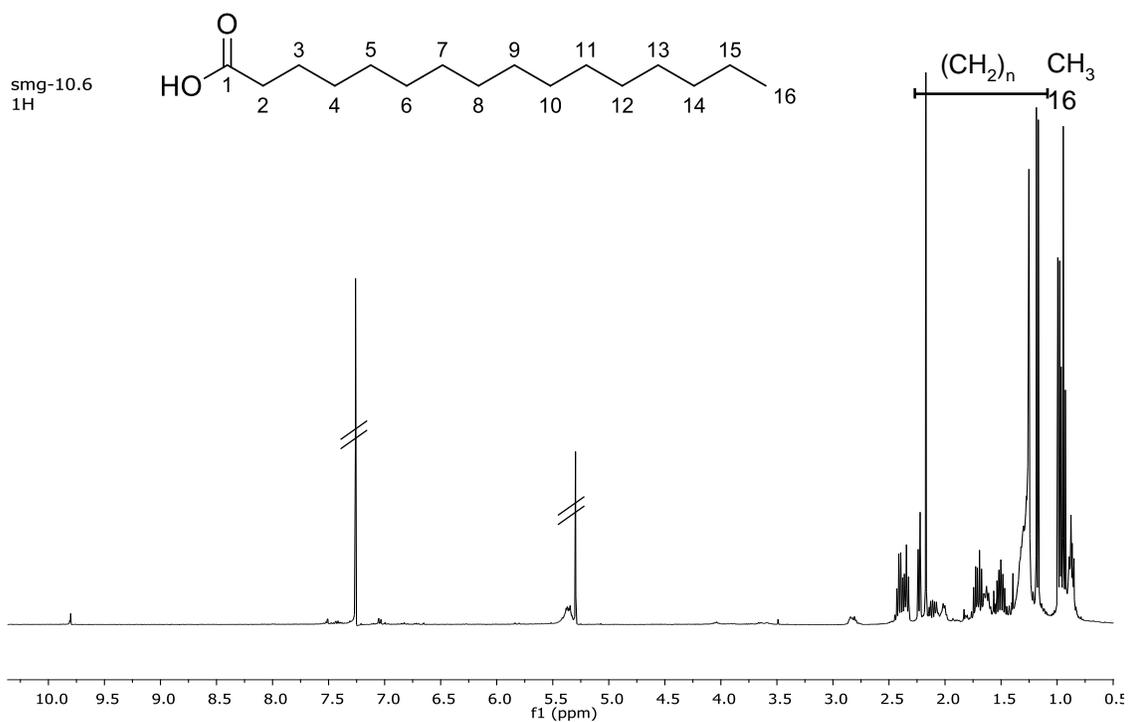
**Figura 38.** Estructura del ácido 3-hidroxi-colest-5,6-en-22-oico

**Tabla 6.** Desplazamientos químicos del compuesto 1 en  $\text{CDCl}_3$  a 400 MHz

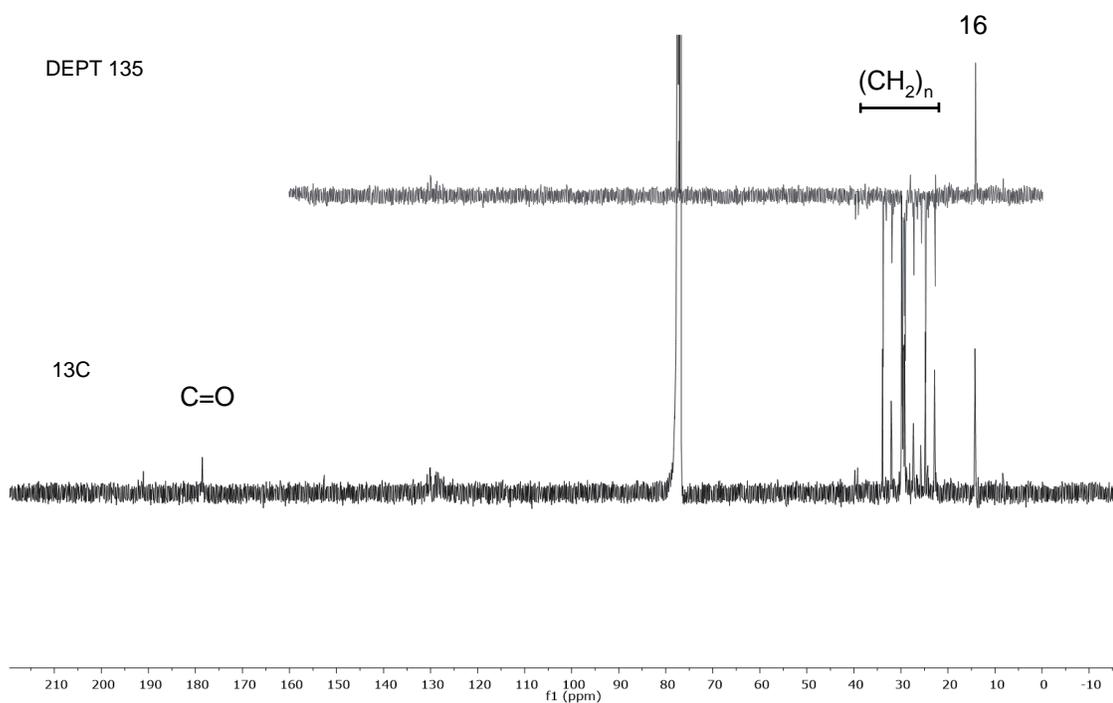
Posición	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Posición	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
1	37.2	1.84	14	56.1	1.15
		1.08	15	24.3	1.58
2	31.6	1.84			1.07
		1.52	16	28.2	1.84
3	71.8	3.52 (ddd, $J=15.8,$ 11.0, 4.6 Hz)			1.25
4	42.2	2.31	17	56.7	1.00
		2.27	18	12.0	0.68
5	140.8		19	19.5	1.01
6	121.7	5.35 (d, $J=5.1$ )	20	35.8	1.36
7	31.9	2.01	21	12.5	0.85
		1.95	22	46.1	2.22
8	31.9	1.44	23	26.4	1.31
9	50.1	0.92			1.03
10	36.5		24	33.9	1.35
11	21.2	1.01			0.98
		1.49	25	28.9	1.68 (ddd, $J=13.8,$ 11.3, 6.9 Hz)
12	36.7	2.00	26	18.9	0.8
		1.16	27	18.8	0.92
13	42.3		C=O	157	

### Compuesto 2

La fracción tDCM-J.6 se obtuvo como un sólido amorfo de consistencia aceitosa, esta fue analizado por RMN. En el espectro de RMN- $^1\text{H}$  (**Figura 39**) se observan señales de hidrógeno entre 0.5 y 2.5 ppm correspondientes a metilos y metilenos; los espectros de RMN- $^{13}\text{C}$  y DEPT 135 (**Figura 40**) muestran varias señales de metilenos entre 10-45 ppm y una señal a 180 ppm, dichas señales pueden ser atribuidas a ácidos grasos.

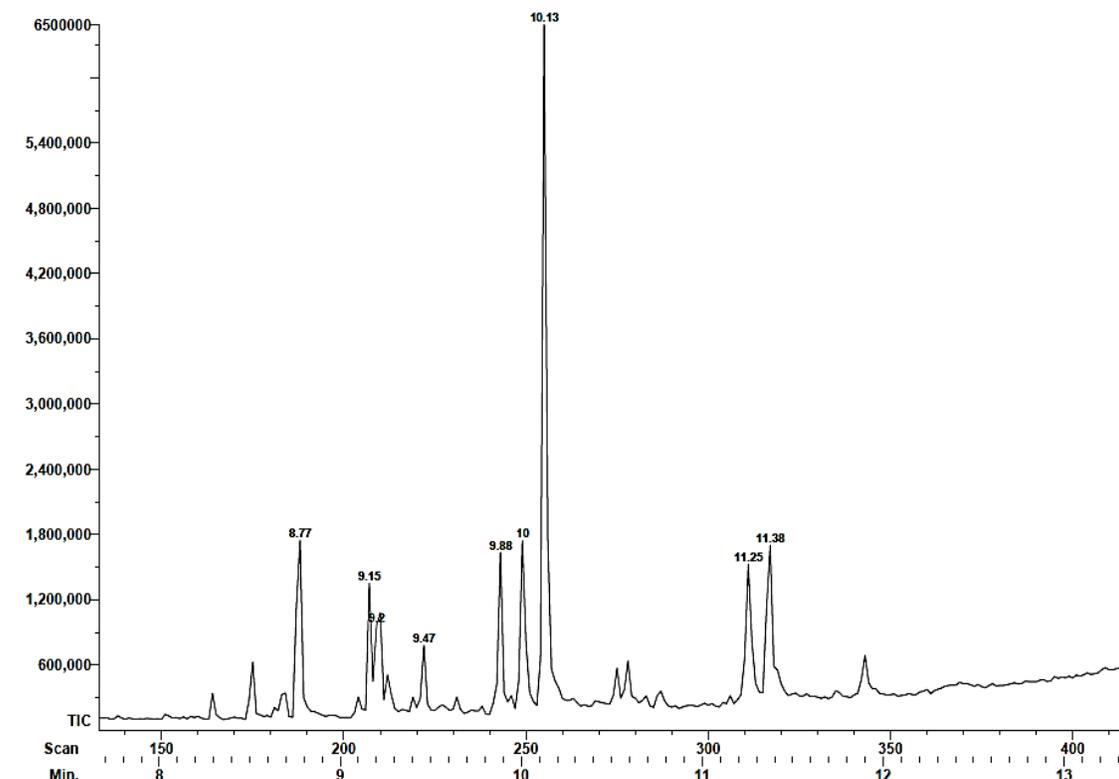


**Figura 39.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto 2 en CDCl<sub>3</sub> a 400 MHz



**Figura 40.** Espectro de RMN-<sup>13</sup>C y DEPT 135 del compuesto 2 en CDCl<sub>3</sub> a 400 MHz

El análisis por RMN sugiere la presencia de una mezcla de ácidos grasos debido a que se observan señales características de  $^1\text{H}$ . El análisis por Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM) (**Figura 41**) reveló la presencia de una mezcla de ácidos grasos, de los cuales el compuesto mayoritario presentó un  $t_R$  de 10.13 min (**compuesto 2**).



**Figura 41.** Cromatograma de la mezcla de ácidos grasos.

En el análisis del espectro masas (**Figura 42**) del compuesto mayoritario, se observó el ion molecular de 256  $m/z$ , así como las pérdidas consecutivas de 14 unidades tras la primera pérdida de 29 unidades, pérdida correspondiente a un  $[\text{CH}_2\text{CH}_3]^+$ . El fragmento correspondiente al pico base pertenece a la unidad  $[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}]^+$ .

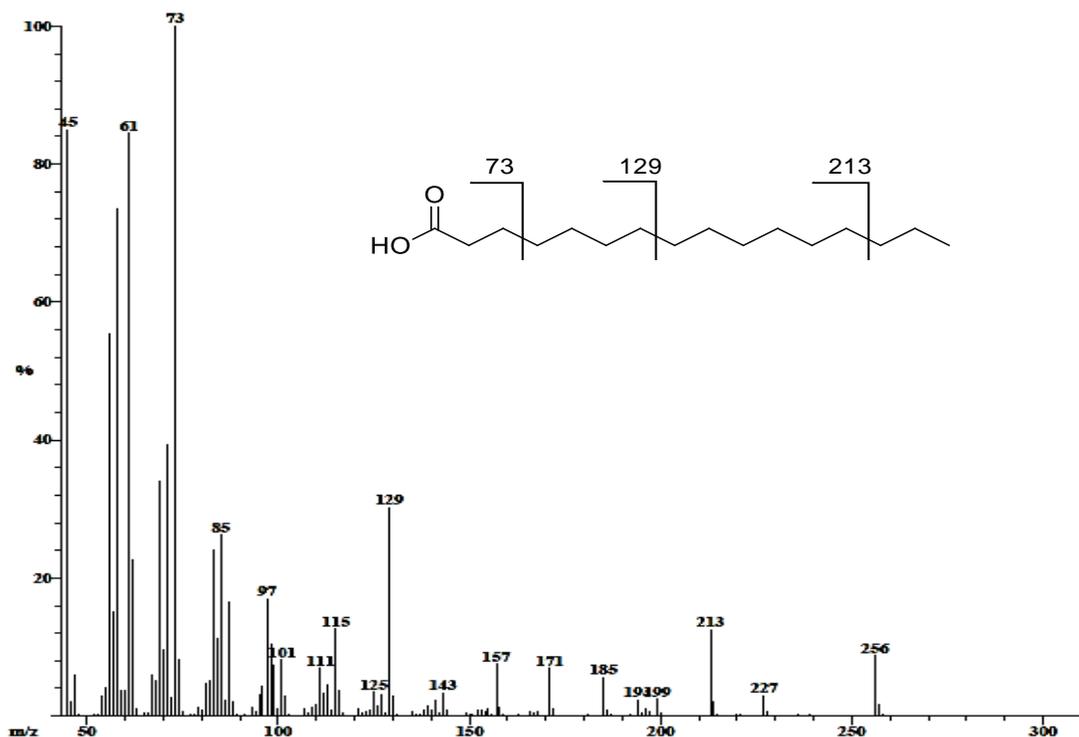


Figura 42. Espectro de EM-IE del compuesto 2.

Tras el análisis del compuesto por CG-EM, RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C y mediante comparación con la literatura se determinó que el **compuesto 2** corresponde al ácido palmítico (Figura 43)

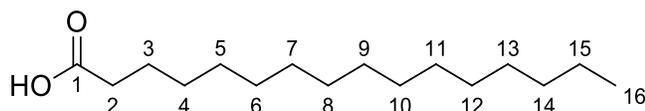
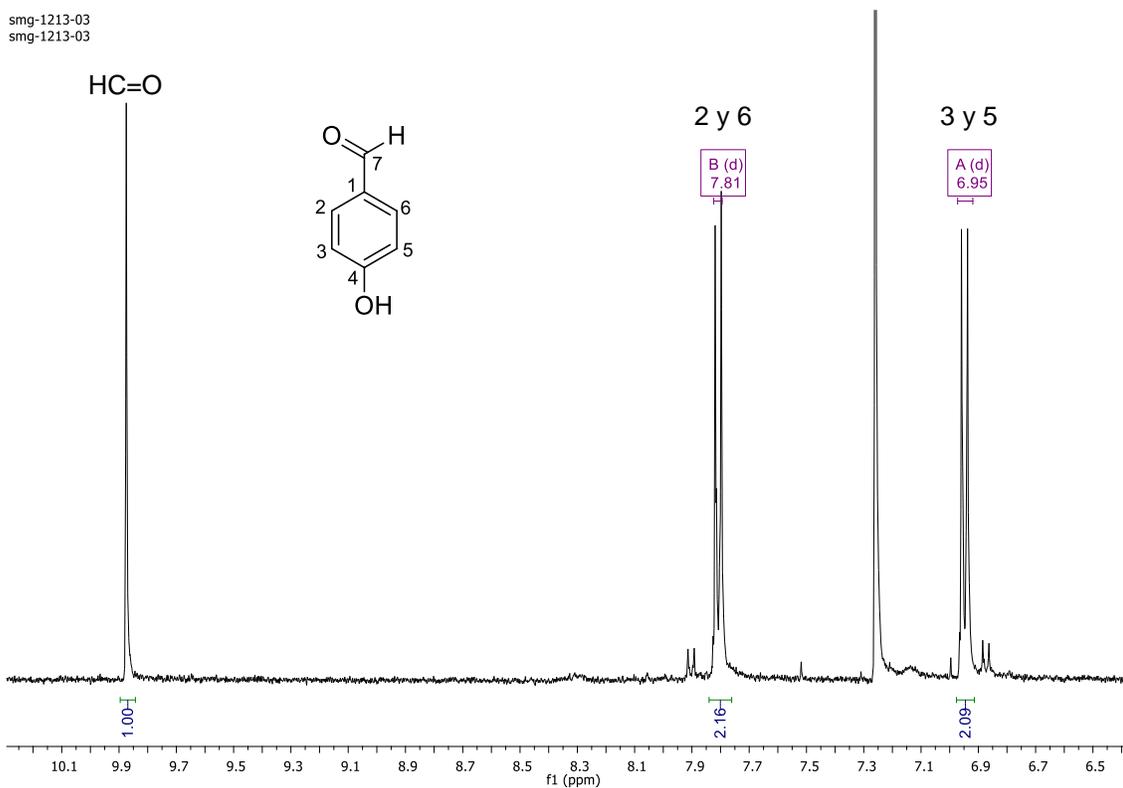


Figura 43. Estructura del ácido palmítico

### Compuesto 3

El **compuesto 3** se obtuvo como un sólido amarillo amorfo. En el espectro de RMN-<sup>1</sup>H (Figura 44) se observa una señal simple a 9.88 ppm, proporcional a un hidrógeno, correspondiente a un aldehído; dos señales dobles a 6.95 (d,  $J=6.95$  Hz, 2H) y 7.81 (d,  $J=7.81$  Hz, 2H) ppm correspondiente a un sistema aromático disustituido (2,6 y 3,5) en posiciones *para*. Considerando la información proporcionada por el espectro de RMN-<sup>1</sup>H se propone la estructura del *p*-hidroxibenzaldehído para este compuesto.



**Figura 44.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto 3 en CDCl<sub>3</sub> a 400 MHz.

En el espectro de RMN-<sup>13</sup>C (**Figura 45**) se aprecian tres señales: a 190.7 ppm, 132.2 ppm y 116.2 ppm. Sin embargo, dos señales correspondientes a carbonos cuaternarios no se encuentran bien definidas; para realizar la asignación de dichas señales se realizó el experimento HMBC (**Figura 46**) donde se aprecian las correlaciones entre H1 y H5 con C3 y C=O; y H2 y H4 con C6. La presencia de dichas correlaciones permitió realizar la asignación de los carbonos cuaternarios faltantes, confirmando de esta manera la estructura propuesta para el **compuesto 3**, la cual corresponde al *p*-hidroxibenzaldehído. Este compuesto ha sido aislado de fuentes marinas, tales como bacterias del género *Chromobacterium*<sup>62</sup> y se encuentra reportado su aislamiento a partir de esponjas de mar *Oceanapia* sp<sup>63</sup> y *Latrinchota* sp,<sup>33</sup> aunque no se ha determinado si corresponde a un producto de descomposición de algún metabolito secundario.

