



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y ANÁLISIS  
CONFORMACIONAL DE 6-HEPTENIL-5,6-DIHIDRO-2H-PIRAN-2-  
ONAS DE ORIGEN VEGETAL**

TESIS  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA

M. en C. GLORIA ALEJANDRA SUÁREZ ORTIZ

TUTOR: DR. ROGELIO PEREDA MIRANDA  
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

COMITÉ TUTOR

DR. GABRIEL EDUARDO CUEVAS GONZÁLEZ-BRAVO,  
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

DR. CARLOS MARTIN CERDA GARCÍA-ROJAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE  
ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

MÉXICO D.F., JUNIO 2013



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **JURADO ASIGNADO**

Presidente	Dr. Gabriel Eduardo Cuevas González-Bravo
Vocal	Dr. José Federico del Río Portilla
Vocal	Dr. Ricardo Reyes Chilpa
Vocal	Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa
Secretario	Dr. Enrique Ramón Ángeles Anguiano

Sitio donde se desarrolló el tema:

Departamento de Farmacia, Laboratorio 123.

Facultad de Química.

Universidad Nacional Autónoma de México.

Asesor: Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda.

Sustentante: Gloria Alejandra Suárez Ortiz.

## AGRADECIMIENTOS

- **Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por la beca otorgada durante el periodo de febrero de 2009 a enero de 2013 con el número de becario 226766.
- **Al Departamento de Supercómputo de la Dirección General de Servicios de Cómputo Académico, UNAM** por la asignación de recursos computacionales para realizar los estudios de modelado molecular.
- **A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM (proyecto IN212813) y al CONACYT (proyecto 104887)** por el financiamiento parcial de esta investigación.
- **Al Dr. Rogelio Pereda Miranda** por haberme dado la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación, por su apoyo, disposición y dedicación en la dirección de esta investigación.
- **Al Dr. Carlos Martin Cerda García-Rojas del Departamento de Química del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional** por la asesoría prestada para el desarrollo de los cálculos de modelado molecular y la determinación de las rotaciones ópticas.
- **A los Drs. Gabriel Eduardo Cuevas González-Bravo y Carlos Martin Cerda García-Rojas**, miembros de mi comité tutelar, por su apoyo y observaciones durante la realización de esta investigación.
- **A la M. en C. Rosa Isela del Villar de la Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación (USAI), Facultad de Química, UNAM** por el registro de los espectros de Resonancia Magnética Nuclear.

- **A la M. en C. Georgina Duarte Lisci y a la Q.F.B. Margarita Guzmán Villanueva de la Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación (USAI) Facultad de Química, UNAM** por el registro de los espectros de masas.
- **A los miembros del Jurado** por sus aportes para mejorar y enriquecer el contenido de este manuscrito.
- **A la Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano** por la asistencia técnica en los procedimientos cromatográficos.
- **A mis Amigos** por todos los momentos compartidos, su apoyo y amistad
- **A la Universidad Nacional Autónoma de México** por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de Doctorado así como la formación y las condiciones necesarias para llegar hasta este momento.

## ***DEDICATORIA***

***A mi madre Gloria Ortiz, mis hermanas y sobrinos  
Por estar siempre a mi lado y por su apoyo incondicional***

***A toda mi Familia***

***La distancia no es obstáculo para llevarlos siempre en mi mente y en mi corazón***

***A Manuel Amézquita***

***Por su amor incondicional, consejos y apoyo a lo largo de este camino.***

**ABSTRACT**

The configurational and conformational behavior of bioactive principles requires an accurate description of their three-dimensional properties thus permitting visualization and understanding of the possible interactions with target biomolecules. A relevant group of cytotoxic compounds comprises the polyacylated-6-heptenyl-5,6-dihydro-2*H*-pyran-2-ones, taxonomically relevant bioactive metabolites of the family (Lamiaceae), containing an  $\alpha,\beta$ -unsaturated  $\delta$ -lactone, which confers properties as alkylating agents. It is known from previous studies that these compounds interact with the thiol groups of proteins by a Michael addition reaction to the lactone ring. However, the pharmacophore's conformational requirements and, in some cases, the absolute configuration of the stereogenic centers in the flexible side chain have not been established.

The present dissertation describes the isolation, purification, and structural characterization of the polyacylated 6-heptyl-5,6-dihydro- $\alpha$ -pyrones obtained from *Hyptis spicigera* and *Hyptis brevipes* (Lamiaceae). These compounds were purified by preparative reversed-phase HPLC through application of the recycling technique. From *Hyptis spicigera*, three compounds previously reported were obtained and are known: as 5'-epi-olguine (**1**), 5-deacetoxy-5'-epi-olguine (**2**) y *R*-[5*R*,6*S*-(diacetyloxy)-1*R*-(hydroxy)-2*R*-(methoxy)-3*E*-heptenyl]-5,6-dihydro-2*H*-pyran-2-one (**3**).

Nine 6-heptyl-5,6-dihydro- $\alpha$ -pyrones were isolated from *Hyptis brevipes*. Three of them with known structures were identified as brevipolides G-I (**4-6**), all of which shared a cyclopropane moiety in their structure. A new compound (**7**) with the same skeletal framework but different substituents was also purified. In addition, five additional compounds were isolated with a novel structure, sharing a 6-heptyl-5,6-dihydro-2*H*-pyran-2-one framework with a tetrahydrofuran moiety (**8-12**).

The absolute configuration and conformational behavior of these compounds were ascertained by circular dichroism, chemical correlation, and X-ray diffraction; in conjunction, with a molecular modeling protocol which includes extensive conformational searching, geometry optimization by DFT B3LYP/DGDZVP calculations, as well as comparison between the theoretical (DFT) and experimental  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NMR coupling constants.

Furthermore, the isolated compounds were evaluated against six human carcinoma cell lines: (KB, Hep-2, HCT-15, HeLa, MCF-7, and PC-3). All of them displayed moderate cytotoxicity against nasopharyngeal cancer cells (KB) with  $\text{IC}_{50}$  values of 0.3-8.0  $\mu\text{g/mL}$ .



## RESUMEN

El comportamiento conformacional de los principios bioactivos requiere una descripción exacta de sus propiedades tridimensionales y, por lo tanto, del establecimiento de su configuración absoluta, permitiendo así la comprensión de las posibles interacciones con biomoléculas. Un grupo importante de compuestos citotóxicos son las 6-heptenil-5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas de la familia Lamiaceae, las cuales contienen un anillo de  $\delta$ -lactona  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturado que les confiere propiedades como agentes alquilantes. Se sabe por estudios previos, que este tipo de compuestos interaccionan con los grupos tiol de las proteínas mediante una reacción de adición tipo Michael 1,4 al anillo lactónico. Sin embargo, el blanco molecular específico, los requisitos conformacionales del farmacóforo y en algunos casos, la configuración absoluta de los centros estereogénicos en la cadena lateral flexible no se han establecido.

La presente disertación describe el aislamiento, la purificación, la caracterización estructural y el análisis conformacional de compuestos polioxigenados obtenidos de las especies *Hyptis spicigera* e *Hyptis brevipes*. La purificación de las 6-heptil-5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas obtenidas de estas dos especies se realizó utilizando cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE), utilizando la técnica de corte y reciclaje de núcleo. A partir de la especie *Hyptis spicigera* se obtuvieron tres compuestos previamente descritos y conocidos como la 5'-epi-olguina (**1**), la 5-desacetoxi-5'-epi-olguina (**2**) y la *R*-[5*R*,6*S*-(diacetiloxi)-1*R*-(hidroxi)-2*R*-(metoxi)-3*E*-heptenil]-5,6-dihidro-2*H*-piran-2-ona (**3**).

Del extracto clorofórmico obtenido de las partes aéreas de la especie *Hyptis brevipes* se aislaron nueve compuestos con un núcleo de 6-heptil-5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona. Tres de ellos con una estructura conocida e identificada como las brevipólidas **G-I** (**4-6**), los cuales contienen un anillo de ciclopropano en su estructura; un compuesto nuevo con el mismo esqueleto (**7**) pero mostrando un patrón de sustitución diferente. También, se aislaron

cinco compuestos con una estructura inédita en la literatura, estos compuestos presentan un anillo de tetrahydrofurano en su esqueleto (**8-12**).

La configuración absoluta de estos compuestos se estableció mediante el registro de sus propiedades quirópticas (dicroísmo circular), correlación química, difracción de rayos X y el análisis de las constantes de acoplamiento  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  en resonancia magnética nuclear. También, se realizó un análisis conformacional para confirmar la configuración absoluta de las cadenas flexibles de heptenilo polifuncionalizadas, que sustituyen la posición C-6 de estas 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas, a través de la aplicación de un protocolo de modelado molecular. Esta aproximación incluyó una extensa búsqueda conformacional y la optimización de la energía para cada uno de los conformeros analizados utilizando el método de DFT B3LYP/DGDZVP que permitió la comparación teórica (DFT) y experimental (RMN) de las constantes de acoplamiento vecinales  $^3J_{\text{H-H}}$ .

Por último, se evaluó el potencial citotóxico de los compuestos aislados utilizando un panel de seis líneas celulares derivadas de tumores humanos. Todos los compuestos ensayados presentaron una citotoxicidad moderada en contra de la línea celular de carcinoma nasofaríngeo (KB) con valores que van  $\text{IC}_{50}$  0.3-8.0  $\mu\text{g/mL}$ .

---

## TABLA DE CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2 ANTECEDENTES</b> .....	3
2.1 Generalidades de la familia Lamiaceae .....	3
2.2 Género <i>Hyptis</i> .....	4
2.2.1 <i>Hyptis spicigera</i> Lam. ....	6
2.2.2 <i>Hyptis brevipes</i> Poit. ....	7
2.1 Metabolitos secundarios del genero <i>Hyptis</i> .....	9
2.1.1 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas. ....	12
2.2 Modelado molecular .....	22
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	26
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	27
4.1 Objetivo general .....	27
4.2 Objetivos específicos .....	27
<b>5. PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	28
5.1 Procedimientos cromatográficos .....	28
5.2 Determinación de las constantes físicas .....	29
5.3 Material vegetal .....	29
5.3.1 Obtención de los extractos .....	30
5.4 Fraccionamiento primario del extracto ( <i>H. spicigera</i> ) .....	31
5.5.1 Purificación de las fracciones .....	31
5.5 Fraccionamiento primario del extracto ( <i>H. brevipes</i> ) .....	34
5.5.1 Purificación de las fracciones .....	35
5.6 Reacción de hidrogenación .....	39
5.7 Preparación de diazometano .....	41
5.7.1 Metilación de la brevipólida G .....	41
5.8 Preparación de ésteres de Mosher .....	41
5.9 Hidrólisis de los compuestos 13 y 14 .....	43
5.10 Análisis de modelado molecular .....	44
5.11 Ensayo de citotoxicidad .....	47
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	49

---

6.1	Estudio químico de <i>Hyptis spicigera</i> .....	49
6.1.1	Aislamiento y purificación de los compuestos 1-3 .....	50
6.2	Estudio químico de <i>Hyptis brevipes</i> .....	52
6.2.1	Aislamiento y purificación .....	53
6.2.2	Caracterización de los compuestos 4-7 .....	56
6.2.3	Caracterización de los compuestos 8-12 .....	66
6.3	Análisis conformacional de 6-alquenil-5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas .....	82
6.3.1	Sinargentólida A.....	82
6.3.2	5'-epi-olguina y 5-desacetoxi-5'-epi-olguina.....	87
6.3.3	Brevipólidas. ....	91
6.4.	Evaluación de Citotoxicidad. ....	100
<b>7.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>102</b>
<b>10.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>104</b>
<b>11.</b>	<b>APÉNDICES</b> .....	<b>115</b>

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
AcOEt	Acetato de etilo
COSY	Correlation Spectroscopy
CLAE	Cromatografía líquida de alta eficiencia
$\delta$	Desplazamiento químico
D	Doblete
Dd	Doble de doble
Ddd	Doble de doble de doble
DFT	Density Functional Theory
DC	Dicroísmo circular
DOR	Dispersión óptica rotatoria
DMAP	4-Dimetilaminopiridina
DEPTQ	Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer including the detection of Quaternary nuclei
GIAO	Gauge-Including Atomic Orbital
HRMS-FAB <sup>+</sup>	Espectrometría de masas de alta resolución Bombardeo de átomos rápidos en modo positivo
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
HETCOR	Heteronuclear Correlation
Hz	Hertz
IC <sub>50</sub>	Concentración inhibidora media
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
$\lambda$	Longitud de onda
m/z	Relación masa carga
MMFF	Molecular Mechanics Force Field

---

MeOH	Metanol
Me <sub>2</sub> CO	Acetona
MeCN	Acetonitrilo
MeONa	Metóxido de sodio
Nm	Nanometros
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
p.f.	Punto de fusión
Ppm	Partes por millón
RMN	Resonancia magnética nuclear
RMN <sup>13</sup> C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
RMN <sup>1</sup> H	Resonancia Magnética nuclear de hidrógeno
T	Triplete
t <sub>R</sub>	Tiempo de retención

---

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Morfología de la especie <i>Hyptis spicigera</i> .....	6
<b>Figura 2.</b> Morfología de la especie <i>Hyptis brevipes</i> <i>Poit.</i> .....	8
<b>Figura 3.</b> Estructuras de diterpenos aislados del género <i>Hyptis</i> . .....	10
<b>Figura 5.</b> Estructuras de triterpenos aislados del género <i>Hyptis</i> .....	11
<b>Figura 6.</b> Anillo de $\delta$ -lactona $-\alpha,\beta$ -insaturado.....	12
<b>Figura 7.</b> Pironetina. ....	13
<b>Figura 8.</b> Ejemplos de 6-heptenil-5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas de origen vegetal.....	15
<b>Figura 10.</b> Compuestos aislados de <i>Discodermia dissoluta</i> .....	17
<b>Figura 11.</b> Ácido parasorbico. ....	19
<b>Figura 12.</b> Incorporación de $^{13}\text{C}$ -acetato en la biosíntesis de la aspirona.....	20
<b>Figura 13.</b> Biosíntesis de psitolina a partir de fenilalanina. ....	21
<b>Figura 14.</b> Incorporación de precursores. ....	22
<b>Figura 15.</b> Estudio conformacional de la espicigerólida y siete de sus estereoisómeros. ....	25
<b>Figura 16.</b> Estructuras de partida para el análisis conformacional. ....	45
<b>Figura 17.</b> 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas de <i>Hyptis spicigera</i> .....	49
<b>Figura 22.</b> Cromatograma de líquidos a nivel preparativo de la fracción X-4.....	54
<b>Figura 23.</b> Cromatograma de líquidos a nivel preparativo de la fracción XII-7 .....	55
<b>Figura 24.</b> Purificación del pico <b>VII</b> , a través de la técnica “rasurado de pico” y “reciclaje de muestra” .....	55
<b>Figura 25.</b> Cromatograma de líquidos a nivel preparativo de la fracción <b>XV-6</b> . ....	56
<b>Figura 26.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ del compuesto <b>7</b> en $\text{CDCl}_3$ (300 MHz). ....	59
<b>Figura 27.</b> Espectro DEPTQ-135 del compuesto <b>7</b> en $\text{CDCl}_3$ (300 MHz). ....	59
<b>Figura 28.</b> Correlaciones homo y heteronuclear observadas para el compuesto <b>7</b> .....	61
<b>Figura 29.</b> Espectro de dicroísmo circular para los compuestos <b>4-7</b> .....	62
<b>Figura 30.</b> Conformaciones posibles para el núcleo de 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona que determinan el signo del efecto Cotton establecido por la regla de Sneath ..... 62	62
<b>Figura 31.</b> Reacción de hidrogenación. ....	63
<b>Figura 32.</b> Reacción de saponificación.....	64
<b>Figura 33.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ de los ésteres <i>R</i> - y <i>S</i> -MTPA del compuesto hidrogenado <b>13</b> en $\text{CDCl}_3$ (300 MHz). ....	64
<b>Figura 35.</b> Diagrama ORTEP del compuesto <b>4</b> . ....	65
<b>Figura 36.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ del compuesto <b>8</b> en $\text{CDCl}_3$ (300 MHz). ....	66
<b>Figura 38.</b> Correlaciones homo y heteronuclear observadas para el compuesto <b>8</b> .....	68

---

<b>Figura 39</b>	Correlaciones NOE observadas para el compuesto <b>8</b> .	69
<b>Figura 40</b>	Espectro NOESY del compuesto <b>8</b> en CDCl <sub>3</sub> .	69
<b>Figura 41</b>	Espectro HETCOR del compuesto <b>9</b> en CDCl <sub>3</sub> .	71
<b>Figura 42</b>	Espectro de RMN <sup>1</sup> H del compuesto <b>10</b> en CDCl <sub>3</sub> (300 MHz).	72
<b>Figura 43</b>	Espectro de dicroísmo circular para los compuestos <b>8-12</b> .	76
<b>Figura 44</b>	Reacción de hidrogenación para los compuestos <b>8-11</b> .	77
<b>Figura 45</b>	Modelo de correlación configuracional para los ésteres ( <i>R</i> ) y ( <i>S</i> )-MTPA.	78
<b>Figura 47</b>	Valores de $\Delta\delta$ ( $\delta_{S-MTPA} - \delta_{R-MTPA}$ ) para los ésteres de Mosher del compuesto <b>9</b> .	79
<b>Figura 48</b>	Proyección para el éster de Mosher del compuesto <b>9</b> .	80
<b>Figura 49</b>	Posibles estereoisómeros de la sinargentólida A.	83
<b>Figura 50</b>	Comparación del error medio cuadrático para las constantes de acoplamiento calculadas (DFT) y experimentales para los estereoisómeros de la sinargentólida A.	85
<b>Figura 51</b>	Confórmeros de mínima energía y su participación ( $P = \%$ ) en la población de Boltzman para el estereoisómero <b>18d</b> de la sinargentólida A.	86
<b>Figura 52</b>	Espectro de.....	87
<b>Figura 54</b>	RMN <sup>1</sup> H (a) experimental y (b) simulado: 5'-epiolguina ( <b>1</b> ).	90
<b>Figura 55</b>	RMN <sup>1</sup> H (a) experimental y (b) simulado: 5-desacetoxi-5'-epiolguina ( <b>2</b> ).	91



---

---

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Usos etnofarmacológicos del género <i>Hyptis</i> .....	4
<b>Cuadro 2.</b> Peso de los extractos obtenidos .....	30
<b>Cuadro 3.</b> Fraccionamiento primario del extracto $\text{CHCl}_3$ de las partes aéreas de <i>Hyptis spicigera</i> .....	31
<b>Cuadro 4.</b> Fraccionamiento primario del extracto de <i>Hyptis brevipes</i> .....	35
<b>Cuadro 5.</b> Desplazamientos químicos de RMN de $^1\text{H}$ (300MHz) y $^{13}\text{C}$ (75MHz) para los compuestos <b>4-7</b> en $\text{CDCl}_3$ .....	60
<b>Cuadro 6.</b> Desplazamientos químicos de RMN de $^1\text{H}$ (300MHz) para los compuestos <b>8-12</b> tomados en $\text{CDCl}_3$ .....	74
<b>Cuadro 7.</b> Desplazamientos químicos de RMN de $^{13}\text{C}$ (75MHz) para los compuestos <b>8-12</b> tomados en $\text{CDCl}_3$ .....	75
<b>Cuadro 8.</b> Desplazamiento químico RMN $^1\text{H}$ de las señales diagnósticas de los derivados de éster (S)- y (R)-MTPA del compuesto <b>9</b> y el derivado hidrogenado <b>13</b> .....	81
<b>Cuadro 10.</b> Correlación entre las constantes de acoplamiento del producto natural 5'-epiolguina y los datos teóricos de <b>1</b> y <b>1a</b> .....	88
<b>Cuadro 11.</b> Correlación entre las constantes de acoplamiento del producto natural 5-desacetoxi-5'-epiolguina y los datos teóricos de <b>2</b> y <b>2a</b> . ....	89
<b>Cuadro 13.</b> DFT B3LYP/DGDZVP energía libre, <sup>a</sup> población <sup>b</sup> y comparación entre las constantes de acoplamiento $J\ ^1\text{H}-^1\text{H}^c$ calculadas por DFT y las experimentales para la brevipólida I ( <b>4</b> ). ....	93
<b>Cuadro 14.</b> DFT B3LYP/DGDZVP energía libre, <sup>a</sup> población <sup>b</sup> y comparación entre las constantes de acoplamiento $J\ ^1\text{H}-^1\text{H}^c$ calculadas por DFT y las experimentales para la brevipólida H ( <b>5</b> ). ....	94
<b>Cuadro 15.</b> Valores obtenidos para la transición electrónica de más baja energía $n\rightarrow\pi^*$ para el compuesto <b>4</b> y su epímero hipotético en C6'(R) utilizando DFT-B3LYP/DGDZVP.....	97
<b>Cuadro 16.</b> DFT B3LYP/DGDZVP energía libre, <sup>a</sup> población <sup>b</sup> y comparación entre las constantes de acoplamiento $J\ ^1\text{H}-^1\text{H}^c$ calculadas por DFT y las experimentales para la brevipólida K ( <b>8</b> ). ....	98
<b>Cuadro 17.</b> Valores obtenidos para la transición electrónica de más baja energía $n\rightarrow\pi^*$ para el compuesto <b>8</b> utilizando DFT- B3LYP/DGDZVP.....	100

## 1. INTRODUCCIÓN

El uso de las plantas medicinales para el tratamiento de enfermedades ha aumentado considerablemente en todo el mundo. La evaluación de los extractos provenientes de plantas superiores y microorganismos continúa representando una alternativa para el descubrimiento de nuevos agentes terapéuticos de interés clínico en el tratamiento de enfermedades neoplásicas y, sobre todo, para aquellos casos de tipo refractario como el cáncer de mama, pulmón, colon y próstata. El descubrimiento de compuestos novedosos permite la caracterización química de principios biodinámicos con una alta actividad biológica, una especificidad en su mecanismo de acción y, por lo tanto, con menor toxicidad.

