



UNIVERSIDADE DA CORUÑA
FACULTAD DE CIENCIAS

Grado en Química

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

*Aislamiento e identificación de productos naturales
bioactivos*

*Illamento e identificación de produtos naturais
bioactivos*

Isolation and identification of bioactive natural products

Director(es): Jaime Rodríguez González
Carlos Jiménez González

María Alejandra Pérez Quintiana

Curso: 2014/2015 – Convocatoria: Junio

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

B₀	Campo magnético externo
δ	Desplazamiento químico (RMN)
B3LYP	DFT de tres parámetros estilo Becke, usando el funcional de correlación de Lee, Yang, Parr
γ	Constante giromagnética
CESGA	Centro de Supercomputación de Galicia
cm	Centímetro
μ	Momento magnético
col.	Colaboradores
ν₀	Frecuencia de un fotón
COSY	Correlation spectroscopy
θ	Ángulo diedro
DFT	Teoría de los funcionales de densidad
Exp.	Valores experimentales para las constantes de acoplamiento
ω₀	Frecuencia de Larmor
FID	Función matemática que representa la variación de la magnetización en el dominio del tiempo
FT	Transformada de Fourier
g	Gramo
GB	Giga bites
h	Constante de Planck
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation
HPLC	High performance liquid chromatography
(-)-HRESIMS	Espectrometría de masas de ionización química por Electrospray de alta resolución modo ion negativo
HSQC	Heteronuclear single quantum correlation
Hz	Hercio
I	Espín total
IR	Infrarrojo
J	Constante de acoplamiento

m	Número cuántico magnético
M	Magnetización
MPW91PW1	DFT de Perdew-Wang, modificado por Adamo y Barone
Mz	Magnetización sobre el eje z
m/z	Relación masa carga
nm	nanómetro
NOE	Efecto nuclear Overhauser
P	Momento angular de spin
ppm	Partes por millón
QC	Química computacional
RAM	Random Access Memory
rf	Radiofrecuencia
RMN	Resonancia magnética nuclear
TD	Total absolute deviation
TMS	Trimetil silano
UV	Ultravioleta
WW	Fracción acuosa

Agradecimientos:

En primer lugar, a los profesores Jaime Rodríguez González y Carlos Jiménez González por permitirme participar en su grupo de investigación, sin cuya ayuda no sería posible este Trabajo de Fin de Grado. Por todos los conocimientos que me han transmitido y disponibilidad a la hora de resolver todas las dudas que fueran surgiendo durante el desarrollo de este proyecto.

A Rosa y a los doctorando Diana, María, Katherine y Juan Carlos, por estar conmigo cada día haciendo que el trabajo fuera más ameno y por enseñarme a manejarme en el laboratorio.

A mis compañeros de Grado, por todos los buenos momentos que hemos compartido a lo largo de estos cuatro años y por hacerme más llevadero el día a día.

A María Teresa Rodríguez Blas por su orientación desde el primer día, apoyo y disponibilidad en todo momento. También, a todos los profesores que hemos tenido a lo largo de la carrera por transmitirnos sus conocimientos y procurar que nos convirtamos en unos buenos profesionales.

A mis amigos Lucía, Juan y Iago por estar siempre ahí.

A mi padre y a mi madre por confiar en mí y apoyarme siempre.

A todos vosotros, muchas gracias.

A Daniel

A mi madre y a mi padre

A la memoria de mis abuelos

ÍNDICE

Resumen.....	1
Resumo.....	2
Abstract.....	3
1. INTRODUCCIÓN.....	4
1.1 Química de los productos naturales marinos.....	5
1.1.1 Química de las esponjas marinas.....	5
1.1.1.1 Esponja Ircina strobilina.....	6
1.1.1.2 Esponja de la familia Haplosclerida.....	7
1.2 RMN: herramienta para la determinación estructural.....	8
1.2.1 Historia de la resonancia magnética nuclear.....	8
1.2.2 Antecedentes en el descubrimiento de la técnica.....	8
1.2.3 Aplicaciones de la técnica de RMN.....	9
1.2.4 Fundamentos Básicos del RMN.....	9
1.2.5 El desplazamiento químico.....	14
1.2.5.1 Apantallamiento nuclear.....	14
1.2.5.2 Compuestos de referencia.....	15
1.3 Análisis configuracional.....	15
1.3.1 La constante de acoplamiento.....	15
1.3.1.1 El acoplamiento vecinal homonuclear 3J (H, H).....	17
1.3.1.2 El acoplamiento vecinal heteronuclear 3J (C, H).....	18
1.3.1.3 El acoplamiento geminal heteronuclear 2J (C, H).....	18

1.3.2 RMN bidimensional.....	18
1.3.3 Uso de las constantes de acoplamiento en el análisis configuracional.....	20
1.3.3.1 Métodos computacionales.....	20
1.3.3.2 Método de Murata. Análisis configuracional basado en constantes de acoplamiento.....	22
1.3.3.3 El Método Murata Extendido.....	25
2. OBJETIVOS.....	26
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	28
3.1 Utilización de un método de aislamiento mediante fraccionamiento con disolventes, separación cromatografía de exclusión y purificación por HPLC. Estudio de la fracción acuosa del extracto orgánico de la esponja Ircina strobilina.....	29
3.1.1 Colección de muestras y preparación del extracto metanólico.....	29
3.1.2 Extracción y fraccionamiento.....	30
3.1.3 Estudio cromatográfico.....	30
3.1.3.1 Columna de exclusión molecular Sephadex LH- 20.....	30
3.1.3.2 Cromatografía de HPLC de las fracciones.....	31
3.2 Utilización de las técnicas bidimensionales de RMN para confirmar la estructura de un compuesto desconocido: el macrólido 120021.....	33
3.3 Utilización de herramientas de computación en el análisis estructural: cálculo de constantes de acoplamiento de RMN homo y heteronucleares de compuestos 1,2	

dimetánicos quirales con átomos de nitrógeno con un funcional de densidad DFT. Cálculo teórico de las constantes de acoplamiento para el modelo Modelo N- OAc.....	34
4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	36
4.1 Utilización de un método de aislamiento mediante fraccionamiento con disolventes, separación cromatografía de exclusión y purificación por HPLC. Estudio de la fracción acuosa del extracto orgánico de la esponja Ircina strobilina	37
4.1.1 Esquema fraccionamiento por el método Kupchan.....	37
4.1.2 Cromatografía de HPLC de las fracciones.....	38
4.1.3 Metabolitos aislados.....	39
4.2 Utilización de las técnicas bidimensionales de RMN para confirmar la estructura de un compuesto desconocido: el macrólido 120021.....	41
4.3 Utilización de herramientas de computación en el análisis estructural: cálculo de constantes de acoplamiento de RMN homo y heteronucleares de compuestos 1,2 dimetánicos quirales con átomos de nitrógeno con un funcional de densidad DFT. Cálculo teórico de las constantes de acoplamiento para el modelo Modelo N-OAc	51
5. CONCLUSIONES.....	59
6. BIBLIOGRAFÍA.....	66

RESUMEN

En este trabajo de fin de grado se ha procurado adquirir los conocimientos necesarios para llevar a cabo el aislamiento, purificación y determinación estructural de compuestos naturales bioactivos. Para ello, se ha dividido en tres partes fundamentales que conlleva el trabajo de investigación en este campo de la química de productos naturales de origen marino.

Parte I. En la primera parte de la memoria se estudia una fracción de la esponja *Ircina strobilina* empleando métodos cromatográficos. Para el aislamiento de los metabolitos presentes en dicha fracción se utiliza una columna de exclusión molecular Sephadex LH-20 y la posterior purificación de las fracciones obtenidas mediante HPLC.

Parte II. En la segunda parte se realiza la caracterización completa de un macrociclo de origen marino *PM120021* empleando espectroscopia de RMN mono y bidimensional para la elucidación de su estructura plana.

Parte III. La tercera parte del trabajo se centra en el empleo de cálculos computacionales que permitieron determinar la estereoquímica relativa de dos centros quirales adyacentes los cuales poseían átomos de O y N. Este estudio se hace a partir de las constantes teóricas homo y heteronucleares realizando una comparación de las mismas con las constantes experimentales obtenidas previamente por otros miembros del grupo de investigación. Se realizan los cálculos computacionales empleando dos tipos de funcionales de densidad (DFT) lo que permite decidir cuál es más adecuado asumiendo un buen compromiso entre coste computacional y exactitud.

RESUMO

Neste traballo de fin de grao procurouse adquirir os coñecementos necesarios para levar a cabo o illamento, purificación e determinación estrutural de compostos naturais bioactivos. Para iso, dividiuse en tres partes fundamentais que supoñen o traballo de investigación neste campo da química de produtos naturais de orixe mariño.

Parte I. Na primeira parte da memoria estúdase una fracción da esponxa *Ircina strobilina* empregando métodos cromatográficos. Para o illamento dos metabolitos presentes na devandita fracción utilízase unha columna de exclusión molecular Sephadex LH-20 e a posterior purificación das fraccións obtidas mediante HPLC.

Parte II. Na segunda parte realízase a caracterización completa dun macrociclo de orixe mariño PM120021 empregando espectroscopia RMN mono e bidimensional para a elucidación da súa estrutura plana.

Parte III. A terceira parte do traballo céntrase no emprego de cálculos computacionais, que permitiron determinar a estereoquímica relativa de dous centros quirais xuntos os cales posuían átomos de O e N. Este estudio fíxose a partir das constantes teóricas homo e heteronucleares comparando as mesmas coas constantes experimentais obtidas previamente por outro membros do grupo de investigación. Realízanse os cálculos empregando dous tipos de funcionais de densidade (DFT) o que permite decidir cal é o máis axeitado para realizar os cálculos asumindo un bo compromiso entre custe computacional e exactitude.

ABSTRACT

In this work I have tried to acquire the knowledge necessary to carry out the isolation, purification and structure determination of bioactive natural compounds. In order to do develop this activity, the research work was divided in three crucial parts in this field of the chemistry of natural products from marine origin.

Part I. The first goal of this work, a polar fraction of the sponge *Ircina strobilina* was studied using chromatographic methods. For the isolation of the metabolites present in that fraction, a molecular exclusion chromatography type Sephadex LH-20, was used and the subsequent purification of the main subfractions was done by using of HPLC methods.

Part II. In the second goal was the complete planar structure characterization of a macrocycle (PM120021) from marine origin using mono and two-dimensional NMR approximations.

Part III. The third aim of this work was focussed on the use of computer calculations to determine the relative stereochemistry of two adjacent chiral centers possessing O and N atoms. This study was based on the comparison of theoretical homo and heteronuclear coupling constants and the experimental ones previously obtained by other members of the research group. The theoretical calculations were acquired by using two different density functionals (DFT) which allowed us to select the best one assuming a good compromise between computational cost and accuracy.

1. Introducción

1.1 Química de los productos naturales marinos

La incomparable biodiversidad de los océanos ofrece grandes oportunidades para el descubrimiento de nuevos productos naturales bioactivos¹. Los organismos marinos constituyen una importante fuente de dichos compuestos con características estructurales singulares y con un enorme potencial para su aplicación en la industria biomédica, agroquímica y cosmética. Este hecho es bien conocido desde la década de los 60 donde se inició la búsqueda de agentes farmacológicos de origen marino. Este novedoso proyecto² nacido en un congreso organizado en 1967 en Rhode Island, EEUU se ha convertido en una importante línea de investigación a lo largo de estos años por los numerosos compuestos aislados y caracterizados que resultaron ser biológicamente activos.

El interés³ por parte de los químicos ha sido doble: por un lado los químicos de productos naturales han visto a los organismos marinos como fuente de moléculas orgánicas nuevas e inusuales, mientras que los químicos sintéticos han empleado estas estructuras para el desarrollo de análogos y nuevas metodologías y estrategias sintéticas.

Son muchos los organismos marinos que actualmente son considerados como las fuentes más importantes de sustancias bioactivas, destacando las esponjas. Producen una gran variedad de metabolitos⁴ secundarios química y biológicamente interesantes para el desarrollo y producción de nuevos compuestos de relevante importancia.

1.1.1 Química de las esponjas marinas

Las esponjas⁵ son un componente fundamental en la estructura de los ecosistemas acuáticos, en los cuales compiten por el espacio con colonias coralinas, tunicados, briozoarios, etc. Se pueden emplear como indicadores de la contaminación ambiental y

¹Fattorusso, E.; Gerwick, W. H.; Tagliatela-Scafati, O. "Handbook of Marine Natural Products", Vol. 1, Springer, **2012**.

² Nieto Prieto, Rosa M. Nuevos compuestos de organismos marinos farmacológicamente activos. Tesis doctoral. Facultad de Química. Universidade Da Coruña. A Coruña. **2013**.

³ Fenical, W.; Jensen, P. R. "Marine microorganisms: a new biomedical resource. in Pharmaceutical and Bioactive Natural Products" Springer US, **1993**, 419-457.

⁴ León, J.; Liza, L.; Soto, I.; Torres, M.; Orosco, A. *Rev. Peru Med. Exp. Salud Pública*. **2010**, *27*, 215-221.

⁵ Amaro M. E.; Liñero-Arana I. *Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela, Univ. Oriente*. **2002**. 45-53.

además, sirven de refugio a otros organismos como crustáceos, moluscos, peces, y otros como bacterias y algas fotosintéticas, que pueden vivir en asociación con ellas. Estos organismos marinos son capaces de producir sustancias tóxicas que utilizan como medio de defensa contra sus depredadores, y se caracterizan por ser fuentes de compuestos biológicamente activos con un gran potencial para su explotación farmacológica.

1.1.1.1 Esponja *Ircina strobilina*

El género *Ircina*⁶ se caracteriza por ser una esponja amorfa, esférica y muchas veces con una concavidad en la parte superior la cual contiene agrupaciones de ósculos (orificio de salida de agua), con altura entre 2 y 20 cm y anchura de 3 a 40 cm. Su color suele ser marrón oscuro, negro grisáceo o beige con la base en tonos anaranjados oscuros. Este género incluye varias especies que son muy ricas fuentes de metabolitos secundarios con una variedad de actividades biológicas y clases estructurales.

Desde el año 1972, el género *Ircina* ha formado parte de varios estudios destacando el descubrimiento de metabolitos secundarios inhibidores del crecimiento celular del cáncer como el alcaloide ircinamina, compuestos con una fuerte actividad frente a la leucemia linfocítica P388 y a varias líneas celulares de cáncer humano, así como dos productos denominados irciniastatinas 1 y 2 a partir de *Ircina racemosa*.

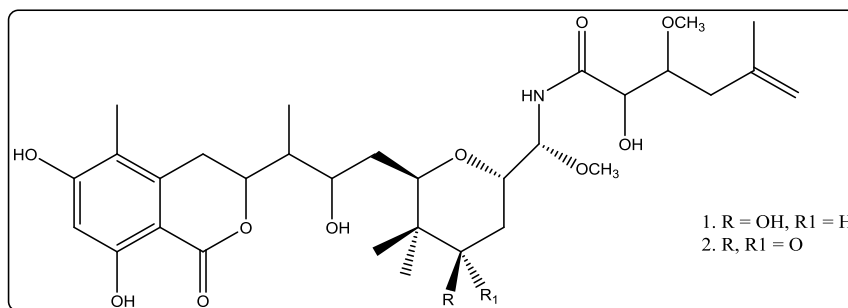


Figura 1. Metabolitos aislados de la esponja *Ircina racemosa*.

⁶ Del Valle Lanza Castillo, Vilma; Actividad biológica y metabolitos secundarios de esponjas marinas recolectadas en la bahía de Mochima, estado Sucre, Venezuela. Tesis Doctoral. Universidad de Oriente. Cumaná **2012**.

De la *Ircinia strobilina*, (orden Dictyoceratida: Familia Irciniidae) fue aislado y caracterizado Variabilin⁷, un furanosesterterpeno que posee propiedades repelentes en peces en ensayos de laboratorio.

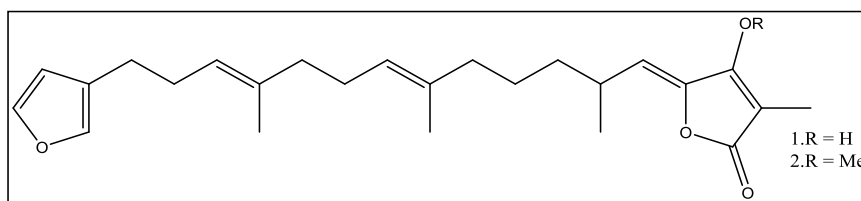


Figura 2.⁸ Metabolito aislado de la esponja *Ircinia strobilina*.

1.1.1.2 Esponja de la familia Haplosclerida

El estudio de esponjas marinas dio lugar a numerosos compuestos entre los que se destacan los macrociclos.⁹ Se definen como moléculas que contienen al menos un anillo grande compuesto por 12 o más átomos y cuyo peso molecular tiende a situarse entre 500-900 uma. Debido a sus propiedades, y gracias a los avances en bioinformática y metodología sintética producidos en la última década, los macrociclos aislados de productos naturales se han podido aplicar como agentes terapéuticos.

De la familia Haplosclerida¹⁰ fue aislado en 2003 un macrociclo denominado Viscosamina que posee una marcada actividad citotóxica.

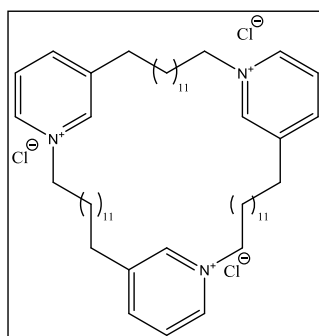


Figura 3. Metabolito aislado de la esponja de la familia Haplosclerida.

⁷ Mohamed, N. M.; Rao, V.; Hamann, M. T.; Kelly, M.; Hill, R. T. *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74*, 4133-4143.

⁸ Epifanio R.; Gabriel R.; Martins D.; Muricy G. *J. Chem. Ecol.* **1999**, *25*, 2247- 2254.

⁹ Marsault, E.; Peterson, M. L. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 1961-2004.

¹⁰ Viana, G. H., Villar, J. A. F., Alves, R. B., *SBQ* **2010**, *42*, 1.

1.2 RMN: herramienta para la determinación estructural

1.2.1 Historia de la resonancia magnética nuclear

La técnica de la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) se considera la herramienta más importante de la que dispone un químico orgánico para elucidar estructuras de compuestos en disolución. La RMN es una técnica espectroscópica basada en las propiedades magnéticas de los núcleos y desde 1943 ha estado ligada a los premios Nobel de Física, Química y Medicina: Otto Stern en 1943, Isidor I. Rabi en 1944 y Felix Bloch y Edward M. Purcell en 1952 recibieron el Premio Nobel de Física por sus trabajos en el desarrollo de RMN¹¹. Se posicionó como una de las técnicas más potentes desde el descubrimiento del desplazamiento químico y el acoplamiento escalar espín-espín y fue a partir de entonces, que se convirtió en herramienta fundamental en la determinación estructural en el campo de los productos naturales.

1.2.2 Antecedentes en el descubrimiento de la técnica

Los primeros equipos de RMN eran de onda continua y fueron comercializados para el estudio del protón a comienzos de la década de los 90. Pero fue el desarrollo de la transformada de Fourier, herramienta matemática que permite el paso de una onda dependiente del tiempo a un espectro de señales en función de su frecuencia, lo que incrementó la sensibilidad de la técnica a finales de la década de los 60, posibilitando su utilización con otros núcleos como el isótopo de ¹³C.

A lo largo de los años 70 y 80 se comenzó con el estudio de técnicas multipulsos que dio lugar a la RMN bidimensional. Estos avances¹² en la técnica tuvieron lugar gracias a los estudios de Richard R. Ernst, premio Nobel de Química en 1991. Más recientemente, la contribución de Kurt Wüthrich al estudio de la estructura tridimensional de biomoléculas mediante RMN también fue premiada con el Nobel de Química en el año 2002. Paul C. Lauterbur y Peter Mansfield en 2003 recibieron el Premio Nobel en Medicina, por sus contribuciones al desarrollo de la RMN de imágenes.

¹¹ López Rituerto, Eva. La resonancia magnética nuclear como herramienta en el estudio y control del proceso de vinificación. Tesis Doctoral. Universidad de La Rioja. La Rioja. **2012**.