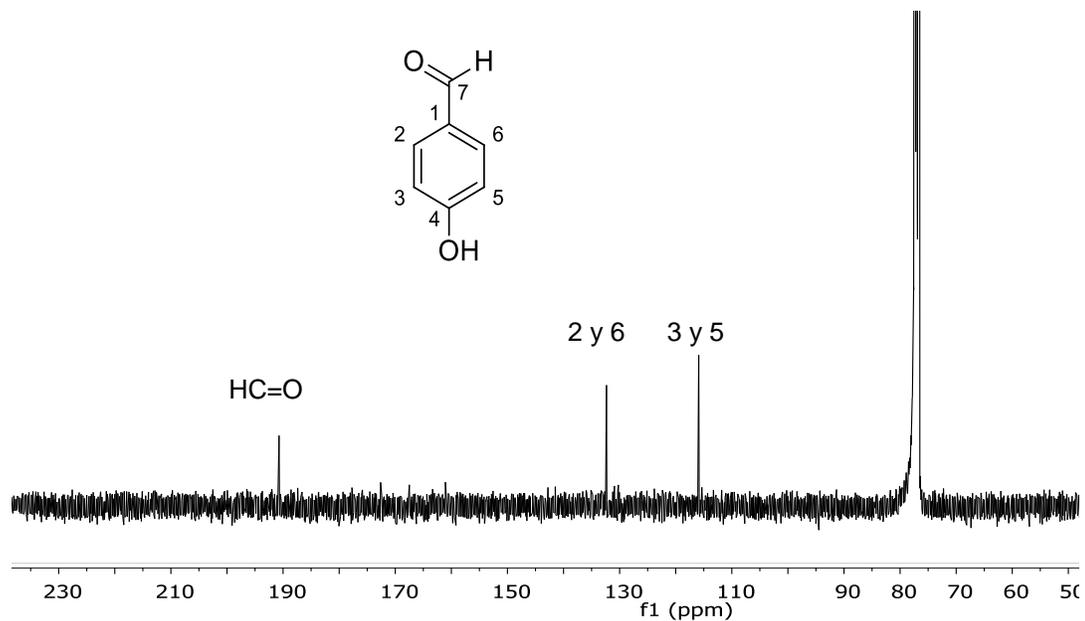


Figura 45. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  correspondiente al compuesto 3 en  $\text{CDCl}_3$  a 400 MHz

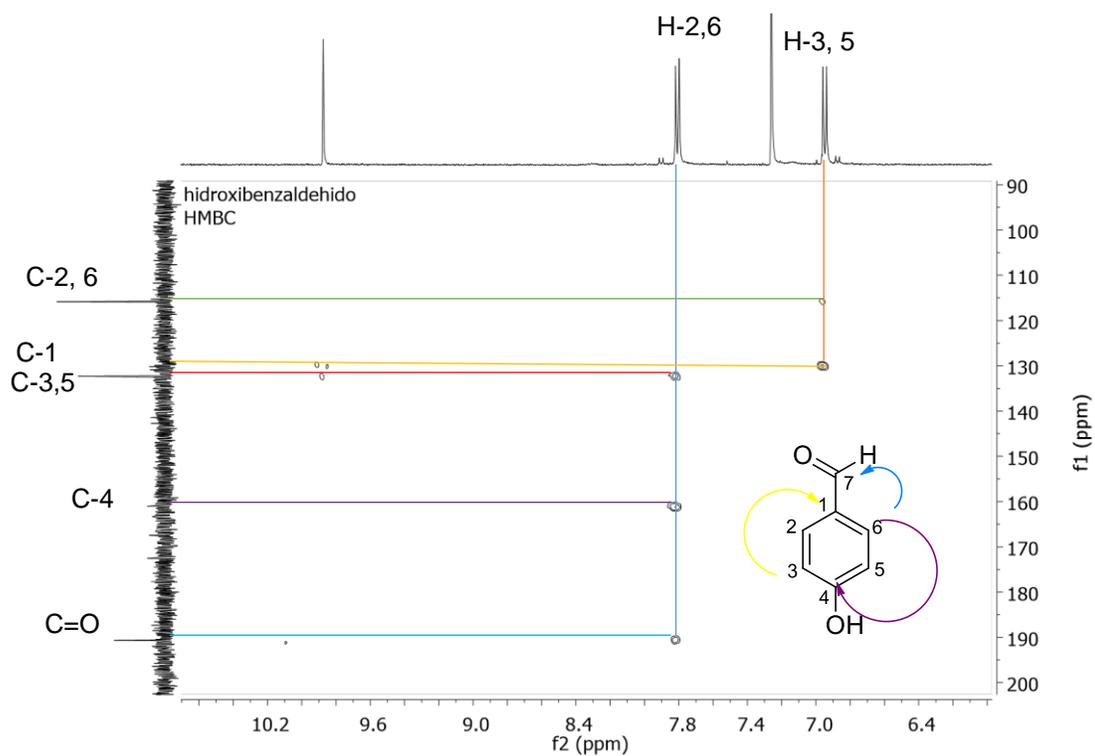
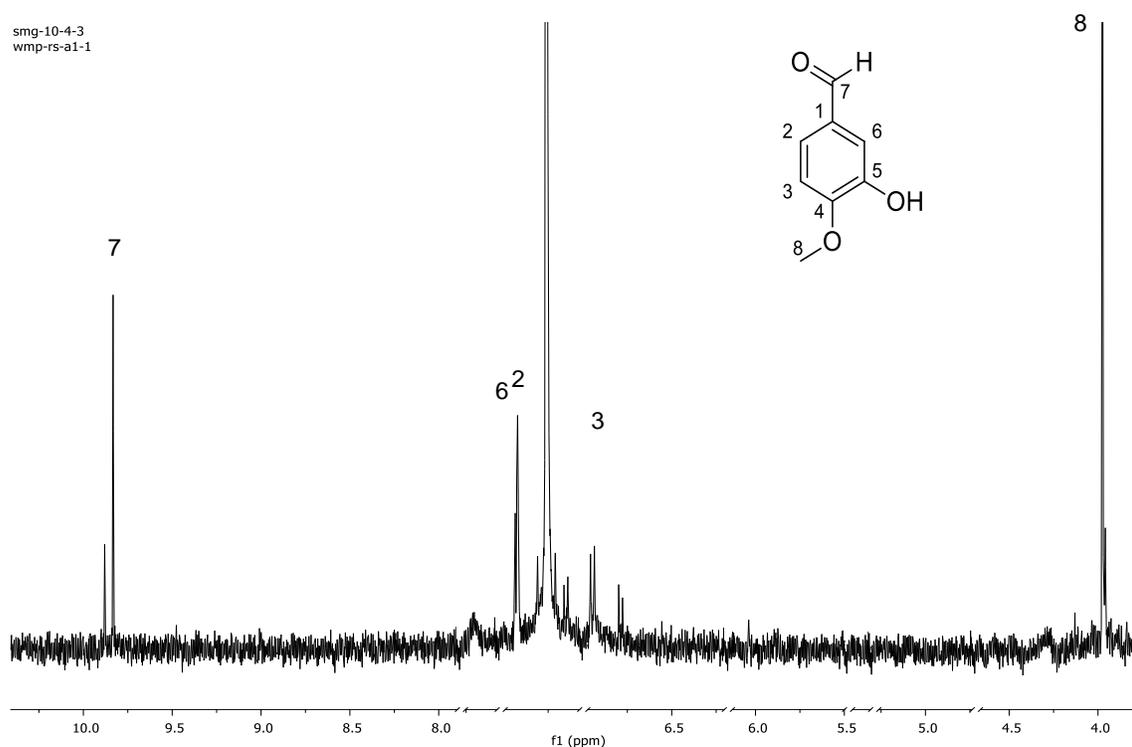


Figura 46. Espectro de HMBC del compuesto 3 en  $\text{CDCl}_3$  a 400 MHz

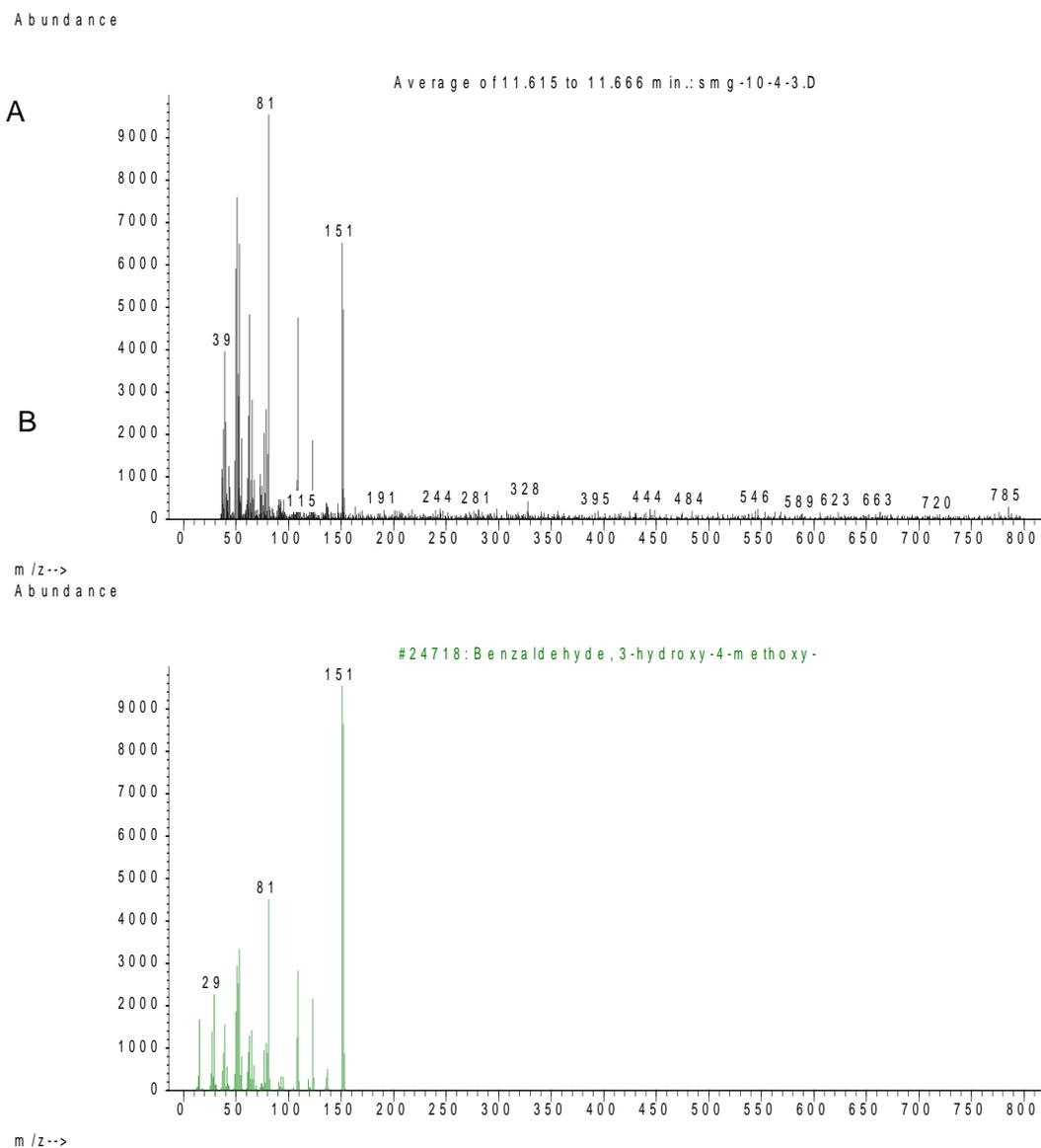
#### Compuesto 4

El **compuesto 4** se obtuvo en una mezcla como un sólido amarillo; en el análisis del espectro de RMN-<sup>1</sup>H (**Figura 47**) se observa una señal a 3.86 ppm, correspondiente a un metoxilo, tres señales de hidrógenos aromáticos entre 6.90 ppm y 7.50 ppm y una señal simple a 9.64 ppm correspondiente a un hidrógeno de aldehído. Dichas señales corresponden a la molécula de vainillina. Se realizó la comparación por Cromatografía de Gases Acoplado a Espectrómetro de Masas el cual indicó mediante comparativo de espectros que el compuesto mayoritario corresponde a la isovainillina (**Figura 48**).

El aislamiento de este compuesto no se encuentra reportado en esponjas de mar, pero si ampliamente reportado en bacterias que forman parte de la biota normal que rodea la esponja de mar.<sup>64</sup> Sin embargo, se ha reportado que la isovainillina forma parte del proceso de síntesis de compuestos como la mimosamicina o renierona, los cuales han sido aislados a partir de esponjas de mar de los generos *Reniera*, *Xestospongia*, *Cribrochalina* y *Haliclona*.<sup>65</sup>



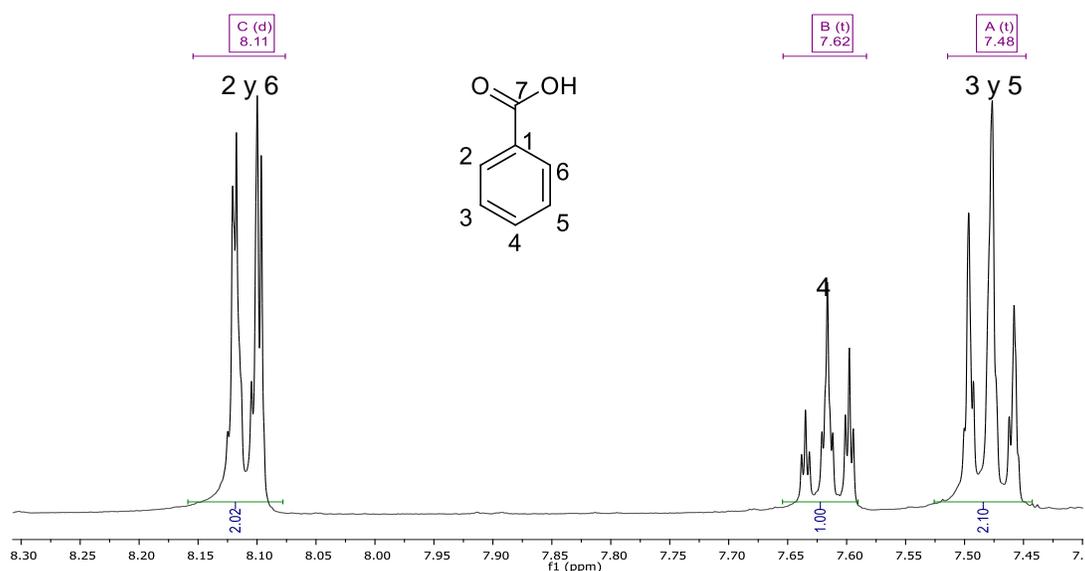
**Figura 47.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto 4 a 400 MHz en CDCl<sub>3</sub>



**Figura 48.** Espectro de masas del compuesto 4 (A) comparado con el espectro de masas de la isovainillina (B)

### Compuesto 5

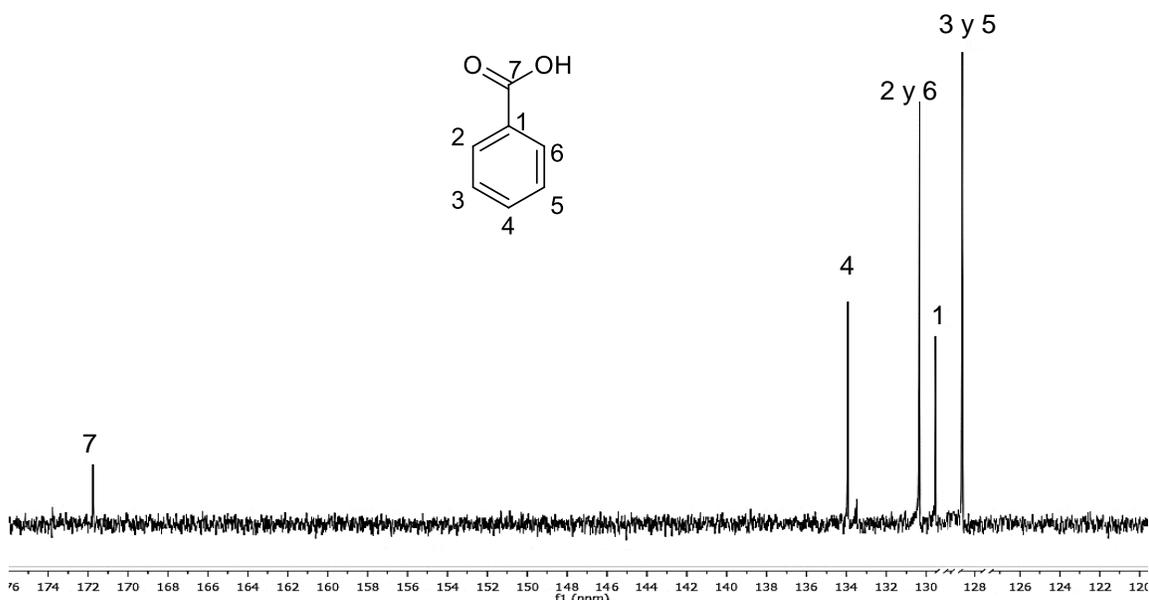
El **compuesto 5** se obtuvo como un sólido blanco amorfo el cual fue analizado por RMN-<sup>1</sup>H (**Figura 49**). En el espectro de RMN-<sup>1</sup>H se observan tres señales entre 7.40 ppm y 8.15 ppm, las cuales muestran un sistema de acoplamiento correspondiente a un sistema aromático de 6 miembros monosustituido.