A través del tiempo, las plantas de la familia Lamiaceae (Labiatae) se han usado como recursos naturales importantes debido a su empleo en la medicina y la agricultura tradicional. Algunas especies de esta familia se emplean como condimentos, e.g., el orégano (*Ocimum basilicum*), saborizantes como la menta (*Mentha piperita*) y como perfumes, e.g., la lavanda (*Lavandula angustifolia*).<sup>1</sup> En la medicina tradicional, numerosas especies de labiadas se utilizan frecuentemente en remedios caseros para el tratamiento de malestares gastrointestinales, debido a la actividad antibacteriana, antiviral, carminativa y espasmolítica de sus aceites esenciales.<sup>1</sup>

Los miembros del género *Hyptis* al igual que todos los miembros de esta familia, poseen un número significativo de compuestos con actividad citotóxica de posible interés terapéutico, misma que ha sido demostrada mediante numerosas evaluaciones biológicas realizadas a diferentes especies de este género.<sup>2</sup> El género *Hyptis* se encuentra conformado por un gran número de especies de gran importancia económica y medicinal en la vida diaria de México. Un programa destinado a establecer el potencial citotóxico de algunas de estas especies, útiles en la medicina tradicional mexicana, demostró la presencia de compuestos antineoplásicos potentes ( $CE_{50} < 1 \mu\text{g/mL}$ ) caracterizados

como 6-poliaciloxialquenil-5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas. Estas investigaciones demostraron un efecto citotóxico específico de estos principios para los carcinomas de colon y ovario.<sup>2,3</sup>

En el presente proyecto, se dio continuidad a la búsqueda de nuevos agentes citotóxicos de origen vegetal a partir de dos miembros del género *Hyptis* (*H. spicigera*, *H. brevipes*), cuya distribución corresponde al territorio nacional. Este trabajo hace una descripción detallada del aislamiento, la purificación, la caracterización y el análisis conformacional de las 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas obtenidas de estas especies.

## 2 ANTECEDENTES

### 2.1 Generalidades de la familia Lamiaceae

La familia se conoce, desde un punto de vista botánico, con los nombres latinos de Labiatae (por la presencia de labios en sus flores) o Lamiaceae (por el nombre del género tipo de esta familia, *Lamium*). La familia se divide en varias subfamilias y tribus de las cuales la subfamilia Nepetoideae agrupa la mayoría de los géneros. Las labiadas están estrechamente relacionadas con la familia Verbenaceae; recientes estudios filogenéticos han demostrado que algunos géneros clasificados en Verbenaceae pertenecen a la familia Lamiaceae, por ejemplo, *Vitex* y *Clerodendrum*. La familia Lamiaceae se compone de aproximadamente 250 géneros y 6700 especies.<sup>3</sup> *Salvia* es el género más grande de esta familia que representa más o menos a 1000 especies que difieren notablemente en su morfología.<sup>4,5</sup>

Las labiadas son una familia de plantas aromáticas constituida principalmente por hierbas o arbustos (rara vez árboles como en *Hyptidendron* o *Lepechinia*), provistas en todas sus partes de glándulas secretoras de aceites esenciales volátiles (que son muy variados en esta familia). Los tallos son cuadrangulares y las hojas siempre opuestas; las inflorescencias son terminales o laterales, de aspecto racemoso (espigas o panículas). Son plantas cosmopolitas que se distribuyen en los trópicos, subtropicos y en las zonas templadas del mundo, abarcando desde el Mediterráneo hasta el centro de Asia, América, las islas del Pacífico, África tropical y China. En México, la familia está representada por más de 512 especies y 27 géneros que pertenecen a seis tribus. La tribu más diversa es *Menthae* con 11 géneros; sin embargo, la tribu *Alviae*, representada por dos géneros (*Monarda* y *Salvia*) es la que presenta mayor riqueza en número de especies, contribuyendo con el 64% del total de las labiadas en México.<sup>6</sup> En particular, el género *Hyptis* comprende varias especies de gran importancia en la medicina tradicional mexicana,<sup>3</sup> conteniendo más de 250 especies con su centro de origen y diversificación en las tierras altas brasileñas, siendo el límite boreal en su distribución el

sur de los Estados Unidos. El género se encuentra dividido en 27 secciones y en México se encuentran ocho secciones que agrupan 33 especies de las cuales sólo 22 especies son endémicas del país. En México, este género se distribuye principalmente en las partes tropicales del sur y a lo largo de ambas costas del territorio nacional.<sup>6</sup>

## 2.2 Género *Hyptis*

El género *Hyptis* es rico en especies de gran importancia económica y etnofarmacológica, cuyo conocimiento se ha transmitido de generación en generación hasta el día de hoy. Estas especies tienen diversos usos medicinales en diferentes países como Brasil, México, India, China, Ecuador, Tailandia, Caribe, Panamá, Nigeria, entre otros.<sup>7</sup> En el Cuadro 1 se resumen los usos etnofarmacológicos de algunas especies pertenecientes al género *Hyptis*.

**Cuadro 1.** Usos etnofarmacológicos del género *Hyptis*

Especie	Usos etnofarmacológicos
<i>H. suaveolens</i>	<p><b>India:</b> El té hecho de las raíces se usa como un aperitivo por sus propiedades estomacales.<sup>8,9</sup></p> <p><b>México:</b> Se utiliza para curar afecciones intestinales. Contra el estreñimiento y la bilis.<sup>10</sup></p> <p><b>Cuba:</b> Se usa como estimulante y carminativo.<sup>11</sup></p>
<i>H. capitata</i>	<p><b>China y Tailandia:</b> Se usa contra los resfriados, la fiebre y el asma.<sup>12,13</sup></p> <p><b>Ecuador:</b> Se usa para curar enfermedades fúngicas.<sup>13</sup></p> <p><b>Colombia:</b> Se utiliza como hemostático y para curar heridas.<sup>14</sup></p>
<i>H. verticillata</i>	<p><b>México:</b> Toda la planta se hierva y se frota sobre la piel para el tratamiento de reumatismo y las infecciones de la piel. Tiene propiedades expectorantes, se utiliza por los indígenas de Oaxaca para tratar infecciones gastrointestinales.<sup>15</sup></p> <p><b>África y el Caribe:</b> Se usa para controlar la fiebre y los resfriados.<sup>16</sup></p>
<i>H. pectinata</i>	<p><b>África occidental:</b> Se utiliza como planta medicinal por sus propiedades antibacterianas y antifúngicas.<sup>17</sup></p> <p><b>México:</b> Se utiliza para tratar infecciones de la piel, la nasofaringitis, la congestión pulmonar y para los trastornos gastrointestinales.<sup>15,18</sup></p>

<i>H. mutabilis</i>	<p><b>México:</b> Se utiliza para tratar trastornos gastrointestinales y malaria.<sup>19</sup></p> <p><b>Brasil:</b> Se usan las hojas frescas de té en la reparación de la mucosa del útero, para tratar gastritis, úlceras gástricas, infecciones de la piel y conjuntivitis.<sup>20</sup></p> <p><b>Colombia:</b> Se utiliza para el tratamiento del paludismo, la infusión de las hojas y flores se utiliza contra dolores estomacales y flatulencias.<sup>14</sup></p> <p><b>Argentina:</b> Se utilizan las hojas contra parásitos intestinales. La raíz se emplea para detener la menstruación excesiva y en combinación con otras plantas para estimular el apetito.<sup>14</sup></p>
<i>H. albida</i>	<p><b>México:</b> Se usa para el tratamiento de las enfermedades del tracto gastrointestinal y como repelente de insectos; la medicina popular la utiliza por sus propiedades antisépticas.<sup>15,21</sup></p>

El género *Hyptis* cuenta con un gran número de especies utilizadas en la medicina tradicional mexicana como remedios caseros para el tratamiento de malestares gastrointestinales e infecciones de la piel, así como para tratar dolores reumáticos, musculares y calambres. Sin embargo, todas las especies comparten su uso como agentes carminativos y antisépticos.<sup>3</sup>

En México, un estudio destinado a establecer el potencial antimicrobiano y citotóxico de algunas especies medicinales del género *Hyptis*, demostró la correlación directa entre los extractos bioactivos y la presencia de principios citotóxicos. De las especies estudiadas se observó que los extractos de las especies *Hyptis pectinata* e *Hyptis verticillata* presentaban una fuerte actividad inhibitoria contra bacterias gram positivas (7-10 mm de la zona de inhibición del crecimiento) y fueron citotóxicos contra ocho líneas celulares derivadas de tumores humanos (CE<sub>50</sub> 0.3 y 4.6 µg/mL). Del estudio biodirigido del extracto de *Hyptis verticillata* se aislaron diez lignanos del tipo podofilotoxina con actividades citotóxicas no específicas (CE<sub>50</sub> < 0.01 µg/mL) y algunos de ellos fueron inhibidores de *Candida albicans* (CE<sub>50</sub> 0.2-1.0 µg/mL).<sup>22</sup> El estudio fitoquímico del extracto de *Hyptis pectinata* permitió el aislamiento de cuatro 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas (pectinólidas A-C y la hyptólida), las cuales presentaron una alta

actividad citotóxica no específica ( $CE_{50} < 4 \mu\text{g/mL}$ ) contra un panel de líneas celulares derivadas de tumores humanos.<sup>3</sup> Del estudio químico de la especie *Hyptis spicigera*, se obtuvo la spicigerólida con una mayor citotoxicidad sobre el carcinoma nasofaríngeo (KB  $CE_{50} 1.5 \mu\text{g/mL}$ ).<sup>23</sup>

### 2.2.1 *Hyptis spicigera* Lam.

*Hyptis spicigera*. se conoce popularmente como hierba de burro, tiene forma de espigas muy densas, continuas, el cáliz imbricado, de tallos generalmente ramificados y hojas ovoides. Es una maleza anual, mide de 50 cm a 1 m de altura. Las flores son muy pequeñas y montadas en inflorescencias terminales densas en forma de espiga cilíndrica, a veces discontinua en la base, y puede medir 2-10 cm de largo. Cada flor está subtendida por una frondosa bractéola lineal de 3 mm de largo y fuertemente ciliadas. El cáliz es un tubo pubescente con 5 dientes muy estrechos. Es de color blanco con manchas de color púrpura en los lóbulos, 4 estambres y el estigma justo por encima de la parte superior de la corola. En la base del estilo, hay 4 ovarios libres dando origen a una semilla.<sup>24</sup>



**Figura 1.** Morfología de la especie *Hyptis spicigera*.

Esta especie se utiliza ampliamente en la medicina tradicional mexicana, principalmente, por sus propiedades antisépticas y carminativas. Las infusiones de toda la planta se utilizan para el tratamiento de infecciones en la piel y como cicatrizante.<sup>10</sup> En África, se utiliza para condimentar los alimentos y como insecticida para controlar la infestación de las cosechas almacenadas o para repeler mosquitos quemando la planta completa.<sup>25</sup>

Un estudio de una variedad mexicana de la especie *Hyptis spicigera* demostró propiedades insecticidas las cuales fueron atribuidas a la presencia de diterpenos del tipo labdano.<sup>26</sup> Adicionalmente, estudios recientes de los aceites esenciales de esta especie demostraron resultados alentadores que sugieren la eficacia y seguridad de *Hyptis spicigera* en el tratamiento de la úlcera gástrica.<sup>27</sup>

### **2.2.2 *Hyptis brevipes* Poit.**

Es una planta erecta anual, llega alcanzar hasta 1m de altura, con el típico tronco cuadrado de las labiadas, a menudo muy peluda. Las hojas son gruesas y peludas en las dos superficies, estrechamente ovoides o lanceoladas de 5-7 cm de longitud y 2 cm de ancho, cuneadas en la base. La inflorescencia es un racimo denso globuloso de 14 mm de diámetro sobre un pedúnculo de alrededor de 1cm de longitud, en la mayoría de las axilas de las hojas. Tiene corola blanca de cinco lóbulos irregulares de 5mm de longitud. El cáliz mide 4mm de longitud, también cuenta con cinco lóbulos finamente dentados. Las semillas son ovoides de color café oscuro de 1mm de longitud, estriado con una cicatriz visible. *Hyptis brevipes* es una planta que crece en zonas de cultivo, en los bordes de los bosques, suelo húmedo, cultivos de arroz, y se ve favorecida por la humedad continua, sin estación seca prolongada.<sup>28</sup>

Es originaria de América tropical, pero en la actualidad se encuentra ampliamente distribuida en otras regiones tropicales del mundo como una especie



exótica invasora, desde hace mucho tiempo naturalizada en Indonesia. El estudio del aceite esencial de *H. brevipes* reveló que contenía cariofileno y óxido de cariofileno los cuales son responsable por sus actividades antimicrobianas. Vale la pena señalar que el aceite de *H. brevipes* se utiliza en la medicina popular para el tratamiento del asma, la malaria, la conservación de los cereales y como repelente de mosquitos.<sup>29</sup>

Los estudios biológicos en los extractos crudos de esta planta han demostrado actividades inhibitoras contra el crecimiento de bacterias y hongos, así como actividad en la intercalación al ADN.<sup>30, 31</sup>



**Figura 2.** Morfología de la especie *Hyptis brevipes* Poit.

## 2.1 Metabolitos secundarios del genero *Hyptis*

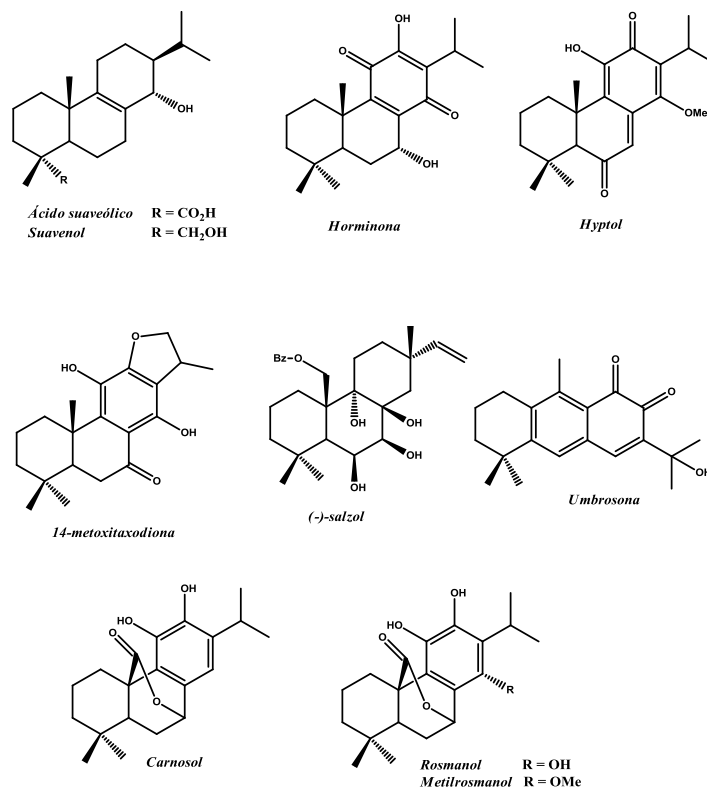
Las plantas del género *Hyptis* poseen una gran variedad de constituyentes químicos y los usos populares de estas especies son un reflejo de la amplia diversidad en su metabolismo secundario.