¹² Blümich, B. "Essential NMR for Scientists and Engineers", Springer, **2005**.

1.2.3 Aplicaciones de la técnica de RMN

Desde su descubrimiento, la RMN siempre se ha empleado para la elucidación de estructuras, fundamentalmente de naturaleza orgánica ya que en principio se centró en el estudio de la RMN de protón ampliándose posteriormente a otros núcleos magnéticamente activos. Por tanto, esta técnica era casi exclusivamente herramienta de los químicos orgánicos, sin embargo, con el desarrollo de imanes y materiales superconductores se consiguió ampliar su campo de aplicación.

Actualmente los campos de aplicación son la bioquímica y biología, farmacología y toxicología, medicina, medio ambiente y alimentación. Es de destacar el gran auge que ha experimentado en los últimos años la RMN en el campo de la cuantificación analítica con el desarrollo de la RMN cuantitativa¹³.

1.2.4 Fundamentos¹⁴ Básicos del RMN

La resonancia magnética nuclear es un método espectroscópico de análisis no destructivo, que se basa en la absorción de energía de radiación electromagnética por parte de núcleos atómicos que tienen un momento magnético.

El espín nuclear

Electrones, neutrones y protones, constituyentes del núcleo de un átomo poseen una propiedad intrínseca que viene dada por el denominado término de espín. El espín es el cuarto número cuántico que tiene lugar al resolver de manera aproximada la ecuación de onda.

El espín representa una propiedad general de las partículas que se puede explicar fácilmente por similitud a las propiedades de los electrones. Los electrones del átomo que circulan alrededor de su núcleo generan un campo magnético que lleva asociado un momento angular descrito con el número cuántico de espín $+1/2$ y $-1/2$.

Para el RMN el espín de protones y neutrones del núcleo es muy interesante. En el núcleo los protones y neutrones se aparean combinando los espines $+1/2$ y $-1/2$. Los

¹³Holzgrabe, U.; Deubner, R.; Schollmayer, C.; Waibel B., *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, *38*, 806-812. DOI: 10.1016/j.jpba.2005.01.050

¹⁴Hesse M.; Meier H.; Zeeh B. "Métodos espectroscópicos en Química Orgánica", 2ª Ed, Editorial Síntesis, **2005**.

núcleos con número de protones y neutrones impar dan lugar a un espín neto, donde el número de desapareamientos contribuye con 1/2 al espín total denominado I. Los isótopos de los átomos con I=0 son inactivos en RMN, con I=1/2 tienen una distribución esférica de carga en el núcleo, mientras que los que poseen I>1 o igual no tienen dicha distribución esférica.

Tabla 1. Dependencia¹⁵ de la señal de RMN con los números másico y atómico.

Número Másico	Número atómico	Señal RMN	Ejemplos
Impar	Impar	Sí	¹ H(1/2), ¹⁵ N ₇ (1/2)
Impar	Par	Sí	¹³ C ₆ (1/2)
Par	Par	No	¹² C ₆ (0), ¹⁶ O ₈ (0)
Par	Impar	Sí	² H ₁ (1)

Cuando I no es nulo, el núcleo presenta momento angular de espín P y un momento magnético μ asociado que depende de la dirección del espín.

$$\mu = \gamma P \text{ (ec.1)}$$

El momento de espín angular que un núcleo puede tomar va desde +I a -I y estos valores se definen como el número cuántico magnético m. El momento angular de espín es una magnitud vectorial.

Comportamiento de los espines en un campo magnético estático

a) situación de equilibrio

Si se introduce una muestra con isótopos que tienen I=1/2 como son el ¹H y ¹³C, dentro de un campo magnético, dichos núcleos tienen 2 posibilidades de estados de momento magnético: +1/2 (o α) y -1/2 (o β). Las energías de α y β se encuentran degeneradas en ausencia de campo magnético externo, y como consecuencia las poblaciones de ambos estados es la misma.

¹⁵ Giménez Martínez, J.J.; Expósito López, J.M. “RMN para químicos orgánicos”. Universidad de Almería, Servicio de publicaciones e Instituto de Estudios Almerienses. Almería **1998**.

Cuando un núcleo con espín no nulo es sometido a un campo magnético externo, B_0 , el eje del momento angular coincide con la dirección del campo aplicado resultando un momento magnético m , que deja de ser nulo y se desdobra en dos estados. Uno de ellos alineado con el campo magnético externo aplicado en la dirección del eje z positivo que será el de menor energía, mientras que el otro estará orientado en la dirección del eje z negativo y tendrá mayor.

La diferencia de energía entre ambos estados del espín $I=1/2$ es proporcional a la fortaleza del campo magnético externo (efecto Zeeman).

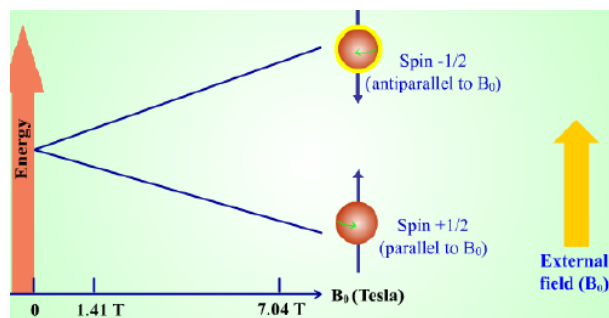


Figura 4. Diagrama en el que se aprecia que los dos estados de espín tienen la misma energía cuando el campo magnético es cero y que esta diverge cuando el campo aumenta.

Por lo tanto, cuanto mayor sea B_0 y mayor sea el valor de γ , tanto mayor será la separación de los dos niveles, y así mayor será la energía necesaria para pasar de un estado a otro. Como consecuencia, la sensibilidad de la técnica de RMN va a depender de:

- El valor de B_0 (a mayor intensidad, mayor sensibilidad)
- El valor de γ (los núcleos como ^1H dan señales más intensas que ^{13}C)
- El número de núcleos presentes (concentración)

Para un campo magnético dado en el que hay una determinada diferencia de E entre estados, hay una diferencia de población entre ellos. Se prefiere el estado de menor energía. La ecuación de Boltzmann que es función de la diferencia de energía y de la temperatura permite calcular cual es esa diferencia de población entre los estados de espín.

$$\frac{N_\beta}{N_\alpha} = e^{\frac{-\Delta E}{k_b T}} \text{ (ec. 2)}$$

En un campo magnético el vector del espín precesiona entorno al campo magnético en la dirección del eje z.

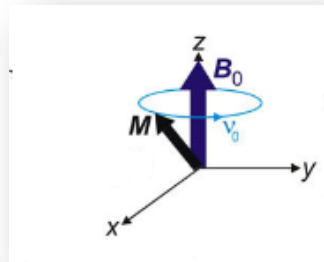


Figura 5. Las componentes en el plano x - y varían con el tiempo a la frecuencia B_0 denominada frecuencia de resonancia de Larmor (ω_0).

El hecho de que exista un pequeño exceso de espines en el nivel de menor E da lugar a un vector de magnetización macroscópica neta M . La suma neta de las componentes distribuidas al azar en el plano x - y es cero y en el equilibrio existe una componente de magnetización neta que apunta en la dirección del campo B_0 en el eje $+z$.

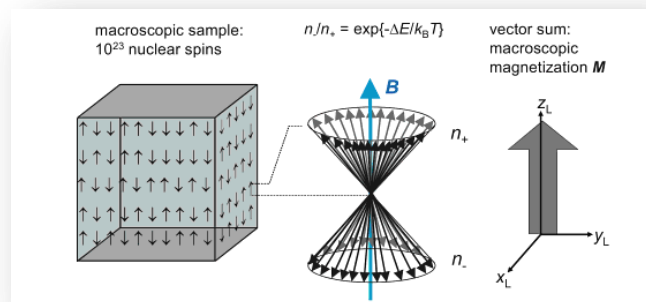


Figura 6. Precesión¹⁶ de los dipolos nucleares con espín $I=1/2$ alrededor del doble cono.

La magnitud del vector magnetización neta M_z es proporcional a la diferencia de poblaciones en el estado $+1/2$ y $-1/2$.

Magnetización macroscópica

A nivel macroscópico los núcleos con espines $I=1/2$ pueden ser considerados como pequeños imanes. En ausencia de campo los espines se encuentran al azar

¹⁶ Blumich, B.; Casanova, F.; Appelt, S. *Chem. Phys. Lett.* **2009**, 477, 231-240.

distribuidos y sufren una orientación al aplicarles un campo magnético externo preferentemente hacia la dirección del campo sobre el eje +z generándose un exceso de población en ese nivel.

$$\Delta E = \frac{\gamma h}{2\pi} B_0 \text{ (ec. 3)}$$

Dependencia de ΔE con la intensidad del campo magnético donde se sitúan los núcleos.

La situación de resonancia entre los dos estados se consigue aplicando una radiación electromagnética en la región de las radiofrecuencias que tenga el mismo valor de ΔE . La energía de un fotón es $E=h\nu_0$ donde ν_0 es su frecuencia. Por tanto, la frecuencia de la radiación electromagnética necesaria para producir resonancia en un campo B_0 es:

$$\omega_0 = \frac{\gamma B_0}{2\pi} \text{ (ec. 4)}$$

Esta frecuencia de resonancia ω_0 es la que da lugar al espectro de RMN denominada frecuencia de Larmor.

b) Situación de no equilibrio

Un pulso de radiofrecuencias aplicado en el plano perpendicular a la dirección del campo externo da lugar a un segundo campo magnético B_1 que genera transiciones entre los dos estados de espín. El pulso tiene que tener la misma energía que ΔE , o sea, su frecuencia tiene que coincidir con la frecuencia de Larmor.

Un pulso de radiofrecuencia es un campo magnético adicional aplicado a lo largo de un eje en el plano x-y durante un período de tiempo corto. El sistema de espines absorbe la energía y la magnetización neta M rota un determinado ángulo hacia el plano x-y mientras dura el pulso.

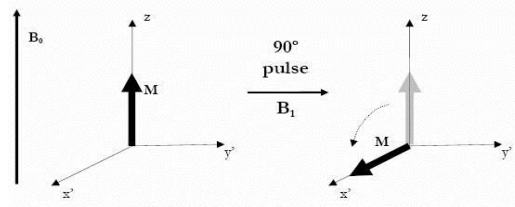


Figura 7. El pulso se aplica un tiempo hasta conseguir girar la magnetización 90° en torno al eje y hasta llevarla sobre el eje x.

Cuando cesa el pulso, los espines nucleares que se encuentran en situación de no equilibrio, tienden a recuperar de forma espontánea su estado inicial. Se consigue emitiendo el exceso de energía en forma de una onda de radiofrecuencias de Larmor.

Esta señal (FID) que es una función matemática que representa la variación de la magnetización (o corriente inducida en la bobina) en el dominio del tiempo, es amplificada y digitalizada y se conoce como un espectro de RMN.

Matemáticamente no existe una ecuación generalizada para describir la FID, puesto que ésta depende del sistema de espín que se estudia. Sin embargo, se puede considerar que esa ecuación deriva del producto de dos funciones:

$$M_y = \cos \omega_s t x \exp\left(-\frac{t}{T_2}\right) \text{ (ec. 5)}$$

Donde ω_s representa todas las frecuencias de Larmor del sistema de espín. El término $\cos \omega_s t$ describe la frecuencia de resonancia de la señal inducida en la bobina receptora, y el término $x \exp\left(-\frac{t}{T_2}\right)$ describe la caída de la onda.

1.2.5 El desplazamiento químico

1.2.5.1 Apantallamiento nuclear

El campo magnético que se siente en las proximidades del núcleo no es el mismo para todos los núcleos del mismo isótopo de la muestra cómo se podría pensar. Existen interacciones de los demás núcleos vecinos especialmente de aquellos con espines

activos en RMN, así como un efecto de apantallamiento de campo debido a la nube electrónica de los átomos vecinos, que ocasionan que el campo que siente cada núcleo sea diferente según su entorno químico y menor al del propio campo B_0 .

Debido a que el campo magnético efectivo va a ser diferente para cada tipo de núcleo no equivalente, es decir, con entorno químico diferente, también lo será la ΔE entre los estados de espín, y por tanto, su frecuencia de resonancia característica. Las diferencias de apantallamiento en las proximidades de cada núcleo van a dar lugar a diferentes picos en el espectro de RMN.

1.2.5.2 Compuestos de referencia

En espectroscopia de RMN no existe una escala espectral absoluta, ya que la frecuencia de resonancia y la densidad de flujo magnético son variables e interdependientes, por lo que se emplea una escala relativa donde se miden las diferencias de frecuencia entre las señales de resonancia de la muestra y las de un compuesto que se toma como referencia. Generalmente se utiliza el TMS. Los pulsos de todas las posiciones de los picos se calculan mediante la FT y se imprimen en el espectro como diferencias de frecuencia, pero como el valor de $\Delta\nu$ depende de B_0 es necesario definir una magnitud adimensional denominada δ que se denomina desplazamiento químico y su valor hace que independientemente del aparato de RMN utilizado sus valores para cada núcleo sean los mismos.

1.3 Análisis configuracional

1.3.1 La constante de acoplamiento

Las señales de RMN no son simples líneas espectrales. Suelen estar divididas en varias líneas debido a lo que se denomina constantes de acoplamiento. El valor de la constante de acoplamiento (J) se expresa en (Hz) y es junto con el desplazamiento químico, un parámetro que se mide experimentalmente en los espectros. Se obtiene restando los valores de la frecuencia de los picos. Este valor a diferencia del desplazamiento químico, no depende de la intensidad del campo externo aplicado, pero aparecen más simples cuando los espectros se realizan con intensidades de campo mayores.

Existen dos tipos de acoplamientos, los que tienen lugar a través del enlace químico conocidos como acoplamientos indirectos espín-espín o escalar y los directos que se producen a través del espacio debido a la interacción de los dipolos nucleares y es responsable de la correlación Nuclear Overhauser (NOE).

El acoplamiento indirecto espín-espín o escalar

La causa de que en un espectro aparezcan señales de singulete, doblete, triplete, etc. es debida a la interacción con los núcleos vecinos que posean momento magnético. Este tipo de acoplamiento es el llamado espín-espín que aparece entre núcleos homonucleares, es decir del mismo tipo y entre heteronucleares y viene a decir que la orientación del espín de un núcleo X influye en el campo magnético local que actúa sobre el núcleo acoplado Y y viceversa.

Estas constantes son junto con los desplazamientos químicos, los parámetros experimentales que se obtienen a partir de un espectro de RMN y que se aplican directamente en la elucidación estructural. Como son independientes de la magnitud del campo, una forma para diferenciar si dos señales se corresponden a dos singuletes o un doblete es, registrando el espectro a diferentes frecuencias de medida, ya que si la separación permanece constante, indicaría claramente que se trata de un fenómeno de acoplamiento.

En disolución, que es como se realizan la mayoría de experimentos de RMN, las orientaciones de los espines no están definidas, por lo que el acoplamiento entre los núcleos X e Y tiene lugar a través de los enlaces de la molécula, es decir un acoplamiento escalar.

Los factores que afectan a las constantes de acoplamiento depende de:

- La hibridación de los átomos implicados.
- Ángulos de enlace y ángulos torsionales.
- Longitud de enlace.
- Presencia de enlaces π próximos.
- Efecto de los pares de electrones no compartidos vecinos.

- Efecto de los sustituyentes.

1.3.1.1 El acoplamiento vecinal homonuclear ${}^3J(\text{H}, \text{H})$

El acoplamiento a tres enlaces entre protones en un sistema saturado, ${}^3J(\text{H}, \text{H})$, se denomina vecinal y está regido por la denominada curva de Karplus¹⁷. Se ha establecido una dependencia de la constante de acoplamiento vecinal con el ángulo diedro. Esta dependencia del valor de 3J con el ángulo diedro formado por los hidrógenos es una de las relaciones más importantes en el análisis conformacional.

Sigue la siguiente expresión:

$${}^3J(\text{H}, \text{H}) = \begin{cases} 8.5 \cos^2 \varphi - 0.28 \text{ Hz} & \text{para } 0^\circ < \varphi < 90^\circ \\ 9.5 \cos^2 \varphi - 0.28 \text{ Hz} & \text{para } 90^\circ < \varphi < 180^\circ \end{cases}$$

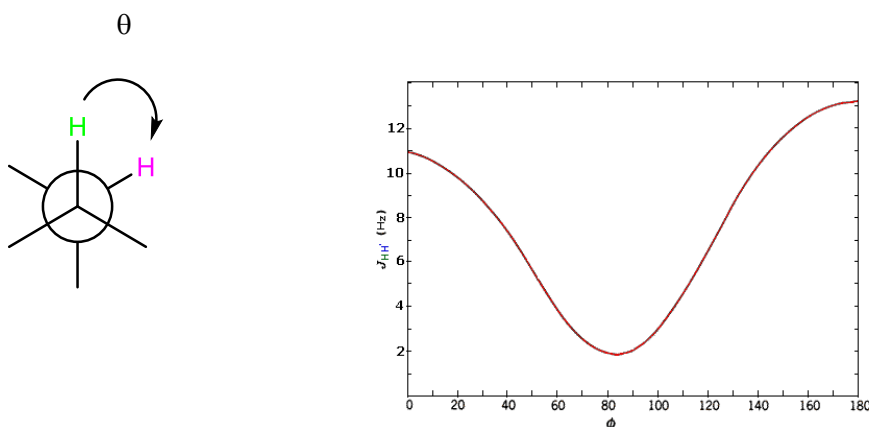


Figura 8. Curva definida por la ecuación de Karplus que relaciona ${}^3J(\text{H}, \text{H})$ (Hz) con el ángulo diedro θ .

Como se puede ver, las constantes vecinales mayores se obtienen cuando θ vale 0° o 180° , y las menores para un valor de θ de 90° , siendo θ el ángulo diedro formado por los planos que contienen a los dos átomos de hidrógeno vecinales.

Dicha curva de Karplus se ha aplicado en la determinación de las configuraciones de los derivados de etano y anillos de seis miembros. Además también se ha estudiado

¹⁷ Karplus, M. J. Am. Chem. Soc. **1963**, 85, 2870.

para el caso de acoplamiento producido a través de los átomos de oxígeno, nitrógeno o azufre.

Hay cuatro efectos que afectan a esta constante de acoplamiento y son los siguientes:

- El ángulo diedro
- Los sustituyentes. Los sustituyentes electronegativos disminuyen la constante de acoplamiento, pero el efecto no es muy acusado
- La distancia entre los dos átomos, la constante disminuye al aumentar la distancia de enlace C-C
- El ángulo H-C-C

1.3.1.2 El acoplamiento vecinal heteronuclear $^3J(\text{C}, \text{H})$

Los acoplamientos vecinales heteronucleares en compuestos alifáticos dependen, al igual que $^3J(\text{H}, \text{H})$, del ángulo diedro.

1.3.1.3 El acoplamiento geminal heteronuclear $^2J(\text{C}, \text{H})$

Estas constantes de acoplamiento a dos enlaces de distancia no mantienen una relación directa con cada parámetro molecular, sino que intervienen un cúmulo de factores que las hace ser más imprecisas a cambios estructurales.

1.3.2 RMN bidimensional¹⁸

En los espectros monodimensionales de RMN de macromoléculas existe generalmente un alto grado de solapamiento entre las distintas señales debido al gran número de protones presentes en la muestra. El análisis de los espectros resulta complicado y, para poder asignar por completo todas las señales es necesario recurrir al RMN bidimensional.

¹⁸Matín-Pintado Zugasti, Nerea, Estudio mediante RMN de la estructura y estabilidad de ácidos nucleicos con furanosas modificadas. Tesis Doctoral. Facultad de Química de la Universidad Europea de Madrid. Madrid. **2013**.