**Figura 49.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto 5 en CDCl<sub>3</sub> a 400 MHz

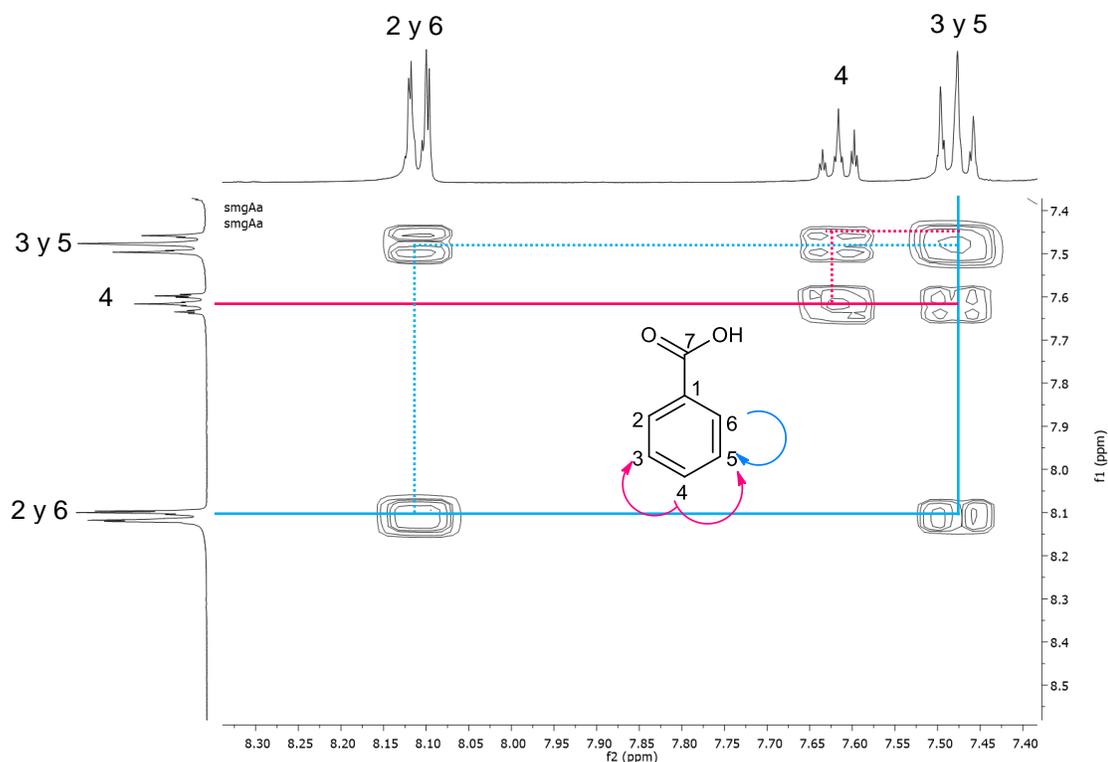
Se observa una señal doble a 8.11 ppm (d,  $J=8.11$  Hz, 2H) una señal triple a 7.62 (t,  $J=7.62$  Hz, 1H) ppm y una señal triple a 7.48 (t,  $J=7.48$  Hz, 2H) ppm, dichas señales corresponden a un sistema aromático de seis miembros monosustituido.

El análisis del espectro de RMN-<sup>13</sup>C (**Figura 50**) muestra la presencia de cinco tipos de carbono; uno de ellos a 171.8 ppm correspondiente a un ácido carboxílico y cuatro carbonos entre 128-134 ppm correspondientes a carbonos aromáticos.



**Figura 50.** Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del compuesto 5 en CDCl<sub>3</sub> a 400 MHz

La caracterización completa de este compuesto se llevó a cabo empleando experimentos en 2D homo y heteronucleares. El experimento COSY (**Figura 51**) se observan los acoplamientos entre H2 y H6 con el respectivo hidrógeno de H3 y H5; así como los acoplamientos entre H4 con H3 y H5. Para determinar las conectividades y las posiciones de cada uno de los grupos se empleó el experimento HMBC (**Figura 52**) en el cual se aprecia las correlaciones de H2 y H6 con C4, C1 y C7; así como la correlación entre H3 con C1. Con ayuda de estos experimentos se determinó que la estructura del **compuesto 5** corresponde al ácido benzoico (**Figura 53**). En la **Tabla 7** se muestran los desplazamientos químicos correspondientes a la molécula del ácido benzoico, los cuales fueron comparados con los desplazamientos químicos reportados en la literatura confirmando la estructura determinada. El ácido benzoico y los derivados del mismo juegan un rol importante en los mecanismos de defensa de la esponja de mar ya que son tóxicos para peces predadores y otras especies; en estudios clínicos se ha visto que los derivados del ácido benzoico muestran actividades antitumorales.<sup>66</sup>



**Figura 51.** Espectro COSY del compuesto 5 en  $\text{CDCl}_3$  a 400 MHz

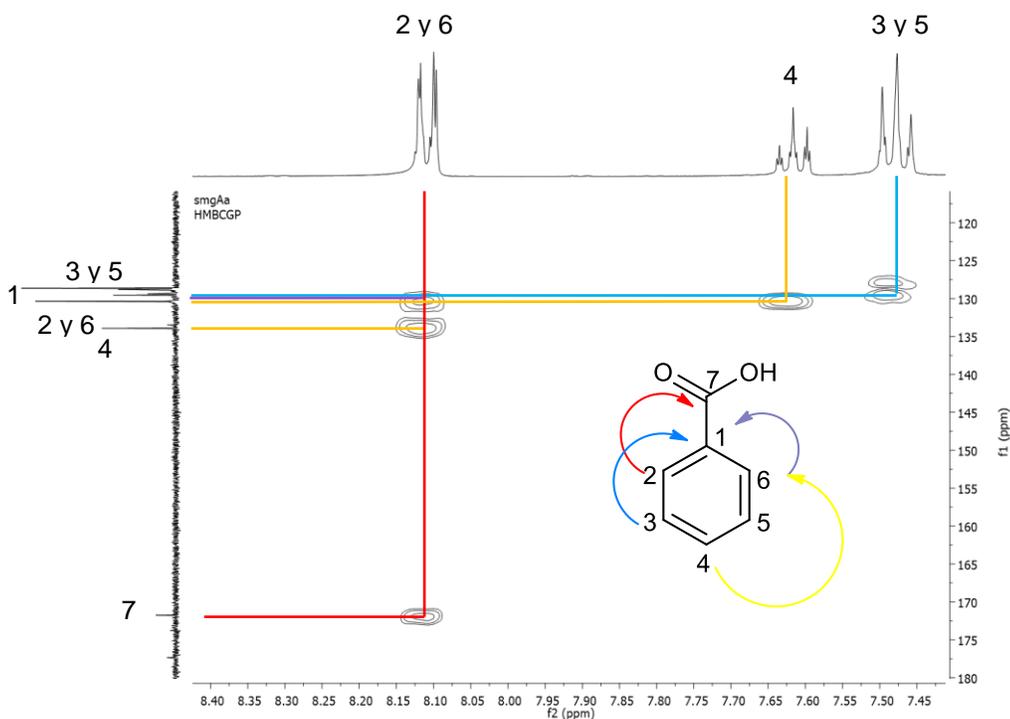


Figura 52. Espectro HMBC del compuesto 5 en  $\text{CDCl}_3$  a 400 MHz

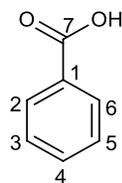


Figura 53. Estructura del ácido benzoico

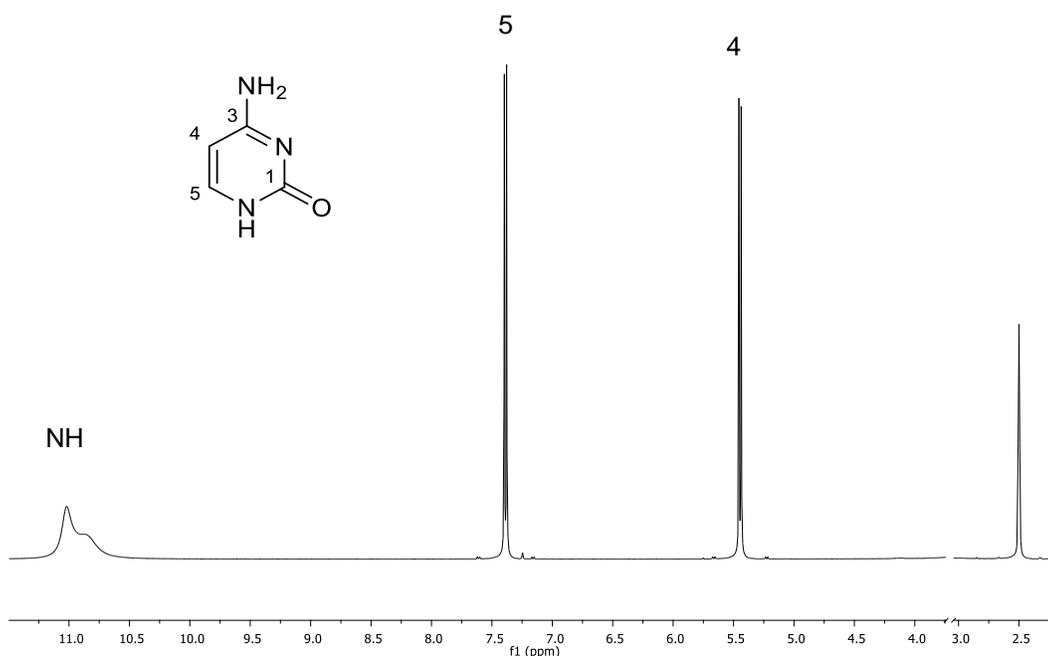
Tabla 7. Desplazamientos químicos del ácido benzoico en  $\text{CDCl}_3$  a 400 MHz

Posición	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}_{\text{ref}}$	$\delta^1\text{H}_{\text{ref}}$
1	129.5		129.4	
2	130.3	8.11 (d, $J=8.11$ Hz, 2H)	130.8	8.12
3	128.6	7.48 (t, $J=7.48$ Hz, 2H)	128.5	7.45
4	133.8	7.62 (t, $J=7.62$ Hz, 1H)	133.8	7.62
5	128.6	7.48 (t, $J=7.48$ Hz, 2H)	128.5	7.45
6	130.3	8.11 (d, $J=8.11$ Hz, 2H)	130.8	8.12
7	171.8		172.7	

\* $\delta^1\text{H}_{\text{ref}}$  y  $\delta^{13}\text{C}_{\text{ref}}$ =valores de referencia

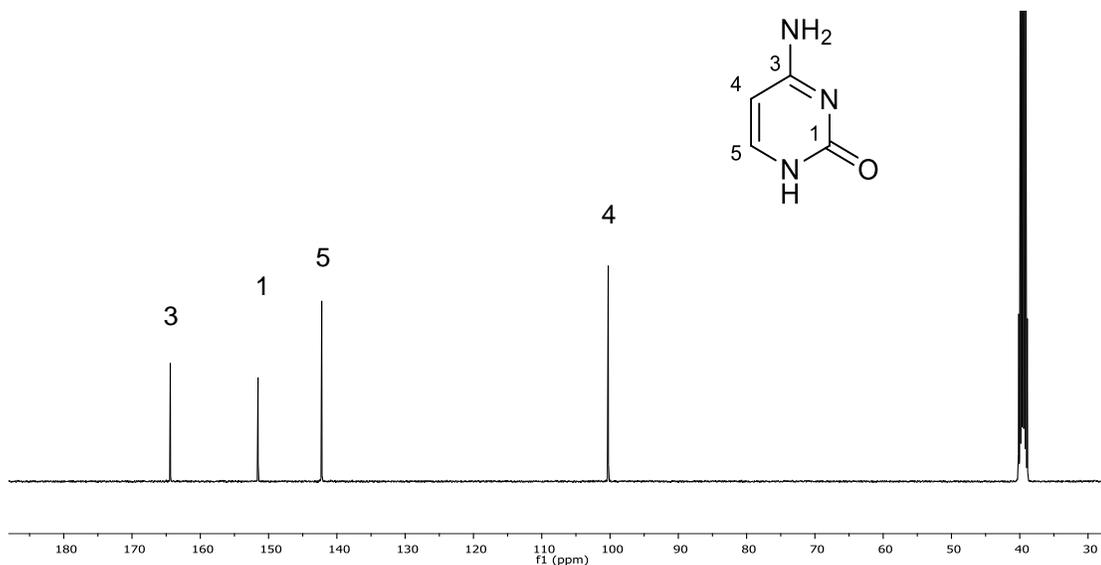
### Compuesto 6

El **compuesto 6** obtuvo como un polvo blanco, en el análisis por RMN- $^1\text{H}$  (Figura 54) se observa un sistema aromático di sustituido.



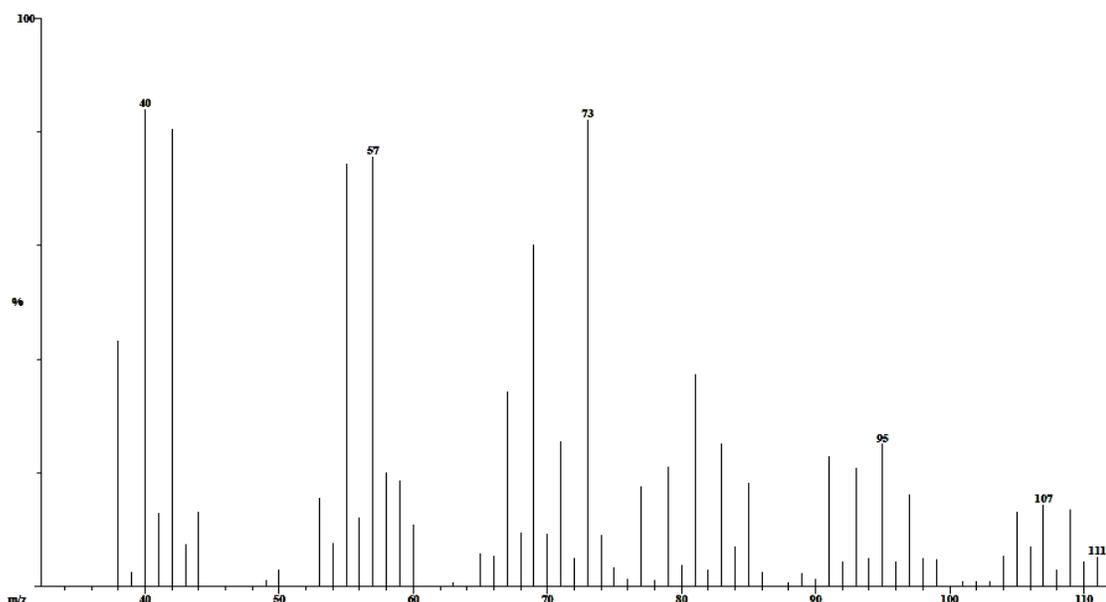
**Figura 54.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  del compuesto 6 DMSO- $d_6$  a 400 MHz

El análisis del espectro de RMN- $^1\text{H}$  muestra dos señales dobles a 7.89 ppm (d,  $J=7.6$  Hz) y 5.45 ppm (d,  $J=7.6$  Hz) y un par de señales anchas entre 10.5 ppm y 11 ppm. Las señales de protón observadas corresponden a hidrógenos situados en un sistema de dobles enlaces conjugados, las señales observadas entre 10.5-11 ppm en el espectro corresponden a moléculas unidas a heteroátomos, los cuales incrementan la anchura de la señal de los hidrógenos unidos a ellos. El análisis del espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (**Figura 55**) muestra la presencia de cuatro carbonos entre 100 y 165 ppm correspondiente a carbonos pertenecientes a un sistema de dobles enlaces conjugados.



**Figura 55.** Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  del compuesto 6 en DMSO- $d_6$  a 400 MHz

El análisis mediante EM (**Figura 56**) mostró un compuesto puro ya que se observó un ion molecular con 111  $m/z$ ; considerando las señales anchas observadas entre 10.5-11 ppm, observando la relación masa/carga impar se determinó la presencia de tres nitrógenos.



**Figura 56.** Espectro de EM-FAB<sup>+</sup> correspondiente al **compuesto 6**

Con ayuda de los experimentos en 2D hetero y homonucleares se realizó la asignación completa de las señales de los núcleos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ . El experimento HSQC permitió establecer las correlaciones entre los hidrógenos con sus carbonos, mientras que determinación de la estructura se llevó a cabo con el experimento HMBC. Los desplazamientos químicos se muestran en la **Tabla 8**.

El análisis del espectro HMBC (**Figura 57**) permite ver la correlación entre H5 con C1, C3 y C4; además de la correlación de H4 con C3 y C5. Dichas correlaciones permiten confirmar la estructura de la molécula, la cual corresponde a la base nitrogenada citosina (**Figura 58**). Los desplazamientos químicos de dicha molécula se presentan en la **Tabla 8**.

La citosina es una de las cuatro bases nitrogenadas que forman parte del ADN; los primeros estudios químicos de esponja de mar mostraron que estas tienen la capacidad de incorporar las bases nitrogenadas en nuevas estructuras con el fin de protegerse contra depredadores. A partir de la esponja de mar *Tethya crypta* se aisló por primera vez la esponjotimidina a partir de la cual se derivaron nuevos fármacos, como la citarabina o arabinosido de citosina, medicamento que actualmente se comercializa para el tratamiento de leucemia mieloide aguda y linfomas.<sup>67</sup>

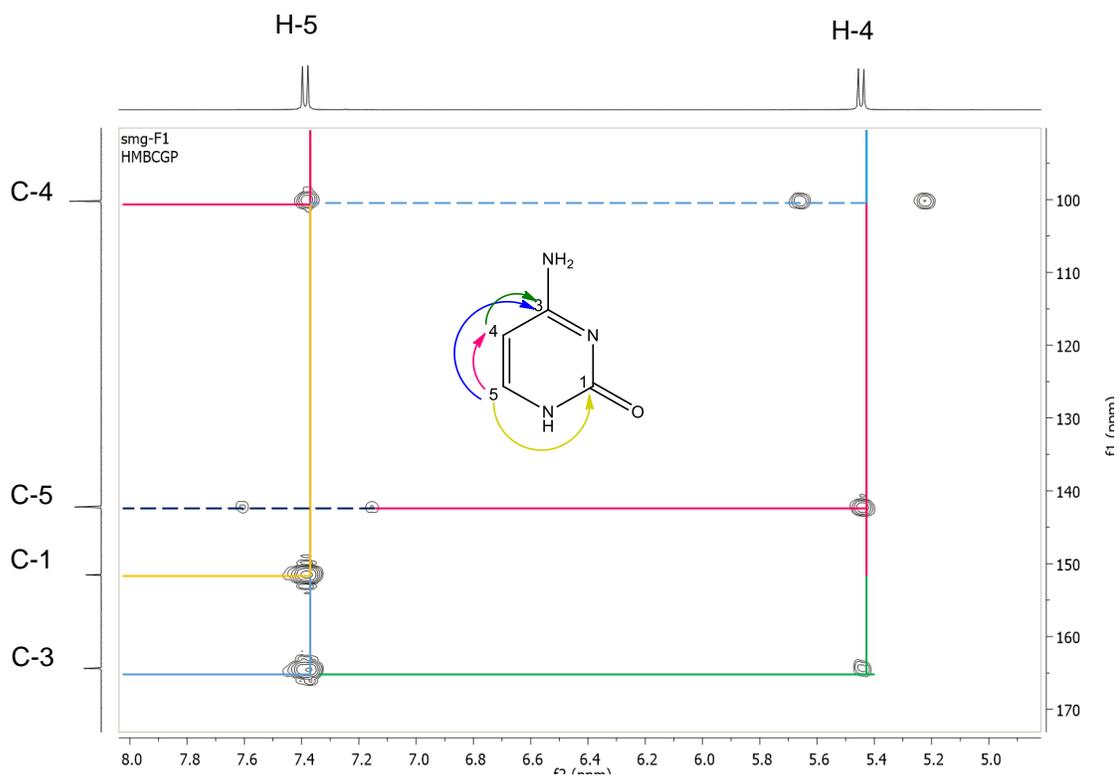


Figura 57. Ampliación del experimento HMBC del compuesto 6 en DMSO-*d*6 a 400 MHz.