La especie más estudiada es *H. suaveolens*, que en muchos países es considerada como una maleza ya que cuenta con un poder de propagación elevada y una gran capacidad de resistencia a las inclemencias ambientales, por ejemplo, es capaz de regenerarse después de ser destruida por el fuego.<sup>32</sup> Es la única especie de *Hyptis* que tiene una capa de mucílago en las semillas donde se han identificado algunos glucósidos como: L-fucosa, D-xilosa, D-manosa, D-galactosa, D-glucosa y 4-O-metil-D-glucurónico.<sup>33</sup> Además de azúcares, también se han encontrado algunos aminoácidos: treonina, valina, arginina, serina, metionina, alanina, glutamina, leucina e isoleucina en los tallos; fenilalanina, glicina, triptófano, lisina y prolina en el fruto.<sup>34</sup>

El uso más difundido de las especies pertenecientes al género *Hyptis* está relacionado con sus aceites esenciales, los cuales también son obtenidos a escala industrial a partir de diferentes especies. Estos aceites son utilizados en cosméticos, saborizantes, así como insecticidas y repelentes de insectos. Estas propiedades han promovido la investigación de los constituyentes químicos identificando así una amplia gama de monoterpenos y sesquiterpenos.<sup>35</sup>

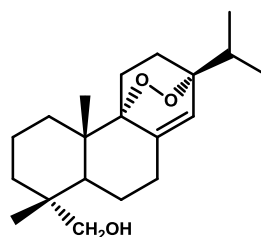
De los aceites esenciales del genero *Hyptis* se han aislado una gran variedad de compuestos encontrándose en mayor cantidad a los monoterpenos:  $\alpha$ -pineno, sabieno y los sesquiterpenos:  $\beta$ -cariofileno y  $\alpha$ -humuleno.<sup>25</sup> Los diterpenos representan uno de los componentes más abundantes en el género *Hyptis* y pueden ser del tipo abietano como: el carnosol, rosmanol, y metilrosmanol.<sup>9</sup> Dentro de este grupo también se pueden mencionar a compuestos con un esqueleto tipo isopimarano,<sup>36-37</sup> por ejemplo el (-) salzol<sup>38</sup> (**Figura 3**). De las partes aéreas de una variedad mexicana de la especie *H.*

*spicigera* se aislaron siete productos que presentan un esqueleto del tipo labdano, los cuales inhiben el crecimiento de larvas del gusano barrenador del maíz europeo.<sup>26</sup>



**Figura 3.** Estructuras de diterpenos aislados del género *Hyptis*.

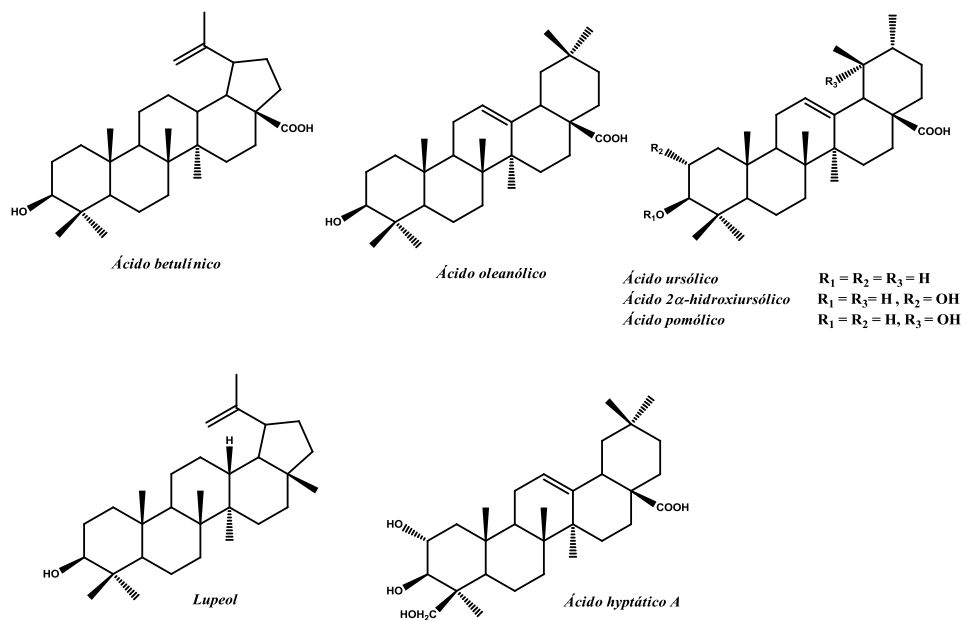
Recientemente, se reportó un diterpenoide abietano con una alta actividad antiplasmódica el cual fue aislado de las hojas de *H. suaveolens* colectado en Nigeria, establecido como *9α,13α-epi-dioxiabiet-8(14)-en-18-ol* (**Figura 4**).<sup>39</sup>



*9,13-epi-dioxiabiet-8(14)-en-18-ol*

**Figura 4.** Diterpenoide aislado de *H. suaveolens*.

Más de 25 triterpenoides diferentes han sido aislados del género *Hyptis*.<sup>7</sup> De acuerdo con sus esqueletos, estos compuestos pertenecen a las series de lupanos, oleananos y ursanos. Se ha observado que la actividad citotóxica encontrada durante el fraccionamiento biodirigido de los extractos orgánicos de diferentes especies pertenecientes a la familia de las labiadas es debida a la presencia de grandes cantidades de triterpenoides moderadamente citotóxicos, entre los cuales se encuentran los ácidos betulínico, oleanólico, ursólico, 2- $\alpha$ -hidroxiursólico, pomólico y el lupeol (**Figura 5**).<sup>3</sup> El ácido 2- $\alpha$ -hidroxiursólico y el ácido hyptático A demostraron citotoxicidad *in vitro* contra células de cáncer de colon (HCT-8) derivadas de tumores humanos con valores de ED<sub>50</sub> de 2.7 y 4.2  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente.<sup>40</sup>



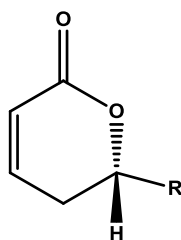
**Figura 5.** Estructuras de triterpenos aislados del género *Hyptis*.

Hasta la fecha, se han reportado 20 diferentes lignanos aislados de cuatro especies diferentes de *Hyptis*.<sup>7</sup> Este grupo de compuestos también contribuye en gran medida al uso en la medicina tradicional de estas especies, debido al amplio espectro de actividad biológica que poseen. Entre las que se destacan las propiedades antimicóticas, antivirales, moduladores de diversas actividades enzimáticas y toxicidad sobre hongos, insectos y vertebrados, entre otras.<sup>41</sup> Curiosamente, estos lignanos incluyen a la

podofilotoxina sustancia conocida como precursor para la semisíntesis de compuestos utilizados como agentes quimioterapéuticos en el tratamiento de la leucemia y cáncer testicular.<sup>42</sup> La desoxipodofilotoxina, aislada de *H. tomentosa* desarrolló una potente citotoxicidad, con un valor ED<sub>50</sub> de 0.032 µg/mL en un sistema de cultivo de células KB.<sup>43-44</sup> En otro estudio, la β-apopicropodofilina y la desmetildesoxi-podofilotoxina, aislados de *H. verticillata*, mostraron actividad citotóxica significativa contra células murinas de leucemia linfocítica P-338 con valores de ED<sub>50</sub> iguales a 0.002 y 0.005 µg/mL, respectivamente. Esta actividad es comparable con el valor desarrollado por el control positivo, la podofilotoxina (ED<sub>50</sub> 0.003 µg/mL).<sup>22</sup>

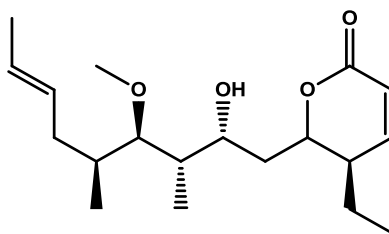
### 2.1.1 5,6-dihidro-α-pironas.

Las 5,6-dihidro-α-pironas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, particularmente en plantas, hongos y bacterias. Poseen un anillo de δ-lactona-α,β-insaturado con un grupo sustituyente alquilo, alquenilo o arilo en el C-6 y ocasionalmente sustituciones en el anillo. Muchos de estos compuestos son biológicamente activos, exhibiendo fitotoxicidad, citotoxicidad contra diferentes líneas de células tumorales o actividad antimicrobiana.<sup>45</sup> Las propiedades de estos compuestos se encuentran asociadas al poder alquilante del núcleo de la δ-lactona-α,β-insaturada (**Figura 6**),<sup>3,15</sup> siendo ésta la unidad estructural análoga al grupo farmacofórico de la pironetina.



**Figura 6.** Anillo de δ-lactona -α,β-insaturado.

La pironetina (**Figura 7**) es un compuesto con potente actividad antitumoral aislado del caldo de cultivo de *Streptomyces sp.*, y cuya biosíntesis y mecanismo de acción se han establecido. Este último, se lleva a cabo a través de una adición tipo Michael en la subunidad  $\alpha$  del dímero de tubulina. Esta reacción sucede entre el nitrógeno terminal de la lisina-352 con la posición C-4 del doble enlace del sistema lactónico  $\alpha,\beta$ -insaturado, mientras que la cadena lateral interacciona por medio de enlaces de hidrógeno con los grupos funcionales de los aminoácidos aledaños al sitio de acción. La pironetina ha llegado a la fase clínica II y se estima que esta molécula puede presentar toxicidad asociada a su capacidad de generar estas uniones covalentes irreversibles.<sup>46</sup>



**Figura 7.** Pironetina.

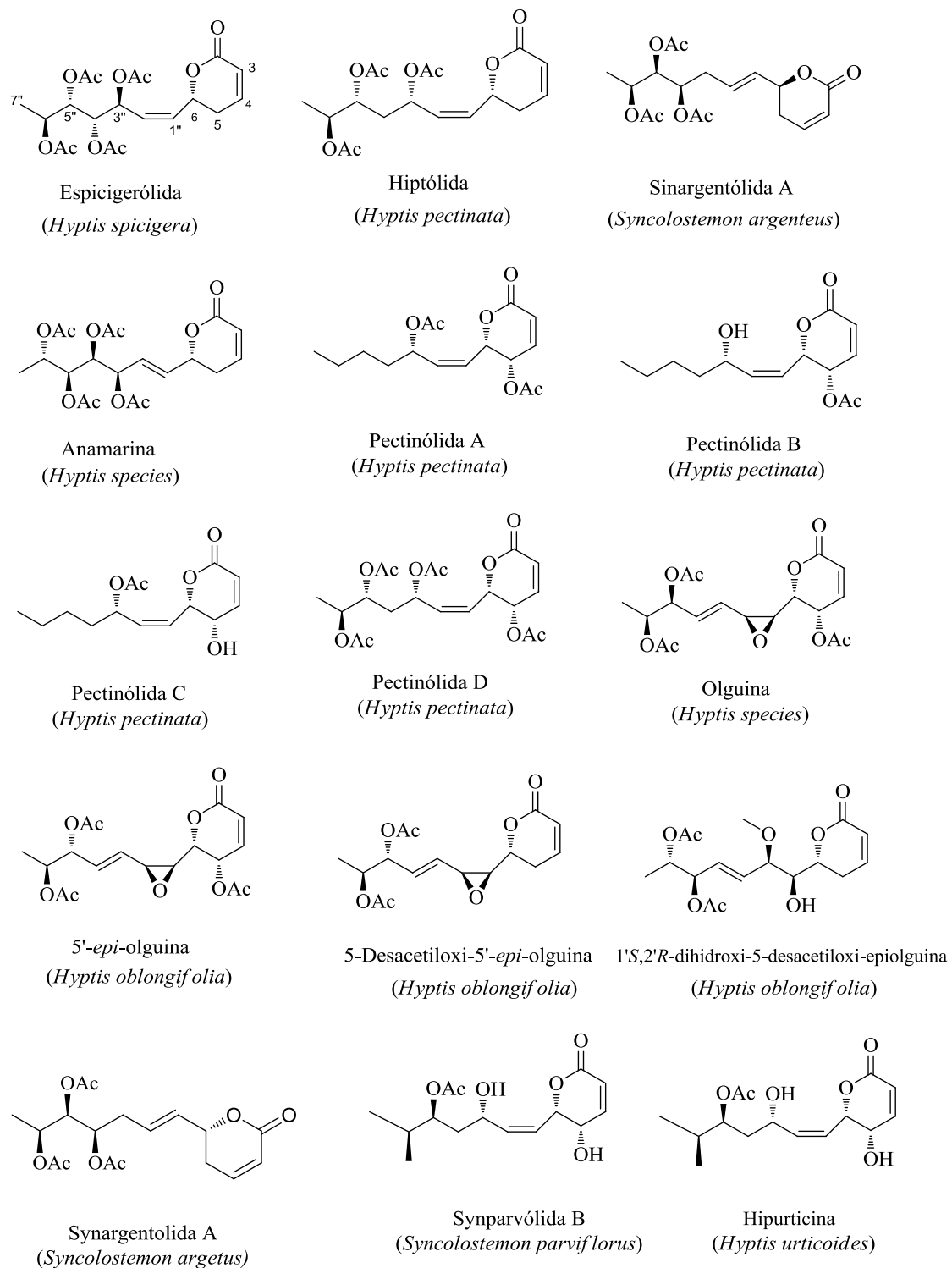
#### 2.1.1.1 6-alquenil-5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas de las labiadas.

Las 6-heptenil-5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas de origen vegetal, tales como las estructuras mostradas en la **Figura 8**, se han aislado de especies pertenecientes a la familia Lamiaceae, en particular de algunas especies de *Hyptis*, *Tetradenia* y *Syncolostemon*.<sup>3,47</sup> Estos compuestos poseen una cadena alifática de siete átomos de carbono la cual contiene un doble enlace y grupos hidroxilo o acetoxilo.

Aun cuando varios de estos compuestos se aislaron desde hace varias décadas, no se conocía con certeza su estructura, estereoquímica y configuración absoluta.<sup>47</sup> Fue hasta el final de la década de los ochenta cuando se logró establecer la configuración de algunas de ellas. La anamarina y la olguina fueron las primeras 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas

aisladas del género *Hyptis*, se registraron en 1979, y sus estructuras se determinaron mediante experimentos de RMN y cristalografía de rayos X.<sup>48</sup> Más tarde, para la hiptólida se emplearon estudios de espectroscopía de dicroísmo circular para determinar la configuración absoluta del centro estereogénico C-6.<sup>49</sup>

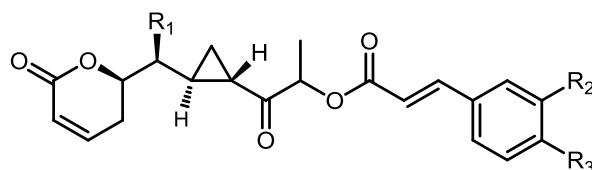
Existen pocos estudios donde se describa la actividad biológica de estos compuestos, dentro de estos se encuentra el estudio realizado a algunos derivados de 6-heptenilpironas y 5-octenilfuranonas con actividad citotóxica y antimicrobiana.<sup>18,50</sup> En un ensayo de citotoxicidad, las pectinólidas A-C exhibieron valores de ED<sub>50</sub> en el rango de 0.7-3.8 µg/mL frente a un panel de líneas celulares de cáncer derivados de varios tumores humanos.<sup>18</sup>



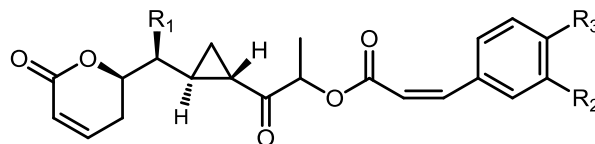
**Figura 8.** Ejemplos de 6-heptenil-5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas de origen vegetal.



De una variedad de Indonesia de la especie *Hyptis brevipes*, recientemente se purificaron derivados de 6-heptil-5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas que contienen un ciclopropano en su esqueleto y la cadena se extiende con un grupo cinamoilo que esterifica al hidroxilo de la posición C-6' de la cadena lateral, los cuales fueron nombrados como brevipólidas A-F.<sup>51</sup> Estos compuestos están estructuralmente relacionados con el esqueleto de los compuestos inicialmente extraídos de la especie *Lippia alva* (Verbenaceae) (Figura 9).<sup>52</sup> Sin embargo, la configuración absoluta para estos compuestos no se estableció en estos estudios pioneros. Estos compuestos exhibieron valores de citotoxicidad en contra de carcinoma de mama en líneas MCF-7 con valores ED<sub>50</sub> que van de buenos a moderados en un rango de 3.6-5.8  $\mu\text{g/mL}$ . Además, los tres compuestos extraídos de *Lippia alva* inhibieron a los receptores CCR5 mostrando valores de IC<sub>50</sub> medidos en un ensayo de movilidad de calcio de 5.5, 6.0, y 7.2  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente.



R <sub>1</sub> = OAc	R <sub>2</sub> = H	R <sub>3</sub> = OH	<i>Brevipólida A (HB)</i>
R <sub>1</sub> = OH	R <sub>2</sub> = OH	R <sub>3</sub> = OH	<i>Brevipólida C (HB)</i>
R <sub>1</sub> = OAc	R <sub>2</sub> = OH	R <sub>3</sub> = OH	<i>Brevipólida E (HB)</i>
R <sub>1</sub> = OH	R <sub>2</sub> = H	R <sub>3</sub> = OH	<i>Sin nombre (LA)</i>
R <sub>1</sub> = OH	R <sub>2</sub> = H	R <sub>3</sub> = OMe	<i>Sin nombre (LA)</i>

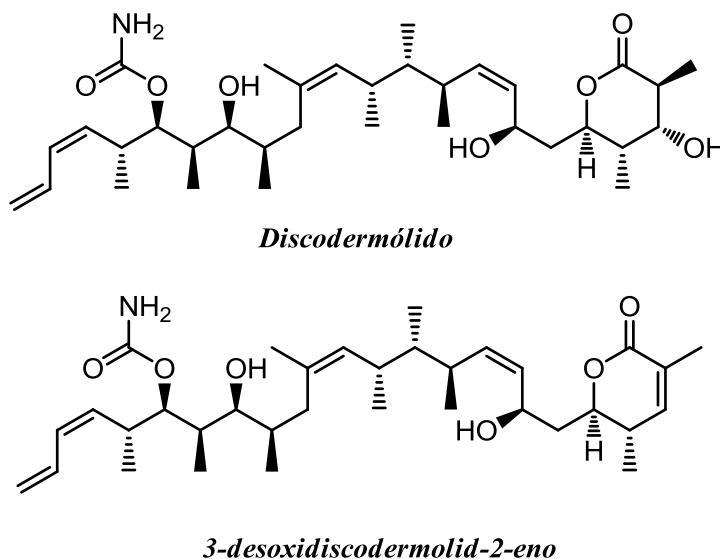


R <sub>1</sub> = OAc	R <sub>2</sub> = H	R <sub>3</sub> = OH	<i>Brevipólida B (HB)</i>
R <sub>1</sub> = OH	R <sub>2</sub> = OH	R <sub>3</sub> = OH	<i>Brevipólida D (HB)</i>
R <sub>1</sub> = OH	R <sub>2</sub> = H	R <sub>3</sub> = OH	<i>Brevipólida F (HB)</i>
R <sub>1</sub> = OH	R <sub>2</sub> = H	R <sub>3</sub> = OMe	<i>Sin nombre (LA)</i>

**Figura 9.** Compuestos aislados de *Hyptis brevipes* (HB) y *Lippia alva* (LA).

Se ha observado que todas las 6-heptenil-5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas de origen vegetal poseen la misma estructura general con la estereoquímica *R* para el centro estereogénico C-6 del núcleo de  $\delta$ -lactona, pero con diferentes grados de sustitución y de oxidación de la cadena lateral, observándose variaciones en la estereoquímica de los centros quirales de la cadena lateral, con excepción de la configuración absoluta en C-6' que a la fecha en todos los casos descritos siempre ha sido *S* (**Figura 8**), lo que parece constituir un rasgo biogénico común a todas estas sustancias.<sup>18,50</sup> La mayoría de las especies del género *Hyptis* que biosintetizan 6-heptenil-5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas pertenecen a la sección *Mesosphaeria*.<sup>6</sup>

Recientemente, las 6-heptenil-5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas han llamado la atención de farmacólogos y químicos sintéticos gracias a su parecido estructural con agentes citotóxicos en fase clínica como la pironetina (HeLa IC<sub>50</sub> 0.08  $\mu$ g/mL), el discodermólido (MCF7 IC<sub>50</sub>=2.8  $\mu$ g/mL), extraído de la esponja *Discodermia dissoluta* y el compuesto semisintético 3-desoxidiscodermolid-2-eno (**Figura 10**), el cual es diez veces más potente que el discodermólido (MCF7 IC<sub>50</sub>=0.21  $\mu$ g/mL).<sup>53</sup>



**Figura 10.** Compuestos aislados de *Discodermia dissoluta*.

La espicigerólida, la hiptólida y la anamarina (**Figura 8**)<sup>54,55</sup> son algunas de las 6-heptenil-5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas que han sido sintetizadas recientemente. Sin embargo, los estudios farmacológicos son inexistentes y tan poco existen estudios de la relación entre la estructura y alguna actividad biológica, ni alguna propuesta concreta para su mecanismo de acción que pudiera ser similar al descrito para la pironetina.