- **COSY** (Correlation spectroscopy). Es un experimento de correlación 2D homonuclear. Las señales de correlación observadas en el espectro conectan protones que se encuentran acoplados escalarmente a dos y tres enlaces. Los picos de cruce que representan la conectividad $1H/1H$ se disponen a ambos lados de la diagonal de forma simétrica.
- **HSQC** (Heteronuclear single quantum correlation). Es un experimento de correlación 2D heteronuclear. Permite establecer el acoplamiento directo C-H que se extrae directamente de los picos de cruce del espectro.
- **HMBC** (Heteronuclear multiple bond correlation). Es un experimento de correlación 2D heteronuclear. Permite establecer las conectividades C-H al igual que el HSQC, pero a dos y tres enlaces de distancia. Gracias a esto es posible establecer conexiones entre carbonos cuaternarios que no aparecían en el espectro HSQC y así poder construir fragmentos de la molécula de la que se quiere elucidar su estructura.

Acoplamiento directo: El efecto nuclear Overhauser

Hasta ahora solo se han considerado los sistemas de espín acoplados mediante un acoplamiento escalar, es decir, a través de los electrones del enlace. Una forma diferente de interacción directa es la que ocurre a través del espacio, en cuyo caso se habla de acoplamiento dipolar entre núcleos. Esta información, que es muy valiosa se obtiene por medida de la correlación NOE, o efecto nuclear Overhauser. La aplicación inmediata proporciona una idea decisiva para investigar la posición de átomos en el espacio tridimensional de la molécula.

Se define correlación NOE como el cambio en la intensidad de la línea de resonancia de un núcleo cuando se perturba con una irradiación las transiciones de otro núcleo próximo en el espacio, pero no acoplado a través de una J escalar. La perturbación del núcleo se lleva a cabo mediante la saturación de una línea de resonancia, es decir, mediante una irradiación con un campo de rf B_2 tal que ν_2 es igual a la frecuencia del desplazamiento químico de un núcleo y la potencia de irradiación permite igualar los dos niveles de energía conectados por esa transición. La correlación

NOE se produce como consecuencia de la respuesta del sistema perturbado al adquirir su posición de equilibrio inicial.

1.3.3 Uso de las constantes de acoplamiento en el análisis configuracional

1.3.3.1 Métodos computacionales

En los últimos años, se ha producido un gran avance a la hora de resolver problemas químicos gracias al aumento de la capacidad computacional de los ordenadores y al desarrollo de software más manejable para el usuario.

Históricamente¹⁹, la Química computacional (QC) surge como una evolución de la Química Teórica con el propósito de investigar el comportamiento de la materia a nivel molecular mediante ordenadores. Gracias a la implementación y aplicación de las técnicas de la Química computacional se puede investigar múltiples propiedades y comportamientos moleculares.

- Distancias y ángulos de enlace, además es posible caracterizar la forma y tamaños relativos de todo tipo de moléculas y macromoléculas, haciéndolo además para conjuntos de conformeros representativos.
- La energía de todo tipo de especies químicas, incluyendo intermedios, estados de transición, estados excitados, etc.
- Propiedades espectroscópicas: predice los espectros IR, UV y RMN, siendo en muchos casos una herramienta indispensable para la correcta interpretación/asignación de los datos experimentales.

Para avanzar en el conocimiento y aplicación de la QC es conveniente partir de una primera clasificación de los métodos teóricos como la que se resume en la siguiente tabla.

¹⁹ Suárez D. Objetivos y características de la química computacional y su aplicación al estudio de los materiales de carbono. Boletín del Grupo Español del Carbón. **2012**, N° 25, 23-28.

Tabla 2. Cuadro resumen de las características de los principales métodos²⁰ teóricos de la Química computacional.

Método	Fundamento	Rango de aplicación	Ventajas	Inconvenientes	Ejemplos
Mecánica Molecular	Potenciales de interacción	1-10 ⁵ átomos	Gran rapidez. Muy eficientes en fases condensadas	Aplicabilidad delimitada por el potencial de Mecánica molecular seleccionado	AMBER, REBO, ReaxFF
Ab initio	Ec. de Schrödinger y Función de onda	1-10 ² átomos (todo tipo de propiedades)	Exactitud y precisión controlable	Lentos. Los métodos más avanzados son muy complicados de usar	HF, MP2, CCSD, CCSD(T)
Teoría del Funcional de Densidad (DFT)	Teorema de Kohn-Sham y Densidad electrónica	1-10 ³ átomos (todo tipo de propiedades)	En general, más rápidos que ab initio pero su aplicación es más limitada	Exceso de métodos DFT disponibles. No hay pautas para mejorar sistemáticamente los resultados	B3LYP, BLYP, MPW1P W91
Semi-empíricos	Ec.de Schrödinger y Func. de onda o Teorema de Kohn-Sham y Densidad electrónica	1-10 ⁴ átomos (muchas, pero no todas las propiedades moleculares)	Gran rapidez. Fáciles de usar. Bastante fiables en moléculas orgánicas	Errores no sistemáticos. Escasa fiabilidad en moléculas con metales y especies inestables	PM3, PM6, SCC-DFTB

En resumen, la Química Computacional emplea modelos teóricos para predecir la estructura y propiedades de un sistema químico. Cada modelo teórico consta de dos componentes esenciales. Uno de ellos es el método teórico que puede ser: semiempírico, DFT, ab initio y dentro de cada uno se elige el nivel teórico como MP2, MP4, B3LYP, etc. El segundo componente es el conjunto base. Dicho conjunto base es una representación matemática de los orbitales de la molécula. Cada combinación de un modelo teórico con un conjunto base representa una aproximación diferente a la ecuación de Schrödinger.

Para el cálculo de las constantes de acoplamiento espín-espín, de los métodos teóricos propuestos anteriormente se empleará la Teoría del Funcional de Densidad, que incluye funcionales. Estos dividen la energía de los electrones en diferentes

²⁰ D. Suárez Bol. Objetivos y características de la química computacional y su aplicación al estudio de los materiales de carbono. Grupo español Carbón. Departamento de Química Física y Analítica. Universidad de Oviedo nº25 Septiembre 2012.

componentes que son tratados separadamente (energía cinética, repulsión de Coulomb...). Un funcional en DFT es una función de densidad electrónica, que es a su vez una función que relaciona a los electrones en el espacio. Entre los funcionales más utilizados se encuentran B3LYP y MPW1PW91 mientras que los conjuntos base más usados son los de Gaussian de alta calidad porque implican un buen compromiso entre coste computacional y exactitud.

En este trabajo se realizarán los cálculos de las constantes de acoplamiento llevando a cabo una comparativa entre el funcional B3LYP con el conjunto base 6-31G (d,p) y el funcional MPW1PW91 con su respectivo conjunto base 6-311G (2d,p).

1.3.3.2 Método de Murata. Análisis configuracional basado en constantes de acoplamiento

En el año 1999 Murata²¹ y col. a la vista de la ausencia de métodos que permitieran el establecimiento de la estereoquímica relativa en sistemas quirales flexibles 1,2 y 1,3 disustituídos con átomos de oxígeno, decidieron crear una nueva metodología²² que más adelante tendría gran utilidad en el campo de los productos naturales. Esta metodología se basaba en el empleo de los valores experimentales de las constantes de acoplamiento homo y heteronucleares.

Dada la relación existente entre las constantes de acoplamiento homo y heteronucleares a tres enlaces, $^3J(\text{H}, \text{H})$ y $^3J(\text{C}, \text{H})$ y heteronucleares a dos enlaces $^2J(\text{C}, \text{H})$ cuando el carbono que forma parte del enlace posea un sustituyente electronegativo X, se pudieron diferenciar las posibles conformaciones entorno a un enlace. Estas constantes se clasificarían en grande o pequeña en función del ángulo diedro.

²¹Blanco Méndez, María. Aplicación de las constantes de acoplamiento a la determinación de la configuración relativa de sistemas acíclicos con oxígeno y nitrógeno en disposición relativa 1,3. Trabajo fin de Máster. Facultad de Química. Universidade da Coruña. A Coruña **2009**.

²²Matsumori, N.; Kaneno, D.; Murata, M.; Nakamura, H.; Tachibana, K. *J Org. Chem.* **1999**, *64*, 866.

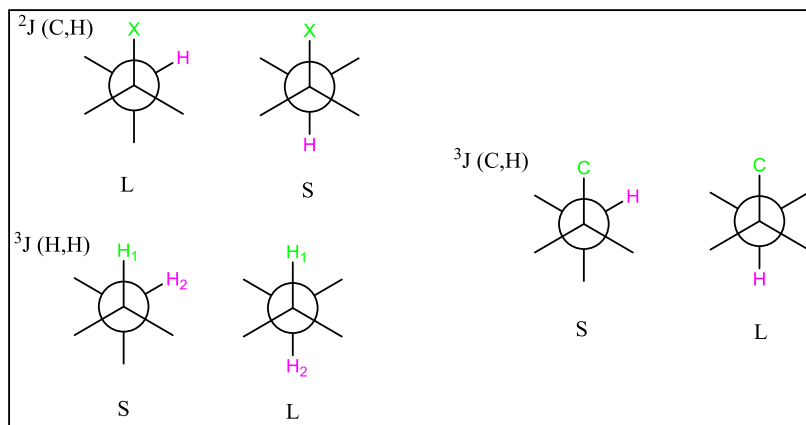
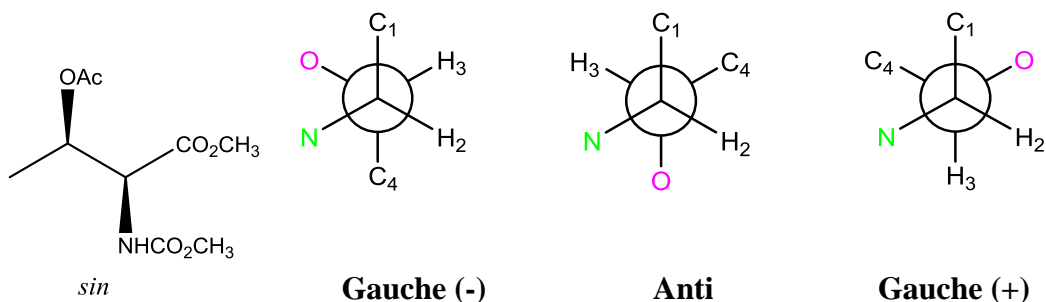


Figura 9. Esquema de constantes de acoplamiento ${}^3J(H, H)$ y ${}^{2,3}J(C, H)$ y su dependencia con el ángulo diedro.

Para realizar el estudio basado en las constantes de acoplamiento se consideraron solamente tres conformeros alternados: los sinclinales (gauche (+) y gauche (-)) y el antiperiplanar (anti) suponiendo que son los que se encuentran mayoritariamente presentes para cada configuración relativa *sin* y *anti*.

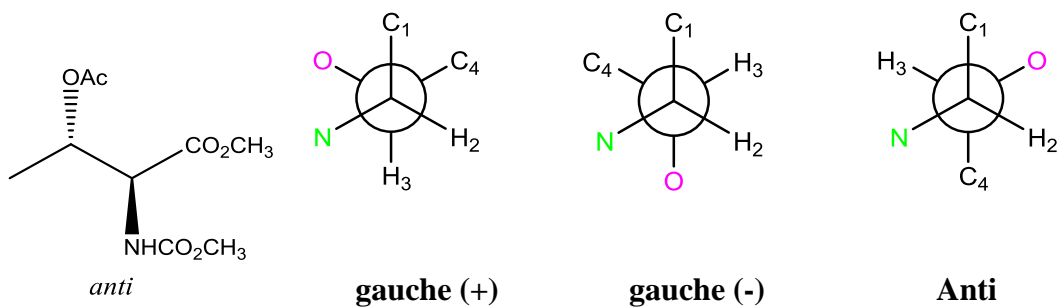
El conjunto de valores de ${}^3J(H, H)$ y ${}^{2,3}J(C, H)$ en torno a un enlace permite diferenciar estos conformeros alternados presentes para cada enlace de entre los 6 posibles, 3 para cada una de las dos configuraciones relativas *sin* y *anti*, de modo que se puede establecer la relación entre los dos centros quirales. En las tablas siguientes se representan las dos posibles configuraciones relativas para un fragmento 1,2-disustituido y las seis posibles conformaciones alternadas. Las conformaciones denominadas con los términos antiperiplanar (anti) y sinclinal (gauche (+)/ (-)) se refieren a la orientación del H2 con respecto a H3.

Tabla 3. Confórmeros alternados para el sistema 1,2 disustituído con configuración *sin* y dependencia de $^{2,3}J(\text{C}, \text{H})$ y $^3J(\text{H}, \text{H})$ con el ángulo diedro.



	Etiquetas		
$^3J(\text{H}_2, \text{H}_3)$	pequeña	grande	pequeña
$^3J(\text{C}_1, \text{H}_3)$	pequeña	pequeña	grande
$^3J(\text{C}_4, \text{H}_2)$	pequeña	pequeña	grande
$^2J(\text{C}_2, \text{H}_3)$	pequeña	grande	grande
$^2J(\text{C}_3, \text{H}_2)$	pequeña	grande	grande

Tabla 4. Confórmeros alternados para el sistema 1,2 disustituído con configuración *anti* y dependencia de $^{2,3}J(\text{C}, \text{H})$ y $^3J(\text{H}, \text{H})$ con el ángulo diedro.



	Etiquetas		
$^3J(\text{H}_2, \text{H}_3)$	pequeña	pequeña	grande
$^3J(\text{C}_1, \text{H}_3)$	grande	pequeña	pequeña
$^3J(\text{C}_4, \text{H}_2)$	pequeña	grande	pequeña
$^2J(\text{C}_2, \text{H}_3)$	grande	pequeña	grande
$^2J(\text{C}_3, \text{H}_2)$	pequeña	grande	grande

1.3.3.3 El Método Murata Extendido

Debido a la dificultad a la hora de clasificar el valor de las constantes en grande o pequeño, Gomez-Paloma y col. idearon un método en el que se obtenía el valor de las constantes de acoplamiento experimentales a partir de medidas de RMN²³ y se comparaba con los valores teóricos obtenidos computacionalmente mediante cálculos de DFT²⁴. De este modo el conjunto de constantes teóricas que más se aproximara a las experimentales indicaría el conformero mayoritario y como consecuencia la configuración relativa de los centros quirales. Este estudio es más complejo puesto que esa sería la situación ideal si no existiera un equilibrio conformacional de dos formas alternadas que se escapa del objetivo de este trabajo.

²³ Bifulco, G.; Bassarello, C.; Riccio, R.; Gomez-Paloma, L. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 1025.

²⁴ Foresman J. B.; Frisch A. *Exploring Chemistry with electronic Structure Methods 2^a Ed.* Gaussian Inc., Pittsburgh, **1996**.

2. Objetivos

Como objetivos principales y específicos para este trabajo, se proponen:

1. Empleo de métodos cromatográficos para la separación de compuestos de origen marino.

1.1 Columna de exclusión molecular Sephadex LH-20.

1.2 HPLC para la separación de compuestos puros.

2. Utilización de las técnicas bidimensionales de RMN para confirmar la estructura plana de un compuesto desconocido: el macrólido 120021

3. Utilización de cálculos computacionales para la determinación de la estereoquímica relativa de dos centros quirales en posiciones 1,2.

3.1 Utilización de un funcional de densidad adecuado para determinar computacionalmente las constantes de acoplamiento Homo y Heteronucleares con el fin de elucidar la estructura relativa de dos centros quirales adyacentes 1,2 con átomos de O y N.

3. Parte experimental

3.1 Utilización de un método de aislamiento mediante fraccionamiento con disolventes, separación cromatografía de exclusión y purificación por HPLC. Estudio del extracto acuoso de la esponja *Ircina strobilina*.

3.1.1 Colección de muestras y preparación del extracto metanólico

Los especímenes de *Ircina strobilina* fueron recolectados el 13 de febrero de 2014 en la bahía de Mochima, Estado de Sucre en Venezuela. La esponja se almacenó en un envase de vidrio junto con agua de mar tomada en el punto de muestreo, hasta su traslado a las instalaciones del laboratorio de Sucre.

Una vez en el laboratorio, la esponja se dejó en agua de mar trafilada durante aproximadamente 45 min, para liberar cualquier organismo contenido en ella. Posteriormente se limpió manualmente y se dividió en pequeños pedazos con una tijera. El material orgánico se extrajo con MeOH durante 5 días (600 mL) antes de realizar el primer filtrado, 2 días (600 mL) antes del segundo y finalmente 5 días (660 mL) antes del tercer filtrado.



Figura 10²⁵. Fotografía subacuática de *Ircina strobilina*.

Tabla 5. Resultados experimentales.

Parámetros	Cantidad
Masa del organismo	1600 g (3 x MeOH)
Volumen de metanol	
1° filtrado	600 mL
2° filtrado	660 mL
3° filtrado	890 mL
Color	Oliva quemado

²⁵ www.reefguide.org/keys/pixhtml/blackball3.html Fecha de entrada 24 de Enero de 2015.

3.1.2 Extracción y fraccionamiento

La esponja se extrajo tres veces con metanol obteniéndose 1600 g de muestra, y el extracto metanólico-acuoso se fraccionó mediante el método de Kupchan modificado que sigue el grupo de investigación para obtener, entre otros, la fracción acuosa WW(ver figura 13).²⁶

3.1.3 Estudio cromatográfico

3.1.3.1 Columna de exclusión molecular Sephadex LH-20

Previo paso por la columna, 1819.1 mg de la fracción acuosa WW de la esponja *Ircinia strobilina* se disolvieron en 10 mL de MeOH:H₂O (2:1) y se filtró a continuación a gravedad. El filtrado rindió 1318.2 mg después de eliminar el disolvente en el rotavapor, lográndose separar 214.6 mg de sales que contenía la muestra. Seguidamente fue separada mediante cromatografía en columna empleando una columna de 5 cm de diámetro por 22.5 cm de alto, empacada con gel de Sephadex LH-20. La columna se eluyó a gravedad empleando como fase móvil 1.5 L de CH₃OH:H₂O (2:1) eligiéndose cuidadosamente el flujo, que fue finalmente de 1 mL/min. Se recolectaron 58 fracciones (con la ayuda de un recolector automático) de aproximadamente 10 mL cada una, que fueron estudiadas por cromatografía de capa fina de sílica de Merk con *n*-butanol/CH₃COOH/H₂O 4:1:5 como fase móvil. Las placas cromatográficas fueron reveladas con una lámpara de luz UV a 254 nm y posteriormente utilizando Ninhidrina como revelante, observándose la presencia de compuestos desde la fracción 25 hasta la 50.

Después de este estudio, se reunieron 6 fracciones denominadas S1-S6 que fueron estudiadas por RMN de protón y ¹³C. Los espectros de resonancia magnética nuclear se realizaron en los equipos Bruker Avance 500 con criosonda dual ¹H/¹³C de la Universidad de A Coruña. Se utilizó como disolvente agua deuterada (D₂O 99.9%). Los desplazamientos químicos se referenciaron en la escala δ (ppm). Para los espectros de

²⁶ Nieto, M. I.; González, N.; Rodríguez, J.; Kerr, R. G.; Jiménez, C. *Tetrahedron*, **2006**, 62, 11747-11754.

RMN de ^1H se utilizó como referencia interna la señal del disolvente deuterado a δ 4.8 ppm.

De las 6 fracciones, se seleccionaron la tercera y cuarta (S3 y S4) a las que se les realizó un espectro de masas HR-ESIMS (ionización negativa y positiva) de alta resolución en un equipo Qstar Qq-TOF de Applied Biosystems. De las dos fracciones solamente mostró picos interesantes S4.

Tabla 6. Fracciones con su masa respectiva.

WW21	Fracciones	Peso (mg)
S1	1-20	29.9
S2	21-26	71.7
S3	27-33	43.0
S4	34-40	188.5
S5	41-49	354.7
S6	50-58	63.0

3.1.3.2 Cromatografía de HPLC de las fracciones

Fracción S4

La cuarta fracción eluida de la columna de Sephadex LH-20 fue estudiada por HPLC de Agilent Technologies, modelo 1100 con detección de diodos y de fluorescencia. Este equipo está controlado por el software HP Chemstation. La separación se llevó a cabo empleando una columna analítica Atlantis $5\mu\text{m}$ C18 (100 x 4.6 mm) y otra semipreparativa Atlantis $5\mu\text{m}$ C18 (100 x 10mm) ambas de Waters. Los módulos que forman parte del equipo son: desgasificador, bomba cuaternaria, automuestreador y compartimento de columna termostatado.