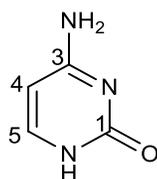


Figura 58. Estructura de la molécula citosina

Tabla 8. Desplazamientos químicos de la citosina en DMSO-*d*6 a 400 MHz

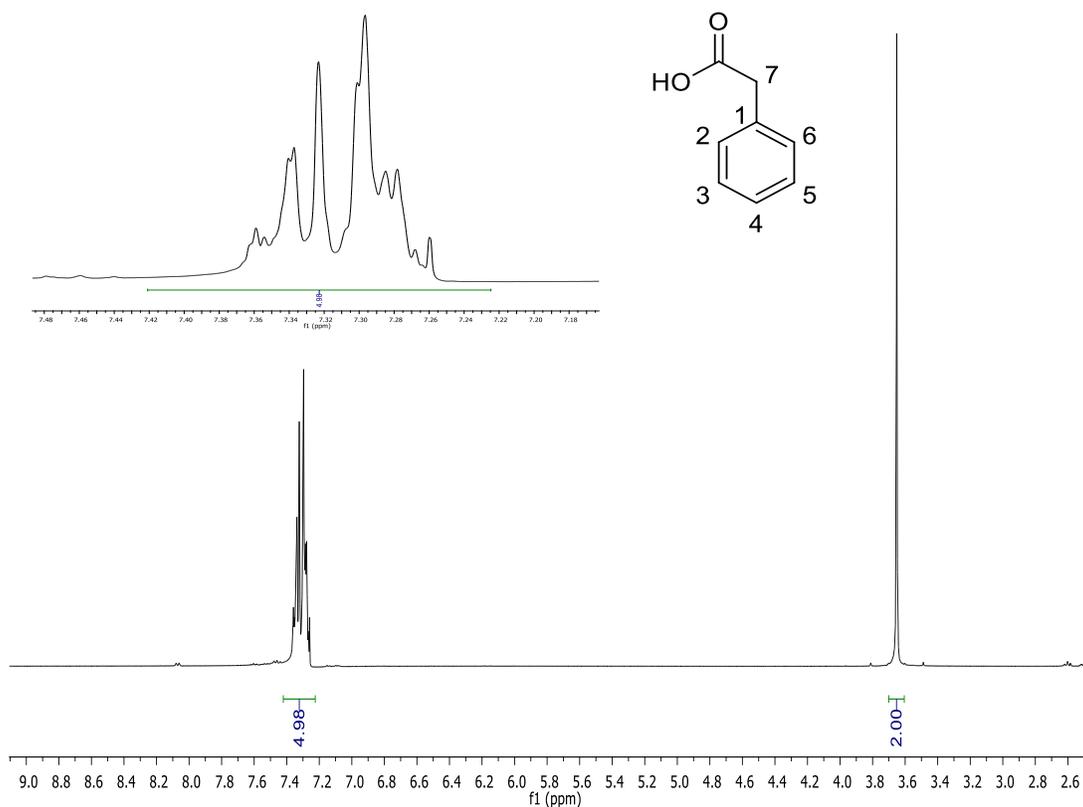
Posición	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}_{\text{ref}}$	$\delta^1\text{H}_{\text{ref}}$
1	151.5		162.0	
3	164.3		170.1	
4	100.3	5.62 (d, $J=7.6$ Hz)	97.8	5.96 (d, $J=7.17$ )
5	142.2	7.39 (d, $J=7.6$ Hz)	145.9	7.39 (d, $J=7.17$ )

\* $\delta^1\text{H}_{\text{ref}}$  y  $\delta^{13}\text{C}_{\text{ref}}$ =valores de referencia en  $\text{D}_2\text{O}$

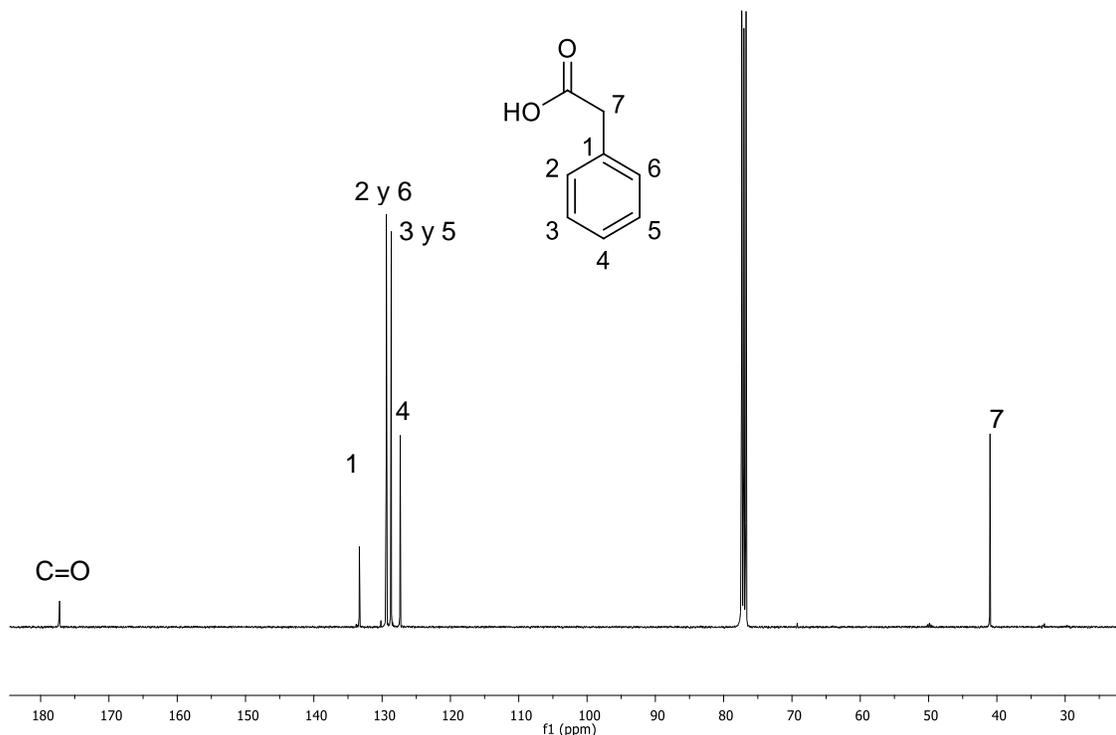
### Compuesto 7

El **compuesto 7** se obtuvo como un polvo blanco, en el análisis del RMN- $^1\text{H}$  (**Figura 59**) se observa una señal múltiple a 7.34 ppm correspondiente a un sistema aromático de seis miembros monosustituido y una señal simple a 3.65 ppm. El análisis del espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (**Figura 60**) muestra la presencia de seis señales; una de ellas a 41.5 ppm, cuatro entre 127-134 ppm lo que sugiere la presencia de un anillo aromático monosustituido y una señal pequeña a 177.5 ppm correspondiente a un carbonilo de ácido carboxílico.

smg-Ab  
smg-Ab

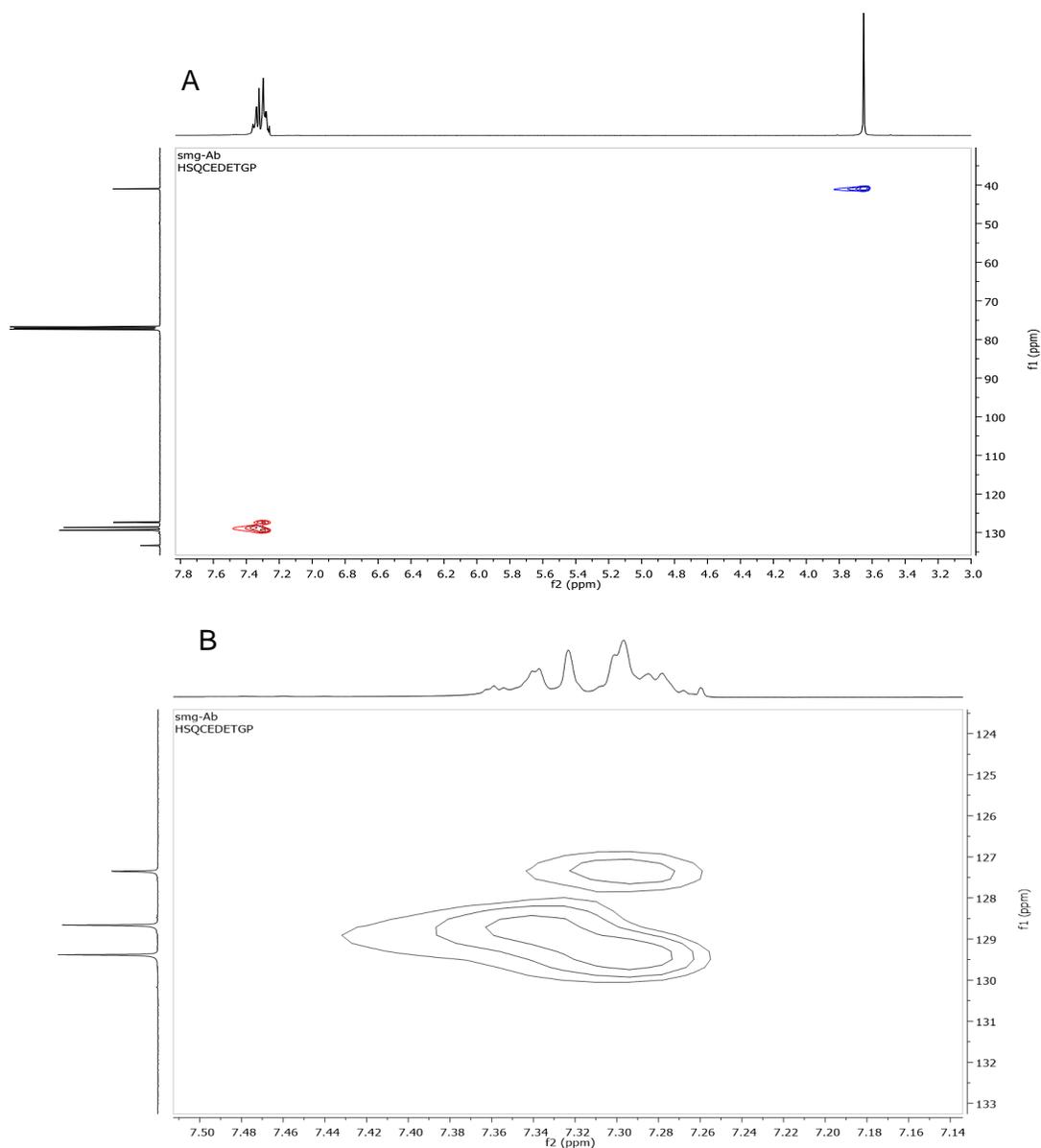


**Figura 59.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  del compuesto 7 en DMSO- $d_6$  a 400 MHz



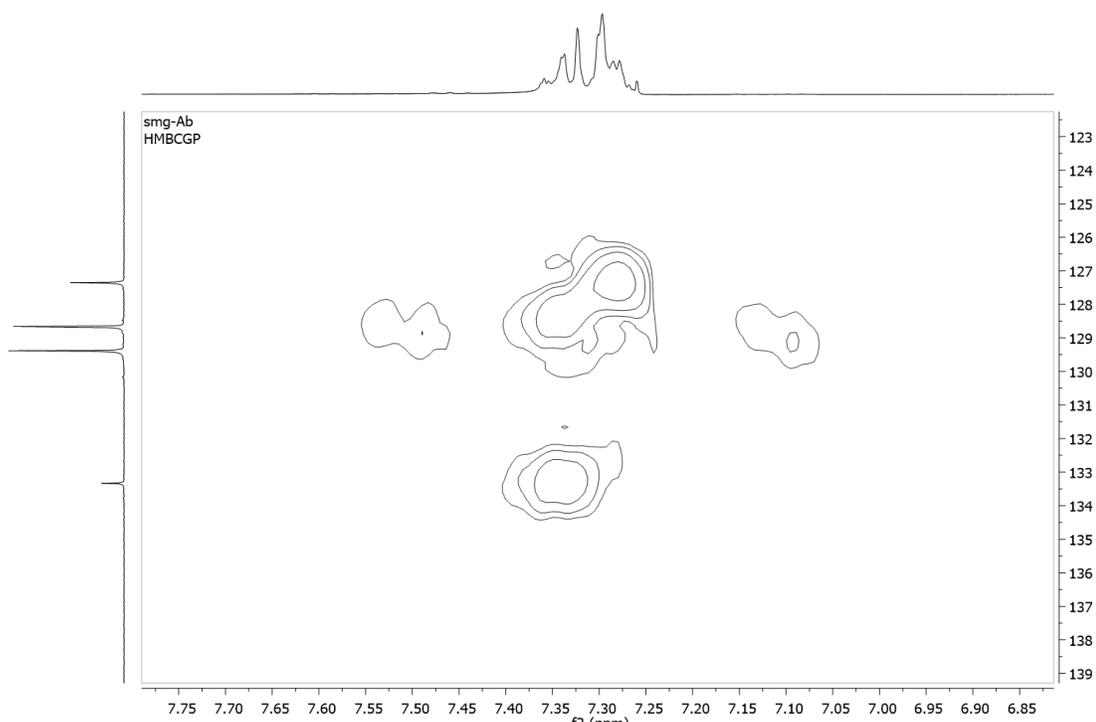
**Figura 60.** Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  del compuesto 7 en DMSO- $d_6$  a 400 MHz

El análisis del espectro en 2D, HSQC editado, (**Figura 61**) muestra las correlaciones de los hidrógenos con sus respectivos carbonos, además se puede apreciar el número de hidrógenos unidos a un carbono, observando la fase del experimento, la cual se aprecia por el cambio de color en el pico; un pico de color azul representa una señal en fase negativa y un pico de color rojo representa una señal en fase positiva.



**Figura 61.** Ampliaciones del espectro HSQC editado en  $\text{CDCl}_3$  a 400 MHz.

En la ampliación del espectro HSQC editado (**Figura 61b**) se aprecia la correlación entre dos hidrógenos a 3.65 ppm con su respectivo carbono a 40.9 ppm, dicha señal corresponde a un metileno que es confirmado por la fase negativa de la señal obtenida (color azul). Por su parte, pese a que las señales del compuesto en la región de dobles enlaces aromáticos se encontraron muy juntas es posible diferenciar las correlaciones entre los hidrógenos y carbonos del núcleo aromático. Sin embargo, el análisis de las correlaciones en el espectro HMBC (**Figura 61b**) no pudo realizarse debido a la superposición de señales (**Figura 62**).



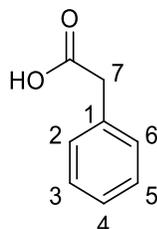
**Figura 62.** Ampliación del espectro HMBC del compuesto 7 en  $\text{CDCl}_3$  a 400 MHz.

Para llevar a cabo la completa asignación de las señales del **compuesto 7** (**Tabla 9**) se realizó el cálculo teórico de las mismas y el comparativo de las señales.

**Tabla 9.** Desplazamientos químicos teóricos y experimentales para el ácido fenilacético

C	$^{13}\text{C}$					$^1\text{H}$		
	Experimental	Corregido		Sin corregir		Experimental	Teórico	$\Delta$
		Teórico	$\Delta$	Teórico	$\Delta$			
1	133.3	133.1	0.19	128.8	4.51			
2	129.4	129.6	0.23	125.4	3.92	7.28	7.37	0.09
3	128.7	127.8	0.88	123.6	5.03	7.34	7.21	0.13
4	127.3	126.6	0.73	122.4	4.88	7.30	7.33	0.03
5	128.6	127.8	0.88	123.6	5.03	7.34	7.21	0.13
6	129.4	129.6	0.23	125.4	3.92	7.28	7.37	0.09
7	40.9	39.3	1.69	39.5	1.46	3.65	3.44	0.21
C=O	177.5	172.3	5.21	163.0	14.22			
	Promedio		1.25		5.37			0.11
	D. Estándar		1.67		3.76			0.05

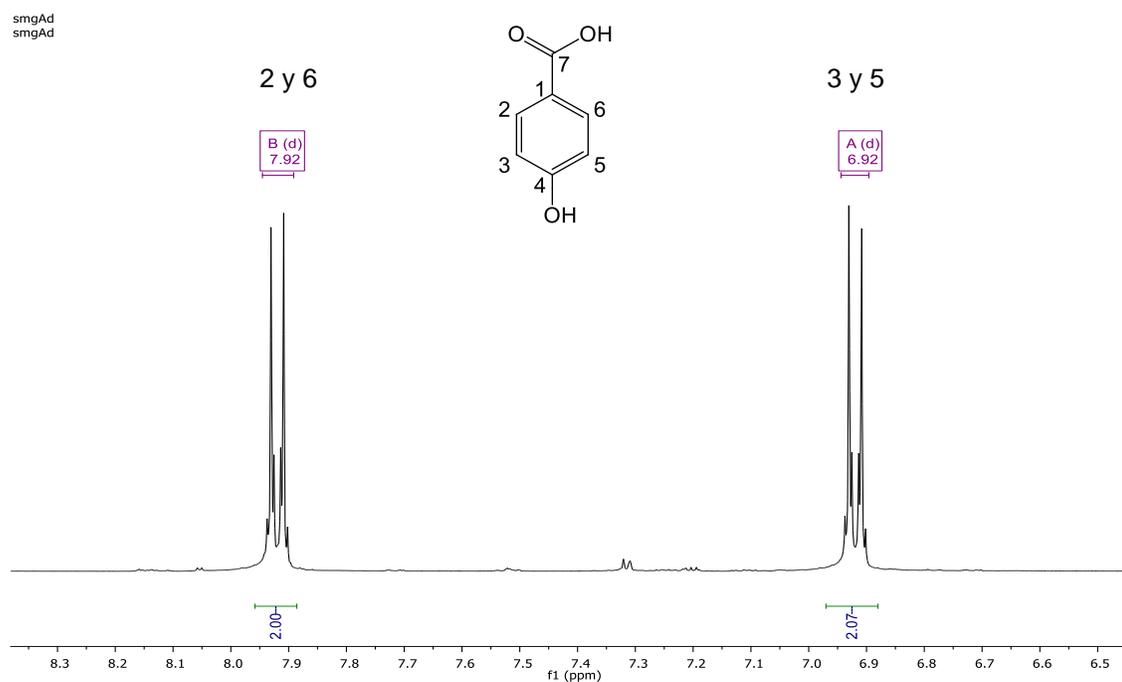
Los valores obtenidos del cálculo teórico para  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  confirmó la estructura propuesta para el **compuesto 7**, la cual corresponde al ácido fenilacético (**Figura 63**). Este compuesto ha sido previamente aislado a partir de esponjas de mar de los géneros *Xestospongia* y *Oceanapia*. Algunos autores sugieren que tanto el ácido fenilacético como, el *p*-hidroxibenzaldehído y el ácido *p*-hidroxibenzoico corresponden a productos de degradación de metabolitos secundarios comúnmente encontrados en las esponjas de mar.<sup>66, 68</sup>