Existen muy pocos ejemplos en donde se ha evaluado el papel modulador que desempeña la estereoquímica en la actividad citotóxica en líneas celulares derivadas de tumores humanos, uno de ellos es el caso de la espicigerólida y tres de sus estereoisómeros.<sup>56</sup> Un segundo ejemplo es el caso de la hipurticina que originalmente se aisló de *Hyptis urticoides*.<sup>57</sup> En estudios posteriores se corrigió y verificó la estructura inicialmente propuesta mediante métodos de modelado molecular (DFT), simulación espectral de las constantes acoplamiento vecinales en la RMN ( $^3J_{H-H}$ ) y la síntesis de compuestos con cadenas análogas. De esta forma, se pudo establecer la conectividad y la estereoquímica de los centros quirales.<sup>56</sup> Debido a su similitud estructural con la pironetina y las otras 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas citotóxicas de la misma familia, podría presentar una actividad alquilante relevante.

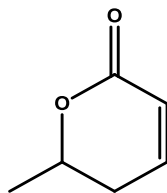
La citotoxicidad de la espicigerólida y la hiptólida se evaluó frente a tres líneas celulares: carcinoma de laringe (HEp-2), carcinoma nasofaríngeo (KB) y carcinoma de cérvix (HeLa). Este estudio demostró que la hiptólida es más potente que la espicigerólida en las tres líneas celulares (espigigerólida: IC<sub>50</sub> 5.4-15.9; hiptólida: IC<sub>50</sub> 2.8-6.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).<sup>56</sup> Con el propósito de obtener mayor información sobre el mecanismo de acción de estos compuestos, se realizó un estudio por citometría de flujo empleando la línea celular HeLa. La distribución de DNA contenido en la población celular fue analizado por esta técnica demostrando que a 48h de exposición con la hiptólida se observó un aumento de la población celular en la fase S (42 a 57%) y una disminución en las fases G1 y G2; en contraste con estos resultados, la espicigerólida mostró un aumento importante en la fase G2 (14 a 23%). La diferencia en los efectos que ejercen estas pironas sobre el ciclo celular se desconoce por lo que merece una mayor atención y

se requiere de estudios enfocados a establecer los efectos moduladores del potencial citotóxico alquilante del núcleo de 5,6-dihidro-2H-piran-2-ona asociados, en primer lugar, a los cambios configuracionales, producto de la variación en la estereoquímica de cada uno de los centros quirales, así como a los que se surgen en las diferentes conformaciones de mínima energía como una consecuencia de la flexibilidad en la cadena polioxygenada.<sup>56</sup>

### 2.1.1.2 Biosíntesis de las 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas.

Los primeros reportes de la biosíntesis de 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas incluyen: el ácido parasórbico, la aspirona, la psitolina y la pironetina.

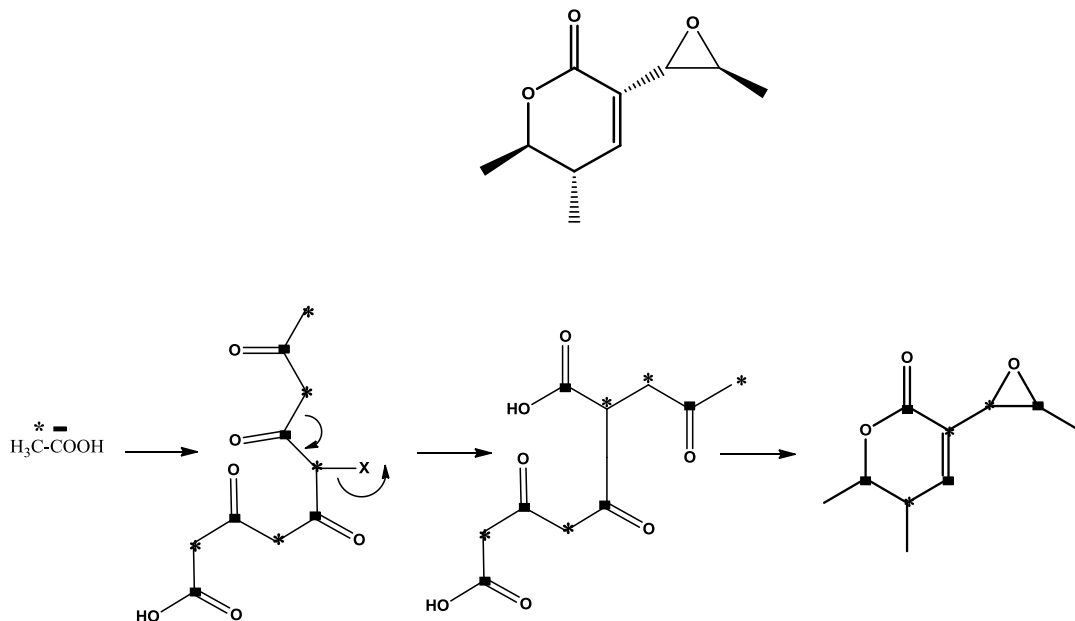
La primera investigación sobre la biosíntesis de una 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona C<sub>6</sub> sustituida se realizó en *Sorbus acuparia* en la formación del ácido parasórbico. La estructura de este compuesto muestra que la L-ramnosa es un posible precursor y se sugiere que la ruta biosintética principal es la vía del acetato malonato, ya que se observó que al utilizar (1-<sup>14</sup>C) y (2-<sup>14</sup>C)-acetato, así como (1-<sup>14</sup>C) malonato de sodio, hay una alta incorporación isotópica en C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> y C<sub>6</sub>.<sup>58</sup>



**Figura 11.** Ácido parasórbico.

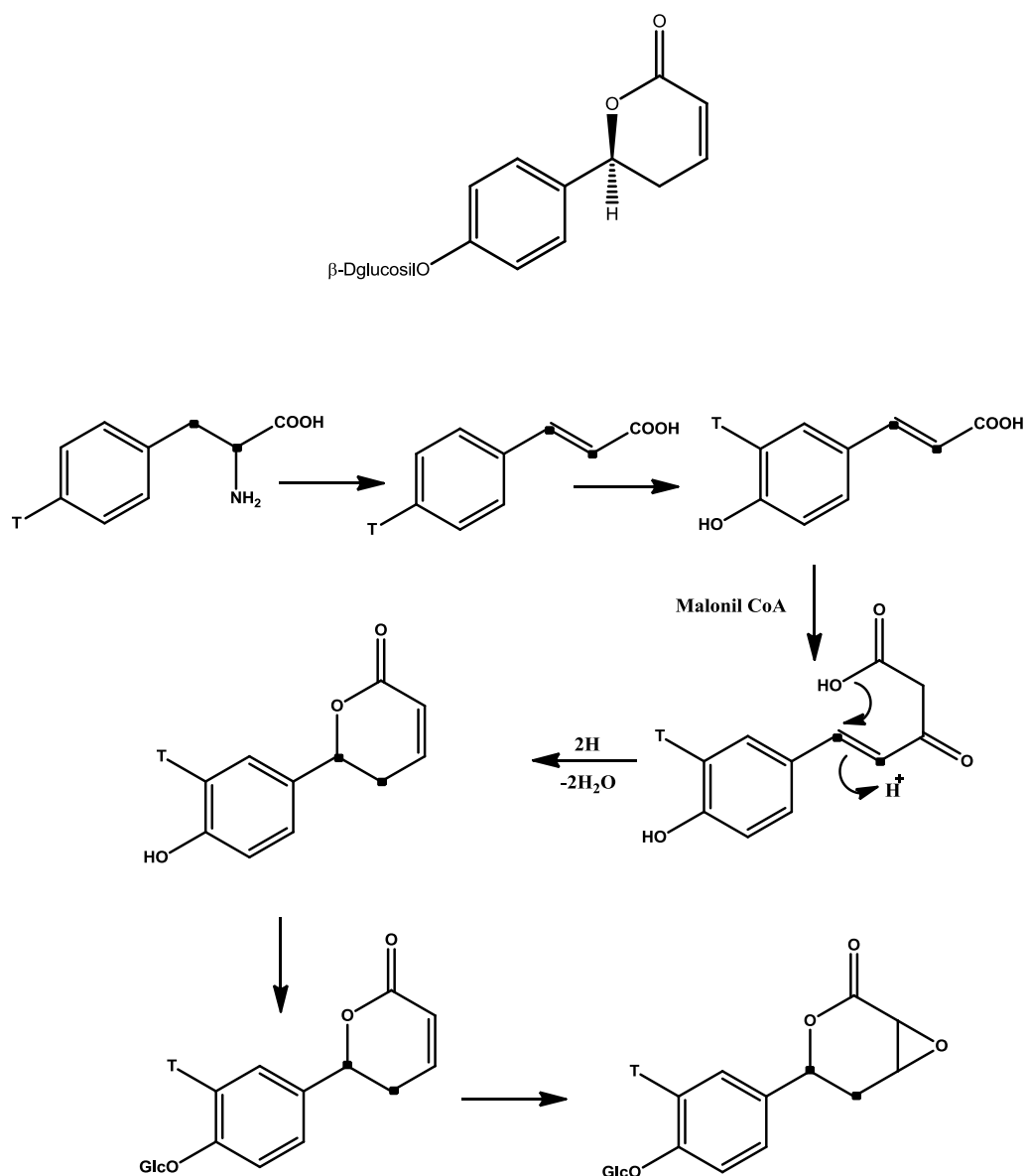
Se han realizado investigaciones biosintéticas exhaustivas con la aspirona aislada del hongo *Aspergillus melleus*, encontrándose que ésta ocurre a través de un rearrreglo de tipo Favorskii de una cadena lineal de policetona (**Figura 12**). Al utilizar como precursor acetato marcado doblemente con <sup>13</sup>C, se logró establecer que la aspirona proviene de tres unidades intactas de acetato y tres carbonos provenientes del

rompimiento de unidades de acetato, además que el enlace entre los C<sub>3</sub> y C<sub>7</sub> se forma por dos unidades de acetato enlazadas cabeza-cabeza.



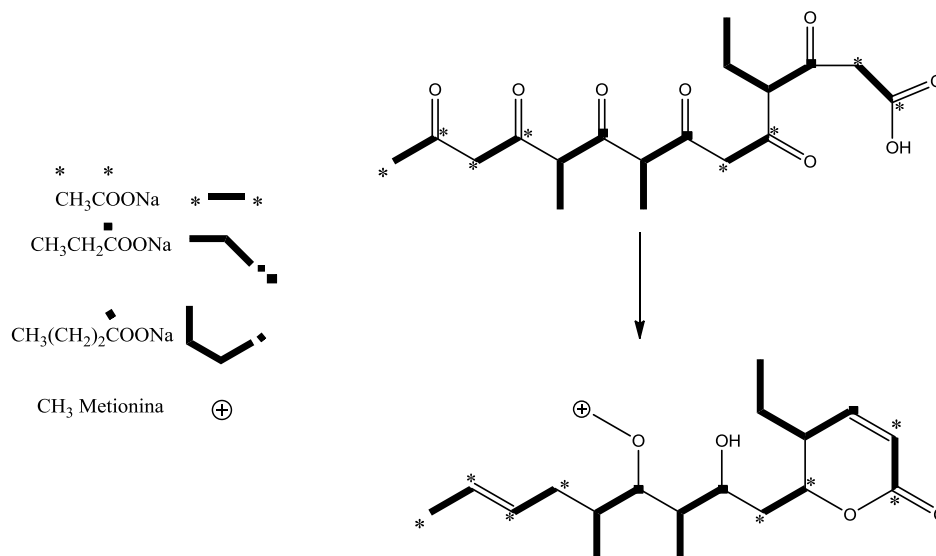
**Figura 12.** Incorporación de <sup>13</sup>C-acetato en la biosíntesis de la aspirina.

La fenilalanina es el precursor biosintético de la psitolina aislada de *Psitlotum nudum*. La ruta fue propuesta mediante los estudios de incorporación isotópica con *R,S*-[2', 3'-<sup>14</sup>C<sub>2</sub>] y *S*-[1'-<sup>14</sup>C]- fenilalanina (**Figura 13**), la extensión de la cadena lateral se lleva a cabo por la adición de una unidad de acetato como malonil CoA. Sin embargo, no se han realizado estudios sobre la biosíntesis de las 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas de las labiadas pero se puede postular que provienen de carbohidratos debido a la consistencia en la configuración absoluta de los centros quirales C-6 de la lactona y C-6' de la cadena de heptenilo.<sup>47</sup>



**Figura 13.** Biosíntesis de psitolina a partir de fenilalanina.

Finalmente, se describió el experimento de incorporación isotópica de precursores marcados con  $^{13}\text{C}$  y el origen biosintético de los átomos de carbono en la pironetina. La ruta propuesta muestra la formación de una cadena policétida lineal de 14 carbonos (**Figura 14**). Se concluyó que la pironetina deriva de cuatro unidades de acetato, dos unidades de propionato, una unidad de butirato y una unidad de metilo proveniente de la metionina.<sup>59</sup>



**Figura 14.** Incorporación de precursores.

## 2.2 Modelado molecular

La química computacional simula estructuras químicas y reacciones basándose totalmente o en parte en las leyes fundamentales de la física. Permite a los químicos sustituir o complementar estudios experimentales mediante la ejecución de cálculos en ordenadores. Puede ser, por ello, tanto un área de investigación independiente como una valiosa herramienta que aporta información extra complementaria a los estudios experimentales. La calidad de los resultados obtenidos ha permitido que las técnicas computacionales se hayan generalizado a diversos campos de la química y la biología, por ejemplo, la química orgánica e inorgánica, la farmacología o la biología molecular.<sup>60</sup> Hay dos grandes áreas dentro de la química computacional: la mecánica molecular y la teoría de estructura electrónica, ambas se enfrentan a los mismos objetivos<sup>61</sup>:

- 1) Cálculo de la energía de una estructura molecular (disposición espacial de átomos o de núcleos y electrones). Las propiedades relacionadas con la energía pueden predecirse también por algunos de estos métodos.

- 2) Optimizaciones geométricas, que localizan la estructura molecular de menor energía a partir de una estructura dada. Dependen del gradiente de la energía, es decir, de su primera derivada respecto a las posiciones de los átomos.

El cálculo de las frecuencias vibracionales de las moléculas dependen de la segunda derivada de la energía respecto a la estructura atómica y permiten la caracterización de estructuras como mínimos o puntos de silla, es decir, puntos de la superficie de energía potencial que son un mínimo energético en todas las direcciones excepto en una en la que es un máximo.<sup>61,62</sup>

En la actualidad, las dos aproximaciones teóricas más usadas en el estudio de aspectos tridimensionales de fármacos son la mecánica molecular y la mecánica cuántica.<sup>60</sup> De tal forma que con el empleo de las herramientas de la química computacional puede determinarse la estereoquímica y la conformación de una sustancia utilizando diferentes niveles de teoría y comparándolos con datos experimentales como las constantes de acoplamiento en la RMN.

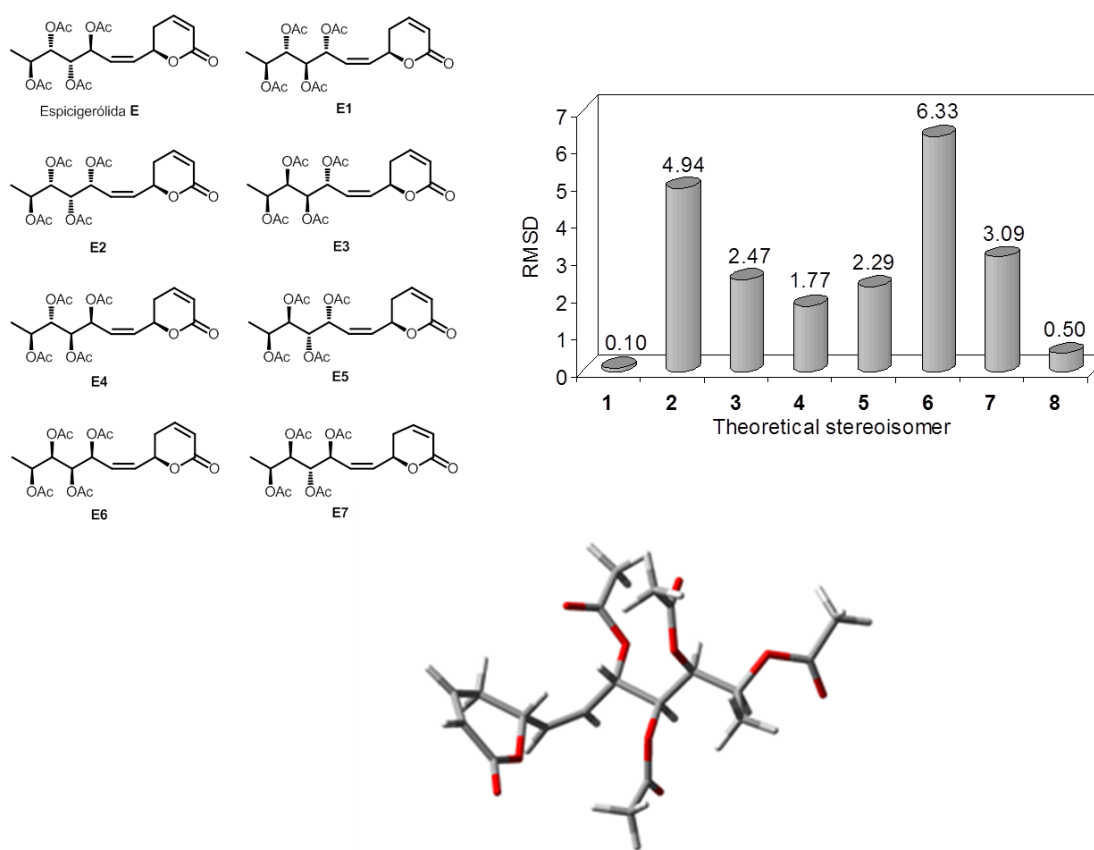
La resonancia magnética nuclear es una de las técnicas más poderosas y ampliamente usadas para establecer la estructura de los productos naturales. Sin embargo no es raro que en algunos casos la asignación estructural este incompleta o incorrecta. La determinación de la configuración absoluta de compuestos flexibles puede ser particularmente desafiante llevando hasta la síntesis de todos los estereoisómeros posibles para establecer cuál de ellos coincide con el producto natural correcto. Los cálculos se han utilizado por más de una década para ayudar en la interpretación de los datos de RMN.<sup>63</sup> A través de los años se ha incrementado el interés en el uso de los cálculos *ab initio* en la predicción de los desplazamientos químicos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  en RMN, para ayudar en la asignación de la estructura en los casos más difíciles. Los desplazamientos químicos de la molécula principal o todos los diastereoisómeros se calculan y comparan con los datos experimentales. Esta técnica fue desarrollada por Bifulco y colaboradores<sup>64</sup> y ha sido aplicada a un gran número de moléculas, incluyendo



productos naturales, mediante el empleo de diferentes conjuntos de bases y niveles de teoría.<sup>65,66</sup> La mayoría de estos estudios se han centrado en moléculas que son conformacionalmente rígidas, de modo que el conformero más importante es el mínimo global. Para los sistemas flexibles, se calcula el desplazamiento químico como un promedio ponderado de la distribución de Boltzmann de los conformeros de mínima energía.<sup>67</sup> Vale la pena mencionar que estos estudios se realizaron para determinar la configuración absoluta de moléculas basándose en el cálculo de los desplazamientos químicos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  y el acoplamiento  $J_{C-H}$ . Sin embargo, existen muy pocos informes donde se determine la configuración de moléculas flexibles utilizando el cálculo de las constantes de acoplamiento vecinales  $J_{H-H}$ .<sup>23,56,69,71</sup>

Un ejemplo de la aplicación de esta metodología describió la determinación de la estereoquímica de la espicigerólida (**Figura 15**), en donde se utilizó el cálculo de las constantes de acoplamiento  $J_{H-H}$  vecinales teóricas a partir de los ángulos diedros obtenidos en modelos de mecánica molecular (MMX, PCModel). Además, dicha determinación se validó mediante modelos experimentales de configuración absoluta conocida, así como la síntesis total del propio compuesto.<sup>23,55</sup> Un segundo ejemplo y con un nivel de cálculo mayor, es el estudio realizado también con la espicigerólida y siete de sus estereoisómeros, el cual consiste en el desarrollo de un protocolo de modelado molecular para confirmar la estereoquímica, el cual se basa en la comparación sistemática de las constantes de acoplamiento vecinales teóricas y experimentales en la RMN  $^1\text{H}$ . El método consiste en la realización de una búsqueda conformacional exhaustiva utilizando mecánica molecular (MMFF94) y el programa Spartan'04. Los conformeros seleccionados se optimizan geoméricamente utilizando la teoría de funcionales de la densidad DFT B3LYP y la base DGDZVP, también se calculan las frecuencias vibracionales y los parámetros termodinámicos a 298 K y 1 atm. Para determinar las constantes de acoplamiento vecinales se utilizó el mismo nivel de cálculo (B3LYP/DGDZVP) y el método GIAO con el comando *spin-spin*. En este estudio se encontraron tres factores de escalamiento para los valores de las constantes de acoplamiento vecinales  $^1\text{H-C-C-}^1\text{H}$  que dependen de la hibridación del átomo de carbono  $f_{(sp3)-(sp3)} = 0.910$ ,  $f_{(sp3)-(sp2)} = 0.929$ ,  $f_{(sp2)-(sp2)} = 0.977$ , los cuales fueron utilizados

para minimizar el error medio cuadrático de los valores obtenidos.<sup>71</sup> Los resultados obtenidos en este estudio demostraron una excelente correlación de los datos experimentales con los calculados, obteniendo errores de 0.1 para el estereoisómeros con la configuración correcta de la espigigerólida (**Figura 15**). Este tipo de estudios pueden ser de gran utilidad y emplearse como una herramienta predictiva en la asignación de la estereoquímica de compuestos biodinámicos con cadenas policétidas flexibles y con múltiples centros quirales.<sup>71</sup>



**Figura 15.** Estudio conformacional de la espigigerólida y siete de sus estereoisómeros.

### 3. JUSTIFICACIÓN

La actividad biológica de compuestos que contienen el núcleo de 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona sustituido en C-6 por un grupo alquenilo polihidroxilado o poliacilado constituye un modelo poco explorado para el estudio de la actividad antineoplásica mediante modificaciones específicas que permitan reconocer los requerimientos estereoquímicos vinculados a los centros estereogénicos de las cadenas laterales polioxigenadas. Debido a esto y de acuerdo a un criterio quimiotaxonómico fueron seleccionadas dos especies pertenecientes al género *Hypis* para realizar el aislamiento, la purificación, la caracterización y el análisis conformacional de las 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas presentes en estas especies.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

Llevar a cabo el aislamiento, la purificación, la caracterización estructural y el análisis conformacional de 6-heptenil-5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas obtenidas a partir de las especies *Hyptis spicigera* e *Hyptis brevipes*.