Antes de proceder a su estudio, se pasó por un filtro de 0.22 micras tipo NYLON para evitar que cualquier impureza interfiriera en el proceso. Primero, se determinaron las condiciones ideales para la separación a partir de la bibliografía empleando HPLC analítico con una columna de fase reversa de la marca Waters Atlantis $5\mu\text{m}$ C18 (100 x

4.6 mm). Posteriormente, se realizó la separación en HPLC semipreparativo utilizando una columna semipreparativa de fase reversa de la marca Waters Atlantis 5 μ m C18 (100 x 10mm) con H₂O: MeCN (95:5) con un flujo de 2.6 mL/min y a 254 nm.

Tabla 7. Peso de la fracciones H0-H7 obtenidas de la separación cromatográfica por HPLC de la fracción S4.

Eluato	Peso (mg)
H0	1.6
H1	15.3
H2	3.8
H3	6.4
H4	5.4
H5	3.7
H6	0.2
H7	3.9

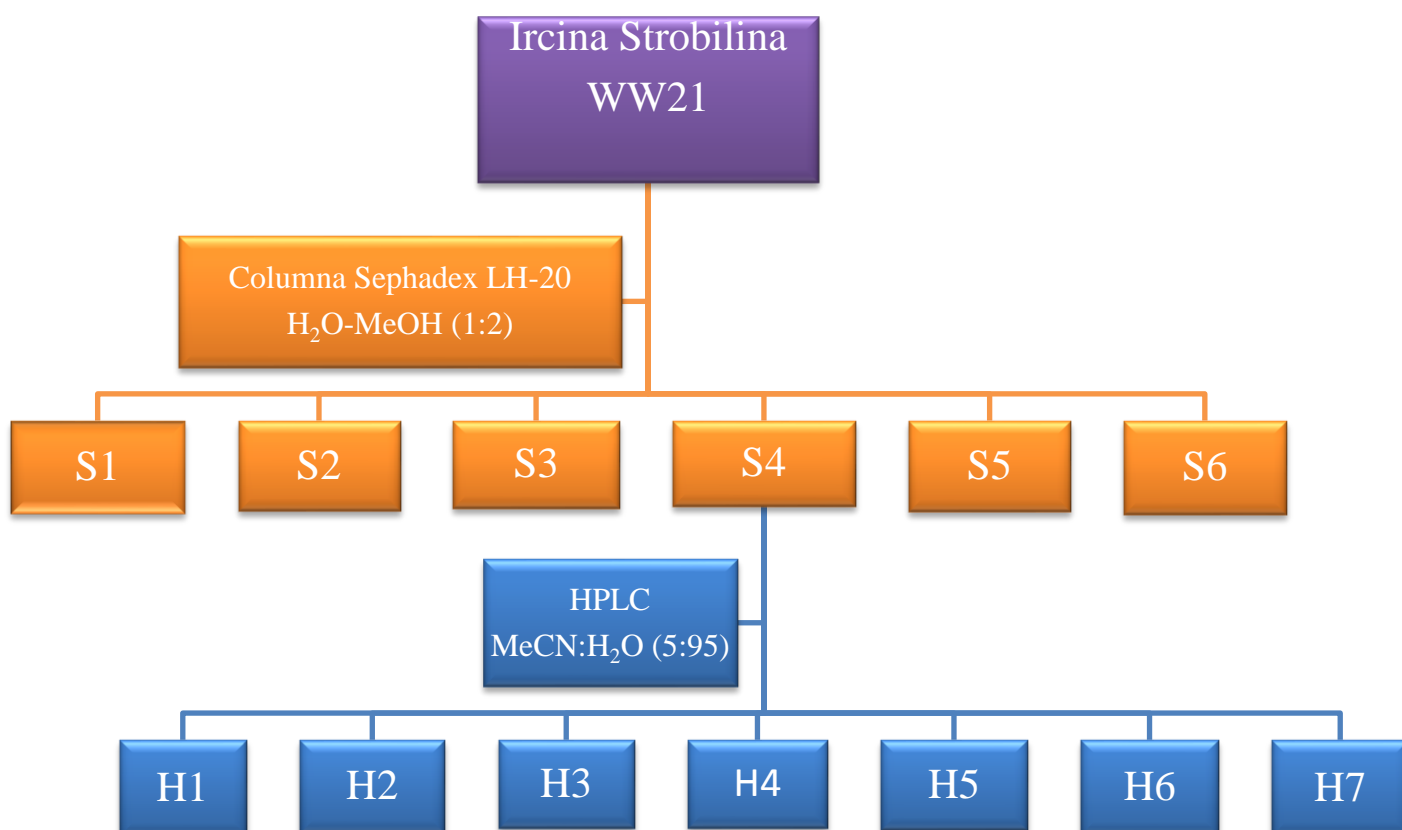


Figura 11. Esquema de fraccionamiento y purificación de la fracción acuosa WW procedente de la esponja *Ircina strobilina*.

3.2 Utilización de las técnicas bidimensionales de RMN para confirmar la estructura plana de un compuesto desconocido: el macrólido 120021.

El compuesto se disolvió en acetonitrilo-D₃ y se realizó el estudio por RMN en el un equipo Bruker Avance 500 con criosonda dual ¹H/¹³C de los Servicios de Apoyo a la Investigación de la Universidad de A Coruña.

3.3 Utilización de herramientas de computación en el análisis estructural: cálculo de constantes de acoplamiento de RMN homo y heteronucleares de compuestos 1,2 dimetínicos quirales con átomos de nitrógeno con funcionales de densidad DFT. Cálculo teórico de las constantes de acoplamiento para el modelo Modelo N-OAc.

Los ficheros de entrada se prepararon en un ordenador personal con un sistema Windows Vista empleando los programas Gaussian 09 versión D.01, Chemdraw y Chem3D versiones 14. Los cálculos se realizaron en el Centro de Supercomputación de Galicia (CESGA) utilizándose un solo procesador, 4GB de memoria RAM y 20 GB de memoria.

Los pasos a seguir se exponen a continuación para cada conformero estudiado:

1. Construcción de la molécula objeto de estudio en el programa ChemDraw²⁷ que permitió pasar de la estructura plana a 3D. Se minimizó su energía y se guardó dicha estructura con la extensión .mol2.
2. Se importó el fichero anterior (.mol2) al software de visualización Gaussview versión 5.08²⁸. Se comprobó que las configuraciones *anti* o *sin* estaban correctamente establecidas, así como la misma numeración de los átomos para cada conformero.
3. Con los conformeros *sin* y *anti* iniciales se varió el ángulo diedro que se forma entre los dos planos que contienen uno al átomo de N y al átomo de O. Se obtuvieron de esa forma los conformeros sinclinales gauche (-), gauche (+) y antiperiplanar cuyos ángulos diedros eran -60, 60° y 180° respectivamente.
4. Se fijó el ángulo diedro utilizando la opción “atom group editor” del programa Gaussview, en donde se seleccionan los átomos cuyo ángulo se quiere fijar mediante la opción “freeze”.

²⁷ ChemBioDraw ultra 14.0.

²⁸ Gaussian 09. Versión D.01 GaussView 5.0.8.

- Con el ángulo fijado, se minimizará cada conformero utilizando el funcional B3LYP y el conjunto base 6-31G (d,p) para cada uno de los conformeros y se guarda como .gif. A continuación se envía al CESSGA para su minimización.
- El fichero de salida nos proporcionó las coordenadas XYZ de cada conformero minimizado, al cual se les realizaron los cálculos de sus constantes de acoplamiento homonucleares ^1H - ^1H y heteronucleares ^{13}C - ^1H . Para ello se prepara de nuevo un fichero de entrada .gif utilizando el funcional B3LYP con el conjunto base mejorado por Seriani colaboradores.²⁹ Se envía al CESSGA para su cálculo.
- El fichero de salida .out del CESSGA se abre con el software Gaussview y Wordpad y con este se leen las constantes de acoplamiento.

```

Total nuclear spin-spin coupling J (Hz) :
      1          2          3          4          5
1  0.000000D+00
2  0.667116D+02  0.000000D+00
3 -0.152350D+00  0.426125D+02  0.000000D+00
4  0.416900D+01  0.124152D+01  0.431378D+02  0.000000D+00
5  0.331699D+02 -0.308743D+01 -0.235579D+00 -0.173327D-01  0.000000D+00
6  0.428068D+02 -0.147704D+02  0.526771D+00 -0.441326D+00 -0.703489D+01
7 -0.273095D+01  0.924176D+00 -0.123604D+00  0.468768D-01 -0.193172D+01
8  0.107508D+00 -0.368766D+01  0.236262D+02 -0.921027D+01  0.104494D+00
9 -0.171735D-01  0.338323D-01 -0.174987D+01  0.463209D-01  0.984491D-01
10 0.136138D-01  0.299050D+00 -0.291385D+01  0.317478D+01 -0.213081D+00
11 0.149635D+01  0.352317D+01 -0.460041D+00 -0.127158D+00  0.504213D+00
12 0.876200D-01  0.103753D+02  0.168679D+01  0.947298D-01 -0.184109D+00
13 0.195073D+01  0.199457D+01  0.599613D+00 -0.105806D-01 -0.390873D-01
14 -0.201805D+00 -0.151906D+01 -0.157105D+00 -0.185563D+00 -0.573477D-01
15 0.926773D-02 -0.881226D-01  0.134216D+01 -0.700410D-01 -0.254852D+00
16 -0.989876D-01 -0.128512D+01 -0.241864D+00  0.158401D-01  0.617254D-01
17 0.237462D-01  0.498777D+00 -0.346753D-01 -0.769189D-02  0.702879D-02
18 -0.347155D+00  0.520370D+00  0.857719D+00  0.130786D+03  0.664055D-01
19 0.190103D+01  0.863985D+01 -0.446229D+01  0.132972D+03 -0.390579D-01
20 -0.162588D+00  0.356306D+01 -0.600294D+01  0.132107D+03  0.486072D-01
21 0.258885D+01 -0.307177D+01  0.148637D+03 -0.167038D+01  0.399209D-01
22 -0.495044D+01  0.150183D+03 -0.582076D+01  0.387385D+01 -0.579426D+00
23 0.918858D+01 -0.165689D+00 -0.550308D-01 -0.453033D-01 -0.512428D+00
24 0.224424D+01 -0.431623D+00  0.177223D+00 -0.439737D-01 -0.195359D+00
25 0.120392D+01 -0.491977D+00  0.254513D+00  0.134060D-01 -0.212749D+00
26 -0.146684D-01 -0.150635D+00  0.160358D+01  0.716885D-01 -0.451729D-01
27 0.376989D-01  0.647370D+00 -0.365510D+00  0.481456D-01 -0.119999D+00
28 -0.475537D-01  0.212612D+00  0.301249D+00 -0.239697D-01 -0.518213D-01
29 -0.533857D-02  0.154588D+00 -0.267318D-01 -0.398531D-01  0.372774D-01
30 0.878462D-01 -0.152123D+00  0.137965D+00  0.147055D-01  0.352279D-01
31 0.488904D-01 -0.153638D+00  0.126144D+00 -0.408524D-01  0.145469D-01
      6          7          8          9         10
6  0.000000D+00
7  0.219933D+02  0.000000D+00
8 -0.120345D-01  0.766101D-02  0.000000D+00

```

Figura 12. Ejemplo de fichero .out (CESSGA) en el programa Wordpad.

La lectura de los valores de acoplamientos de J en el fichero de salida se leyeron en la parte Total nuclear spin-spin coupling J (Hz). Como ejemplo, se ha seleccionado el fichero de vuelta del conformero antiperiplanar del estudio con el funcional de Seriani y $\theta_2=180^\circ$. En azul se resaltan los números 22 y 4 que se corresponden con el

²⁹ Hu, X.; Carmichael, I.; Seriani, A.S. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 4899-4910.

número de átomo de la molécula objeto de estudio, protón y carbono respectivamente que participa en el acoplamiento a tres enlaces que se corresponde con la constante $^3J(\text{C4}, \text{H2})$. Para leer el valor de J se hace la línea de cruce entre los valores 4 y 22, leyendo en el eje X el número de átomo de la molécula menor en este caso 4 y en el eje Y el mayor que es el 22. La lectura en el fichero de salida se expresa en potencias de 10 (p.e 0.387385D+01 son 3.87 Hz).

4. Discusión de resultados

4.1 Utilización de un método de aislamiento mediante fraccionamiento con disolventes, separación cromatografía de exclusión y purificación por HPLC. Estudio de la fracción acuosa del extracto orgánico de la esponja *Ircina strobilina*

4.1.1 Esquema fraccionamiento por el Método de Kupchan

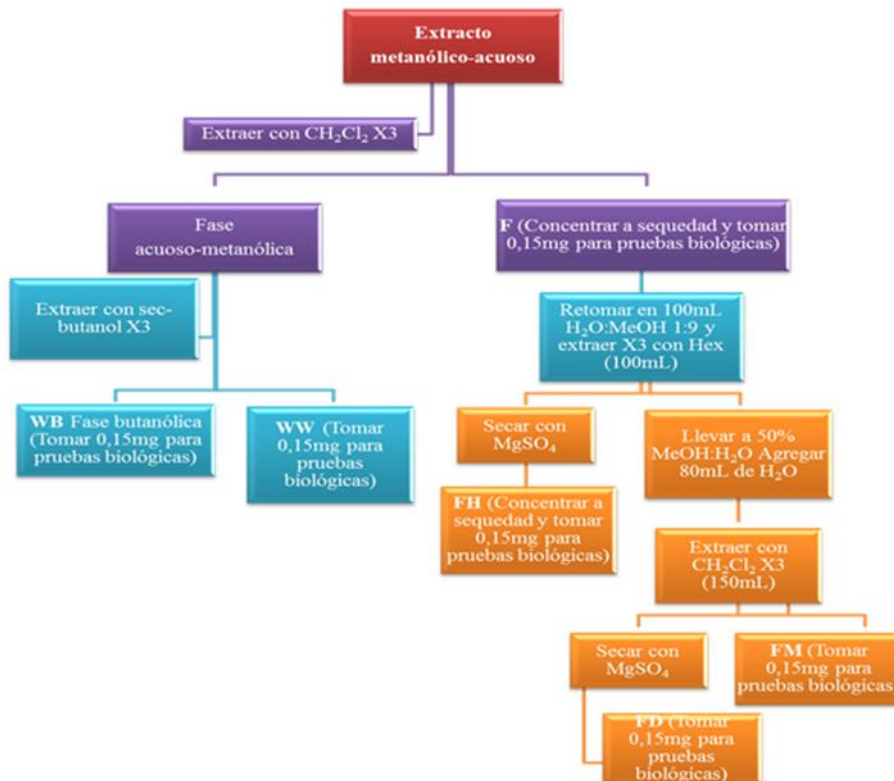


Figura 13. Esquema extracción y fraccionamiento de la esponja *Ircinia strobilina*.

El grupo de investigación emplea el método Kupchan modificado para el fraccionamiento del extracto metanólico-acuoso de la esponja *Ircina strobilina*. A partir de la fracción acuosa WW que fue sometida a cromatografía de exclusión molecular Sephadex LH-20 y que dio lugar a 58 fracciones agrupadas en seis gracias al estudio por cromatografía en capa fina, se siguió con el estudio de la cuarta fracción que fue purificada mediante HPLC.

4.1.2 Cromatografía de HPLC de las fracciones

El cromatograma obtenido de la fracción S4 fue el siguiente, del que pudieron separarse 7 fracciones, las cuales fueron estudiados por RMN ^1H (500 MHz, D_2O).

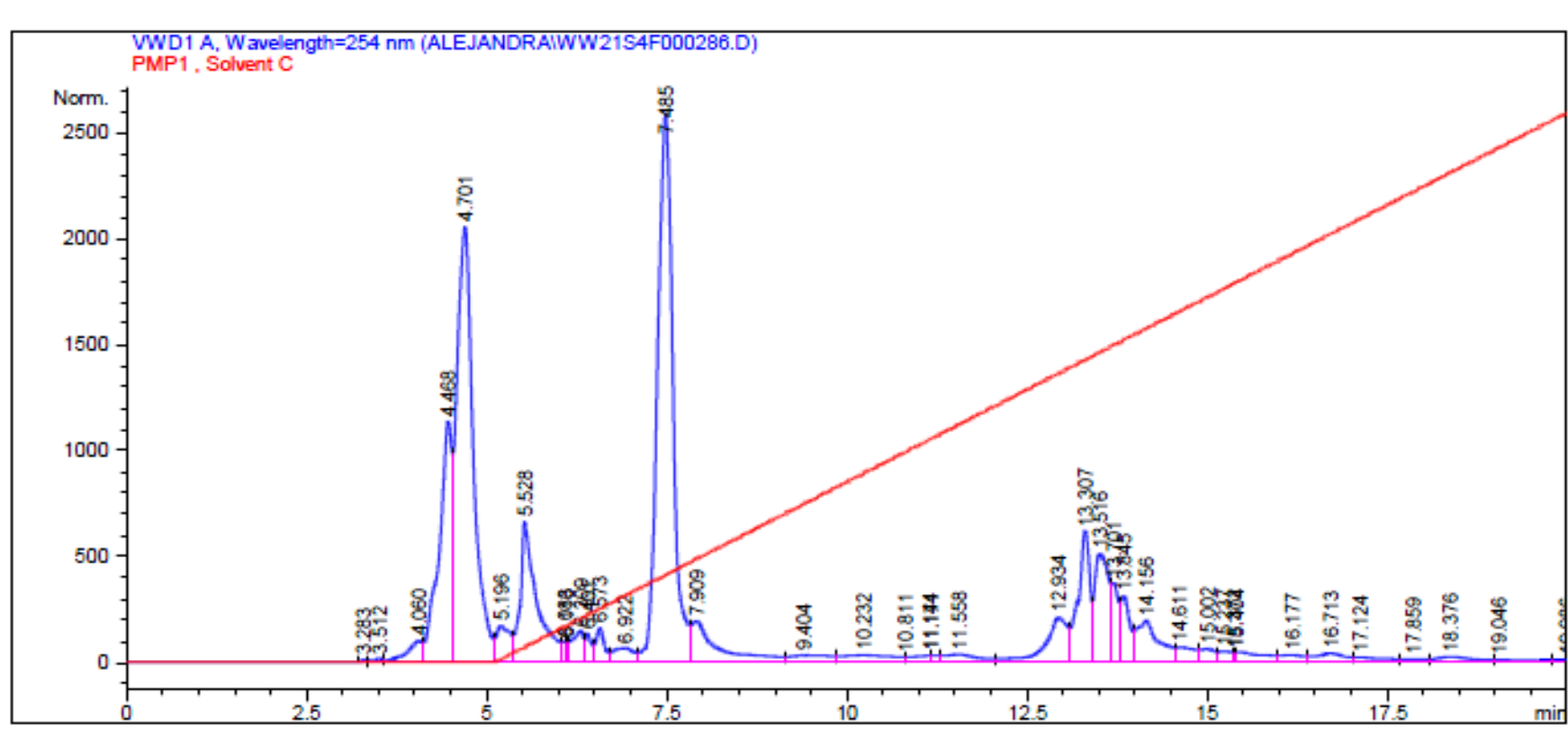


Figura 14. Cromatograma de la fracción S4 en HPLC semipreparativo.

4.1.3 Metabolitos aislados

De la columna de Sephadex LH-20 fue posible el aislamiento de un sólido blanco cristalino procedente de la fracción S45, por lo que fue realizado inmediatamente un estudio de RMN ^1H (300 MHz, D_2O) dando como resultado que se trataba del aminoácido tirosina (Figura 11).

Del estudio de la fracción S4 empleando la técnica de HPLC, las fracciones interesantes resultaron ser H3 y H4, por lo que se realizaron 6 inyecciones para tener la cantidad suficiente para poder realizar RMN ^1H y RMN ^{13}C (500 MHz, D_2O) Como se puede ver en las figuras 12 y 13, los compuestos aislados resultaron ser una mezcla de los aminoácidos leucina e *isoleucina*.

No se detectaron otros compuestos de peso molecular más elevado que los correspondientes a los aminoácidos naturales tirosina, leucina e *isoleucina*, por lo que se dejó el estudio de esta fracción considerándose que se había alcanzado el primer objetivo del trabajo de fin de grado.