**Figura 63.** Estructura del ácido fenilacético

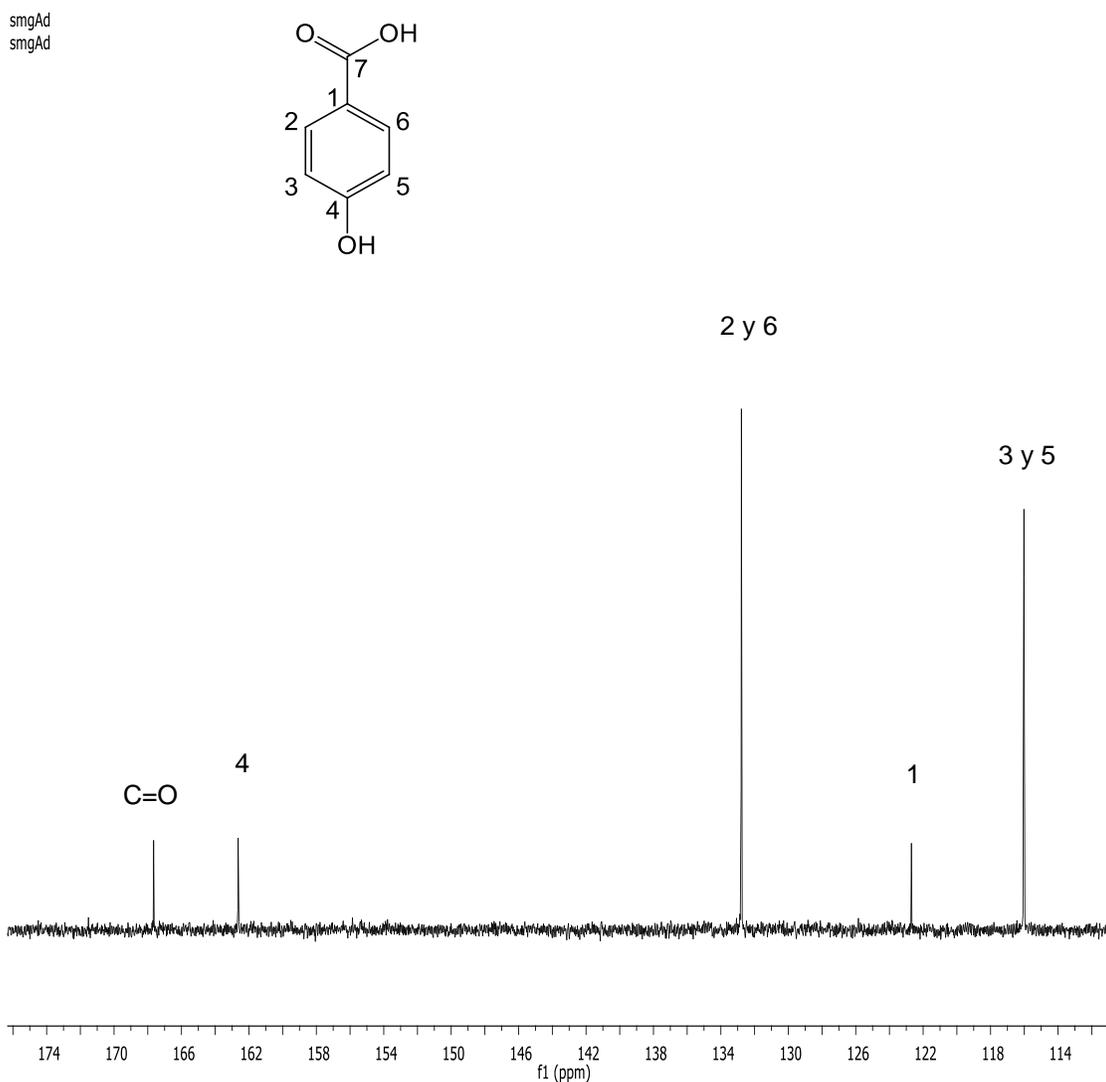
#### Compuesto 8

El **compuesto 8** se obtuvo como un sólido blanco y fue analizado por RMN- $^1\text{H}$  (**Figura 64**), donde se observó la presencia de dos señales dobles a 7.92 ppm (d,  $J=8.86$  Hz) y 6.92 ppm (d,  $J=8.86$  Hz), dichas señales correspondientes a un anillo aromático de seis miembros disustituido.



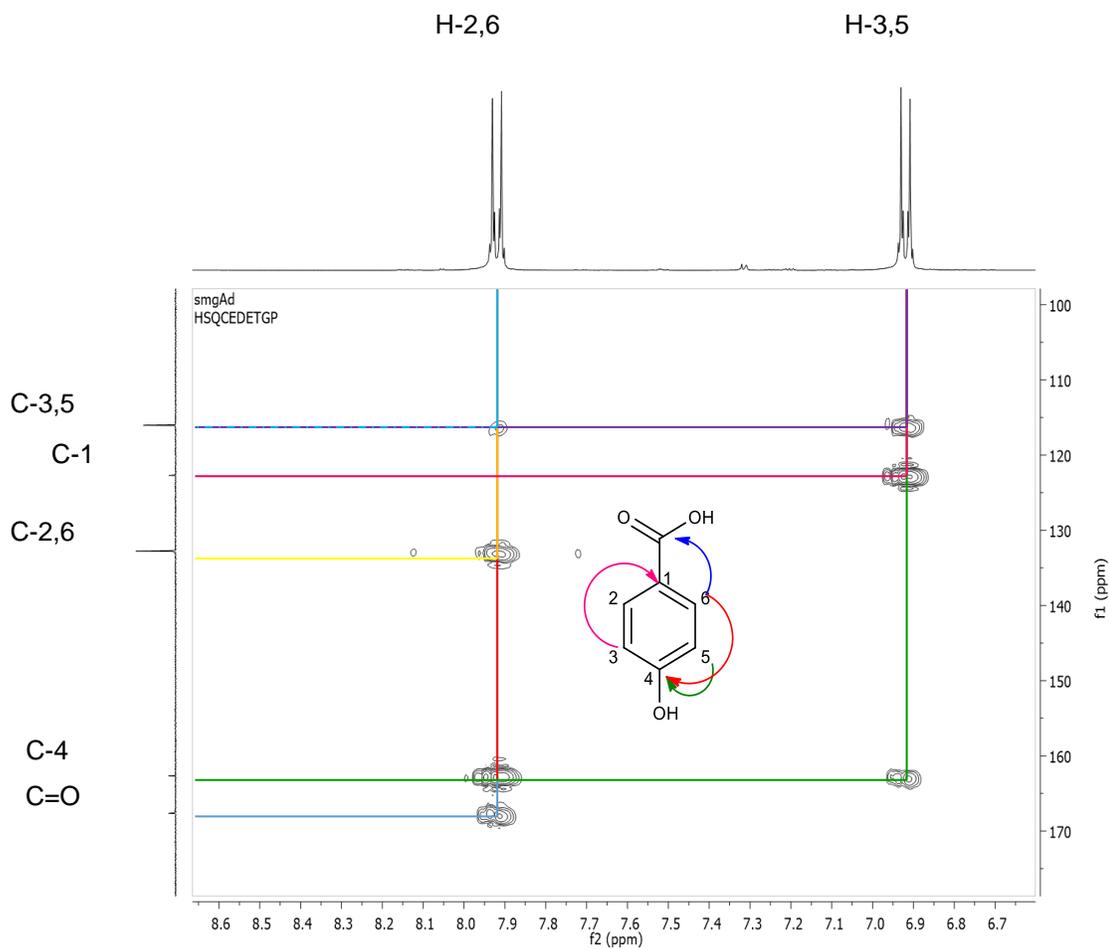
**Figura 64.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  del compuesto 8 en acetona- $d_6$  a 400 MHz

Para confirmar el esqueleto de seis miembros se analizó el experimento de RMN-<sup>13</sup>C (**Figura 65**) en el cual se observa la presencia de cinco señales; tres de ellas correspondientes a carbonos sp<sup>2</sup> aromáticos entre 114 y 134 ppm y dos de ellas a 167.4 y 162.7 ppm correspondientes a carbonos sp<sup>2</sup> unidos a heteroátomos.



**Figura 65.** Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del compuesto 8 en acetona-*d*<sub>6</sub> a 400 MHz.

Para llevar a cabo la completa asignación del **compuesto 8** se realizó el análisis de los experimentos en 2D heteronucleares HSQC y HMBC (**Figura 66**)

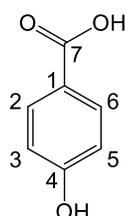


**Figura 66.** Espectro HMBC del compuesto 8 en acetona- $d_6$  a 400 MHz.

En el espectro de HMBC se puede observar la correlación entre los hidrógenos a 7.92 ppm (H2 y H6) con los carbonos a 162.7 ppm (C4) y 167.4 ppm (C=O), mientras que los hidrógenos a 6.92 ppm (H3 y H5) muestran una correlación con los carbonos a 162.7 ppm (C4) y 122.8 ppm (C1). Estas correlaciones permiten confirmar la estructura y realizar la asignación completa del **compuesto 8 (tabla 10)**, el cual corresponde al ácido *p*-hidroxibenzoico (**Figura 67**)

**Tabla 10.** Desplazamientos químicos correspondientes al ácido *p*-hidroxibenzoico en acetona-*d*6 a 400 MHz.

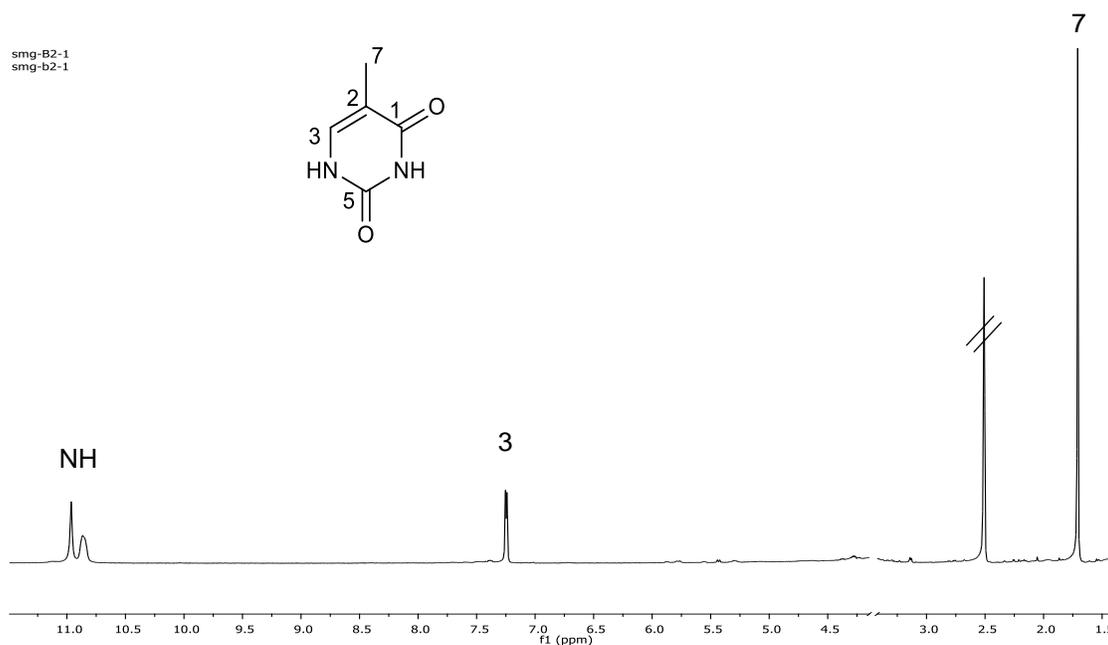
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
1	122.8	
2	132.8	7.92 (d, $J=8.8$ Hz, 1H)
3	116.1	6.92 (d, $J=8.2$ Hz, 1H)
4	162.7	
5	116.1	6.92 (d, $J=8.2$ Hz, 1H)
6	132.8	7.92 (d, $J=8.8$ Hz, 1H)
C=O	167.4	



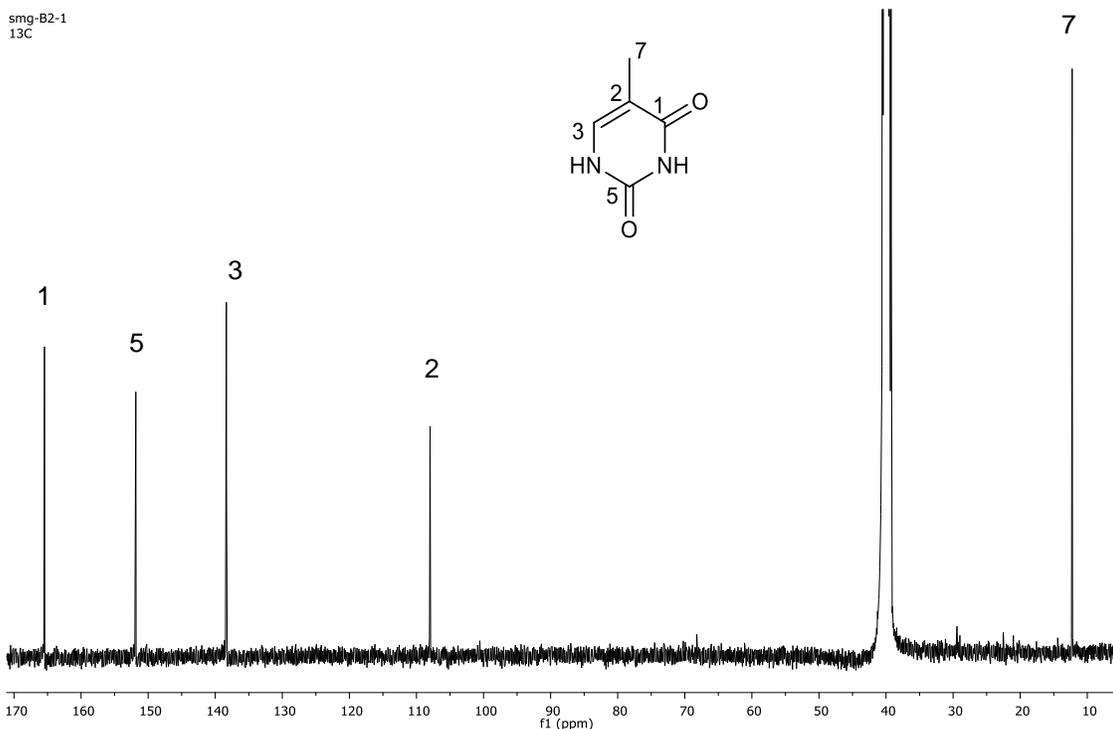
**Figura 67.** Estructura del ácido *p*-hidroxibenzoico

#### Compuesto 9

El **compuesto 9**, fue obtenido como cristales en forma de aguja. Se analizó mediante RMN- $^1\text{H}$  (**Figura 68**) y RMN- $^{13}\text{C}$  (**Figura 69**).



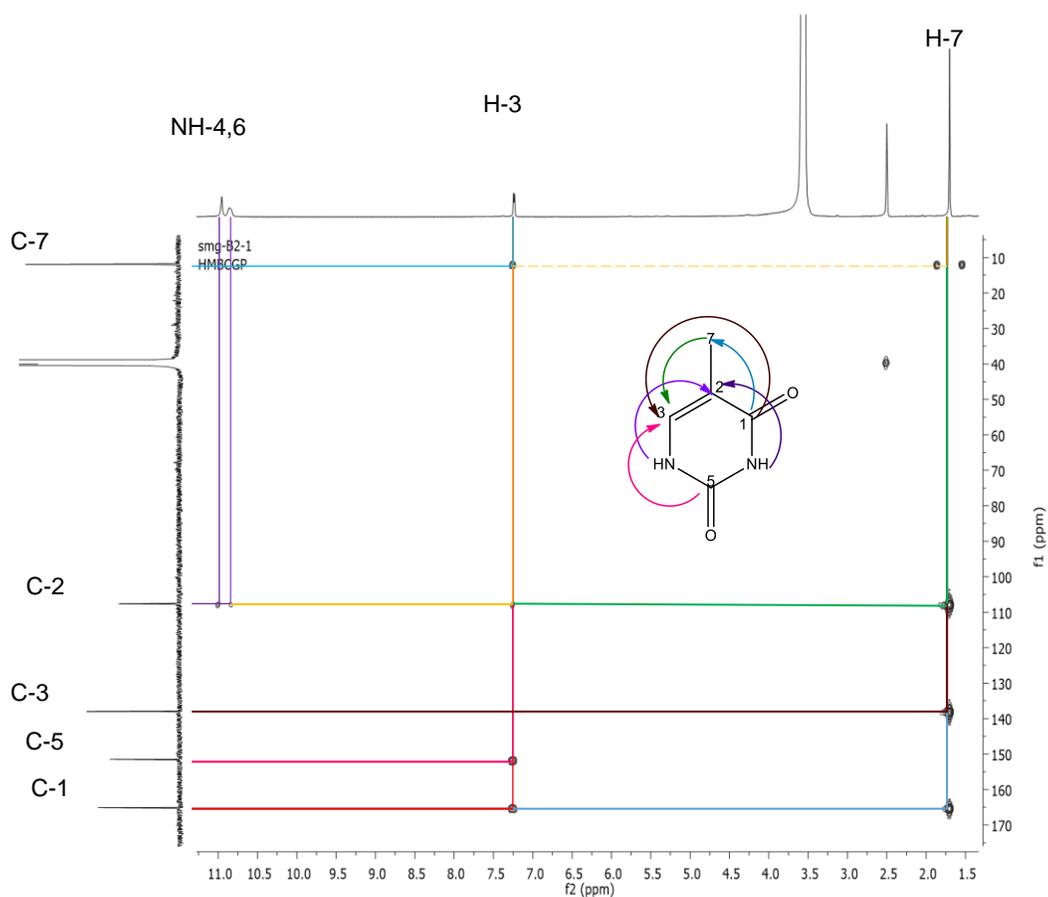
**Figura 68.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  del compuesto 9 en DMSO-*d*6 a 400 MHz



**Figura 69.** Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del compuesto 9 en DMSO-d<sub>6</sub> a 400 MHz.

En el espectro de RMN-<sup>1</sup>H se observan dos señales simples a 1.70 ppm y 7.24 ppm; dos señales anchas entre 10.5-11 ppm. El espectro de RMN-<sup>13</sup>C muestra la presencia de cinco carbonos; uno de ellos a 12 ppm, correspondiente a un metilo unido a un sistema aromático, una señal a 110 ppm y tres más entre 135-170 ppm. Para realizar la caracterización completa se realizó el análisis del experimento HMBC (**figura 70**).