### 4.2 Objetivos específicos

- 4.2.1 Realizar el aislamiento y la purificación de 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas de estructura novedosa, utilizando diferentes técnicas cromatográficas (Cromatografía en columna y CLAE).
- 4.2.2 Caracterizar los compuestos obtenidos utilizando las técnicas de resonancia magnética nuclear (RMN) y espectrometría de masas (MS-FAB<sup>+</sup>), así como a través de correlaciones químicas y medidas quirópticas.
- 4.2.3 Mediante un protocolo de modelado molecular y resonancia magnética nuclear, se propone estudiar la conformación teórica y experimental en solución de las cadenas lineales polioxigenadas presentes en estos compuestos, iniciando con la revisión estructural de la *synargentólida A* y continuando con las pironas obtenidas de las especies en estudio (*H. spicigera* y *H. brevipes*).
- 4.2.4 Determinar el potencial citotóxico de los compuestos bioactivos utilizando seis líneas celulares derivadas de tumores humanos: HTC-15 (carcinoma de colon), HeLa (carcinoma de cervix), MCF-7 (carcinoma de mama), KB (carcinoma nasofaríngeo), Hep-2 (carcinoma laríngeo) y PC-3 (carcinoma de próstata).

## 5. PARTE EXPERIMENTAL

### 5.1 Procedimientos cromatográficos

La cromatografía en columna abierta se empleó para llevar a cabo el fraccionamiento primario del extracto clorofórmico de las partes aéreas de las especies en estudio, empleando gel de sílice 60 Merck (70-230 mesh) como fase estacionaria y como fase móvil se inició la elución con hexano; posteriormente, se incrementó gradualmente la polaridad con los sistemas de elución constituidos por hexano-cloroformo, cloroformo-acetona, acetona-metanol y, finalmente, metanol. El análisis de la homogeneidad de cada una de las fracciones obtenidas se realizó mediante la cromatografía en capa fina, empleando cromatoplasmas de gel de sílice 60 F254 sobre aluminio, las cuales fueron reveladas con una mezcla de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-sulfato cérico y se desarrolló el color por calentamiento sobre una parrilla.

La cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) se utilizó para lograr la separación de los constituyentes individuales en las fracciones enriquecidas con las 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas. Para llevar a cabo esta purificación, inicialmente, se encontraron las condiciones analíticas óptimas para obtener una buena resolución y una mayor definición de los picos, empleando cromatografía en fase normal con una columna de sílice y como fase móvil hexano-acetato de etilo en diferentes proporciones; también, se utilizó la cromatografía en fase reversa usando como fase estacionaria una columna de silicooctadecilo y una fase móvil de acetonitrilo-agua. El perfil cromatográfico se generó de manera isocrática. Posteriormente, las condiciones analíticas se escalaron a nivel preparativo para poder recolectar cantidades suficientes de los constituyentes individuales y llevar a cabo su caracterización.

Se utilizó un cromatógrafo marca Waters (Millipore Corporation, Waters Chromatography Division Milford, MA, EE.UU.) equipado con una bomba (modelo 600E) y un detector de arreglo de diodos Waters 2996 integrados a un equipo de

cómputo (OptiPlex GX280, Dell). El control del equipo, la adquisición de datos, el proceso y el manejo de la información cromatográfica se hizo a través del software Empower v.2 (Waters). Una válvula de recirculación de muestra y disolvente en línea se adaptó al sistema cromatográfico.

## 5.2 Determinación de las constantes físicas

Los espectros de masas de baja resolución y alta resolución se registraron en un equipo JEOL SXIO mediante el método de ionización por bombardeo con átomos acelerados (MS-FAB<sup>+</sup>) en el modo positivo sobre una matriz de alcohol 3-nitrobencilo en un Thermo DFS spectrometer. Los experimentos de resonancia magnética nuclear de hidrógeno <sup>1</sup>H y carbono <sup>13</sup>C se registraron en equipos Varian Innova, Bruker-Avance 300 operados a una frecuencia de 400 MHz y 300 para <sup>1</sup>H y 100 y 75 MHz para <sup>13</sup>C. Se utilizó como disolvente cloroformo deuterado (CDCl<sub>3</sub>), y los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se expresaron en ppm. Los puntos de fusión determinaron en un aparato Fisher-Johns sin corrección. Las rotaciones ópticas se obtuvieron con un polarímetro modelo Perkin-Elmer 341, utilizándose cloroformo como disolvente. La difracción de rayos X se colectó en un Bruker SMART APEX CCD por el método  $\omega$ -scan.

## 5.3 Material vegetal

Se trabajó de forma separada con dos colectas de las partes aéreas de la especie *Hyptis spicigera* provenientes de la región de Pinoltepec localizada en el municipio de Emiliano Zapata (Veracruz-México), las cuales se obtuvieron en los meses de octubre y noviembre del año 2009 (Hernández-Rojas, XAL0000246). De la especie *Hyptis brevipes* se obtuvieron dos colectas de las partes aéreas, recolectadas en la región de Dos Ríos en el municipio Emiliano Zapata en los meses de octubre y noviembre de 2009. La identificación y la recolección del material vegetal se realizó por la bióloga Adriana Hernández Rojas y un ejemplar fue depositado en el herbario del Instituto de Ecología, Xalapa, Veracruz-México (Hernández-Rojas 119; XAL0000247).

### 5.3.1 Obtención de los extractos

Las partes aéreas de las especies *H. spicigera* y *H. brevipes* se secaron a temperatura ambiente. El material vegetal seco y pulverizado fue sometido a una maceración exhaustiva con cloroformo. Al término de cada una de las extracciones, las soluciones se filtraron y se concentraron a sequedad a presión reducida (**Cuadro 2**).

**Cuadro 2.** Peso de los extractos obtenidos

<b>EXTRACTO</b>	<b>1<sup>ra</sup> colecta</b>	<b>2<sup>da</sup> colecta</b>	<b>1<sup>ra</sup> colecta</b>	<b>2<sup>da</sup> colecta</b>
<b>Partes aéreas</b>	<b><i>H. spicigera</i></b>	<b><i>H. spicigera</i></b>	<b><i>H. brevipes</i></b>	<b><i>H. brevipes</i></b>
Clorofórmico	53.36 g	55.89 g	98.41 g	93.82 g
Tratamiento				
MeOH	20.60 g	21.24 g	50.67 g	30.40 g

Cada uno de los extractos clorofórmicos obtenidos se sometió a un tratamiento metanólico que consistió en adicionar 50 mL de MeOH por cada gramo de extracto, se dejó por una noche a 0°C, se filtró y se concentró; finalmente, se repitió el procedimiento una vez más con el fin de precipitar los compuestos insolubles, como los triterpenos y grasas para tener un mejor manejo cromatográfico de las muestras que contienen los compuestos de interés.

#### 5.4 Fraccionamiento primario del extracto (*H. spicigera*)

Para las dos colectas se realizó el mismo procedimiento. Se inició con el fraccionamiento primario de 20 g del extracto obtenido de las partes aéreas generando 100 eluatos de 400 mL, las cuales se combinaron para finalmente obtener 13 fracciones (I-XIII). Se observó que las fracciones III, IV y V contienen 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas al ser analizadas mediante RMN  $^1\text{H}$ .

**Cuadro 3.** Fraccionamiento primario del extracto  $\text{CHCl}_3$  de las partes aéreas de *Hyptis spicigera*

Fase móvil	% Proporción	Número de fracción	Fracciones combinadas	Clave
Hexano	100	-	-	-
Hexano: $\text{CHCl}_3$	80:20	F1-F7	F1-F7	I
Hexano: $\text{CHCl}_3$	50:50	F8-F14	F8-F14	II
$\text{CHCl}_3$	100	F15-F29	F15-26	III
			F27-32	IV
$\text{CHCl}_3$ : $\text{Me}_2\text{CO}$	95:5	F30-F43	F33-F43	V
$\text{CHCl}_3$ : $\text{Me}_2\text{CO}$	80:20	F44-F49	F45-F47	VI
			F48-F49	VII
$\text{CHCl}_3$ : $\text{Me}_2\text{CO}$	50:50	F50-F66	F50-F51	VIII
			F52-F61	IX
			F62-F66	X
$\text{Me}_2\text{CO}$	100	F67- 70	F67-F70	XI
$\text{Me}_2\text{CO}$ : $\text{MeOH}$	70:30	F71-F75	F71-F75	XII
$\text{MeOH}$	100	F75-100	F75-F100	XIII

##### 5.5.1 Purificación de las fracciones

Se encontraron las condiciones analíticas óptimas para llevar a cabo la purificación de las fracciones III, IV y V las cuales presentaron la mayor concentración de los compuestos de interés. Estas condiciones fueron escaladas a nivel preparativo lo cual permitió la obtención del producto puro a través de las técnicas de corte de núcleo y reciclaje de muestra,<sup>72</sup> obteniéndose en cantidades suficientes para su identificación mediante diferentes técnicas espectroscópicas y espectrométricas.



#### 5.4.1.1 Condiciones en CLAE a nivel analítico:

**Fase estacionaria:** gel de sílice  $\mu$ porasil waters (3.9  $\times$  300 mm, 10  $\mu$ m).

**Fase móvil:** hexano-acetato de etilo (1:1)

**Flujo:** 0.4 mL/min

**Detector:** arreglo de diodos,  $\lambda$ : 254nm

**Volumen de inyección:** 20  $\mu$ L

**Concentración de la muestra:** 1mg/100  $\mu$ L

**Modo de elución:** isocrático

Para escalar el flujo a nivel preparativo se utilizó la siguiente fórmula:

$$F_p = F_a \times (L_p/L_a) \times (d_p)^2/(d_a)^2$$

F<sub>p</sub>: Flujo a nivel preparativo; F<sub>a</sub>: Flujo a nivel analítico; L<sub>p</sub>: Longitud de la columna preparativa; L<sub>a</sub>: longitud de la columna analítica; d<sub>p</sub>: diámetro interno de la columna preparativa; d<sub>a</sub>: diámetro interno de la columna analítica.

#### 5.4.1.2 Condiciones en CLAE a nivel preparativo:

**Fase estacionaria:** gel de sílice, ISCO (21.2  $\times$  250 mm, 5  $\mu$ m)

**Fase móvil:** hexano-acetato de etilo (1:1)

**Flujo:** 9.0 mL/ min

**Detector:** arreglo de diodos,  $\lambda$ : 254nm

**Volumen de inyección:** 500  $\mu$ L

**Concentración de la muestra:** 50mg/500  $\mu$ L

**Modo de elución:** isocrático

Las condiciones analíticas encontradas para las fracciones **III** y **V** permitieron la separación de 3 picos resueltos con los siguientes tiempos de retención; A =  $t_R$  13.9 min, B =  $t_R$  16.98 min, y C =  $t_R$  35.6 min. El perfil cromatográfico se reprodujo cuando se

trabajó a nivel preparativo. Cada pico se recolectó utilizando la técnica corte de núcleo para obtener 3 muestras de menor complejidad.

El pico A se reinyectó y logró su purificación mediante la técnica de “rasurado de pico”,<sup>72</sup> seguido del reciclaje del mismo a través de la columna hasta por 4 ciclos para obtener la máxima resolución que garantizó una mayor pureza. Este pico correspondió a la **5'-epiolguina (1)** ( $t_R$  13.9 min, 236 mg). De la misma manera, se purificó cada uno de los picos restantes. Así, del pico **B**, se obtuvo la **5-desacetoxi-5'-epiolguina (2)** ( $t_R$  16.98 min, 100 mg). Del pico **C**, se obtuvo un compuesto que corresponde a la apertura del epóxido mediante la adición de MeOH al compuesto **B (3)** ( $t_R$  35.6 min, 20 mg). De las dos colectas de *Hyptis spicigera* analizadas se obtuvieron los mismos compuestos.

**5'-epi-olguina (1):** sólido blanco; p.f 145-147 °C; DOR  $[\alpha]_{589} +127$ ,  $[\alpha]_{578} +133$ ,  $[\alpha]_{546} +153$ ,  $[\alpha]_{436} +286$ ,  $[\alpha]_{365} +521$  (c 0.29, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  7.08 (dd,  $J = 9.7, 5.7$  Hz, H-4), 5.22 (d,  $J = 9.7$  Hz, H-3), 5.85 (dd,  $J = 15.8, 5.9$  Hz, H-4'), 5.77 (dd,  $J = 15.8, 4.8$  Hz, H-3'), 5.32 (dd,  $J = 6.1, 4.1$  Hz, H-5'), 5.27 (dd,  $J = 5.7, 2.9$  Hz, H-5), 5.06 (qd,  $J = 6.6, 4.2$  Hz, H-6'), 4.18 (dd,  $J = 8.3, 2.9$  Hz, H-6), 3.68 (dd,  $J = 4.3, 4.3$  Hz, H-2'), 3.47 (dd,  $J = 9.5, 5.5$  Hz, H-1'), 1.18 (d,  $J = 6.6$  Hz, H-7'), 2.02, 2.07, 2.13 (s, -OAc); RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  170.4, 170.0, 169.8, (C=O'), 161.3 (C-2), 140.5 (C-4), 130.7 (C-4'), 126.9 (C-3'), 125.0 (C-3), 74.8 (C-6), 74.3 (C-5'), 70.3 (C-6'), 62.7 (C-5), 55.6 (C-2'), 54.5 (C-1'), 21.2, 21.1, 20.6 (Me-OAc), 15.4 (C-7'); MS-FAB<sup>+</sup>  $m/z$  383 [M + H]<sup>+</sup>.

**5-desacetoxi-5'-epi-olguina (2):** sólido blanco; p.f 75-76 °C; DOR  $[\alpha]_{589} -64$ ,  $[\alpha]_{578} -67$ ,  $[\alpha]_{546} -76$ ,  $[\alpha]_{436} -122$ , (c 0.1, CHCl<sub>3</sub>). ; RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  6.94 (ddd,  $J = 10, 5.5, 3.5$  Hz, H-4), 6.07 (dd,  $J = 9.7, 1.4$  Hz, H-3), 5.85 (dd,  $J = 15.8, 5.2$  Hz, H-4'), 5.78 (dd,  $J = 15.8, 6.3$  Hz, H-3'), 5.37 (dd,  $J = 6.3, 4.1$  Hz, H-5'), 5.07 (qd,  $J = 6.6, 4.1$  Hz, H-6'), 4.18 (dd,  $J = 8.3, 2.9$  Hz, H-6), 3.63 (dd,  $J = 4.5, 4.5$  Hz, H-2'), 3.33 (dd,  $J = 8.3, 4.0$  Hz, H-1'), 1.19 (d,  $J = 6.6$  Hz, H-7'), 2.60 (m, H-5), 2.04, 2.08, (s, -OAc); RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  170.3, 169.9, (C=O'), 162.5 (C-2), 144.3 (C-4), 130.4 (C-4'),

127.3 (C-3'), 121.6 (C-3), 74.1 (C-5'), 73.7(C-6), 70.2 (C-6'), 57.9(C-1'), 56.0 (C-2'), 27.2 (C-5), 21.1, 20.9, (Me-OAc), 15.2 (C-7'); MS- FAB<sup>+</sup>  $m/z$  325 [M + H]<sup>+</sup>.

**6R-[5R,6S-(diacetiloxi)-1R-(hidroxi)-2R-(metoxi)-3E-heptenil]-5,6-dihidro-2H-**

**piran-2-ona (3):** Aceite amarillo; RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDC1<sub>3</sub>): δ 6.95 (ddd,  $J = 9.8, 5.6$  Hz, H-4), 6.04 (dt,  $J = 9.7, 2.5$  Hz, H-3), 5.79 (dd,  $J = 16.0, 4.0$  Hz, H-4', 3'), 5.34 (dt,  $J = 3.7, 1.8$  Hz, H-5'), 5.10 (qd,  $J = 6.6, 3.7$  Hz, H-6'), 4.49 (ddd,  $J = 10.7, 7.8, 5.1$  Hz, H-6), 4.01 (dd,  $J = 4.3, 2.6$  Hz, H-2'), 3.65 (td,  $J = 7.8, 2.7$  Hz, H-1'), .1.20 (d,  $J = 6.6$  Hz, H-7'), 2.04, 2.08, (s, -OAc), 3.32 (-OMe).; RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CDC1<sub>3</sub>): δ 170.5, 170.2, (C=O'), 163.5 (C-2), 145.4 (C-4), 131.3 (C-4'), 128.9 (C-3'), 121.1 (C-3), 78.6 (C-2'), 76.4 (C-6), 74.6 (C-1'), 74.7 (C-5'), 70.3 (C-6'), 25.8 (C-5), 21.3, 20.8 (Me-OAc), 15.3 (C-7'); MS- FAB<sup>+</sup>  $m/z$  357 [M + H]<sup>+</sup>.