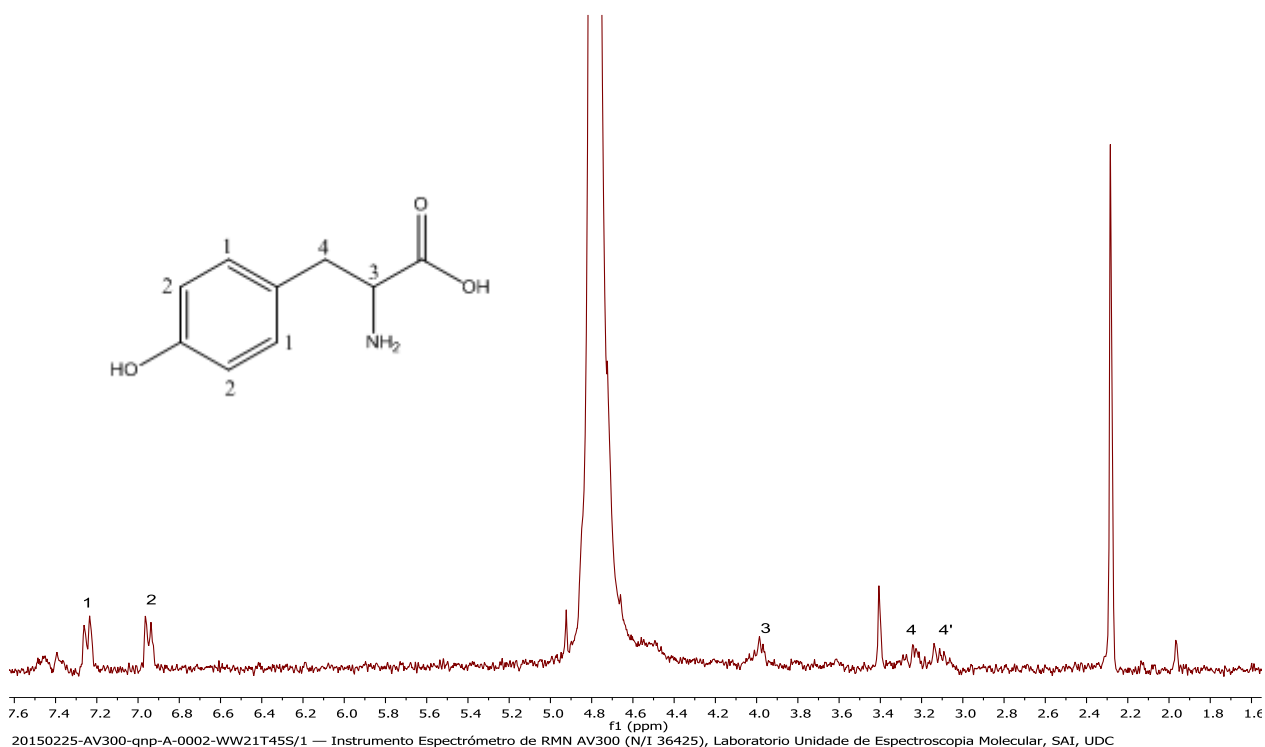


Figura 15. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, H_2O) de S45 (aminoácido Tirosina).

Discusión de resultados

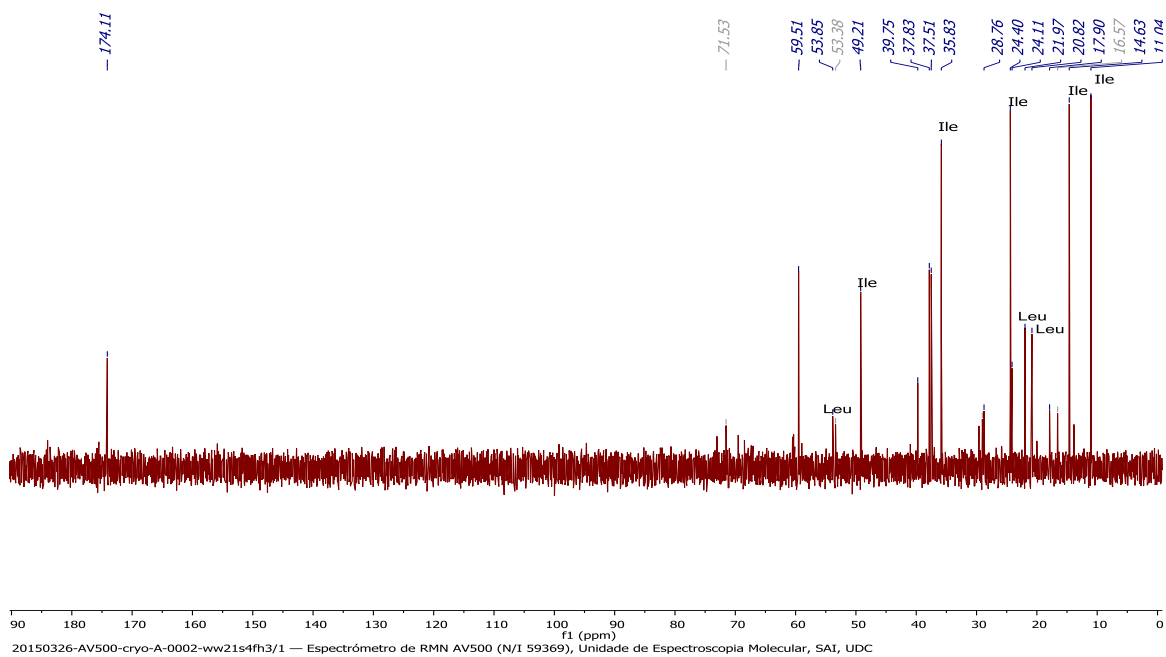


Figura 16. Espectro de RMN de ^{13}C (500 MHz, H_2O) de H3 (Mezclas de los aminoácidos Leucina e isoleucina).

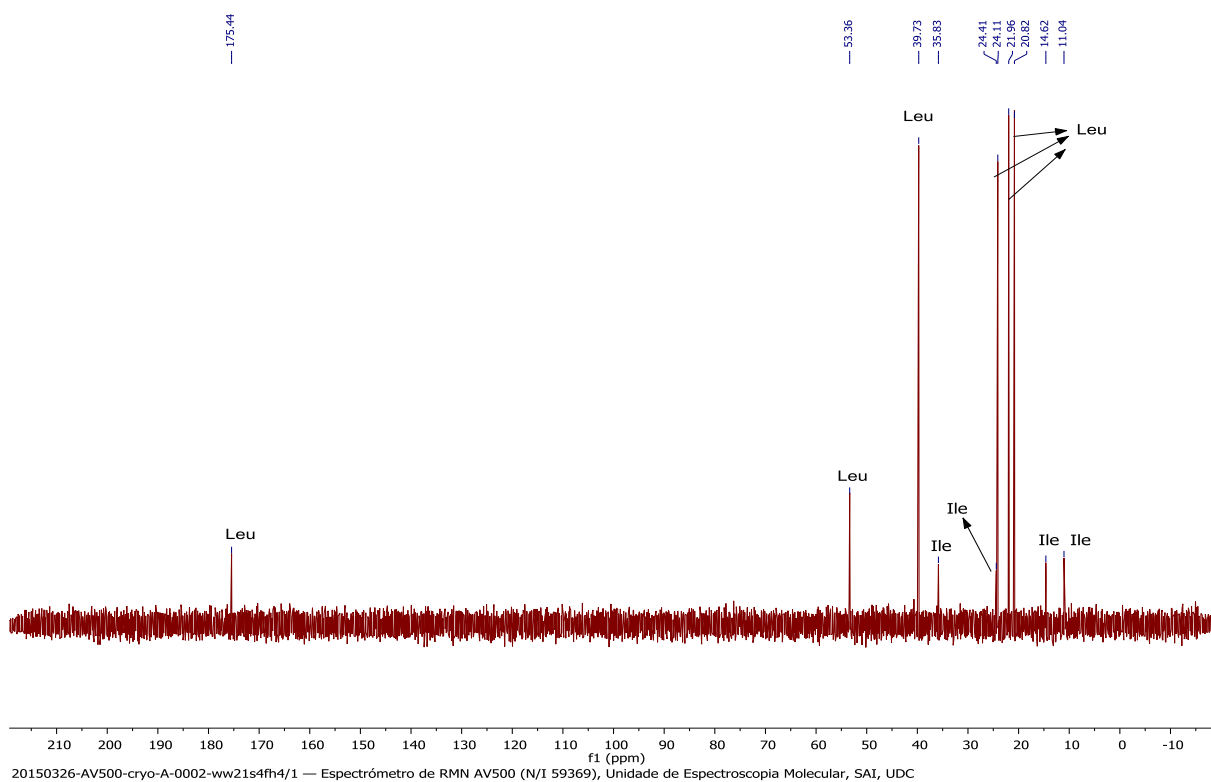


Figura 17. Espectro de RMN de ^{13}C (500 MHz, H_2O) de H4 (mezcla aminoácidos Leucina e Isoleucina).

4.2 Utilización de las técnicas bidimensionales de RMN para confirmar la estructura de un compuesto desconocido: el macrólido 120021

El segundo objetivo que se me encomendó consistió en la confirmación de la estructura plana de un compuesto denominado macrociclo 120021, un metabolito secundario aislado de la esponja de la familia Haplosclerida, de la cual no se dispone hasta el momento de datos de clasificación taxonómica. Para ello, se utilizaron los siguientes experimentos de espectroscopia de RMN monodimensional: ^1H y ^{13}C . Además, se obtuvieron los experimentos bidimensionales de RMN ^1H - ^1H COSY, ^{13}C - ^1H HSQC-editado y ^{13}C - ^1H HMBC. También se contó con los datos de espectrometría de masas de ionización química por electrospray de alta resolución (HR-ESIMS modo ion negativo).

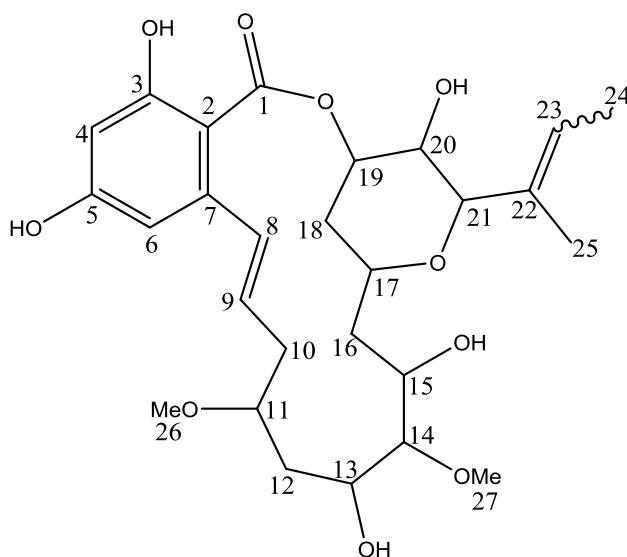


Figura 18. Estructura del compuesto *PM120021*.

El espectro de masas (-)-HRESIMS compuesto objeto de estudio mostró el siguiente ion molecular m/z 521.2392, que corresponde con una masa molecular exacta de 522.2465 uma. Al tratarse de una masa molecular par se sabe que presenta un número par de átomos de N o carece de ellos.

Como se desconocía la fórmula molecular del compuesto, se hizo una primera aproximación a partir del número de carbonos presentes en el espectro de ^{13}C que fueron 27, y con la ayuda de Molecular Weight Calculator 6.49 se obtuvo una fórmula

molecular de $C_{27}H_{38}O_{10}$ correspondiente a una masa exacta calculada para su ion $[M-H]^-$ de 521.2392 uma (desviación con la masa exacta experimental 0.0 muma).

Un paso importante es el cálculo de los DBE (double bond equivalent o grados de insaturación) antes de analizar los grupos funcionales ya que ofrecerá más pistas para reducir las opciones de los grupos funcionales presentes en la molécula. Se obtuvieron 9 DBE que a la vista del espectro ^{13}C resultarían de 3 grupos carbonilo (1 DBE x 3), un alqueno (1 DBE) y un anillo aromático (4 DBE).

Del espectro de RMN de 1H se pudieron asignar claramente una serie de señales tales como: en la región aromática las señales correspondientes a H4 y H6 cuyos desplazamientos a δ_H 6.30 y 6.50 respectivamente y que son un claro ejemplo de sustitución aromática en meta. Los protones H26 y H27 a 3.33 y 3.53 ambos singuletes y que integran por 3H fueron fácilmente asignables a dos grupos OMe, así como los metilos cuyos hidrógenos H24 y H25 a 1.67 y 1.72 doblete y singulete respectivamente. Los protones H8 y H9 a 7.17 y 6.16 ppm cuyo valor de su constante de acoplamiento fue de 15.85 Hz permitió deducir que ambos se encontraban presentes en un doble enlace con una disposición *trans* entre ellos

En el espectro de RMN de ^{13}C junto con el experimento HSQC-editado se pudieron deducir la presencia de 27 señales que pudieron ser asignadas a seis carbonos cuaternarios, 4 carbonos primarios, 4 carbonos secundarios y 13 carbonos terciarios.

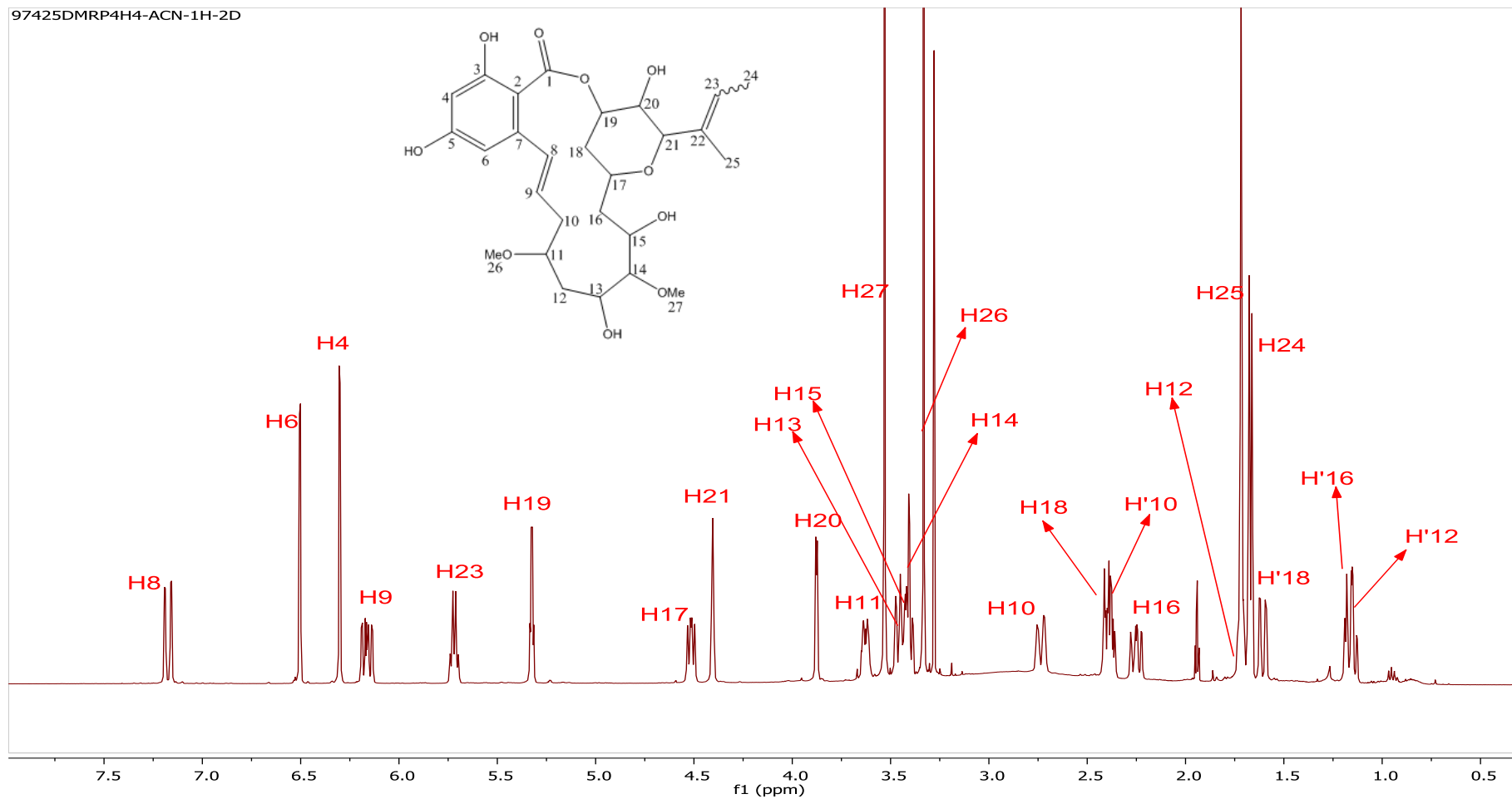


Figura 19. Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CD₃CN) del compuesto *macrólido120021*.

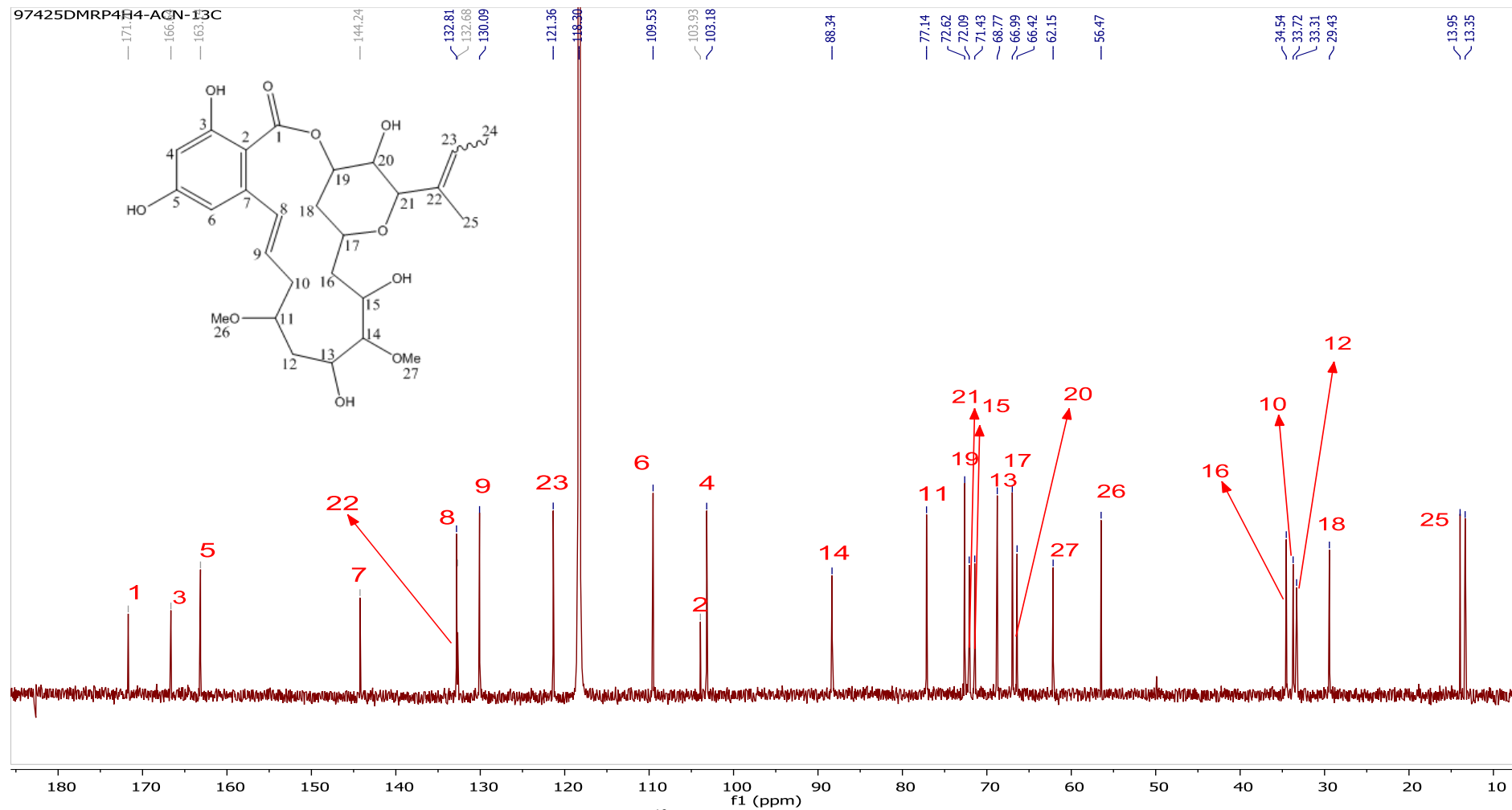


Figura 20. Espectro de RMN de ¹³C (500 MHz, CD₃CN) del compuesto *macrólido120021*.