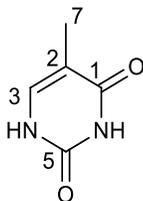
En el espectro HMBC se pueden observar las correlaciones de un hidrógeno a 1.71 ppm con tres carbonos a 108.4, 138.8 y 165.7 ppm; además de las correlaciones entre la señal del hidrógeno a 7.24 ppm con tres carbonos a 108.4, 152.3 y 165.7 ppm. Además, se logra apreciar la correlación de dos hidrógenos unidos a heteroátomo con el carbono a 108.4 ppm. Con estos datos se determinó que la estructura del **compuesto 9** corresponde a timina (**Figura 71**) (**Tabla 11**). Derivados de la timina han sido aislados previamente de esponja de mar, el más importante ellos es la esponjotimidina el cual ha servido como base para el diseño de nuevos fármacos.<sup>66</sup>



**Figura 70.** Espectro de RMN-HMBC del compuesto 9 en DMSO-*d*<sub>6</sub> a 400 MHz

**Tabla 11.** Desplazamientos químicos de timina en DMSO-*d*<sub>6</sub> a 400 MHz

Posición	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
1	165.7	
2	108.4	
3	138.8	7.24 (s, 1H)
4 (NH)		10.9 (s, 1H)
5	152.3	
6 (NH)		10.8 (s, 1H)
7	12.4	1.71 (s, 3H)



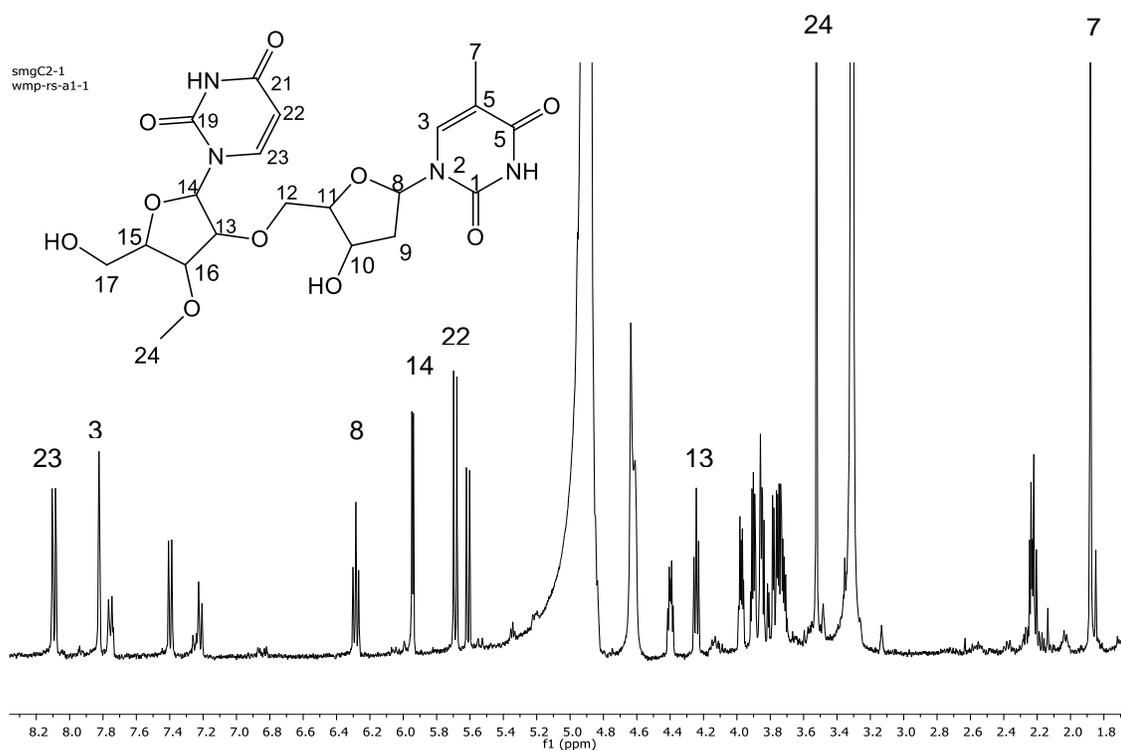
**Figura 71.** Estructura de la timina

### Compuesto 10

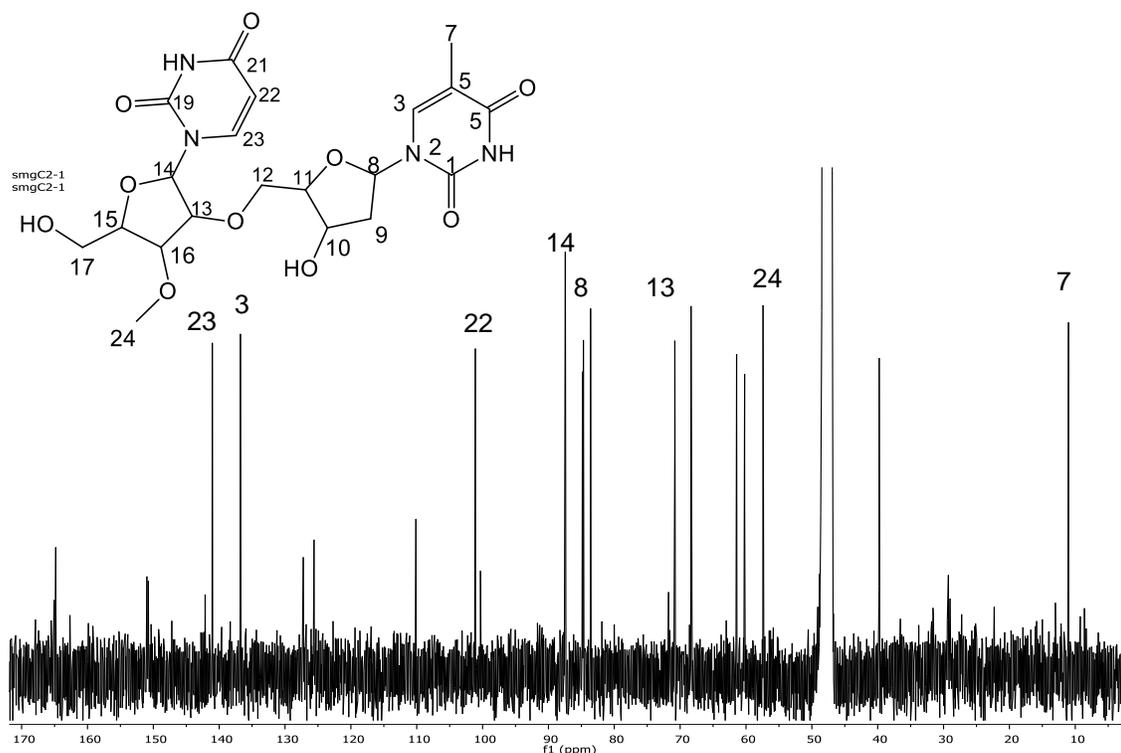
El **compuesto 10** se aisló como un sólido amorfo de color amarillo oscuro y fue analizado por RMN-<sup>1</sup>H (**Figura 72**), en el espectro se observan dos señales simples a 1.88 y 7.82 ppm, dichas señales son características de la base nitrogenada timina, la cual fue previamente aislada y caracterizada como el **compuesto 9**. Por otro lado, se observa una señal simple a 3.52 ppm correspondiente a metoxilo, así como una señal múltiple a 2.22 ppm (dd,  $J=6.6, 3.7$  Hz, 2H), y un grupo de señales entre 3.6-6.5 ppm correspondientes a hidrógenos unidos a heteroátomo; estas señales corresponden a hidrógenos pertenecientes a sistemas de aldopentosas. Adicionalmente se observan un par de señales dobles a 5.67 ppm (d,  $J=8.08$  Hz, 1H) y 8.10 ppm (d,  $J=8.08$  Hz, 1H) correspondientes a la base nitrogenada uracilo.<sup>69</sup>

En el espectro de RMN-<sup>13</sup>C (**Figura 73**) se observa la presencia de una señal a 12 ppm correspondiente al metilo de la base nitrogenada timina, se observan cuatro señales entre 150 y 170 ppm correspondientes a los carbonilos de las bases nitrogenadas timina y uracilo, así como cuatro señales entre 100 ppm y 140 ppm correspondientes a los dobles enlaces presentes tanto en la timina como el uracilo. Se aprecian once señales entre 40 y 90 ppm correspondientes a carbonos unidos a heteroátomos correspondientes a dos unidades de aldopentosas. Para realizar la caracterización estructural completa de las moléculas aisladas se emplearon los experimentos en 2D homo y heteronucleares: COSY, HMBC y HSQC.

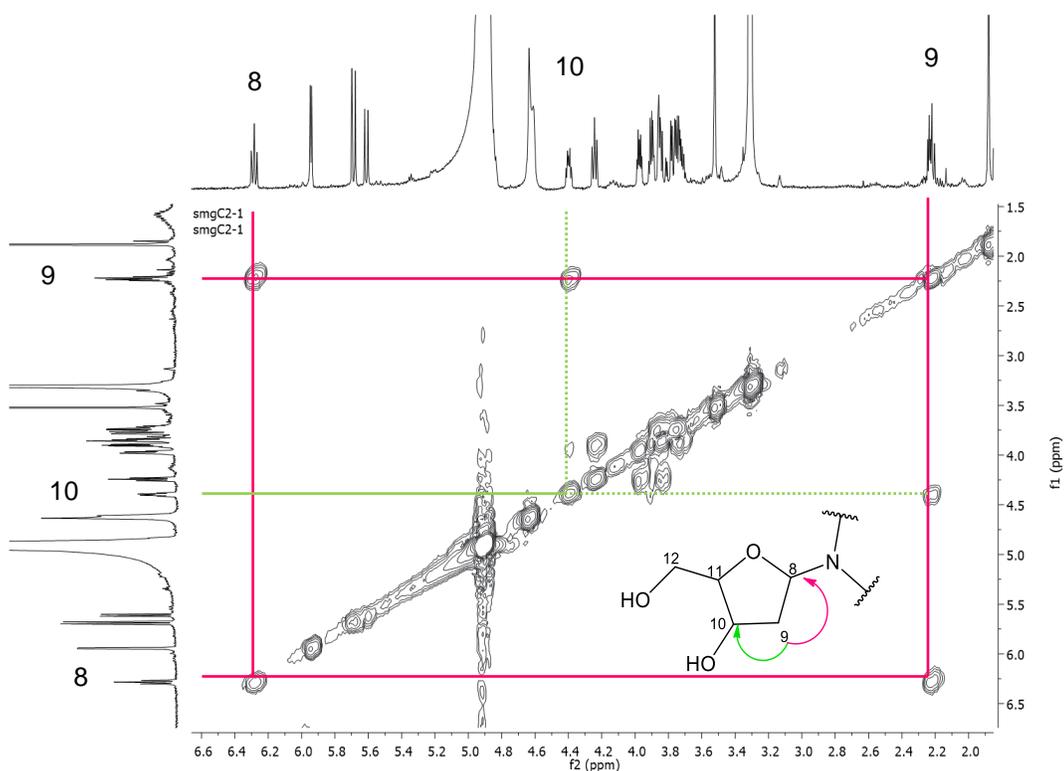
En el experimento COSY (**Figura 71**) se observan las correlaciones entre el hidrógeno a 2.22 ppm (dd,  $J=6.6, 3.7$  Hz, 2H) con los hidrógenos a 6.28 ppm y 4.40 ppm; dichos acoplamientos explican su multiplicidad. El sistema presente indica que la unidad de azúcar corresponde a la desoxirribosa ya que presenta los desplazamientos químicos de la misma. Con ayuda del experimento HSQC se determinó la correspondencia entre cada carbono y los hidrógenos unidos ellos. A partir de los datos obtenidos de los espectros de RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C se observó la presencia de las señales correspondientes a la molécula de timina: dos señales simples a 1.88 ppm y 7.82 ppm, una señal de metilo a 12 ppm, dos señales a 111.6 ppm y 138.2 ppm de carbonos de doble enlace y dos señales a 153.2 y 166.4 correspondientes a carbonilo. Las señales correspondientes a la base nitrogenada uridina se obtuvieron a partir de los espectros de RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C. Partiendo de esto y con la información obtenida respecto a las señales correspondientes a aldopentosas se planteó que la estructura está compuesta por dos unidades de nucleósidos. Mediante los experimentos COSY y HMBC se determinó la estructura de las unidades de aldopentosas presentes.



**Figura 72.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  del compuesto 10 en  $\text{CD}_3\text{OD}$  a 400 MHz

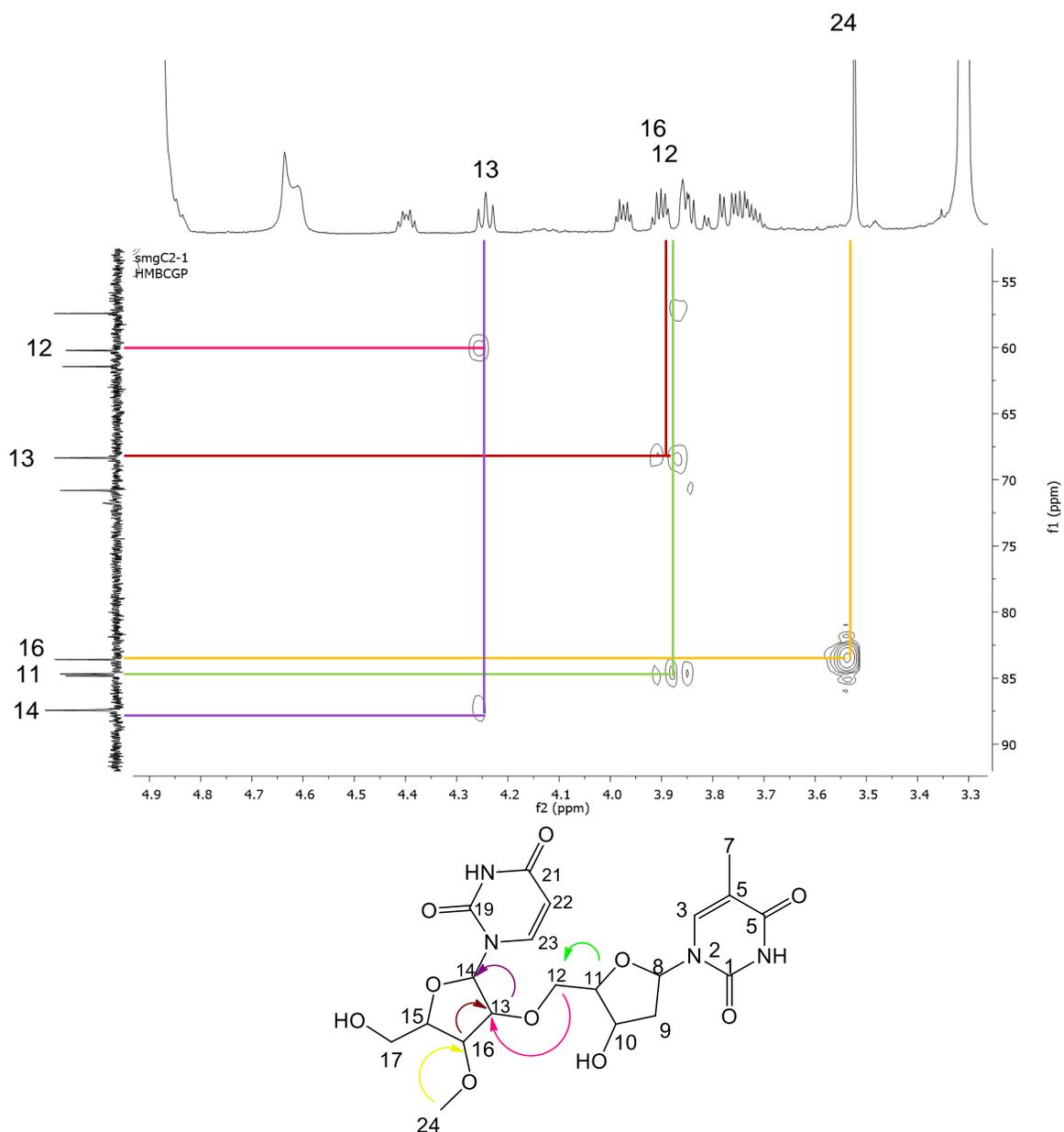


**Figura 73.** Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  del compuesto 10 en  $\text{CD}_3\text{OD}$  a 400 MHz.



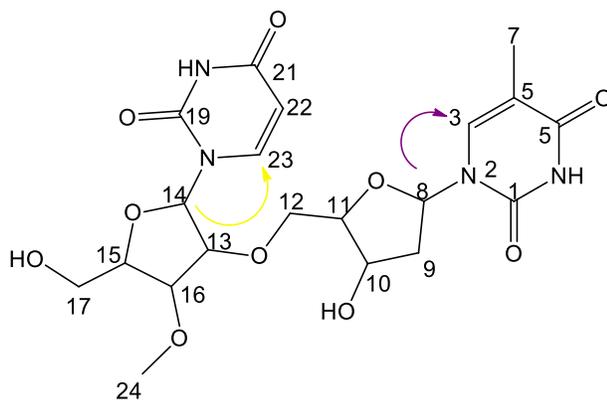
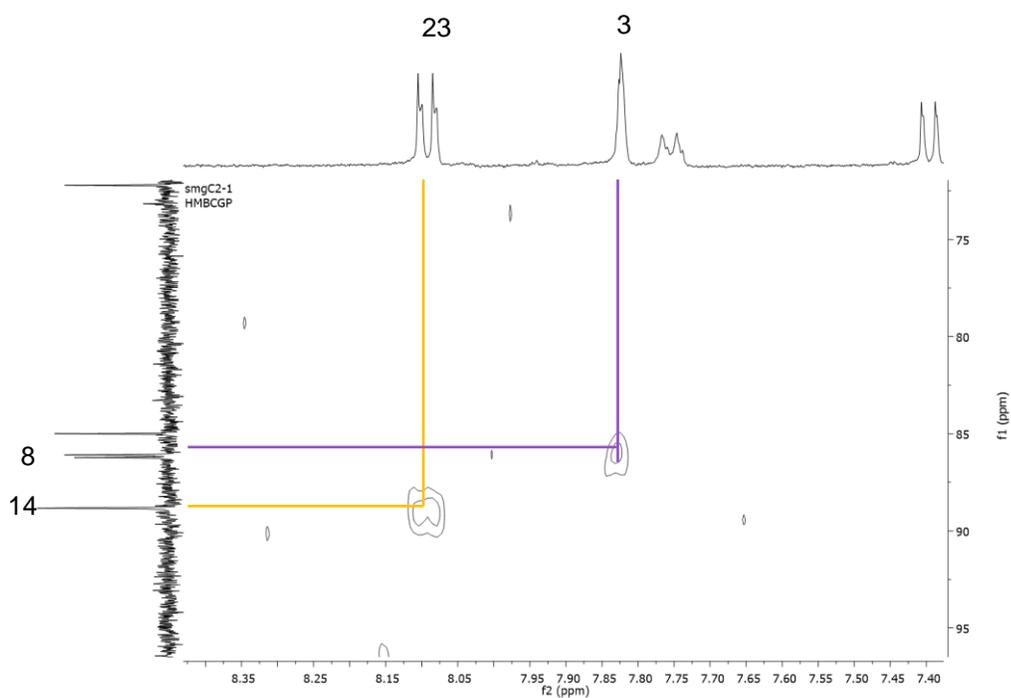
**Figura 74.** Ampliación del espectro COSY del compuesto 10 en  $\text{CD}_3\text{OD}$  a 400 MHz.