## 5.5 Fraccionamiento primario del extracto (*H. brevipes*)

Para las dos colectas se realizó el mismo procedimiento. Se inició con el fraccionamiento primario de 50 g del extracto obtenido de las partes aéreas generando 70 eluatos de 300 mL, los cuales se combinaron para obtener 20 fracciones (**I-XX**) (**Cuadro 4**). Las fracciones **X** (6.0 g), **XII** (2.3 g) y la fracción **XV** (9.0 g) se fraccionaron sobre sílica gel (230-400 mesh) usando un gradiente de concentración incrementando la polaridad de hexano-AcOEt, AcOEt -Me<sub>2</sub>CO y Me<sub>2</sub>CO-MeOH. De este procedimiento, se escogieron 3 subfracciones por contener las señales características en RMN <sup>1</sup>H del anillo de pirona α-β-insaturado. De las subfracciones **X-4** (480 mg eluida con hexano- AcOEt, 1:1), **XII-7** (200 mg eluida con hexano- AcOEt, 4:1) y **XV-6** (100 mg eluida con hexano- AcOEt, 2:3) se obtuvo el perfil cromatográfico utilizando CLAE en fase reversa.

**Cuadro 4.** Fraccionamiento primario del extracto de *Hyptis brevipes*

Fase móvil	Proporción %	Número fracción	Fracciones combinadas	Clave
Hexano	100	F1-F3	F1-F2	I
			F3	II
Hexano:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	80:20	F4-F8	F4-F6	III
			F7-F8	IV
Hexano:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	50:50	F9-F13	F9-F10	V
			F11-F13	VI
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100	F14-F25	F14-18	VII
			F19-25	VIII
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : Me <sub>2</sub> CO	90:10	F26-F32	F26-F27	IX
			F28-F30	X
			F31-F32	XI
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : Me <sub>2</sub> CO	80:20	F33-F44	F33-F40	XII
			F41-F42	XIII
			F43-F44	XIV
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : Me <sub>2</sub> CO	70:30	F45-F49	F45-F49	XV
Me <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	100	F50- 60	F50-F60	XVI
Me <sub>2</sub> CO:MeOH	60:40	F61-F75	F61-F66	XVII
			F67-F75	XVIII
MeOH	100	F75-100	F75-F85	XIX
			F86-F100	XX

### 5.5.1 Purificación de las fracciones

Para llevar a cabo la purificación de las subfracciones **X-4**, **XII-7** y **XV-6** se encontraron las condiciones analíticas óptimas utilizando cromatografía en fase reversa.

#### 5.5.1.1 Condiciones utilizadas en CLAE a nivel analítico:

**Fase estacionaria:** Symmetry C-18 (4.6 × 250 mm, 5 μm).

**Fase móvil:** acetonitrilo:agua (4:6) y (3:7)

**Flujo:** 0.4 mL/min

**Detector:** arreglo de diodos,  $\lambda$ : 254 nm

**Volumen de inyección:** 20  $\mu$ L

**Concentración de la muestra:** 1 mg/100  $\mu$ L

**Modo de elución:** isocrático

### 5.5.1.2 Condiciones utilizadas en CLAE a nivel preparativo:

**Fase estacionaria:** Columna Symmetry C-18 (19  $\times$  300 mm, 7  $\mu$ m)

**Fase móvil:** acetonitrilo:agua (4:6) y (3:7)

**Flujo:** 9.0 mL/min

**Detector:** arreglo de diodos,  $\lambda$ : 254 nm

**Volumen de inyección:** 500  $\mu$ L

**Concentración de la muestra:** 50 mg/500  $\mu$ L

**Modo de elución:** isocrático

Las condiciones analíticas encontradas para la subfracción **X-4** permitió la separación de 2 picos resueltos con tiempos de retención de  $t_R$  58.0 min (pico **I**) y  $t_R$  61.4 min (Pico **II**). Este perfil cromatográfico se reprodujo cuando se trabajó a nivel preparativo. Cada pico fue colectado e independientemente reinyectados en el modo de reciclaje de 5 a 9 ciclos consecutivos hasta obtener una homogeneidad cromatográfica. Con esta técnica se obtuvieron los compuestos puros **8** y **9**.

La subfracción **XII-7** (200 mg, eluida con AcOEt-Me<sub>2</sub>CO, 4:1) se resolvió por CLAE utilizando las condiciones analíticas anteriormente descritas para la subfracción X-4. Los picos generados a nivel preparativo correspondieron a los siguientes tiempos de retención: **III**  $t_R$  = 12.8 min, **IV**  $t_R$  = 17.9 min, **V**  $t_R$  = 19.5 min, **VI**  $t_R$  = 31.6 min y **VII**  $t_R$  = 33.9 min. Cada uno de los picos obtenidos se inyectó individualmente y purificó mediante la técnica de “rasurado de pico” y “reciclaje de muestra”, obteniendo los compuestos puros **10**, **11**, **4** y **5**, respectivamente. A partir la subfracción **X-6**

(fracción **XV**), se obtuvieron los compuestos puros **12**, **6**, **7** con tiempos de retención de: **VIII**  $t_R = 28.8$  min, **IX**  $t_R = 31.1$  min, **X**  $t_R = 34.7$  min.

**Brevipólida I (4) Pico VI:** Sólido incoloro; p.f.: 124-125 °C; DOR  $[\alpha]_{589} +36, [\alpha]_{578} +37.3, [\alpha]_{546} +42, [\alpha]_{436} +59$ ; DC ( $c 2.2 \times 10^{-5}$  M, CH<sub>3</sub>CN)  $\lambda_{\max} (\Delta\epsilon)$  229 (-0.91), 264 (+2.20), 319 (-1.26); RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) y RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) ver Cuadro 7 ; HRMS-FAB<sup>+</sup>  $m/z$  401.1595 [M + H]<sup>+</sup> (calculado C<sub>22</sub>H<sub>25</sub>O<sub>7</sub>, 401.1522).

**Brevipólida H (5) Pico VII:** Sólido incoloro; p.f.: 114-116 °C; DOR  $[\alpha]_{589} +157.5, [\alpha]_{578} +165, [\alpha]_{546} +195, [\alpha]_{436} +421, [\alpha]_{365} +1067.9$ ; DC ( $c 2.8 \times 10^{-5}$  M, CH<sub>3</sub>CN)  $\lambda_{\max} (\Delta\epsilon)$  230 (-3.71), 259 (+3.83), 305 (+8.54); RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) y RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) ver ) ver Cuadro 7 ; HRMS-FAB<sup>+</sup>  $m/z$  401.1596 [M + H]<sup>+</sup> (calculado C<sub>22</sub>H<sub>25</sub>O<sub>7</sub>, 401.1522).

**Brevipólida G (6) Pico IX:** Aceite incoloro; DOR  $[\alpha]_{589} +138.7, [\alpha]_{578} +142.5, [\alpha]_{546} +167.5, [\alpha]_{436} +361.2$ ; DC ( $c 5.5 \times 10^{-5}$  M, CH<sub>3</sub>CN)  $\lambda_{\max} (\Delta\epsilon)$  230 (-2.99), 260 (+4.22), 301 (+4.02); RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) y RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) ver Cuadro 7; HRMS-FAB<sup>+</sup>  $m/z$  387.1455 [M + H]<sup>+</sup> (calculado C<sub>22</sub>H<sub>23</sub>O<sub>7</sub>, 387.1438).

**Brevipólida J. (7) Pico X:** Aceite incoloro; DOR  $[\alpha]_{589} +147.0, [\alpha]_{578} +156.5, [\alpha]_{546} +183.5, [\alpha]_{436} +392.9$ ; DC ( $c 8.6 \times 10^{-5}$  M, CH<sub>3</sub>CN)  $\lambda_{\max} (\Delta\epsilon)$  229 (-4.11), 262 (+6.11), 294 (+5.83); RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) y RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) ver Cuadro 7; HRMS-FAB<sup>+</sup>  $m/z$  416.1467 [M + H]<sup>+</sup> (calculado C<sub>22</sub>H<sub>25</sub>O<sub>7</sub>, 416.1471).

**Breviólida K (8) Pico I:** Aceite incoloro; DOR  $[\alpha]_{589} -27.0, [\alpha]_{578} -32.0, [\alpha]_{546} -35.0, [\alpha]_{436} -70.0, [\alpha]_{365} -287$ ; DC ( $c 3.2 \times 10^{-5}$  M, CH<sub>3</sub>CN)  $\lambda_{\max} (\Delta\epsilon)$  215 (+8.70), 260 (+5.41), 303 (-1.65), 312 (-2.19); RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) y RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) ver Cuadro 5 y 6; HRMS-FAB<sup>+</sup>  $m/z$  403.1729 [M + H]<sup>+</sup> (calculado C<sub>22</sub>H<sub>27</sub>O<sub>7</sub>, 403.1751).

**Breviólida L (9) Pico II:** Aceite incoloro; DOR  $[\alpha]_{589} +10.8$ ,  $[\alpha]_{578} +13.3$ ,  $[\alpha]_{546} +16.7$ ,  $[\alpha]_{436} +44.2$ ,  $[\alpha]_{365} +95$ ; DC ( $c 3.0 \times 10^{-5}$  M, CH<sub>3</sub>CN)  $\lambda_{\max}$  ( $\Delta\epsilon$ ) 233 (-0.11), 262 (+ 2.88); RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) y RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) ver Cuadro 5 y 6 HRMS-FAB<sup>+</sup>  $m/z$  403.1735 [M + H]<sup>+</sup> (calculado C<sub>22</sub>H<sub>27</sub>O<sub>7</sub>, 403.1751).

**5,6,3'-trihidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona Pico III:** Sólido amarillo, p.f. 214-216°C; RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ H 12.37 (1H, s, OH-5), 7.66 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz, H-2'), 7.63(1H, dd,  $J = 8.4$  Hz, H-6'), 6.99 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-5'), 6.52 (1H, s, H-8), 3.96 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.94 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.81(3H, s, OCH<sub>3</sub>); RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ C 178.8 (C-4), 156.3 (C-7), 153.3 (C-5), 149.7 (C-4'), 148.6 (C-3'), 146.7 (C-9), 145.1 (C-2), 138.7 (C-3), 129.4 (C-6), 122.7 (C-6'), 122.4(C-1'), 114.8 (C-5'), 111.2(C-10), 106.3 (C-2'), 90.3 (C-8), 60.2 (OCH<sub>3</sub>), 56.5 (OCH<sub>3</sub>), 56.2 (OCH<sub>3</sub>); HRMS-FAB<sup>+</sup>  $m/z$  361.0930 [M + H]<sup>+</sup> (calculado C<sub>18</sub>H<sub>17</sub>O<sub>8</sub>, 361.0923).

**Brevipólida M (10) Pico IV:** Aceite incoloro; DOR  $[\alpha]_{589} +10.6$ ,  $[\alpha]_{578} +11.3$ ,  $[\alpha]_{546} +13.3$ ,  $[\alpha]_{436} +35.3$ ,  $[\alpha]_{365} +80.6$ ; DC ( $c 3.4 \times 10^{-5}$  M, CH<sub>3</sub>CN)  $\lambda_{\max}$  ( $\Delta\epsilon$ ) 259 (+ 3.87); RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) y <sup>13</sup> RMN <sup>13</sup>C C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) ver Cuadro 5 y 6; HRMS-FAB<sup>+</sup>  $m/z$  389.1578 [M + H]<sup>+</sup> (calculado C<sub>22</sub>H<sub>27</sub>O<sub>7</sub>, 389.1595).

**Brevipólida N (11) Pico V:** Aceite incoloro; DOR  $[\alpha]_{589} +7.5$ ,  $[\alpha]_{578} +5.0$ ,  $[\alpha]_{546} +6.3$ ,  $[\alpha]_{436} +21.3$ ,  $[\alpha]_{365} +52.5$ ; DC ( $c 5.15 \times 10^{-5}$  M, CH<sub>3</sub>CN)  $\lambda_{\max}$  ( $\Delta\epsilon$ ) 216 (+4.6), 258 (+3.22); 312 (-0.69); RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) y RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) ver Cuadro 5 y 6; HRMS-FAB<sup>+</sup>  $m/z$  389.1572 [M + H]<sup>+</sup> (calculado C<sub>21</sub>H<sub>25</sub>O<sub>7</sub>, 389.1595).

**Brevipólida O (12) Pico VIII:** Aceite incoloro; DOR  $[\alpha]_{589} +100$ ,  $[\alpha]_{578} +103.3$ ,  $[\alpha]_{546} +126.6$ ,  $[\alpha]_{436} +272.2$ ; DC ( $c 2.3 \times 10^{-5}$  M, CH<sub>3</sub>CN)  $\lambda_{\max}$  ( $\Delta\epsilon$ ) 259 (+3.54); RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) y RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) ver Cuadro 7; HRMS-FAB<sup>+</sup>  $m/z$  405.1551 [M + H]<sup>+</sup> (calculado C<sub>21</sub>H<sub>25</sub>O<sub>8</sub>, 405.1549).

## 5.6 Reacción de hidrogenación

La hidrogenación de los compuestos se llevó a cabo en un reactor tipo Parr de acero inoxidable. El compuesto **4** (30 mg) se disolvió en 15 mL de THF seco; posteriormente, se adicionó 5% mol del catalizador (10% Pd/C).<sup>73</sup> La mezcla se presurizó con H<sub>2</sub> a 200 psi y la reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante 24 horas. Al finalizar el tiempo de reacción, se liberó el gas, la mezcla de reacción se filtró y se concentró a presión reducida, obteniéndose el producto de hidrogenación en forma cuantitativa. El mismo procedimiento se realizó con los compuestos **5** (30mg) y **7** (25mg), **8** (12.20 mg), **9** (20 mg), **10** y **11** (10mg).

**Derivado tetrahidrogenado (13).** Aceite incoloro DOR  $[\alpha]_{589} +46.4, [\alpha]_{578} +48.3, [\alpha]_{546} +56.7, [\alpha]_{436} +115.8, [\alpha]_{365} +242.8$ ; RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDC1<sub>3</sub>):  $\delta$  7.11 (d,  $J = 8.7$  Hz, H-3" y H-5"), 6.82 (d,  $J = 8.7$  Hz, H-2" y H-6"), 5.16 (q,  $J = 7.1$  Hz, H-6'), 4.39 (dd,  $J = 10.8, 3.2$  Hz, H-6), 3.78 (s, OCH<sub>3</sub>), 3.54 (dd,  $J = 6.1, 3.2$  Hz, H-1'), 2.90 (t,  $J = 7.4$  Hz, H-7"), 2.68 (t,  $J = 7.4$  Hz, H-8"), 2.61 (m, H-5), 2.47 (m, H-5), 2.10 (m, H-4'), 1.83-1.91 (m, H-3), 1.54 (ddd,  $J = 9.8, 6.0, 2.9$  Hz, H-2'), 1.43 (d,  $J = 7.1$  Hz, H-7'), 1.27 (m, H-3'<sub>proS</sub>), 1.02 (ddd,  $J = 8.1, 6.6, 3.9$  Hz, H-3'<sub>proR</sub>); RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDC1<sub>3</sub>):  $\delta$  206.5 (C-5'), 173.1 (C-9"), 171.7 (C-2), 158.1 (C-4"), 132.3 (C-1"), 129.3 (C-2",6"), 113.9 (C-3", 5"), 83.3 (C-6), 75.2 (C-6'), 72.5 (C-1'), 55.3 (OCH<sub>3</sub>), 35.8 (C-8"), 29.9 (C-7"), 29.8 (C-5), 26.4 (C-2'), 21.6 (C-3), 21.3(C-4'), 18.4 (C-4), 15.6 (C-7'), 14.3 (C-3'); HRMS-FAB<sup>+</sup>  $m/z$  405.1875 [M + H]<sup>+</sup> (calculado C<sub>22</sub>H<sub>29</sub>O<sub>7</sub>, 405.1908).

**Derivado tetrahidrogenado (14).** Aceite incoloro; ORD  $[\alpha]_{589} +39.2, [\alpha]_{578} +40.0, [\alpha]_{546} +46.7, [\alpha]_{436} +95.0, [\alpha]_{365} +190.8$ ; RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDC1<sub>3</sub>):  $\delta$  7.06 (d,  $J = 1.9$  Hz, H-2"), 6.80 (d,  $J = 8.2$  Hz, H-5"), 6.71 (dd,  $J = 8.2, 1.9$  Hz, H-6"), 5.20 (q,  $J = 7.1$  Hz, H-6'), 4.42 (ddd,  $J = 10.7, 3.1, 3.1$  Hz, H-6), 3.89 (s, OCH<sub>3</sub>), 3.54 (dd,  $J = 3.3, 6.3$  Hz, H-1'), 2.90 (t,  $J = 7.05$  Hz, H-7"), 2.71 (t,  $J = 7.05$  Hz, H-8"), 2.42-2.61 (m, H-5), 2.10 (m, H-4'), 1.83-1.91 (m, H-3), 1.57 (ddd,  $J = 9.8, 6.4, 2.3$  Hz, H-2'), 1.47 (d,  $J = 7.1$  Hz, H-



7'), 1.32 (m, H-3'<sub>proS</sub>), 1.04 (ddd,  $J = 8.1, 6.6, 3.9$  Hz, H-3'<sub>proR</sub>); RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDC1<sub>3</sub>):  $\delta$  206.6 (C-5'), 172.5 (C-9''), 171.5 (C-2), 145.5 (C-4'') 145.1 (C-3''), 133.6 (C-1''), 119.7 (C-6''), 114.6 (C-5''), 110.8 (C-2''), 83.2 (C-6), 75.3 (C-6'), 72.6 (C-1'), 56.0 (OCH<sub>3</sub>), 35.6 (C-8''), 30.1 (C-7''), 29.8 (C-5), 26.5 (C-2'), 21.6 (C-3), 21.3(C-4'), 18.4 (C-4), 15.9 (C-7'), 14.3 (C-3'); HRMS-FAB<sup>+</sup>  $m/z$  420.1779 [M ]<sup>+</sup> (calculado para C<sub>22</sub>H<sub>28</sub>O<sub>8</sub>, 420.1784).

**Derivado tetrahidrogenado (15).** Aceite incoloro DOR [ $\alpha$ ]<sub>589</sub> -13.0, [ $\alpha$ ]<sub>578</sub> -13.0, [ $\alpha$ ]<sub>546</sub> -15.0, [ $\alpha$ ]<sub>436</sub> -24.0, [ $\alpha$ ]<sub>365</sub> -39.0; RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDC1<sub>3</sub>):  $\delta$  7.12 (d,  $J = 8.5$  Hz, H-2'' y H-6''), 6.82 (d,  $J = 8.5$  Hz, H-3'' y H-5''), 4.91 (p,  $J = 6.4$  Hz, H-6'), 4.34 (dd,  $J = 6.7$  Hz, H-2'), 4.13 (m, H-6), 3.92 (q,  $J = 6.3$  Hz, H-5'), 3.78 (s, OCH<sub>3</sub>), 3.34 (dd,  $J = 6.1, 3.2$  Hz, H-1'), 2.89 (t,  $J = 7.7$  H-7''), 2.60 (t,  $J = 7.7$  H-8''), 2.45 (m, H-3), 2.23 (m, H-5), 1.97 (m, H-3,'4',4), 1.66 (m, H-4, 4'), 1.19 (d,  $J = 6.5$  Hz, H-7'); RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDC1<sub>3</sub>):  $\delta$  173.7 (C-9''), 171.4 (C-2), 158.2 (C-4''), 132.4 (C-1''), 129.3 (C-2'',6''), 113.9 (C-3'', 5''), 82.1 (C-5'), 80.6 (C-6), 78.2 (C-2'), 73.9 (C-1'), 72.9 (C-6'), 55.4 (OCH<sub>3</sub>), 36.5 (C-8''), 30.2 (C-7''), 29.9 (C-3), 28.4 (C-5), 27.5 (C-4'), 25.0 (C-3') 18.2 (C-4), 17.1 (C-7'); HRMS-FAB<sup>+</sup>  $m/z$  407.2062 [M + H]<sup>+</sup> (calculado C<sub>22</sub>H<sub>31</sub>O<sub>7</sub>, 407.2070).