A partir del experimento ^{13}C - ^1H HSQC-editado, que proporciona el acoplamiento directo carbono-protón, se han podido correlacionar cada protón unido directamente a su carbono-13. Al mismo tiempo se utilizó el experimento ^1H - ^1H COSY mediante el cual cada núcleo de protón se conectó a través de sus constantes de acoplamiento, con protones que están a tres enlaces de distancia entre sí, protones vecinales, o a dos enlaces de distancia, protones geminales. Con la combinación de estos dos experimentos se pudieron proponer los siguientes sistemas de espín:

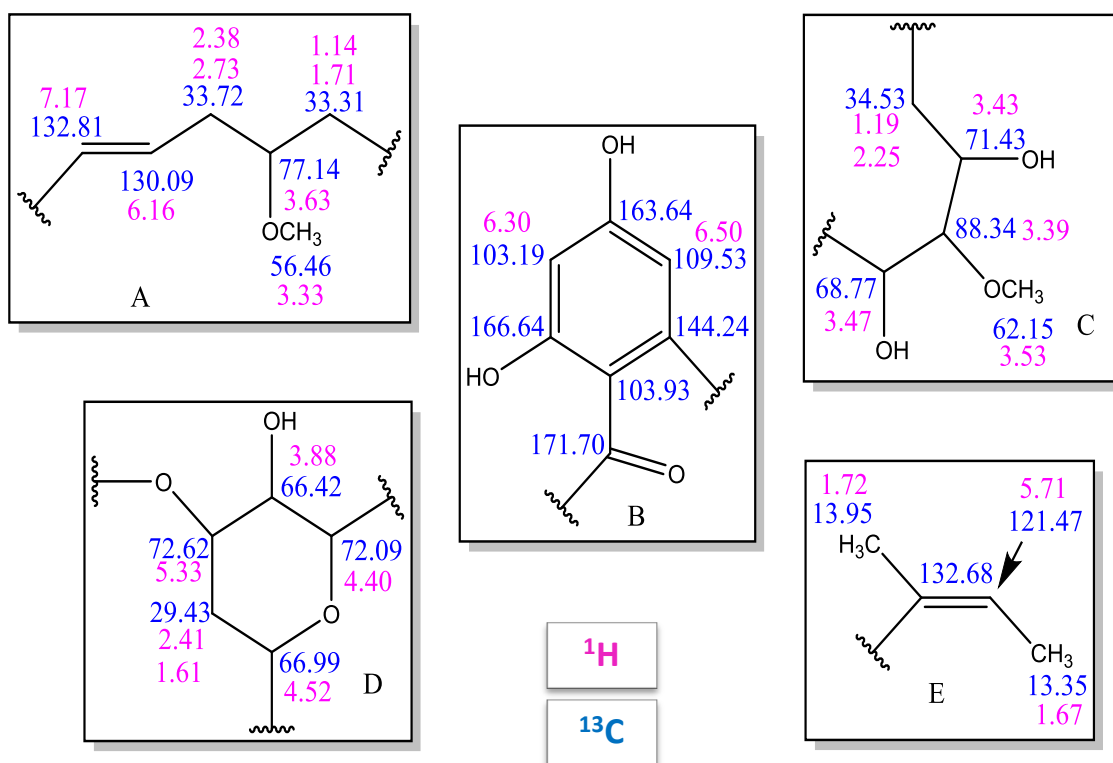


Figura 21. Fragmentos A, B, D, D Y E del macrólido120021 deducidos a partir de los sistemas de espín obtenidos de los experimentos ^1H - ^1H COSY y HSQC.

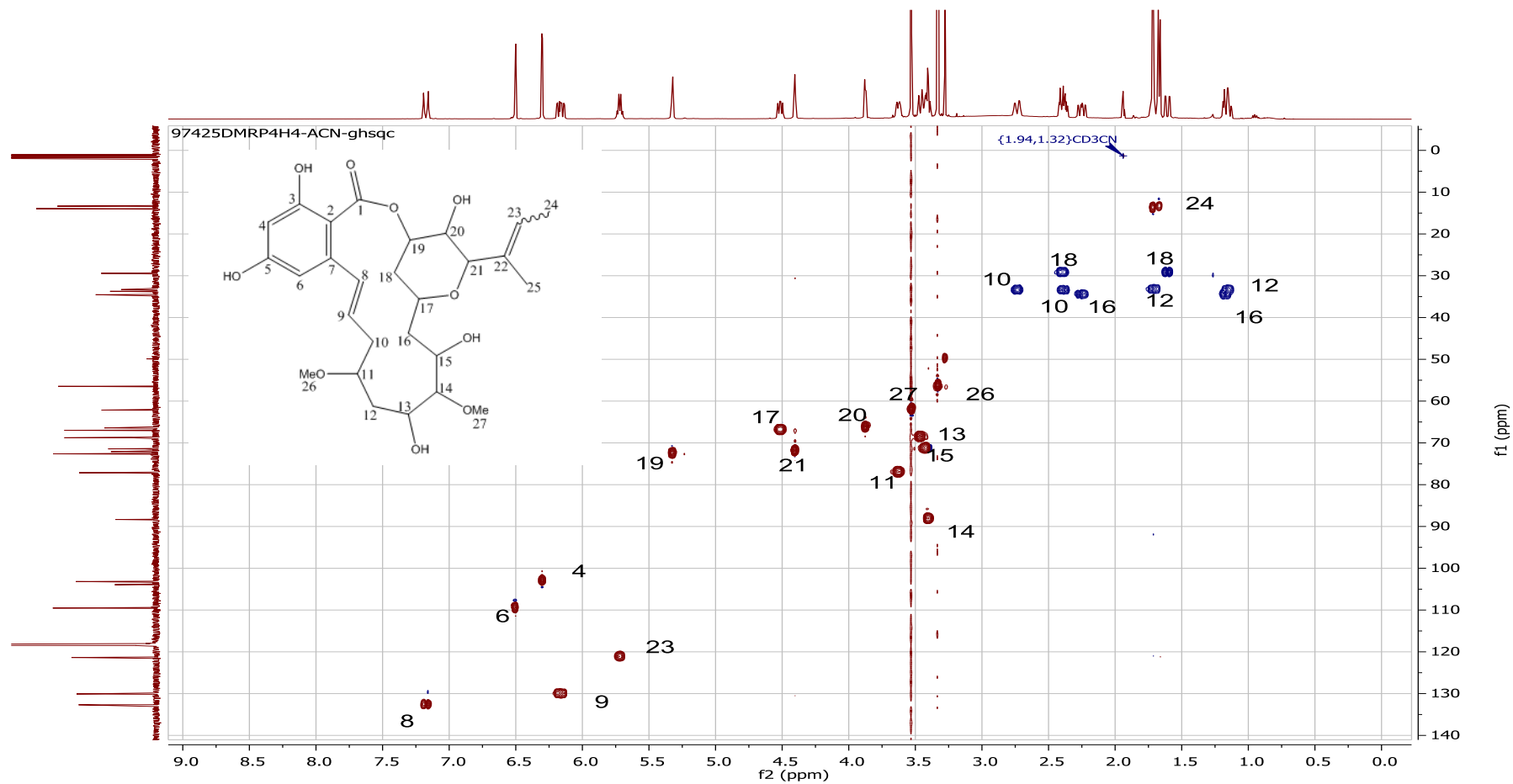


Figura 22. Espectro ^{13}C - ^1H HSQC-Editado (500 MHz, CDCl_3) del macrólido 120021.

Una vez deducidos los sistemas de espín, el experimento HMBC que mostró las correlaciones indicadas en la siguiente figura, nos permitió unir los fragmentos mencionados anteriormente en la figura 21 dando lugar a la estructura plana del macrociclo tal como se muestra a continuación.

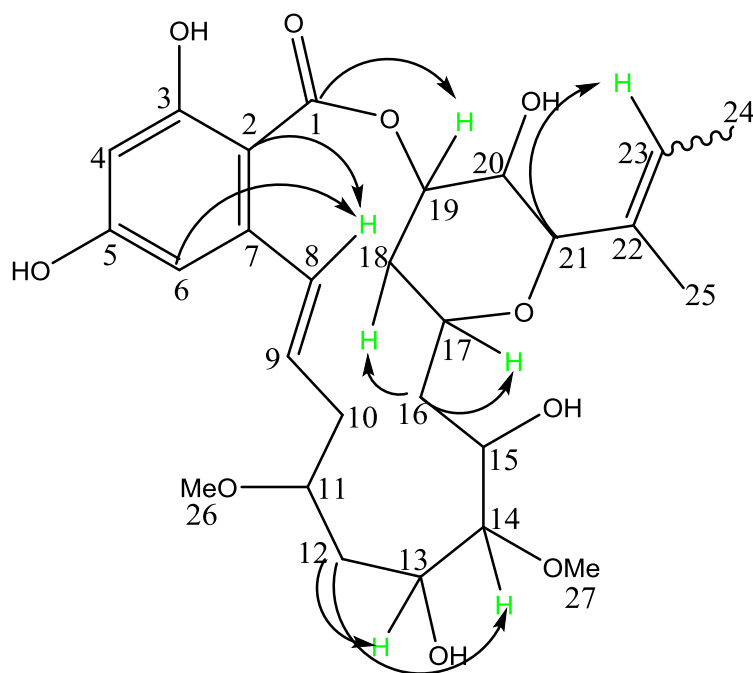


Figura 23. Acoplamiento deducidos del experimento HMBC. Las flechas indican acoplamiento de carbono a protón.

Los acoplamientos HMBC de los carbonos C2 y C6 a 103.93 y 109.53 ppm respectivamente con el protón H8 a 7.17 ppm permitieron unir el fragmento B con el A. El carbono C12 del fragmento A a 33.31 ppm mostró acoplamiento HMBC con los protones H13 y H14 a 3.47 y 3.39 ppm respectivamente, con lo que se dedujo que se encontraban consecutivos en el anillo. Del mismo modo, los acoplamientos entre C16 a 34.53 ppm mostraron acoplamientos fuertes con H17 y H18 a 4.52 y 2.41 ppm uniendo el fragmento C con D y además, el carbono C1 a 171.70 ppm dio acoplamiento HMBC con H19 a 5.33 ppm del sistema de espín D. Finalmente, C21 a 72.09 ppm mostró acoplamiento a larga distancia con H23 a 5.71 ppm, permitiéndonos unir el fragmento D con el último sistema de espín E y dando lugar a la estructura del macrociclo.

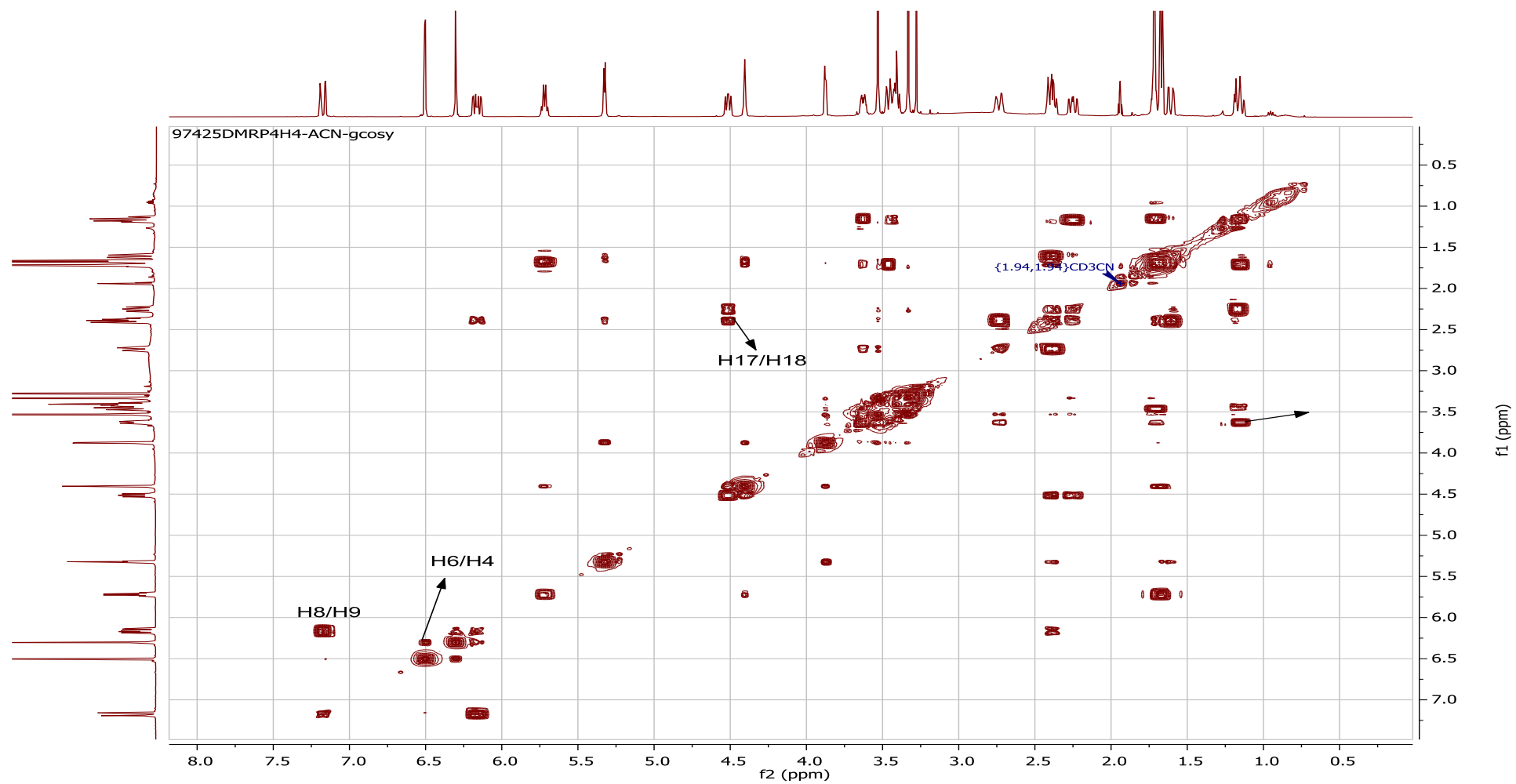


Figura 24. Espectro ^1H - ^1H COSY (500 MHz, CD_3CN) del *macrórido*120021.

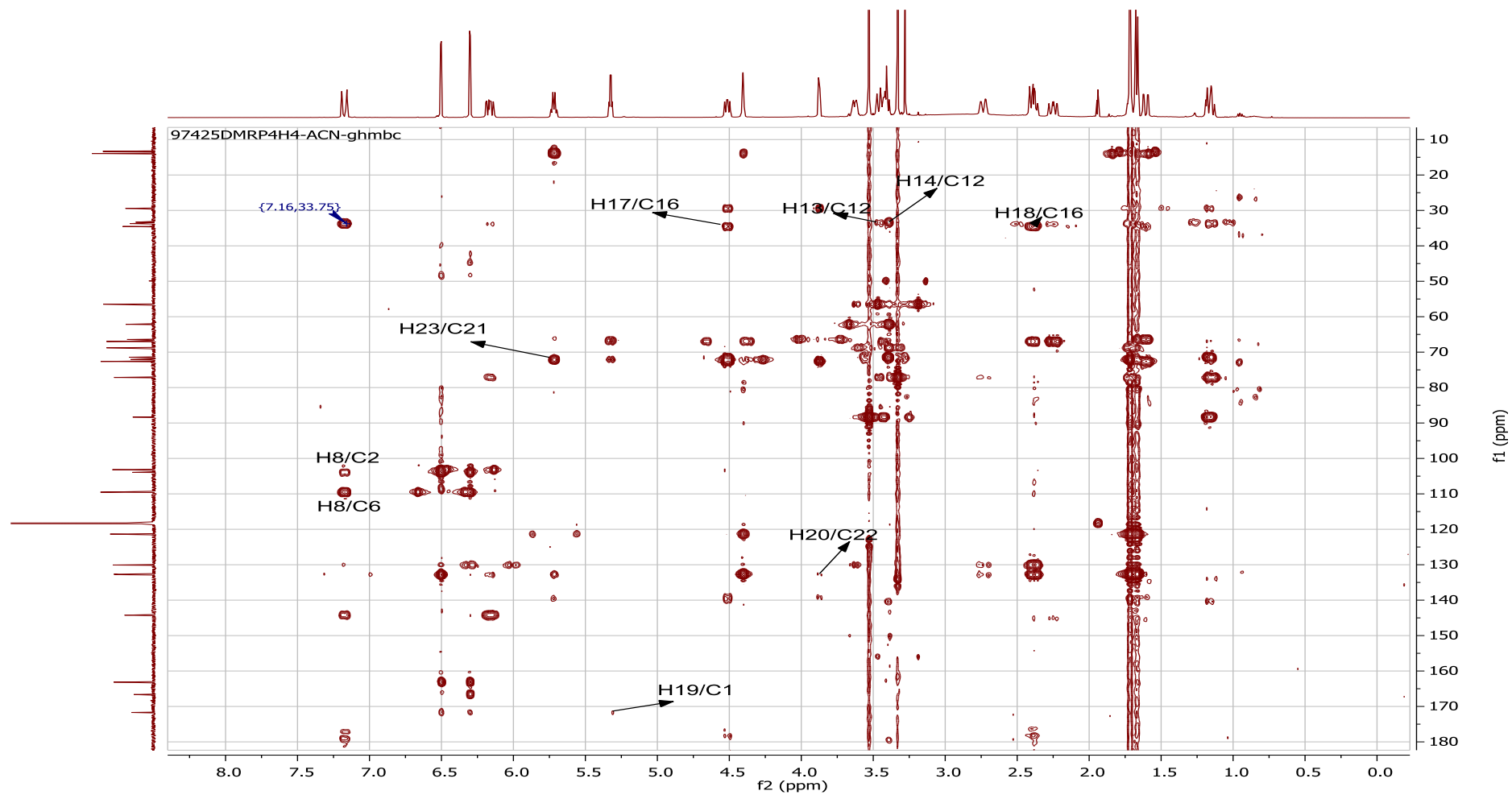


Figura 25. Espectro HMBC (500 MHz, CD₃CN) del macrólido 120021.

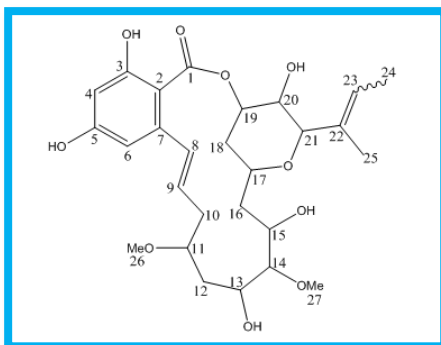


Tabla 8. Datos de RMN de ^1H (500 MHz) y ^{13}C (500MHz) de *PM120021*.

Posición	δ_{H} (ppm), mult. J(Hz)	δ_{C} (ppm)
1	-	171.70
2	-	103.93
3	-	166.64
4	6.30 d 2.56	103.19
5	-	163.14
6	6.5 d 2.56	109.53
7	-	144.24
8	7.17 dd 15.85,2.56	132.81
9	6.16 ddd 15.85, 10.30, 3.14	130.09
10	2.73 ddd 16.5, 3.14 2.56	33.72
11	3.63 m	77.14
12	1.71 1.14	33.31
13	3.47 dt 12.22 2.40	68.77
14	3.39 dd 8.80, 2.40	88.34
15	3.43 dd 4.4 1.0	71.43
16	1.19 s 2.25 ddd 15.9, 11.02, 2.21	34.53
17	4.52 dd 11.02,7.06	66.99
18	2.41 t 7.06,3.0 1.61 ddd 1.0, 3.0, 15.2	29.43
19	5.33 c 3.0,3.0,3.0	72.62
20	3.88 d 3.0	66.42
21	4.40 s	72.09
22	-	132.68
23	5.71 ct 6.89,1.45	121.47
24	1.67 dt 6.89,1.45	13.35
25	1.72 s	13.95
26	3.33 s	56.46
27	3.53 s	62.15

Se confirmó la estructura plana del macrociclo 120021, compuesto que no ha sido descrito en la bibliografía.