En el experimento HMBC (**Figura 75**) se observan las correlaciones entre H13 a 4.24 ppm (t,  $J=5.6$  Hz, 1H) con C14 a 88.8 ppm, así como la correlación entre H16 a 3.84 ppm con C14 a 69.7 ppm, las cuales permiten establecer que la estructura de la segunda aldopentosa corresponde a un derivado de la unidad de ribosa, la cual se encuentra sustituida en la posición C16 por un grupo metoxilo, sustitución que se aprecia mediante la correlación de H24 a 3.52 ppm con C16 a 84.9 ppm. Se confirmó la unión de las dos unidades de aldopentosas mediante un enlace éster observando las correlaciones entre H11 a 3.98 y C12 a 61.6 ppm, así como la correlación entre C12 con H13 a 4.24 ppm.



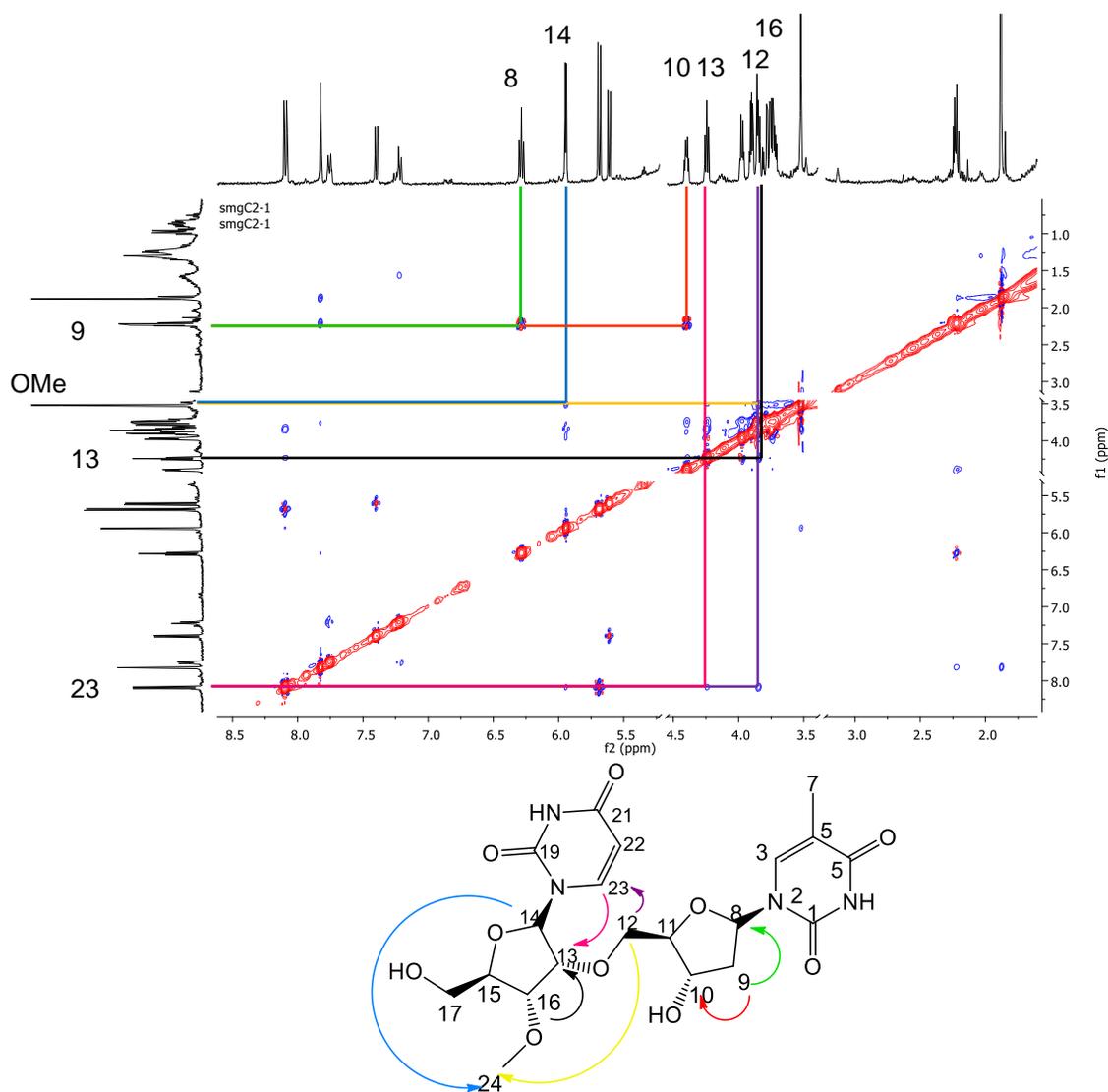
**Figura 75.** Ampliación del espectro HMBC del compuesto 10 en  $\text{CD}_3\text{OD}$  a 400 MHz.

Para confirmar la unión de las unidades de azúcar con la respectiva base nitrogenada se empleó el experimento HMBC (**Figura 76**) en el cual se observa la correlación entre C8 (86 ppm) con un hidrógeno a 7.82 ppm correspondiente a H3 de la molécula de timina, así como la correlación entre C14 de la unidad de metoxiribosa con un hidrógeno a 8.10 ppm (d,  $J=8.08$  Hz, 1H) perteneciente a H23 de la base nitrogenada uridina.



**Figura 76.** Ampliación del espectro HMBC del compuesto 10 en  $\text{CD}_3\text{OD}$  a 400 MHz.

En el espectro NOESY-2D (**Figura 77**) se pueden apreciar los acoplamiento espaciales entre los hidrógenos de la molécula. Con ayuda de este experimento se realizó la asignación de la estereoquímica relativa para la molécula previamente caracterizada.

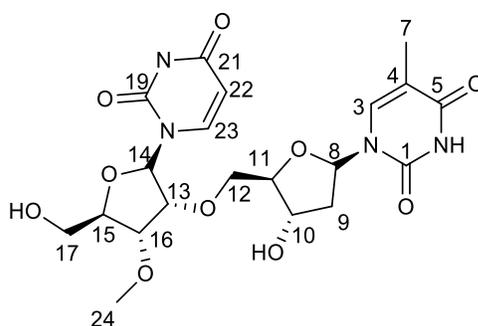


**Figura 77.** Espectro NOESY-2D que muestra los acoplamientos espaciales del compuesto 10 en  $\text{CD}_3\text{OD}$  a 400 MHz

En el espectro de NOESY se observaron las correlaciones existentes entre los hidrógenos H9 a 2.22 ppm con los hidrógenos de las posiciones H8 (6.28 ppm) y H10 (4.40 ppm) lo cual permitió establecer que el hidrógeno correspondiente a H8 y uno de los hidrógenos de H9 se encuentran orientados hacia el mismo plano, esto permite confirmar que la estereoquímica presente en la unidad de desoxirribosa corresponde a la que encontramos en la naturaleza. Para confirmar la estereoquímica de la metoxirribosa se observaron las correlaciones entre los hidrógenos a 3.84 ppm (H16) y a 4.24 ppm (H13), esta correlación confirma que ambos hidrógenos se encuentran orientados hacia la misma posición, mientras que la ausencia de la correlación entre H13

con H14 (5.95 ppm) confirma que la estereoquímica presente en esta unidad de azúcar corresponde a la encontrada de manera regular en la naturaleza. Las correlaciones observadas entre H12 (3.85 ppm), H23 (8.10 ppm) y H24 (3.52 ppm) permitieron confirmar la relación existente entre la unidad de azúcar de la timina con la unidad de azúcar del uracilo y con el uracilo mismo. La orientación del grupo metoxilo se corroboró al observar la correlación entre H14 con los H24.

Mediante los experimentos en 1D y 2D homo y heteronucleares se confirmó la estructura del compuesto 10 (**Figura 78**) (**Tabla 12**).



**Figura 78.** Estructura del 1-(3-((3-hidroxi-5-(5-metil-2,4-dimetilen-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il) tetrahidrofuran-2-il)metoxi)-5-(hidroximetil)-4-metoxitetrahidrofuran-2-il) pirimirin-2,4(1H,3H)-diona

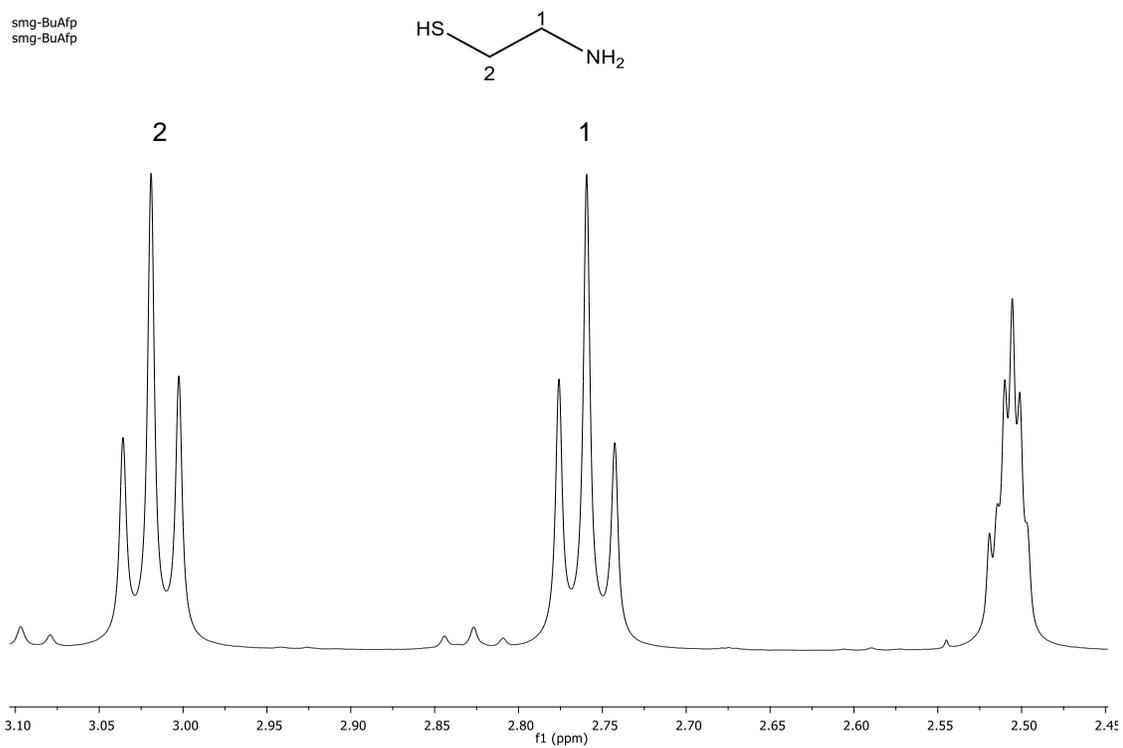
Debido a la falta de movilidad de las esponjas de mar y la falta de defensas físicas contra sus depredadores, estas han desarrollado un amplio conjunto de defensas químicas, las cuales ayudan a mantener lejos a peces, tortugas, invertebrados y plantas. Metabolitos secundarios como los nucleósidos juegan un rol importante en la defensa del animal y sus novedosas estructuras son el resultado de una evolución independiente entre las diferentes especies de mar. Los nucleósidos aislados de esponja de mar han mostrado tener importantes actividades como antivirales, anticancerígeno, vasodilatadores, relajantes musculares y antihipertensivos; hasta el momento las esponjas de mar son la principal fuente de nucleósidos con nuevas estructuras. Sin embargo, estructuras como el **compuesto 10** no se han reportado en la literatura.<sup>70</sup>

**Tabla 12.** Desplazamientos químicos correspondientes al compuesto 10 en CD<sub>3</sub>OD a 400 MHz

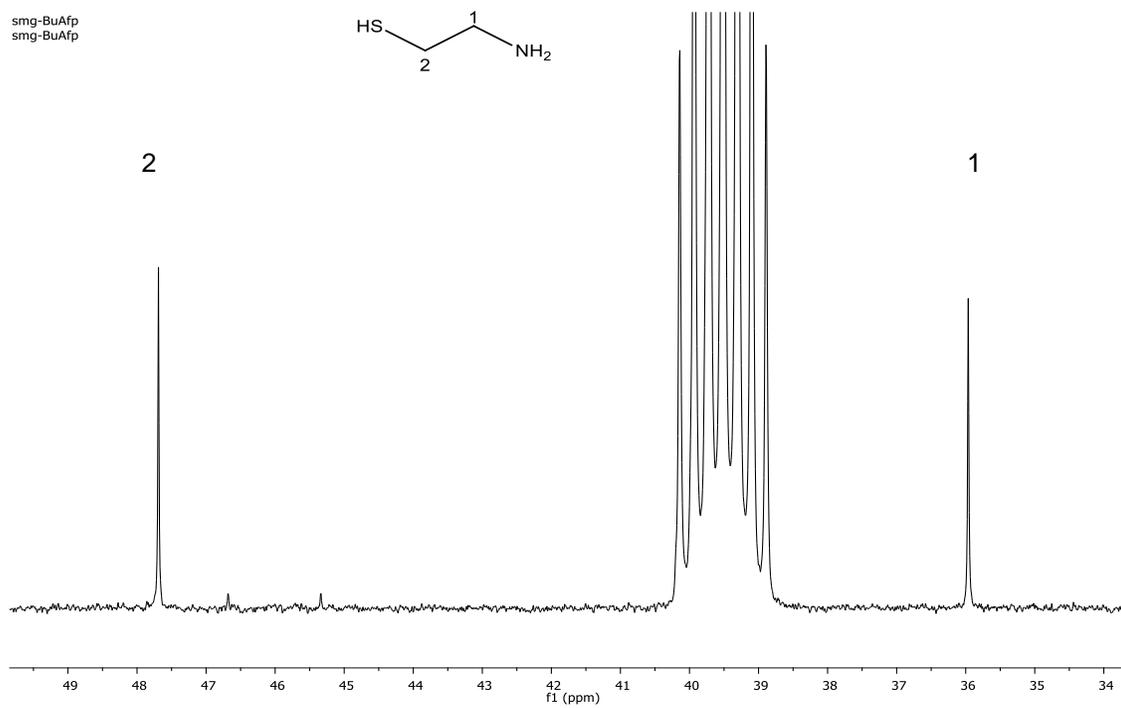
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
1	153.2	
3	138.2	7.82
4	111.6	
5	166.4	
7	12.4	1.88
8	86.0	6.28 (t, $J=6.8$ Hz, 1H)
9	41.1	2.22 (m, 2H)
10	72.3	4.40 (dt, $J=6.8, 3.4$ Hz, 1H)
11	86.2	3.98 (dt, $J=5.8, 2.7$ Hz, 1H)
12	61.6	3.85, 3.75
13	69.7	4.24 (t, $J= 5.6$ Hz, 1H)
14	88.8	5.95 (d, $J=3.6$ Hz, 1H)
15	88.8	3.90
16	84.9	3.84
17	62.8	3.78, 3.74
19	152.2	
21	166.2	
22	102.6	5.67 (d, $J=8.08$ Hz, 1H)
23	142.1	8.10 (d, $J=8.08$ Hz, 1H)
MeO-	58.8	3.52

### Compuesto 11

El **compuesto 11** se obtuvo como un polvo blanco. En el análisis por RMN-<sup>1</sup>H (**figura 79**) se observó la presencia de dos señales triples a 2.75 (t,  $J=6.6$  Hz, 2H) y 3.01 (t,  $J=6.6$  Hz, 2H) ppm; mientras que en el espectro de RMN-<sup>13</sup>C (**figura 80**) se observó nuevamente la presencia de dos señales, una de ellas a 36 ppm y la otra a 47.7 ppm. Dichas señales corresponden a metilenos unidos a heteroátomos.



**Figura 79.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto 13 en DMSO-*d*6 a 400 MHz

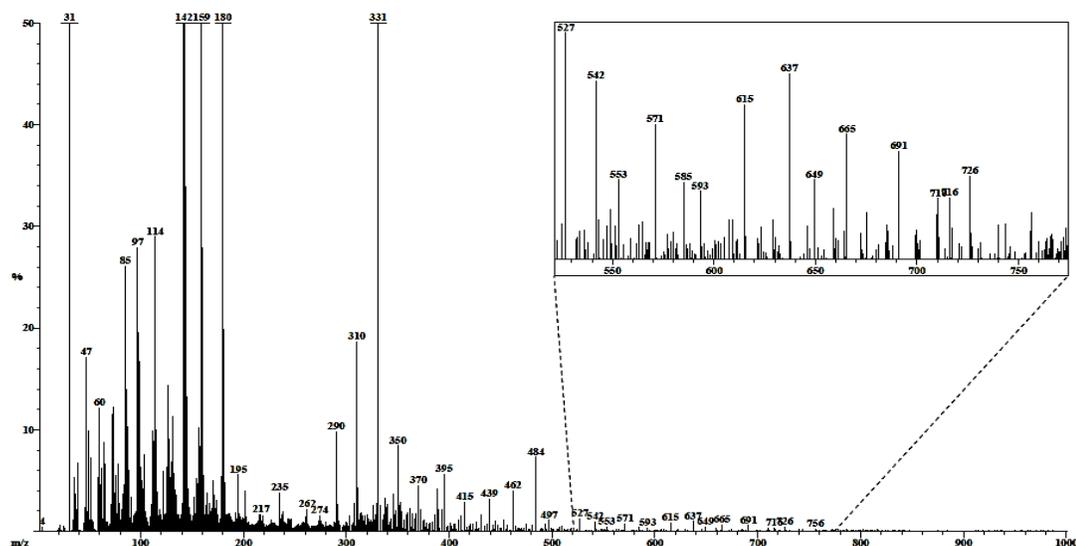


**Figura 80.** Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del compuesto 13 en DMSO-*d*6 a 400 MHz

Se realizó el análisis del espectro de EM (**figura 81**) para confirmar el peso molecular del **compuesto 13**. Los resultados obtenidos muestran la polimerización del mismo durante su análisis.