**Derivado tetrahidrogenado (16).** Aceite incoloro DOR [ $\alpha$ ]<sub>589</sub> -15.0, [ $\alpha$ ]<sub>578</sub> -13.6, [ $\alpha$ ]<sub>546</sub> -16.4, [ $\alpha$ ]<sub>436</sub> -24.3, [ $\alpha$ ]<sub>365</sub> -35.7; RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDC1<sub>3</sub>):  $\delta$  7.04 (d,  $J = 8.4$  Hz, H-2'' y H-6''), 6.74 (d,  $J = 8.4$  Hz, H-3'' y H-5''), 4.90 (p,  $J = 6.7$  Hz, H-6'), 4.31 (dd,  $J = 7.1$  Hz, H-2'), 4.06 (m, H-6), 3.91 (m, H-5'), 3.35 ( H-1'), 2.87 (t,  $J = 7.4$  H-7''), 2.61 (t,  $J = 7.7$  H-8''), 2.46 (m, H-3), 2.20 (m, H-5), 2.06-1.85 (m, H-3,'4',4), 1.79-1.52 (m, H-4,5, 4'), 1.19 (d,  $J = 6.3$  Hz, H-7'); RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDC1<sub>3</sub>):  $\delta$  173.8 (C-9''), 171.1 (C-2), 154.5 (C-4''), 132.0 (C-1''), 129.5 (C-2'',6''), 115.5 (C-3'', 5''), 82.2 (C-5'), 80.7 (C-6), 78.2 (C-2'), 73.9 (C-1'), 73.0 (C-6'), 36.5 (C-8''), 30.1 (C-7''), 29.9 (C-3), 28.4 (C-5), 27.4 (C-4'), 24.9 (C-3') 18.2 (C-4), 17.2 (C-7'); HRMS-FAB<sup>+</sup>  $m/z$  393.1922 [M + H]<sup>+</sup> (calculado C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>O<sub>7</sub>, 393.1913).

## 5.7 Preparación de diazometano

5g de N-metil-N-nitroso-p-toluensulfonamida (Diazald) en 25 mL de éter se adicionaron lentamente a una solución de 5 g de KOH, 8 mL de agua y 10 mL de etanol (95 %). La mezcla de reacción se calentó a 60° C. A medida que se adicionó el diazald se generó el diazometano mediante un proceso de destilación, el cual se colectó en un matraz mantenido en un baño de hielo seco a -78° C.

### 5.7.1 Metilación de la brevipólida G

El compuesto **6** (3 mg) se disolvió en 100 µL de metanol. Posteriormente, se adicionó gota a gota un exceso de la solución etérea de diazometano hasta que no se observa la emisión de gas nitrógeno en la mezcla de reacción. El curso de la reacción se monitoreo mediante cromatografía en capa fina. Al término de la reacción, se eliminó el disolvente mediante rotaevaporación y se obtuvo el producto metilado **5**.

## 5.8 Preparación de ésteres de Mosher

Para iniciar la preparación de los derivados de éster se utilizaron 6.0 mg del compuesto **13**, el cual se disolvió en 1 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco. Esta solución se transfirió a dos tubos limpios de RMN modelo WILMAD screw-cap (0.5 mL en cada tubo) y la muestra se secó en un sistema de vacío durante toda la noche. Posteriormente, se adicionaron CDCl<sub>3</sub> (0.75 mL), DMAP (0.5 mg) y piridina-*d*<sub>5</sub> (0.10 mL). Inmediatamente después y manteniendo una atmósfera de N<sub>2</sub>, se adicionaron 10 µL de cloruro de (*S*)- o (*R*)- $\alpha$ -metoxi- $\alpha$ -(trifluorometil)fenilacetil [(*S*)- or (*R*)-MTPA-Cl].<sup>26,74</sup> El curso de la reacción se monitoreo mediante RMN <sup>1</sup>H cada hora hasta que se agotó la materia de partida en 4 horas. Para el compuesto **9** y **15**, se siguió el mismo procedimiento utilizando 5.2 y 6.0 mg respectivamente, repartidos en dos tubos de RMN, en este caso la reacción término a las 24 horas.

**Ester R-MTPA de 13:** RMN  $^1\text{H}$   $\delta$  7.03(d,  $J = 8.6$  Hz, H-2" y H-6"), 6.73(d,  $J = 8.6$  Hz, H-3" y H-5"), 5.00 (q,  $J = 7.1$ , H-6'), 4.70 (dd,  $J = 9.5$ , 2.9 Hz, H-1'), 4.37 (ddd,  $J = 11.0$ , 3.2, 3.2 Hz, H-6 ), 2.37 (m, H-5), 2.18 (m, H-3), 2.00 (m, H-4'), 1.72 (m, H-2'), 1.25 (d,  $J = 7.1$ , H- 7'), 1.13 (dt,  $J = 9.1$ , 4.5 Hz, H-3'<sub>proS</sub>), 0.90 (dd,  $J = 8.8$ , 4.3 Hz, H-3'<sub>proR</sub>).

**Ester S -MTPA de 13:** RMN  $^1\text{H}$   $\delta$  7.03(d,  $J = 8.6$  Hz, H-2" y H-6") 6.72(d,  $J = 8.6$  Hz, H-3" y H-5"), 5.00 (q,  $J = 7.1$  Hz, H-6'), 4.77 (dd,  $J = 8.8$ , 2.6 H-1'), 4.46 (ddd,  $J = 11.0$ , 3.1, 3.1 Hz, H-6), 2.47 (m, H-5), 2.19 (m, H-3), 1.87 (m, H-4'), 1.71 (m, H-2'), 1.26 (d,  $J = 7.1$  Hz, H-7'), 1.10 (ddd,  $J = 9.2$ , 4.7, 4.7 Hz, H-3'<sub>proS</sub>), 0.80 (ddd,  $J = 8.6$ , 6.6, 4.4 Hz, H-3'<sub>proR</sub>).

**Ester R-MTPA de 9:** RMN  $^1\text{H}$   $\delta$  7.53 (d,  $J = 8.36$  Hz, H-2" y H-6"), 7.52 (d,  $J = 15.9$  Hz, H-7"), 6.71 (d,  $J = 8.3$  Hz, H-3" y H-5"), 6.62 (m, H-4), 6.16 (d,  $J = 15.9$  Hz, H-8"), 5.76 (d,  $J = 9.8$  Hz H-3), 5.37 (t,  $J = 3.8$ , H-1'), 4.79 (td,  $J = 12.8$ , 6.4 Hz, H-6'), 4.55 (m, H-6 ), 4.01 (dd,  $J = 11.0$ , 6.6 Hz, H-2'), 3.73 (dt,  $J = 12.8$ , 6.3 H-5'), 2.33 (m, H-5), 1.78 y 1.46 (m, H-3'), 1.54 y 1.13 (m, H-4'), 0.98 (d,  $J = 6.4$  Hz, H-7').

**Ester S -MTPA de 9:** RMN  $^1\text{H}$   $\delta$  7.60 (d,  $J = 8.36$  Hz, H-2" y H-6"), 7.55 (d,  $J = 15.9$  Hz, H-7"), 6.76(d,  $J = 8.3$  Hz, H-3" y H-5"), 6.57 (m, H-4), 6.20 (d,  $J = 15.9$  Hz, H-8"), 5.76 (d,  $J = 9.8$  Hz H-3), 5.45 (t,  $J = 3.8$ , H-1'), 4.91 (td,  $J = 12.0$ , 6.4 Hz, H-6'), 4.49 (m, H-6 ), 3.99 (m, H-2'), 3.86 (dt,  $J = 12.8$ , 6.3 H-5'), 2.10 (m, H-5), 1.83 y 1.61 (m, H-3'), 1.83 y 1.61 (m, H-4'), 1.10 (d,  $J = 6.4$  Hz, H-7').

**Ester R-MTPA de 15:** RMN  $^1\text{H}$   $\delta$  6.92(d,  $J = 8.3$  Hz, H-2" y H-6"), 6.63(d,  $J = 8.3$  Hz, H-3" y H-5"), 5.21 (t,  $J = 4.6$ , H-1'), 4.68 (q,  $J = 6.4$  Hz, H-6'), 4.39 (d,  $J = 10.9$  Hz, H-6), 3.94 (m, H-2'), 3.65 (m, H-5'), 2.69(t,  $J = 7.5$  Hz, H-7"), 2.39(t,  $J = 7.5$  Hz, H-8"), 2.13 (m, H-5), 1.67 (m, H-3), 1.53 (m, H-4, 3',4'), 1.52 (m, H-4,4'), 0.91 (d,  $J = 6.4$  Hz, H-7').

**Ester S -MTPA de 15:** RMN  $^1\text{H}$   $\delta$  6.96(d,  $J = 8.3$  Hz, H-2" y H-6"), 6.66(d,  $J = 8.3$  Hz, H-3" y H-5"), 5.29 (t,  $J = 4.6$ , H-1'), 4.74 (q,  $J = 6.4$  Hz, H-6'), 4.31 (d,  $J = 10.9$  Hz, H-6), 3.89 (m, H-2'), 3.75 (m, H-5'), 2.72(t,  $J = 7.4$  Hz, H-7"), , 2.42(t,  $J = 7.4$  Hz, H-8"), 1.93 (m, H-5), 1.53 (m, H-3,4, 3',4'), 1.41 (m,H-4,4'), 0.98 (d,  $J = 6.4$  Hz, H-7').

## 5.9 Hidrólisis de los compuestos 13 y 14

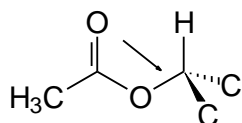
El compuesto **13** (21.7 mg) se disolvió en 400  $\mu\text{L}$  de metanol. Posteriormente, se adicionaron 3.6 mg de MeONa y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente. El curso de la reacción se monitoreo por cromatografía de capa fina hasta alcanzar el término de la reacción en 1h. A la mezcla de reacción, se adicionó una solución saturada de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y la mezcla se diluyó con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .<sup>75</sup> La fase orgánica se secó, filtró y concentró a presión reducida. El producto de reacción se purificó mediante CLAE en una columna symmetry C-18 utilizando una elución isocrática de MeOH-MeCN (7:3) y un flujo de 0.3 mL/min (volumen de inyección, 20  $\mu\text{L}$ ; concentración, 0.05 mg/ $\mu\text{L}$ ) para, finalmente, obtener el compuesto **17** puro (6 mg). El compuesto **14** se hidrolizó utilizando el mismo procedimiento. La purificación por CLAE del producto permitió la obtención del compuesto **17** (5.4 mg).

**Compuesto 17.** Aceite incoloro; DOR  $[\alpha]_{589} +88.6, [\alpha]_{578} +92.9, [\alpha]_{546} +107.1, [\alpha]_{436} +207.1, [\alpha]_{365} +412.9$ . RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  4.51 (q,  $J = 7.0$  Hz, H-6'), 3.74 (sobrelapado con  $\text{OCH}_3$ , H-6), 3.71 (s,  $\text{OCH}_3$ ), 3.24 (dd,  $J = 7.4, 3.5$  Hz, H-1'), 2.71 (m, H-2'), 2.42 (t,  $J = 7.1$  Hz, H-3), 2.13 (ddd,  $J = 8.3, 4.3, 4.0$  H-4'), 1.58 (m, H-5), 1.47 (d,  $J = 7.0$  Hz, H-7'), 1.37 (ddd,  $J = 8.5, 4.3, 4.0$  Hz, H-3'<sub>proS</sub>), 1.11 (ddd,  $J = 8.1, 6.6, 4.0$  Hz, H-3'<sub>proR</sub>) RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  211.9.5 (C-5'), 174.4 (C-2), 73.9 (C-6), 73.1 (C-6'), 75.6 (C-1'), 51.7 ( $\text{OCH}_3$ ), 31.1 (C-5), 26.9 (C-2'), 33.6 (C-3), 21.4 (C-4'), 21.0 (C-4), 19.8 (C-7'), 15.5 (C-3'); EIMS  $m/z$  257  $[\text{M} - \text{OH}]^+$  (10), 197 (15), 131 (50), 99 (100).

## 5.10 Análisis de modelado molecular

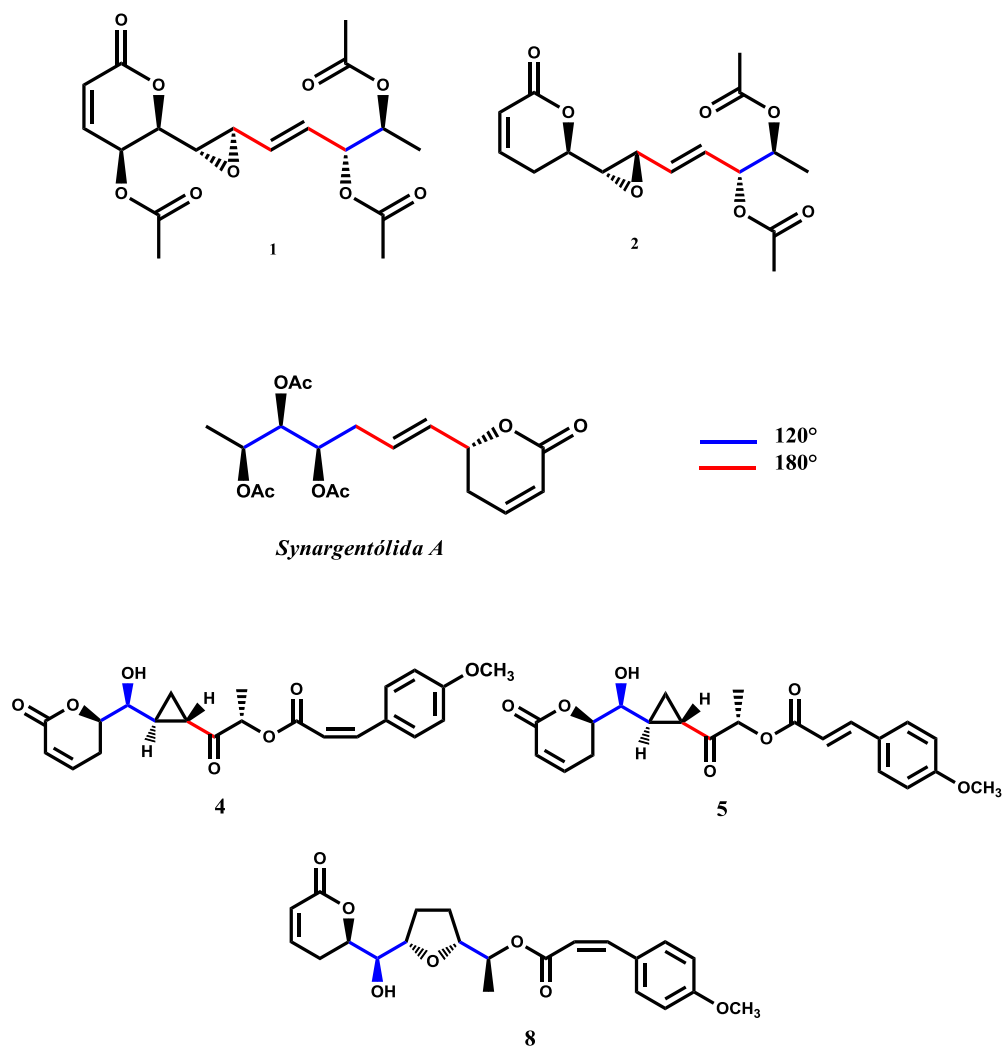
Para el análisis conformacional de los siguientes compuestos: la sinargentólida **A**, la 5'-epi-olguina (**1**), la 5-desacetoxi-5'-epi-olguina (**2**) y las brevipólida I (**4**) y H (**5**), se utilizó el método de búsqueda sistemática empleando el programa Spartan'04 (Wavefunction, Inc.) con el campo de fuerza de mecánica molecular MMFF94 (Molecular Mechanics Force Field) considerando los siguientes criterios:

1. Para la sinargentólida **A**, se consideraron los cuatro posibles estereoisómeros considerando una estereoquímica *S* en el carbono C-6' de la cadena.<sup>45</sup> Para la 5'-epi-olguina (**1**) y la 5-desacetoxi-5'-epi-olguina (**2**), se consideraron el epímero correspondiente a cada uno de estos compuestos en la posición C-5'. Finalmente, para las brevipólidas I (**4**) y H (**5**), se realizó un análisis para cada uno de ellos con la estereoquímica propuesta en cada caso.
2. Todos los grupos acetoxilo se orientaron en la conformación de mayor estabilidad, es decir con el enlace C-H geminal al grupo acetoxilo en posición *synclinal* al doble enlace C=O del carbonilo, como se ilustra en el siguiente diagrama:<sup>69,76</sup>



3. El núcleo de 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona se considera como una unidad fija en la conformación de pseudosilla de mayor estabilidad inferida a partir de los estudios de difracción de rayos X utilizando compuestos relacionados.<sup>47</sup>

4. Rotaciones de  $120^\circ$  y  $180^\circ$  para cada uno de los enlaces en la cadena polioxygenada.



**Figura 16.** Estructuras de partida para el análisis conformacional.

De los conformeros generados para cada compuesto, se eliminaron los que presentaron conformaciones con interacciones estéricas desfavorables. Posteriormente, los conformeros se optimizaron geoméricamente empleando el programa Gaussian 03

(Gaussian, Inc.) y utilizando la teoría de funcionales de la densidad (DFT) al nivel B3LYP/DGDZVP.<sup>77</sup> Para cada una de las estructuras optimizadas geoméricamente, se calcularon sus frecuencias vibracionales y sus parámetros termodinámicos a 278 K y 1 atm. En este punto, se realizó una selección de conformeros, como criterio de selección se empleó la energía relativa respecto al  $\Delta G$  considerando una ventana energética de 0 a 4 Kcal mol<sup>-1</sup>. Los valores para la energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) se obtuvieron a partir de los cálculos de la frecuencia vibracional como la suma de las energías electrónica y térmica.

Las constantes de acoplamiento  $J_{H-H}$  para las estructuras optimizadas con DFT se calcularon empleando el método GIAO tal como se encuentra implementado en el programa Gaussian 03 utilizando el comando *Spin-Spin* durante los cálculos de RMN.<sup>78</sup> El cálculo de la población conformacional, expresada en fracción molar de acuerdo a la distribución de Boltzmann para los conformeros seleccionados, se calculó mediante el programa FracMol.<sup>79</sup> Las constantes de acoplamiento teóricas se calcularon efectuando la sumatoria del producto de la fracción molar para cada conformero por su constante de acoplamiento individual según la siguiente ecuación:

$$J_{\text{cal}} = \sum_{i=1}^M n_i J_i$$

Dónde:

$M$  = Número total de conformeros a ser considerados.

$n_i$  = Fracción molar del  $i$ ésimo conformero.

$J_i$  = Constante de acoplamiento vecinal del  $i$ ésimo conformero.

$J_{\text{cal}}$  = Constante de acoplamiento vecinal calculada.

La comparación entre las constantes de acoplamiento teóricas contra las experimentales se llevó a cabo empleando el estadístico del error medio cuadrático (EMC) que se expresa con la siguiente fórmula:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{k=1}^M (J_k^{\text{exp}} - J_k^{\text{calc}})^2}{M}}$$

Dónde:

M = Número total de constantes de acoplamiento consideradas en la molécula.

$J_{\text{exp}}$ ,  $J_{\text{cal}}$  = Constantes de acoplamiento experimentales y calculadas, respectivamente.