4.3 Utilización de herramientas de computación en el análisis estructural: cálculo de constantes de acoplamiento de RMN homo y heteronucleares de compuestos 1,2 dimetínicos quirales con átomos de nitrógeno con un funcional de densidad DFT. Cálculo teórico de las constantes de acoplamiento para el modelo Modelo N-OAc

Como objetivo principal para este capítulo, se propuso el estudio de sistemas flexibles quirales con presencia de heteroátomos de N y O adyacentes, y ver si se puede deducir la configuración relativa *sin* o *anti* de estos centros aplicando el método de Murata extendido (ver apartados 1.3.3.2 y 1.3.3.3 en la introducción). Para ello se comparan las constantes de acoplamiento protón-protón ($^3J(\text{H}, \text{H})$) y carbono protón ($^2J(\text{C}, \text{H})$ y $^3J(\text{C}, \text{H})$) experimentales con las calculadas por un método computacional de los tres conformeros alternados a través del enlace C2-C3 para las dos posibles configuraciones *sin* o *anti*. Se utiliza como método computacional, dos aproximaciones distintas de funcionales de densidad (DFT) para ver con cual se obtenían mejores resultados.

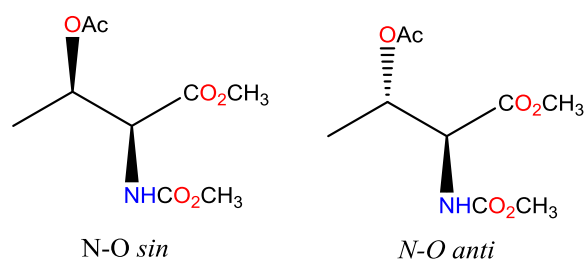


Figura 26. Modelos computacionales N-OAc.

Se pretende determinar si los valores de las constantes $^2J(\text{C}, \text{H})$, $^3J(\text{C}, \text{H})$ y $^3J(\text{H}, \text{H})$ se pueden calcular computacionalmente mediante un modelo teórico que pueda establecer una relación entre dichas constantes de acoplamiento y ángulos diedros. Para el N-OAc, se utilizaron los funcionales B3LYP o Seriani y MPW91PW1 o Adamo; y como conjunto base 6-31+G (d,p) y 6-311+G (2d,p) respectivamente. Para ello se propone que cada una de las configuraciones esté representada por los conformeros alternados a través del enlace C2-C3 (*gauche* positivo, *gauche* negativo y *anti*). Para los seis conformeros, tres para la configuración *sin* y otros tres de la configuración *anti*, se calculan las constantes de acoplamiento de forma teórica y después se comparan con las experimentales.

En el siguiente esquema se muestra la dinámica seguida para realizar el experimento.

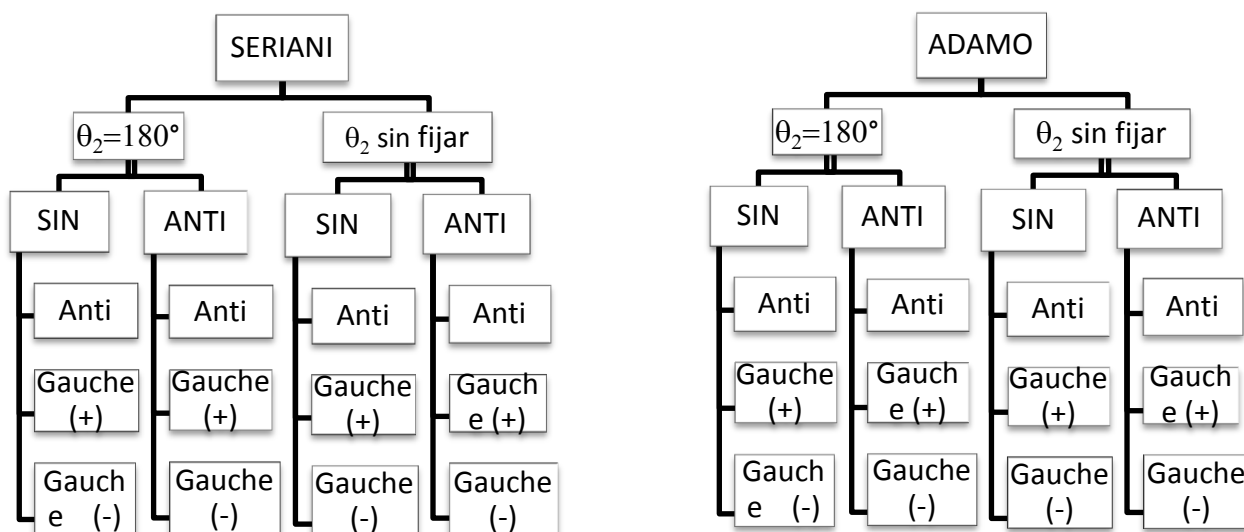


Figura 27. Esquema de los experimentos.

Como se puede ver, se ha estudiado el sistema para las disposiciones *sin* y *anti* empleando en ambos casos los dos funcionales y dentro del mismo funcional un caso con el ángulo θ_2 sin fijar y fijado. El ángulo diedro θ_2 que corresponde *al formado entre el hidrógeno de la amida y el oxígeno del carbonilo de la misma se fija 180°*, pues como se vio en la bibliografía³⁰ la configuración *trans* para dichos átomos es la que mejores resultados proporciona.

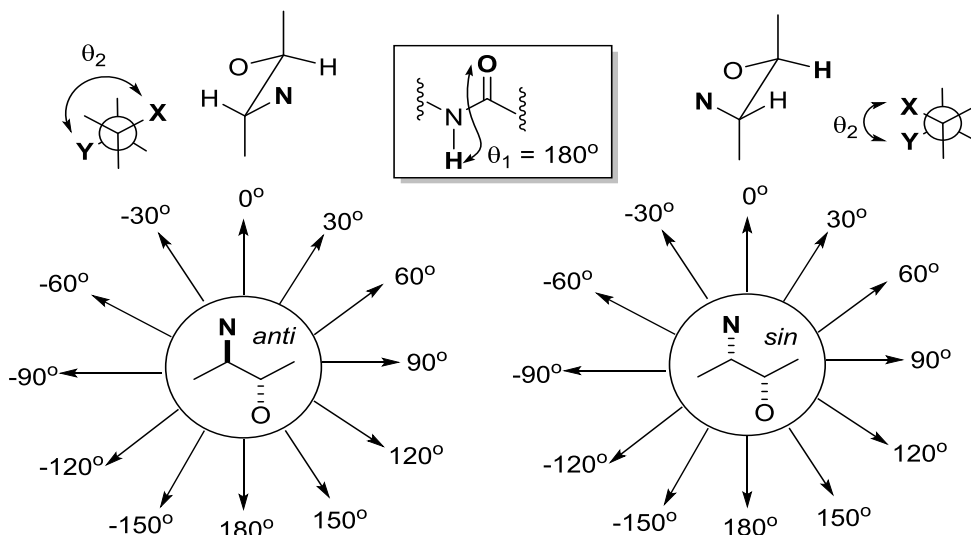


Figura 28. Esquema de la variación del ángulo diedro que permite obtener de los posibles conformeros para las configuraciones relativas *sin* y *anti*.

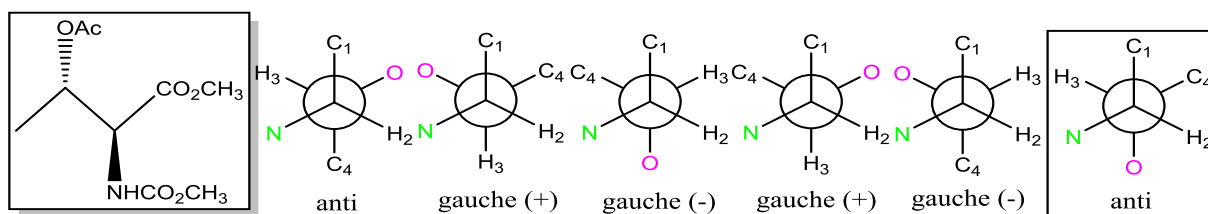
³⁰ Zhu Y.; Pan Q.; Thibaudeau C.; Zhao S.; Carmichael I.; Serianni A.S. *J. Org. chem.* **2006**, *71*, 470.

Se realizó una comparación de las constantes de acoplamiento experimentales obtenidas de los espectros de RMN con las calculadas para cada uno de los seis posibles conformeros mediante métodos DFT (ya recopiladas por otro miembro del grupo de investigación). Se empleó la siguiente nomenclatura:

- Exp: valores experimentales para las constantes de acoplamiento.
- Anti, gauche (+) y gauche (-) indican la orientación de H2 con respecto a H3 para los conformeros de las configuraciones relativas *anti* y *sin*.
- TD (total absolute deviation): es la diferencia entre el valor experimental y el calculado en valor absoluto para cada constante de acoplamiento.
- Suma (TD): es la suma de todas las diferencias anteriores.

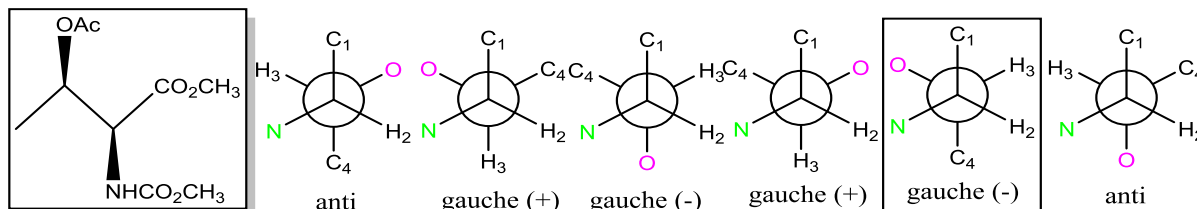
A continuación se presentan las tablas comparativas de los valores de las constantes de acoplamiento experimentales con los valores calculados para cada conformero de las configuraciones *anti* y *sin* para cada modelo. En naranja se representan las constantes de acoplamiento junto a su valor experimental. Los valores teóricos de las constantes de acoplamiento se representan de color verde para los conformeros *anti* y azul para los *sin*. Destacando en color rosa el conformero que más se ajusta al valor experimental.

Tabla 9. Comparación de las constantes de acoplamiento experimentales para el modelo **N-OAc** *anti* con las calculadas de los seis conformeros alternados posibles empleando el funcional de Seriani fijando el ángulo de la amida 180°.



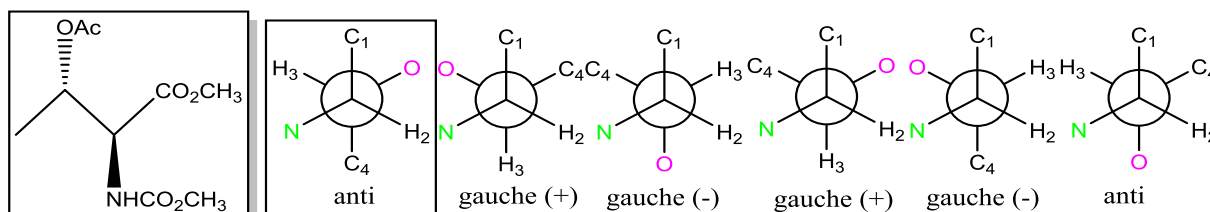
ANTI		ANTI						SIN					
<i>J</i>	EXP anti	anti	AD	g(+)	AD	g(-)	AD	g(+)	AD	g(-)	AD	anti	AD
³ <i>J</i> (H2,H3)	3.7	11.1	7.4	4.6	0.9	4.5	0.8	6.3	2.6	15	11.3	11	7.3
³ <i>J</i> (C1,H3)	3	2.6	0.4	9.8	6.8	0.1	2.9	8.7	5.7	1.9	1.1	2.2	0.8
³ <i>J</i> (C4,H2)	3.7	3.9	0.2	0.9	2.8	5.7	2	5.5	1.8	1.7	2	3.1	0.6
² <i>J</i> (C2,H3)	-2.1	-3.1	1	-3.9	1.8	1	3.1	-2.1	0	2.3	4.4	-2.2	0.1
² <i>J</i> (C3,H2)	-4.6	-5.8	1.2	-0.5	4.1	-6.1	1.5	-5.1	0.5	0.04	4.64	-5.7	1.1
TD			10.2		16.4		10.3		10.6		23.4		9.9
AD			2.04		3.28		2.06		2.12		4.69		1.98

Tabla 10. Comparación de las constantes de acoplamiento experimentales para el modelo **N-OAc sin** con las calculadas de los seis conformeros alternados posibles empleando el funcional de Seriani fijando el ángulo de la amida 180°.



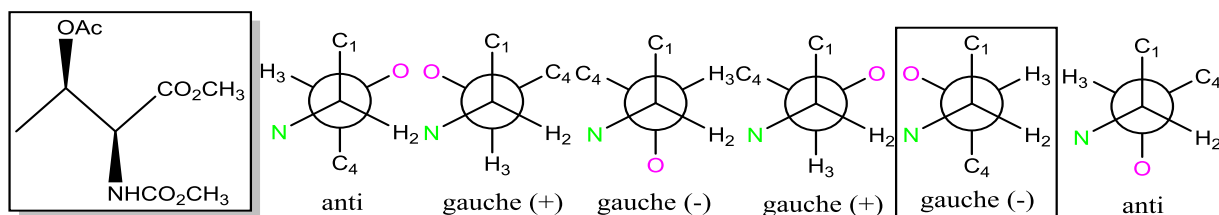
<i>J</i>	EXP sin	ANTI						SIN					
		anti	AD	g(+)	AD	g(-)	AD	g(+)	AD	g(-)	AD	anti	AD
³ <i>J</i> (H2,H3)	2.4	11.1	8.7	4.6	2.2	4.5	2.1	6.3	3.9	1.5	0.9	11	8.6
³ <i>J</i> (C1,H3)	3.1	2.6	0.5	9.8	6.7	0.1	3	8.7	3.2	1.9	1.2	2.2	0.9
³ <i>J</i> (C4,H2)	1.3	3.9	2.6	0.9	0.4	5.7	4.4	5.5	5	1.7	0.4	3.1	1.8
² <i>J</i> (C2,H3)	0	-3.1	3.1	-3.9	3.9	1	1	-2.1	6.3	2.3	2.3	-2.2	2.2
² <i>J</i> (C3,H2)	-2.1	-5.8	3.7	-0.5	1.6	-6.1	4	-5.1	8.4	0.04	2.14	-5.7	3.6
TD			18.6		14.8		14.5		26.8		6.94		17.1
AD			3.72		2.96		2.9		5.36		1.39		3.42

Tabla 11. Comparación de las constantes de acoplamiento experimentales para el modelo **N-OAc anti** con las calculadas de los seis conformeros alternados posibles empleando el funcional de Seriani sin fijar el ángulo de la amida.



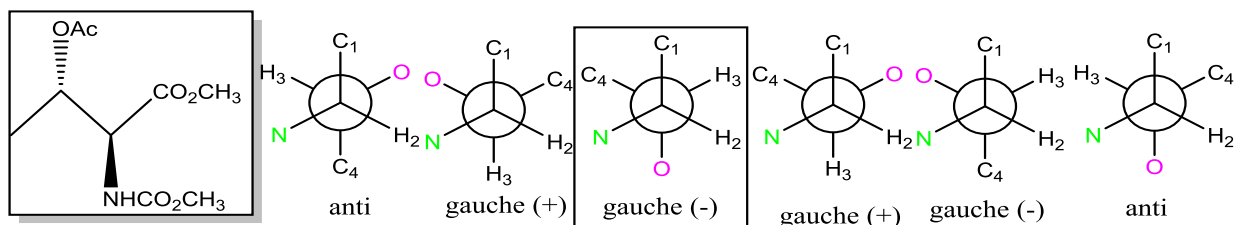
<i>J</i>	EXP anti	ANTI						SIN					
		anti	AD	g(+)	AD	g(-)	AD	g(+)	AD	g(-)	AD	anti	AD
³ <i>J</i> (H2,H3)	3.7	11.1	7.4	4.5	0.8	4.3	0.6	6.9	3.2	2.7	1	10.5	6.8
³ <i>J</i> (C1,H3)	3	2.7	0.3	9.9	6.9	0.4	2.6	8.9	3.9	1.7	1.3	1.5	1.5
³ <i>J</i> (C4,H2)	3.7	4	0.3	0.7	3	5.7	2	5.5	3.2	1.6	2.1	2.3	1.4
² <i>J</i> (C2,H3)	-2.1	-3	0.9	-3.7	1.6	1.6	3.7	-2.7	9	1.7	3.8	-3.4	1.3
² <i>J</i> (C3,H2)	-4.6	-5.9	1.3	0.7	5.3	-6.6	2	-5.1	11.5	-1.6	3	-6	1.4
TD			10.2		17.6		10.9		30.8		11.2		12.4
AD			2.04		3.52		2.18		6.16		2.24		2.48

Tabla 12. Comparación de las constantes de acoplamiento experimentales para el modelo **N-OAc sin** con las calculadas de los seis conformeros alternados posibles empleando el funcional de Seriani sin fijar el ángulo de la amida.



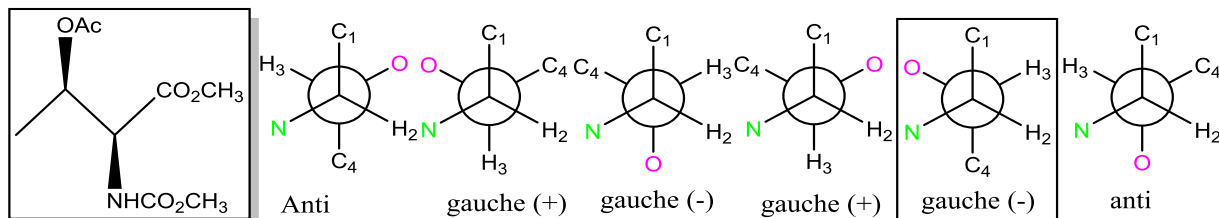
SIN <i>J</i>	EXP sin	ANTI						SIN					
		anti	AD	g(+)	AD	g(-)	AD	g(+)	AD	g(-)	AD	anti	AD
³ <i>J</i> (H2,H3)	2.4	11.1	8.7	4.5	2.1	4.3	1.9	6.9	4.5	2.7	0.3	10.5	8.1
³ <i>J</i> (C1,H3)	3.1	2.7	0.4	9.9	6.8	0.4	2.7	8.9	3.8	1.7	1.4	1.5	1.6
³ <i>J</i> (C4,H2)	1.3	4	2.7	0.7	0.6	5.7	4.4	5.5	5.6	1.6	0.3	2.3	1
² <i>J</i> (C2,H3)	0	-3	3	-3.7	3.7	1.6	1.6	-2.7	6.9	1.7	1.7	-3.4	3.4
² <i>J</i> (C3,H2)	-2.1	-5.9	3.8	0.7	2.8	-6.6	4.5	-5.1	9	-1.6	0.5	-6	3.9
TD			18.6		16		15.1		29.8		4.2		18
AD			3.72		3.2		3.02		5.96		0.84		3.6

Tabla 13. Comparación de las constantes de acoplamiento experimentales para el modelo **N-OAc anti** con las calculadas de los seis conformeros alternados posibles empleando el funcional de Seriani fijando el ángulo de la amida.