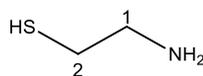
Base: m/z 180; 33.3%FS TIC: 5592970 (Max Inten : 349408)

#Ions: 1613



**Figura 81.** Espectro de EM del **compuesto 13**.

Mediante comparación de los desplazamientos químicos con la literatura se determinó la estructura del **compuesto 13**, la cual corresponde a la molécula de cisteamina (**Figura 82**). Dicho compuesto juega un papel importante en la síntesis del anillo de tiazina presente en las adociaquinonas y alisiaquinonas, compuestos aislados a partir de esponjas de mar de los géneros *Xestosponia* y *Adocia*.<sup>71, 72</sup>



**Figura 82.** Estructura de la cisteamina

## CONCLUSIONES

Se realizó la validación externa para el cálculo del modelo teórico  $\omega$ B97X-D/6-31G(d). Esta mostró la disminución del error para el modelo corregido mediante regresión en el caso del  $^{13}\text{C}$ , con lo cual se concluye el empleo del escalamiento empírico mediante regresión lineal puede ser empleado como herramienta auxiliar en la asignación de estructuras de compuestos obtenidos a partir de esponja de mar.

La corrección del modelo empleando regresión lineal para el  $^1\text{H}$  no mostró mejora significativa sobre el modelo sin corregir, por lo cual podemos concluir que el empleo del escalamiento empírico para el caso del  $^1\text{H}$  es irrelevante.

A partir de los extractos de diclorometano (0.20%), acetato de etilo (0.20%) y butanol (2.61%) se aislaron y purificaron once compuestos, los cuales fueron caracterizados empleando RMN, EM. Dichos compuestos corresponden a metabolitos involucrados, en su mayoría, en la defensa del animal contra depredadores. La presencia de los mismos muestra que el animal se encontraba sometido a estrés por depredación al momento de su colecta.

El ácido fenilacético se aisló y fue caracterizado empleando cálculos teóricos como auxiliar en la asignación átomo por átomo, mostrando la rapidez y eficacia en el proceso de asignación estructural de la metodología propuesta, a pesar de tratarse de una molécula pequeña, con lo que se concluye que el empleo de dicha metodología disminuirá el tiempo de análisis de moléculas complejas.

A partir del extracto de diclorometano se aisló el ácido 3-hidroxi-colest-5,6-en-22-oico, el cual fue caracterizado empleando RMN y corresponde a una molécula sin reporte previo en la literatura, la variante observada en la cadena lateral de este esteroide puede ser atribuida a la nutrición del espécimen, lo cual sugiere que el sitio de colecta puede ser un factor determinante en los metabolitos producidos por los especímenes a estudiar.

A partir del extracto de acetato de etilo se aisló y caracterizó el compuesto 6-(14-hidroxi-15-metilpenta-12,14-dien-12-il) uridilato, el cual corresponde a una molécula perteneciente al grupo de los nucleósidos, de la cual no se cuenta con reporte previo en la literatura. Este grupo de compuestos están implicados en los mecanismos de defensa de la esponja de mar contra depredadores o bacterias. La estructura inusual encontrada nos lleva a pensar que el estrés por depredación al que estaba sometido el espécimen podría ser atribuido a organismos resistentes a otros medios de defensa.

Se aisló el compuesto cisteamina a partir del extracto con butanol, el cual no se encuentra reportado para esponjas del género *Haliclona*. Dicho compuesto juega un papel importante en la síntesis del anillo de tiazina implicado en la síntesis de compuestos más complejos. Considerando que este compuesto corresponde a un precursor de moléculas más grandes, así como el tamaño y tipo de los compuestos

obtenidos, se concluye que el espécimen era de corta edad por lo cual no había logrado sintetizar aun compuestos de mayor tamaño.

## REFERENCIAS

1. Monks, N.; Lerner, C.; Henriques, A.; Farias, F.; Schapovol, E.; Suyenaga, E.; Rocha, A.; Shwartsman, G.; Mothes, B. Anticancer, antichemotactic and antimicrobial activities of marine's sponges collected off the coast of Santa Catarina, Southern Brazil. *J Exp Mar Biol Ecol*, **2002**, *281*, 1-12
2. Takamatsu, S.; Hodges, T.; Rajbhandari, I.; Gerwick, W.; Hamann, M.; Nagle, D. Marine natural products as a novel antioxidant prototype. *J Nat Prod*, **2003**, *66*, 605-608
3. Müller, W.; Jeanteur, Ph.; Kostovic, I.; Macieira-Coello, A.; Rhoads, R.E. *Marine Molecular Biotechnology*; Springer: Alemania, **2003**
4. De la Calle, F. Farmacos de origen marino, *Treballs de la SCB*, **2007**, *58*, 141-155
5. A. Moreno.; R. Outerelo.; E. Ruiz. Estudio y diversidad de los poríferos. *Red Biol*, **2011**, *4(2)*, 7-18
6. Chuan, Z.; Quiong, G.; Wei-Guo, X.; Guo-Sheng, X.; De-Jun, J.; Rong, X.; He, L.; Hong-Quan, D.; Jing, Z.; Sheng-An, T. Three new polyunsaturated lipids from a Guangxi marine sponge *Haliclona* sp. *J As Nat Prod Res*, **2015**, *17(2)*, 114-119
7. Abdjul, D.; Yamazaki, H.; Kanno, S.; Takahashi, O.; Kirikoshi, R.; Ukai, K.; Namikoshi, M. Haliclonadamine derivatives and 6-epi-Monancherin from the Marine Sponge *Halichondria panacea* Collected at Iriomote Island, *J Nat Prod*, **2016**, *79*, 1149-1154
8. Carballo, J.; Gómez, P.; Cruz-Barraza, J. Biodiversidad de Porifera en México. *Rev Mex Biod*, **2014**, *85*, S143-S153
9. Gerwick, F.; Tagliapietra, W. *Handbook of Marine Natural Products*, Springer, Dordrecht, **2012**, 305-307
10. Koehn, T.; Carter, G. The evolving role of nature products in drug discovery, *Nature*, **2005**, *4*, 206-220
11. Harvey, A. Natural products in drug discovery, *Drug Discovery Today*, **2008**, *113(19)*, 894-901
12. George, W.; Wilson, H. Sponges of Beaufort (N.C.) Harbor and vicinity. *Bull. Bur. Fish.* **1919**, *36 (876)*: 130-179.
13. L. Mander.; H. Liu. *Comprehensive natural products II: Chemistry and Biology*; first edition: Elsevier, United Kingdom. **2010**, 330
14. Clark, R.; Field, K.; Charan, R.; Garson, M.; Brereton, I.; Willis, A. The haliclonacyclamine, cytotoxic tertiary alkaloids from the tropical marine sponge *Haliclona* sp, *Tetrahedron*, **1998**, *54*, 8811-8826
15. Kobayashi, M.; Chen, Y.; Aoki, S.; In, Y.; Ishida, T.; Kitagawa, I. Four new  $\beta$ -carboline Alkaloids isolated from two Okinawan marine sponges of *Xestospongia* sp and *Haliclona* sp, *Tetrahedron*, **1995**, *13*, 3727-37236
16. Hwand, B.; Soon, J.; Jeong, E.; Sim, C.; Rho, J. Densanins A and B, new macrocyclic pyrrole alkaloids isolated from the marine sponge *Haliclona densaspicula*, *Organic Letter*, **2012**, *4(24)*, 6154-6157

17. Zhang, H.; Loveridge, S.; Tenney, K.; Crews, P. A new 3-alkylpyridine alkaloid from the marine sponge *Haliclona* sp. And its cytotoxic activity, *J Nat Prod*, **2016**, *30*(11), 1262-1265
18. Aray, M.; Sobou, M.; Vilchéze, C.; Baughn, A.; Hashizume, H.; Pruksalcorn, P.; Ishida, S.; Matsumoto, M.; Jacobs, W.; Kobayashi, M. Halicyclamine A, a marine spongean alkaloid as a lead for anti-tuberculosis agent, *Biorg Med Chem*, **2008**, *16*, 6732-6736
19. Liang, Z.; Sulzmaier, F.; Yoshida, W.; Kelly, M.; Ramos, J.; Williams, P. Neopetrocyclamines A and B, polycyclic Diamine Alkaloids from the sponge *Neopetrosia cf exigua*, *J Nat Prod*, **2015**, *78*, 543-547
20. Chill, L.; Yosief, T.; Kashman, Y. Halichondriamine, a new tetracyclic bipiperidine alkaloid from the marine sponge *Halichondria* sp, *J Nat Prod*, **2002**, *65*, 1738-1741
21. Charan, R.; Garson, M.; Brereton, I.; Willis, A.; Hooper, J. Haliclonyclamines A and B, cytotoxic alkaloids from the tropical marine sponge *Haliclona* sp, *Tetrahedron*, **1996**, *52*(27), 9111-9120
22. Aneiros, A.; Garateix, A. Bioactive peptides from marine sources: pharmacological properties and isolation procedures. *J Chrom B*, **2004**, *803*(1) 41-53
23. Sera, Y.; Adachi, K.; Fujii, K.; Shizuri, Y. Isolation of Haliclonyamides: new peptides as antifouling substances from a marine sponge species, *Haliclona*, *Mar Biotechnol*, **2002**, *3*, 441-446
24. D. Williams.; A. Steino.; N. Voogd.; G. Mauk.; R. Andersen. Halicloic acid A and B isolated from the marine sponge *Haliclona* sp collected in the Philippines inhibit indoleamine 2,3-Dioxygenase, *J Nat Prod*, **2012**, *75*, 1451-1458
25. Trianto, A.; Hermanwan, I.; Voogd, N.; Tanaka, J. Halioxepine, a new meroditerpene from an Indonesian sponge *Haliclona* sp, *Chem Pharm Bull*, **2011**, *59*(10), 1311-1313F
26. Shin, J.; Seo, Y.; Cho, K.; Rho, J. Osirisyne A-F oxygenated polyaceylenes from de sponge *Haliclona osiris*, *Tetrahedron*, **1998**, *54*, 8711-8720
27. Civjan, N. *Natural products in chemical biology*, first edition; Wiley: Canada, **2012**, 39-42
28. Swami, U.; Shah, U.; Goel, S. Eribulin in cancer treatment, *Mar Drugs*, **2015**, *13*, 5016-5058
29. Huang, R.M.; Yin-Ning, C.; Cheng-Hai, G. Marine Nucleosides: structure, bioactivity, synthesis and Biosynthesis. *Mar Drugs*, **2014**, *12*, 5817-5838
30. Wang, B.; Dong, J.; Zhou, X.F.; Lee, K.J.; Huang, R.M. Nucleosides from the marine sponge *Haliclona* sp. *Z. Naturforsch C*, **2009**, *64*, 143–148.
31. Mikhailopulo, I.; Miroshnikov, A. New Trends in Nucleoside Biotechnology. *Acta Naturae*. **2010**, *2*(2) ,36-56
32. Habsan, M.; Wan, N.; Fandah, A.; Khamsah, S.; Abd, M. Chemical Compound from a marine sponge: *Xestospongia* sp and its Biological Activities. *Open Conf Proc J*, **2013**, *4*, 201

33. Li, Y.; Dong, G.; Hu, J.; Liu, Y. Studies on the chemical constituents of marine sponge *Lotrochota* sp. *Chong Yao Cai*, **2010**, 33(4), 545-546
34. Pankratyev, E.; Tulyabaev, A.; Khalilov, L. How Reliable are GIAO calculations of <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR Chemical Shifts? A Statistical Analysis and Empirical corrections at DFT (PBE/3z) level. *J. Comp. Chem.* **2011**, 32 (9), 1993- 1997
35. Jameson, C. Parameters, calculation of nuclear magnetic resonance, *EAC*, **2013**, online, 1-33
36. Facelli, J. Chemical shift tensors: Theory and application to molecular structural problems. *Nucl Magn Reson Spectrosc*, **2011**, 58, 176-201
37. Eriksen, J.; Olsen, J.; Aidas, K.; Agren, H.; Mikkelsen, K.; Kongsted, J. Computational protocols for prediction of solute NMR relative chemical shifts. A case study of L-Tryptophan in Aqueous Solution. *J. Comp Chem*, **2011**, 32, 2853-2864
38. Breton, R.C.; Reynolds, W.F. *Nat. Prod. Rep.*, **2013**, 30, 501
39. Kwan, E.; Liu, R. Enhancing NMR prediction for organic compounds using molecular dynamics, *J Chem Theory Comput*, **2015**, 11, 5083-5089
40. Bühl, M.; Kaupp, M.; Malkina, O.; Malkin, V. The DFT route to NMR Chemical Shifts. *J Comp Chem*, **1999**, 20, 91-105
41. De Dios, A. Ab initio calculations of the NMR chemical shift. *Nucl Magn Reson Spectrosc*, **1996**, 29, 229-278
42. H. Eschrig. The Fundamentals of Density Functional Theory. University of Technology Dresden; Germany: **2003**, 10-14
43. Chai, J.; Head-Gordon, M. Long-range corrected hybrid density functionals with damped atom-atom dispersion corrections. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2008**, 10, 6615–6620
44. Chai, J.; Head-Gordon, M. Long-range corrected double-hybrid density functionals. *J. Chem. Phys.* **2009**, 131, 174 105
45. Chai, J.; Head-Gordon, M. Optimal operators for Hartree-Fock exchange from long-range corrected hybrid density functionals. *Chemical Physics Letters*, **2008**, 467 176–178
46. Lodewyk, M.; Siebert, M.; Tantillo, D. Computational prediction of <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C Chemical Shifts: A useful tool for natural products, mechanistic, and synthetic organic chemistry, *Chem Rev*, **2012**, 112, 1839-1862
47. Pulay, P.; Hinton, J. Shielding theory: GIAO method. *Ency of Mag Res*, **2007**, 1-2
48. Stewart, B.; Hylton, D.; Ravi, N. A systematic approach for understanding Slater-Gaussian functions in computational chemistry. *Chemical Physics Letters*, **2008**, 467, 176–178
49. Hehre, W.; Ohlinger, S. Spartan'16: Tutorial and user's guide. Wavefunction, Inc. Japan, 2017. Appendix A
50. Facelli, J. *J Phys Chem*, **1993**, 102, 2111
51. Saielli, G.; Nocolaou, K.; Ortiz, A.; Bagno, A. *J. Am Chem Soc.* **2011**, 133, 6072.
52. Evidente, A.; Abou-Donia, A.; Darwish, F.; Amer, M.; Kassem, F.; Hammouda, H.; Motta, A. *Phytochemistry*, **1999**, 51, 1151–1155.

53. Lodewyk, M.; Tantillo, D. Prediction of the Structure of Nobilisin A Using Computed NMR Chemical Shifts. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 1339.
54. Schwartz, B.; White, L.; Banwell, M.; Willis, A. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 8560.
55. Pearson, J.; Lee, H.; Sanders, L.; Godbout, N. *J Am Chem Soc*, **1997**, *119*, 11941
56. Pierens, G.; Venkatachalam, T.; Reutens, D. NMR and DFT investigations of structure of colchicine in various solvents including density functional theory calculations. *Nature*, **2017**, *7*, 5605, 1-9
57. Duque, C.; Martínez, A.; Peñuela, G.; *Rev. Col. Quim.* **1983**, *12(1)* 51 (1983)
58. Gaussian 09, Revisión A.1; D.J. Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009
59. Kanazawa, A. Sterols in marine invertebrates. *Fisheries Science*, **2001**, *67*, 997-1007
60. Santalova, E.; Makarieva, T.; Gorshkova, I.; Dmitrenok, A.; Krasokhin, V.; Stonik, V. Sterols from six marine sponges. *Biochem System Ecol*, **2004**, *32*, 153-167
61. Ilyin, S.; Reshetnyak, M.; Schedrin, A.; Makarieva, T.; Shubina, L.; Stonik, V.; Elyakov, G. X-Ray analysis of two steroids from sponges of family Halichondriidae: Sokotrasterol and 24,24,26,26-tetramethylcholesta-5,22E,25(27)-trien-3 $\beta$ -ol-acetate, *J Nat Prod*, **1992**, *55(2)*, 232-236
62. Hong, L.; Matsunaga, S.; Fusetani, N. Simple antifungal metabolites from a marine sponge *Halichondria* sp. *Comp. Biochem. Physiol.* **1994**, *107B*, 261-264
63. Kijjoa, A.; Wattanadilok, R.; Campos, N.; Sao José Nascimento, M.; Pinto, M.; Herz, W. Anticancer activity evaluation of kuanoniamines A y C isolated from the marine sponge *Oceanapia sagittaria*, collected from the Gulf of Thailand. *Mar. Drugs*. **2007**, *5*, 6-22
64. Gerwick, W.; Sitachitta N. *The alkaloids: Chemistry and Biology; Chapter 4-Nitrogen containing metabolites from marine bacteria.* **1999**, *53*, 239-285
65. Saito, N.; Tanaka, C.; Satomi, T.; Oyama, C. Kubo, A. Chemistry of Renieramycins. Part 4 Synthesis of a Simple Natural Marine Product, 6-Hydroxy-7-methoxyisoquinolinemethanol. *Chem Pharm. Bull*, **2004**, *52(2)*, 282-286
66. Mehbub, M.; Lei, J.; Franco, C.; Zhang, W. Marine sponge derived natural products between 2001-2010: Trends and opportunities for discovery of bioactives. *Mar Drugs*, **2014**, *12* 4539-4577
67. Malve, H. Exploring the ocean for new drug developments: Marine pharmacology. *J. Pharm Bioallied Sci.* **2016**, *8(2)*, 83-91
68. Mohamad, H.; Jamil, W.; Ariad, F.; Mohamad, K.; Ali, A. Chemical compounds from a marine sponge: *Xestospongia* sp. and its biological activities. *Open Conf Procs J*, **2013**, *4*, 201
69. Hurd, R.E.; Reid, B.R. NMR spectroscopy of the ring nitrogen protons of uracil and substituted uracils; relevance to A $\Psi$  base pairing in the solution structure of transfer RNA
70. Anjum, K.; Abbas, S.; Shah, S.; Akhter, N.; Batool, S.; Hassan, S. Marine Sponges as a Drug Treasure. *Biomol Ther*, **2016**, *24(4)*, 347-362

71. Katritzky, A. *Advances in heterocyclic Chemistry, Volume 100*. 1<sup>st</sup> edition, Oxford, UK. **2010**, 66-68
72. Gomes, N.; Dasari, R.; Chandra, S.; Kiss, R.; Kornienko, A. Marine Invertebrate Metabolites with Anticancer Activities: Solutions to the "Supply Problem". *Mar. Drugs*, **2016**, 14(5), 98