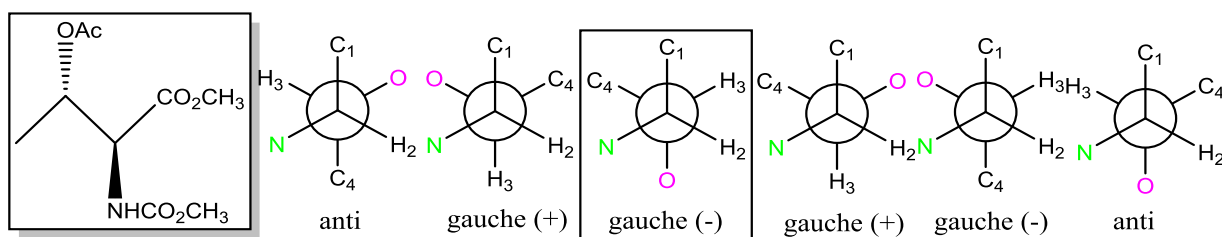
ANTI <i>J</i>	EXP anti	ANTI						SIN					
		anti	AD	g(+)	AD	g(-)	AD	g(+)	AD	g(-)	AD	anti	AD
³ <i>J</i> (H2,H3)	3.7	9.4	5.7	4.2	0.5	3.9	0.2	5.3	1.6	1.4	2.3	9.4	5.7
³ <i>J</i> (C1,H3)	3	2.4	0.6	9	6	0.06	2.94	7.8	2.3	1.7	1.3	2.1	0.9
³ <i>J</i> (C4,H2)	3.7	3.5	0.2	0.9	2.8	5.2	1.5	5.1	1.6	1.5	2.2	2.9	0.8
² <i>J</i> (C2,H3)	-2.1	-3.9	1.8	-5	2.9	-0.7	1.4	-3.3	7.4	0.6	2.7	-3.2	1.1
² <i>J</i> (C3,H2)	-4.6	-6.4	1.8	-1.9	2.7	-6.9	2.3	-6	9.9	-1.2	3.4	-6.2	1.6
TD			10.1		14.9		8.34		22.8		11.9		10.1
AD			2.02		2.98		1.668		4.56		2.38		2.02

Tabla 14. Comparación de las constantes de acoplamiento experimentales para el modelo **N-OAc** *sin* con las calculadas de los seis conformeros alternados posibles empleando el funcional de Adamo fijando el ángulo de la amida 180 grados.



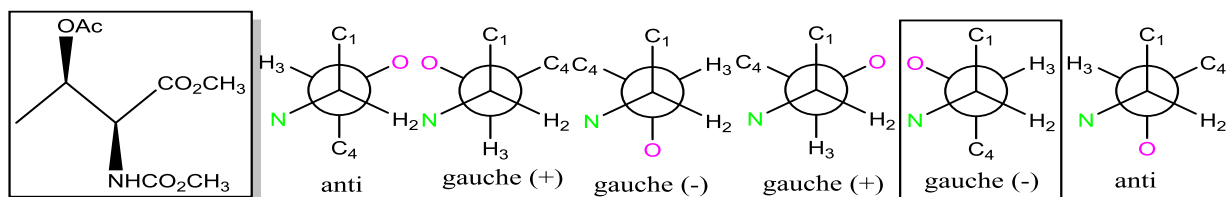
SIN		ANTI						SIN					
<i>J</i>	EXP sin	anti	AD	g(+)	AD	g(-)	AD	g(+)	AD	g(-)	AD	anti	AD
³ <i>J</i> (H2,H3)	2.4	9.4	7	4.2	1.8	3.9	1.5	5.3	2.9	1.4	1	9.4	7
³ <i>J</i> (C1,H3)	3.1	2.4	0.7	9	5.9	0.06	3.04	7.8	2.2	1.7	1.4	2.1	1
³ <i>J</i> (C4,H2)	1.3	3.5	2.2	0.9	0.4	5.2	3.9	5.1	4	1.5	0.2	2.9	1.6
² <i>J</i> (C2,H3)	0	-3.9	3.9	-5	5	-0.7	0.7	-3.3	5.3	0.6	0.6	-3.2	3.2
² <i>J</i> (C3,H2)	-2.1	-6.4	4.3	-1.9	0.2	-6.9	4.8	-6	7.4	-1.2	0.9	-6.2	4.1
TD		18.1		13.3		13.94		21.8		4.1		16.9	
AD		3.62		2.66		2.788		4.36		0.82		3.38	

Tabla 15. Comparación de las constantes de acoplamiento experimentales para el modelo **N-OAc** *anti* con las calculadas de los seis conformeros alternados posibles empleando el funcional de Adamo sin fijar el ángulo de la amida.



ANTI		ANTI						SIN					
<i>J</i>	EXP anti	anti	AD	g(+)	AD	g(-)	AD	g(+)	AD	g(-)	AD	anti	AD
³ <i>J</i> (H2,H3)	3.7	9.4	5.7	4	0.3	3.7	0	5.9	2.2	2.3	1.4	8.8	5.1
³ <i>J</i> (C1,H3)	3	2.5	0.5	9.1	6.1	0.4	2.6	8.1	2.9	1.5	1.5	1.4	1.6
³ <i>J</i> (C4,H2)	3.7	3.6	0.1	0.6	3.1	5.2	1.5	5	2.2	1.4	2.3	2.1	1.6
² <i>J</i> (C2,H3)	-2.1	-3.9	1.8	-4.9	2.8	-0.4	1.7	-3.9	8	-0.08	2.02	-4.3	2.2
² <i>J</i> (C3,H2)	-4.6	-6.4	1.8	-0.5	4.1	-7.3	2.7	-5.9	10.5	-2.7	1.9	-6.5	1.9
TD		9.9		16.4		8.5		25.8		9.12		12.4	
AD		1.98		3.28		1.7		5.16		1.824		2.48	

Tabla 16. Comparación de las constantes de acoplamiento experimentales para el modelo N-OAc *sin* con las calculadas de los seis conforméros alternados posibles empleando el funcional de Adamo *sin* fijar el ángulo de la amida.



SIN <i>J</i>	EXP <i>sin</i>	ANTI						SIN					
		anti	AD	g(+)	AD	g(-)	AD	g(+)	AD	g(-)	AD	anti	AD
³ <i>J</i> (H2,H3)	2.4	9.4	7	4	1.6	3.7	1.3	5.9	3.5	2.3	0.1	8.8	6.4
³ <i>J</i> (C1,H3)	3.1	2.5	0.6	9.1	6	0.4	2.7	8.1	2.8	1.5	1.6	1.4	1.7
³ <i>J</i> (C4,H2)	1.3	3.6	2.3	0.6	0.7	5.2	3.9	5	4.6	1.4	0.1	2.1	0.8
² <i>J</i> (C2,H3)	0	-3.9	3.9	-4.9	4.9	-0.4	0.4	-3.9	5.9	0.08	0.08	-4.3	4.3
² <i>J</i> (C3,H2)	-2.1	-6.4	4.3	-0.5	1.6	-7.3	5.2	-5.9	8	-2.7	0.6	-6.5	4.4
TD		18.1		14.8		13.5		24.8		2.48		17.6	
AD		3.62		2.96		2.7		4.96		0.496		3.52	

Como se puede ver en las tablas, empleando el funcional de Adamo a pesar de necesitar un tiempo de cálculo mucho mayor que el de Seriani, el conforméro que se obtiene en todos los casos es *gauche (-)* para la disposición *sin* y con una desviación muy pequeña en comparación con el resto de conforméros, por lo que se puede decir que es el funcional más adecuado para realizar los cálculos asumiendo un buen compromiso entre coste computacional y exactitud.

Cabe destacar que las etiquetas S y L según el método de Murata no se ajustan perfectamente a los valores teóricamente calculados empleando el Método Murata extendido, observándose un valor de constante de acoplamiento mediano en algunos casos. Esta desviación es debida a la existencia de un equilibrio conformacional entre dos formas alternadas que se escapa del objetivo de este trabajo.

5. Conclusiones

El presente trabajo realizado me ha permitido iniciarme en las tareas de investigación dentro del área de Química Orgánica, y en particular en el campo de la elucidación estructural.

A continuación se muestran los objetivos propuestos y alcanzados durante el presente Trabajo de Fin de Grado:

El primer objetivo propuesto fue el de familiarizarse con la utilización de métodos de aislamiento de productos naturales a partir de una fracción acuosa del extracto orgánico de la esponja *Ircina strobilina*. Se utilizaron métodos de separación mediante cromatografía de exclusión molecular y de purificación por HPLC empleando columnas de C18 de fase reversa. Se considera alcanzado el objetivo, ya que he utilizado columnas de gel de exclusión molecular del tipo Sephadex LH-20 y sobre todo, he conseguido un nivel básico de usuaria en el funcionamiento del HPLC. Me he familiarizado con un software de control como es el Chemstation, he aprendido a crear métodos de separación y he sido capaz de hacer cambios de columnas cromatográficas de HPLC. Además he manejado bases de datos de productos de origen marino como es Antimarin versión 7.07 y las propias de productos naturales incluidas en la aplicación de la ACS Scifinder-Scholar.

El segundo objetivo alcanzado con éxito, fue el de confirmar la estructura plana de un compuesto de naturaleza macrocíclica que se me fue asignado. Este compuesto es un metabolito secundario aislado de una esponja de la familia Haplosclerida, cuyo género y especie están siendo todavía estudiados desde un punto de vista taxonómico. He aprendido a utilizar programas de manejo de datos de RMN como son MestreNova versión 10.0 y Topspin versión 2.1. He utilizado técnicas de RMN tanto monodimensionales de protón y carbono-13, así como espectros bidimensionales tipo ^1H - ^1H COSY, HSQC y HMBC, profundizando en la técnica de RMN como herramienta para la elucidación estructural.

El tercer objetivo que se me propuso fue el de la utilización de una de las herramientas que trata de poner a punto el grupo de investigación, el análisis configuracional empleando la Química Computacional. Para ello se me encargó el estudio de la determinación de la estereoquímica relativa entre dos centros quirales adyacentes, para ello me fue necesario el aprendizaje de nociones básicas de Química

Computacional, como son el uso de funcionales de densidad (DFT) y los programas de modelización molecular, Chemdraw/Chem3D versiones 14 y Gaussian 09 versión D.01.

Finalmente, he realizado durante este TFG las siguientes actividades formativas:

- **Cursos:** Curso práctico avanzado de RMN en los Servicios de Apoyo a la Investigación. Curso impartido por el Dr. Antonio Hernández Daranas de la Universidad de La Laguna.
- **Conferencias:** XI Ciclo de Conferencias: Perspectiva da Investigación Química Actual.
- **Beca de colaboración:** del Ministerio con el mismo grupo de investigación en donde he realizado el presente Trabajo de Fin de Grado.

O presente traballo realizado permitíume iniciarme nas tarefas de investigación dentro da área de Química Orgánica, e en particular no campo da elucidación estrutural.

A continuación móstranse os obxectivos propostos e alcanzados durante o presente Traballo de Fin de Grao.

O primeiro obxectivo proposto foi o de familiarizarse coa utilización de métodos de illamento de produtos naturais a partir dunha fracción acuosa do extracto orgánico da esponxa *Ircina strobilina*. Utilizáronse métodos de separación mediante cromatografía de exclusión molecular y de purificación por HPLC empregando columnas de C18 de fase reversa. Considérase alcanzado o obxectivo, xa que utilicei columnas de exclusión molecular tipo Sephadex LH-20 e sobre todo, conseguín un nivel básico de usuaria no funcionamento de HPLC. Familiariceime con un software de control como é o Chemstation, aprendín a crear métodos de separación e fun capaz de facer cambios de columnas cromatográficas de HPLC. Ademais manexei bases de datos de produtos de orixe mariño como é Antimarin versión 7.07 e as propias de produtos naturais incluídas na aplicación da ACS Scifinder-Scholar.

O segundo obxectivo alcanzado con éxito, foi o de confirmar a estrutura plana dun composto de natureza macrocíclica que me foi asignado. Este composto é un metabolito secundario illado dunha esponxa da familia Haplosclerida, cuxo xénero e especie están sendo estudados desde un punto de vista taxonómico. Aprendín a utilizar programas de manexo de datos de RMN como son MestreNOva versión 10.0 e Topspin versión 2.1. Utilicei técnicas de RMN tanto monodimensionais de protón e carbono-13, así como espectros bidimensionais tipo ^1H - ^1H COSY, HSQC y HMBC, profundizando na técnica de RMN como ferramenta para a elucidación estrutural.

O terceiro obxectivo que se me propuxo foi o da utilización dunha das ferramentas que trata de poñer a punto o grupo de investigación, o análise configuracional empregando a Química Computacional. Para iso foime encargado o estudio da determinación da estereoquímica relativa entre dous centros quirais contiguos, para iso foime necesaria a aprendizaxe de nocións básicas de Química Computacional, como son o uso de funcionais de densidade (DFT) e os programas de modelización molecular, Chemdraw/Chem3D versións 14 e Gaussian 09 versión D.01.

Finalmente, realicei durante este TFG as seguintes actividades formativas:

- **Cursos:** Curso práctico avanzado de RMN nos Servizos de Apoio á Investigación. Curso impartido polo Dr. Antonio Hernández Daranas da Universidade La Laguna.
- **Conferencias:** XI Ciclo de Conferencias: Perspectiva da Investigación Química Actual.

Beca de colaboración: do Ministerio co mesmo grupo de investigación en donde realicei o presente Traballo de Fin de Grao.

The present work has allowed to me begin in the tasks of research inside the area of Organic Chemistry, and especially in structural elucidation field.

The proposed aims and the reached goals during the elaboration of the present “Trabajo de Fin de Grado” were the following:

The first proposed goal was the familiarization with the use of isolation methods of natural products from an aqueous fraction from the organic extract of the sponge *Ircina strobilina*. Separation methods such as molecular exclusion and purification by reverse phase HPLC have been used. This goal has been reached because I have been used molecular exclusion gel filtration columns like Sephadex LH-20 and furthermore I have got a basic level in the HPLC operation. I have familiarized with the use of Chemstation software control, I have learnt to create separation methods and also I am able to change HPLC chromatography columns in the equipment. Moreover I have handled natural products database such as Antimarin 7.07 version and ACS Scifinder-Scholar application which are specifically for natural products.

The second goal was reached successfully. In this case the planar structure of a macrocyclic compound was confirmed. This compound is a secondary metabolite from a sponge belonging to Haplosclerida family, whose species and genus have not been taxonomically determined. I have learnt how to use data management programs such as MestreNova 10.0 and Topspin 2.1. I have used advanced NMR techniques such as monodimensional (^1H and ^{13}C) as well as bidimensional experiments as ^1H - ^1H COSY, HSQC and HMBC which are powerfull tool for structural elucidation.

The third goal proposed was the use of Computational Chemistry for configurational analysis as one of the methodologies that the research group is getting to tune up. I have studied the relative stereochemistry of two adjacent chiral centers. In order to do that I have to learn basic notions of Computational Chemistry such as the use of density functionals (DFT) and the molecular modelling programs, Chemdraw/Chem3D 14 and Gaussian 09 and D.01.

Finally, I have carried out the following training activities during this TFG:

- **Course:** NMR Advanced Practical Course at the “Servicios de Apoyo a la Investigación” This course was taught by Dr. Antonio Hernández Daranas from Universidad de La Laguna.
- **Conferences:** XI Ciclo de Conferencias: Perspectiva da Investigación Química Actual.
- **Beca de colaboración del Ministerio** I was working within the same research group where I have done this “Trabajo de Fin de Grado”.

6. Bibliografía

- [1] Fattorusso, E.; Gerwick, W. H.; Tagliatela-Scafati, O. "Handbook of Marine Natural Products", Vol. 1, Springer, **2012**.
- [2] Nieto Prieto, Rosa M. Nuevos compuestos de organismos marinos farmacológicamente activos. Tesis doctoral. Facultad de Química. Universidade Da Coruña. A Coruña. **2013**.
- [3] Fenical, W.; Jensen, P. R. "Marine microorganisms: a new biomedical resource. in Pharmaceutical and Bioactive Natural Products" Springer US, **1993**, 419-457.
- [4] León, J.; Liza, L.; Soto, I.; Torres, M.; Orosco, A. *Rev. Peru Med. Exp. Salud Pública*, **2010**, 27, 215-221.
- [5] Amaro, M. E.; Liñero-Arana I. Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela, Univ. Oriente. **2002**. 45-53.
- [6] Del Valle Lanza Castillo, Vilma. Actividad biológica y metabolitos secundarios de esponjas marinas recolectadas en la bahía de Mochima, estado Sucre, Venezuela. Tesis Doctoral. Universidad de Oriente. Cumaná. **2012**.
- [7] Mohamed, N. M.; Rao, V.; Hamann, M. T.; Kelly, M.; Hill, R. T. *Appl. Environ. Microbiol.*, **2008**, 74, 4133-4143.
- [8] Epifanio R.; Gabriel R.; Martins D.; Muricy G. *J. Chem. Ecol.* **1999**, 25, 2247-2254.
- [9] Marsault, E.; Peterson, M. L. *J. Med. Chem.* **2011**, 54, 1961-2004.
- [10] Viana, G. H.; Villar, J. A. F.; Alves, R. B.; Freitas. *SBQ* **2010**, 42, 1.
- [11] López Rituerto, Eva, La resonancia magnética nuclear como herramienta en el estudio y control del proceso de vinificación. Tesis Doctoral. Universidad de La Rioja. La Rioja. **2012**.
- [12] Blümich, B. "Essential NMR for Scientists and Engineers", Springer, **2005**.
- [13] Holzgrabe, U.; Deubner, R.; Schollmayer, C.; Waibel B., *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, 38, 806-812. DOI: 10.1016/j.jpba.2005.01.050
- [14] Hesse M.; Meier H.; Zeeh B.; Métodos espectroscópicos en Química Orgánica, 2^a Ed, Editorial Síntesis, **2005**.
- [15] Giménez Martínez, J.J.; Expósito López, J.M. "RMN para químicos orgánicos". Universidad de Almería, Servicio de publicaciones e Instituto de Estudios Almerienses. Almería, **1998**.
- [16] Blumich, B.; Casanova, F.; Appelt, S. *Chem. Phys. Lett.* **2009**, 477, 231-240.
- [17] Karplus, M. J. *Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2870.

- [18] Matín-Pintado Zugasti, Nerea, Estudio mediante RMN de la estructura y estabilidad de ácidos nucleicos con furanosas modificadas. Tesis Doctoral. Facultad de Química de la Universidad Europea de Madrid. Madrid. **2013**.
- [19] Suárez D. Objetivos y características de la química computacional y su aplicación al estudio de los materiales de carbono. Boletín del Grupo Español del Carbón. **2012**, N° 25, 23-28.
- [20] D. Suárez Bol. Objetivos y características de la química computacional y su aplicación al estudio de los materiales de carbono. Grupo español Carbón. Departamento de Química Física y Analítica. Universidad de Oviedo n°25 Septiembre **2012**.
- [21] Blanco Méndez, María Aplicación de las constantes de acoplamiento a la determinación de la configuración relativa de sistemas acíclicos con oxígeno y nitrógeno en disposición relativa 1,3. Trabajo fin de Máster. Facultad de Química. Universidade da Coruña. A Coruña **2009**.
- [22] Matsumori, N.; Kaneno, D.; Murata, M.; Nakamura, H.; Tachibana, K. *J Org. Chem.* **1999**, 64, 866.
- [23] Bifulco, G.; Bassarello, C.; Riccio, R.; Gomez-Paloma, L. *Org. Lett* **2004**, 6, 1025.
- [24] Foresman J. B.; Frisch A. Exploring Chemistry with electronic Structure Methods 2ª Ed. Gaussian Inc., Pittsburgh, **1996**.
- [25] www.reefguide.org/keys/pixhtml/blackball3.html Fecha de entrada 24 de Enero de 2015.
- [26] Nieto, M. I.; González, N.; Rodríguez, J.; Kerr, R. G.; Jiménez, C. *Tetrahedron*, **2006**, 62, 11747-11754.
- [27] ChemBioDraw ultra 14.0.
- [28] Gaussian 09. Versión D.01 GaussView 5.0.8.
- [29] Hu, X.; Carmichael, I.; Serianni, A.S. *J. Org. Chem.* **2010**, 75, 4899-4910.
- [30] Zhu Y.; Pan Q.; Thibaudeau C.; Zhao S.; Carmichael I.; Serianni A.S. *J. Org. chem.* **2006**, 71, 470.