Los valores obtenidos para las constantes de acoplamiento de los compuestos **1**, **2** y los estereoisómeros de la sinargentólida A se corrigieron utilizando los tres factores de escalamiento:  $f_{(\text{sp}^3)-(\text{sp}^3)} = 0.910$ ,  $f_{(\text{sp}^3)-(\text{sp}^2)} = 0.929$ ,  $f_{(\text{sp}^2)-(\text{sp}^2)} = 0.977$ .<sup>71</sup> Adicionalmente, para los compuestos **4** y **5**, así como para sus respectivos epímeros hipotéticos en la posición C-6', se calculó el dicroísmo circular electrónico teórico<sup>80</sup> utilizando el comando TD-B3LYP/DGDZVP a partir de los conformeros optimizados geoméricamente.

### 5.11 Ensayo de citotoxicidad.

Se utilizaron seis líneas celulares derivadas de tumores humanos: carcinoma nasofaríngeo (KB), carcinoma de colon (HCT-15), carcinoma de mama (MCF-7),<sup>81</sup> carcinoma de cérvix (HeLa), carcinoma de laringe (Hep-2) y carcinoma de próstata (PC-3). Estas líneas se mantuvieron en medio RMPI 1640 suplementado con 10 % de suero bovino fetal. Todas las líneas se cultivaron a 37° C bajo atmosfera de CO<sub>2</sub> al 5% en aire y 100% de humedad relativa.

La citotoxicidad se determinó usando el ensayo de sulforodamina B (SRB).<sup>82</sup> El ensayo se realizó cuando las células se encontraban en la fase logarítmica de crecimiento, se trataron por triplicado con varias concentraciones de las muestras de ensayo (0.16 a 20 mg/mL) y se incubaron durante 72 horas a 37 °C como se describió anteriormente. Los resultados se expresan como la concentración que inhibe el 50% de control del crecimiento después del período de incubación (IC<sub>50</sub>). Los valores fueron

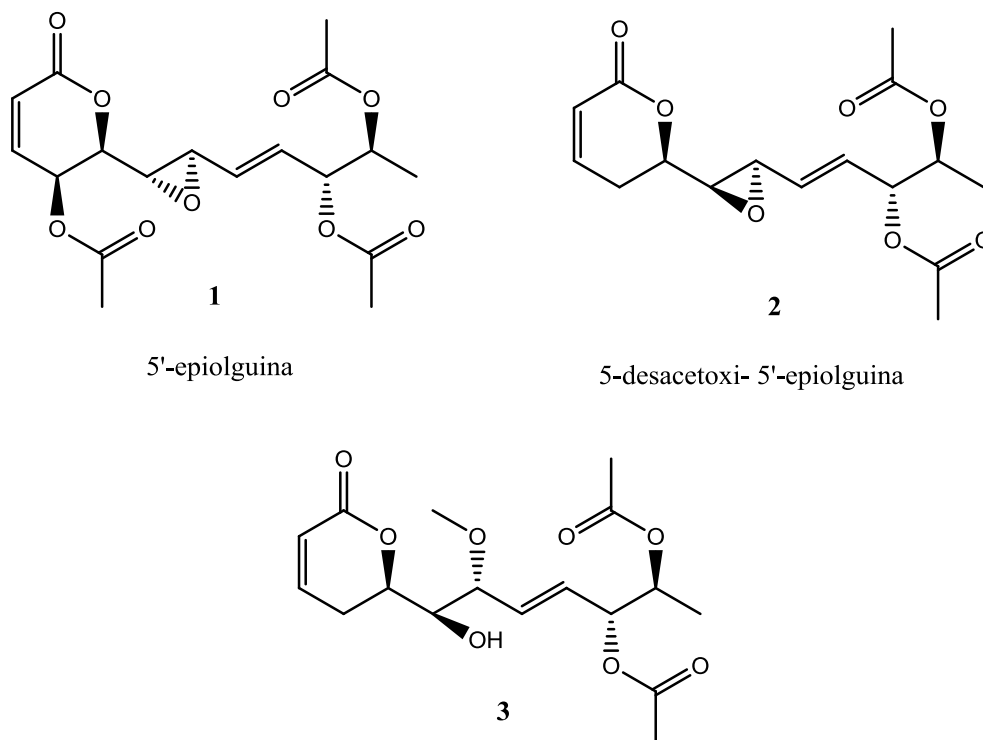


estimados a partir de la gráfica semilogarítmica de la concentración del fármaco ( $\mu\text{g/mL}$ ) frente al porcentaje de inhibición del crecimiento. Se utilizó como control positivo la vinblastina.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Estudio químico de *Hyptis spicigera*

A partir del extracto clorofórmico de las partes aéreas de la especie *Hyptis spicigera* se obtuvieron tres compuestos con esqueleto de 6-heptenil-5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas, previamente aislados en la especie *Hyptis oblongifolia*.<sup>48c</sup> Estos compuestos fueron identificados como: 5'-epi-olguina (**1**), 5-desacetoxi-5'-epi-olguina (**2**) y *R*-[5*R*,6*S*-(diacetiloxi)-1*R*-(hidroxi)-2*R*-(metoxi)-3*E*-heptenil]-5,6-dihidro-2*H*-piran-2-ona (**3**) (Figura 17).



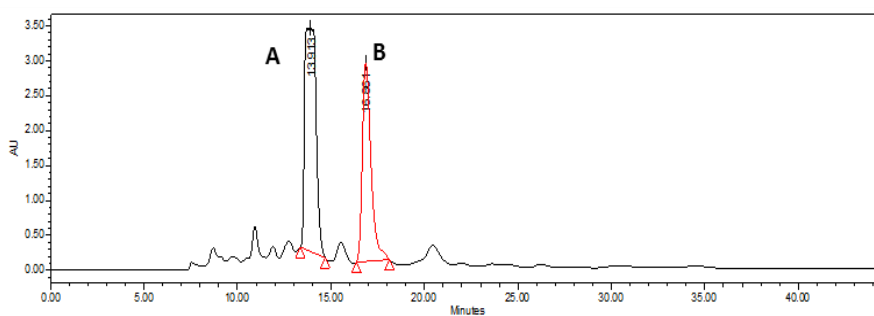
**Figura 17.** 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas de *Hyptis spicigera*.

### 6.1.1 Aislamiento y purificación de los compuestos 1-3

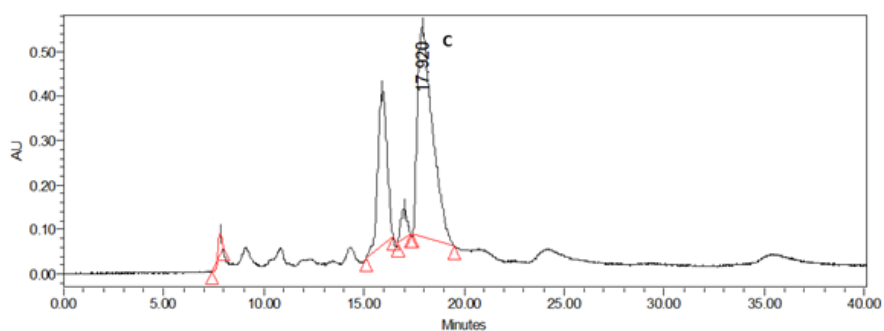
El fraccionamiento del extracto cloróformico de *H. spicigera* permitió la obtención de 13 fracciones primarias, de las cuales se escogieron tres por presentar una mayor concentración de los compuestos de interés (**III-V**). Para llevar a cabo la purificación de éstas, se utilizó la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE). Primero, se buscaron las condiciones cromatográficas adecuadas a nivel analítico utilizando una fase normal con una columna de sílice, encontrando que el sistema de elución que permitió la mejor separación fue cuando se empleó una mezcla de hexano-acetato de etilo (1:1) como la fase móvil. Estas condiciones fueron escaladas a nivel preparativo donde se llevaron a cabo inyecciones de 50 mg de muestra en 500  $\mu$ L de disolvente, empleando la técnica de sobrecarga de columna y corte de núcleo hasta obtener tres muestras con una menor complejidad correspondientes a los picos A-C. Los picos generados a nivel preparativo a partir de la fracción **III** correspondieron a los siguientes tiempos de retención: A,  $t_R = 13.9$  min y B,  $t_R = 16.98$  min; en tanto que el pico C,  $t_R = 17.9$  min, se obtuvo a partir de la fracción **V** (**Figura 18**).

El pico A se reinyectó y su purificación se logró mediante la técnica de “rasurado de pico”,<sup>72</sup> seguido del reciclaje del mismo a través de la columna hasta por 4 ciclos para obtener la máxima resolución que garantizó una mayor pureza (**Figura 19**). De la misma manera, se purificaron cada uno de los picos restantes. Así, del pico A se obtuvo la 5'-epiolguina (**1**) (sólido blanco,  $t_R$  13.9 min, 236 mg), del pico B, se obtuvo la 5-desacetoxi-5'-epiolguina (**2**), (sólido blanco,  $t_R$  16.98 min, 100 mg). Del pico C, se obtuvo un compuesto que correspondió a la apertura del epóxido mediante la adición de MeOH al compuesto **B** nombrado como: *R*-[5*R*,6*S*-(diacetiloxi)-1*R*-(hidroxi)-2*R*-(metoxi)-3*E*-heptenil]-5,6-dihidro-2*H*-piran-2-ona (**3**) (aceite amarillo,  $t_R$  35.6 min, 20 mg). Las estructuras fueron determinadas por la comparación de los datos de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  con los datos reportados para estos compuestos aislados de *Hyptis oblongifolia*.<sup>48c</sup>

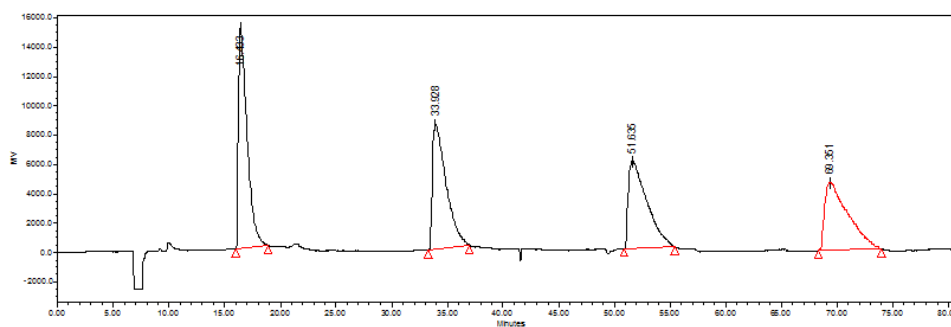
a)



b)



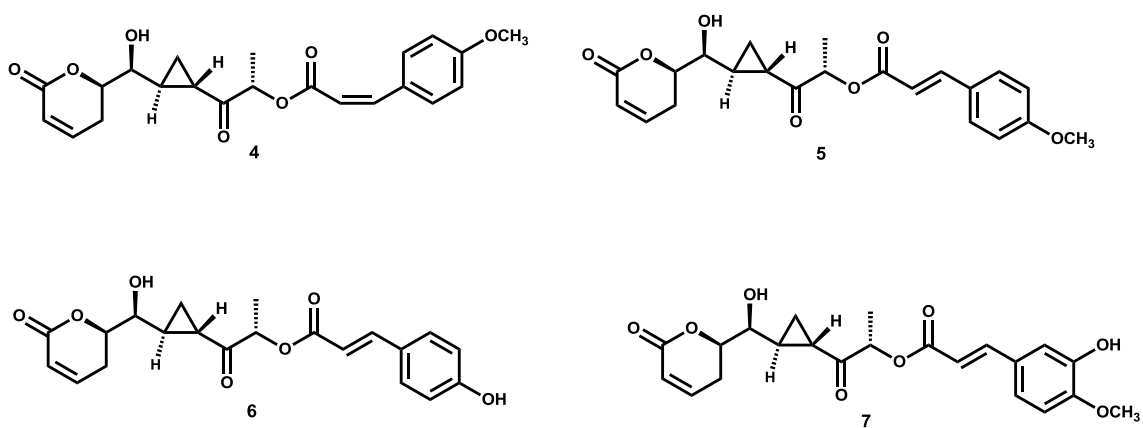
**Figura 18.** Cromatogramas de líquidos a nivel preparativo de la fracción III (a) y la fracción V (b). Condiciones cromatográficas: columna de fase normal de sílice (21.2 × 250 mm, 5µm); detector: arreglo de diodos (254 nm); fase móvil: hexano-AcOEt (1:1); flujo de elución: 9 mL/min; volumen de inyección de la muestra: 500 µL (50 mg/100 µL).



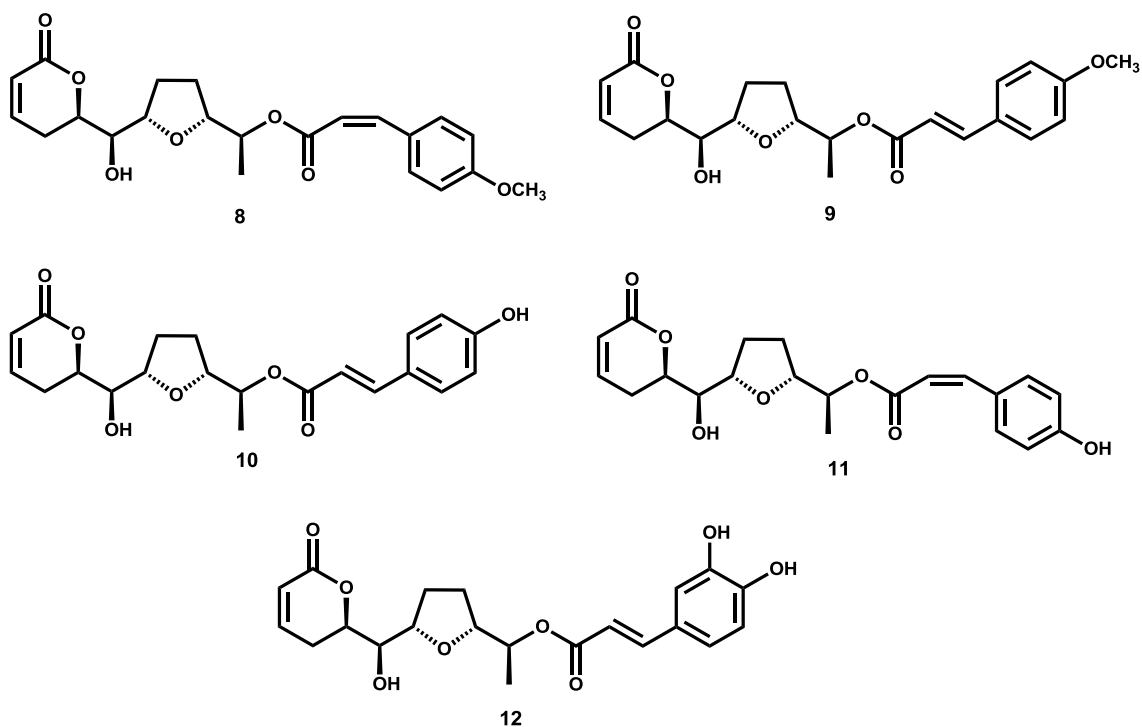
**Figura 19.** Purificación del pico A, a través de la técnica “rasurado de pico” y “reciclaje de muestra”. Condiciones cromatográficas: véase Figura 15.

## 6.2 Estudio químico de *Hyptis brevipes*

A partir del extracto clorofórmico de las partes aéreas de la especie *Hyptis brevipes* se obtuvieron nueve compuestos derivados de las 6-heptil-5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas y una flavona (5,6,3'-trihidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona): cuatro tienen en su estructura un anillo de ciclopropano, siendo que tres de estos ya habían sido aislados de *Hyptis brevipes*<sup>51</sup> y *Lippia alva*,<sup>52</sup> los cuales fueron nombrados como brevipólidas **G-I** (**4-6**; **Figura 20**); el compuesto restante representa una estructura novedosa con el mismo esqueleto de las brevipólidas, nombrada como brevipólida **J** (**7**). Cinco corresponden a estructuras que no han sido descritas en la literatura y contienen en su esqueleto un anillo de tetrahidrofurano y la cadena se extiende con un grupo cinámico (**8-12**, **Figura 21**).



**Figura 20.** Derivados de 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas con un anillo de ciclopropano aisladas del extracto clorofórmico de *Hyptis brevipes*.

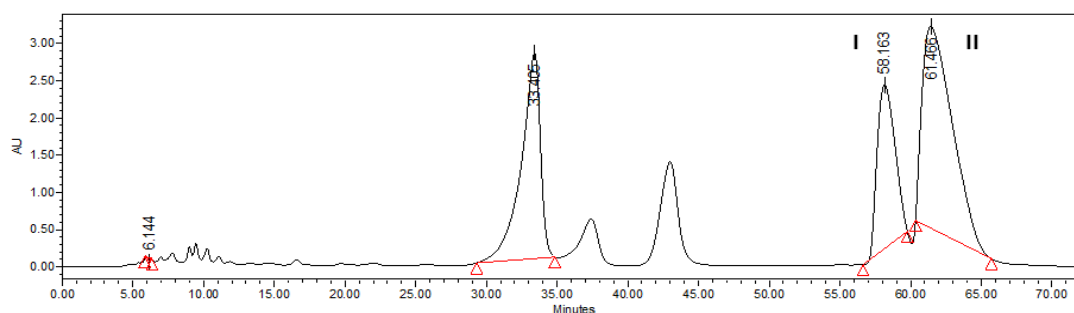


**Figura 21.** Derivados de 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas con un anillo de tetrahidrofurano aisladas del extracto clorofórmico de *Hyptis brevipes*.

### 6.2.1 Aislamiento y purificación

El tratamiento metanólico realizado a partir del extracto clorofórmico obtenido de las partes aéreas de la especie *Hyptis brevipes* permitió obtener 50 g de extracto, el cual fue sometido a un fraccionamiento primario en columna abierta. Esta separación permitió la obtención de veinte fracciones (I-XX). Se escogieron las fracciones X (6.0 g), XII (2.3 g) y la fracción XV (9.0 g), las cuales fueron sometidas a un segundo fraccionamiento sobre sílica gel (230-400 mesh). De este procedimiento, se seleccionaron tres subfracciones (X-4, XII-7, XV-6) por contener las señales características en RMN  $^1\text{H}$  del anillo de pirona  $\alpha$ - $\beta$ -insaturado. Para cada una de las fracciones escogidas se encontraron las condiciones cromatográficas óptimas para la

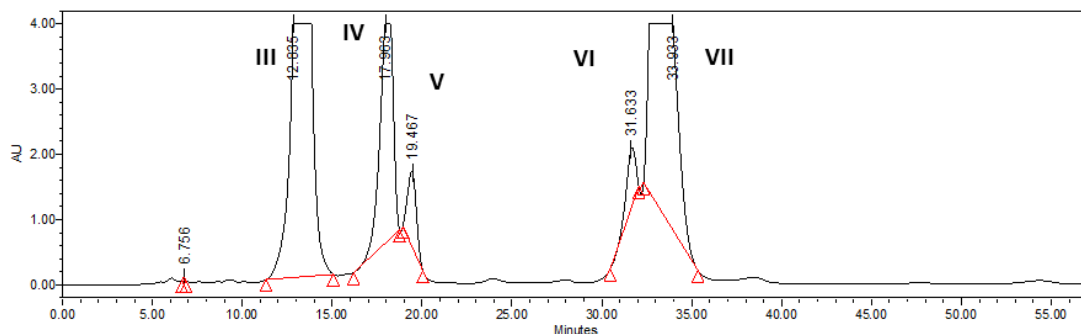
mejor resolución de los constituyentes individuales a nivel analítico. Para la separación se utilizó cromatografía de líquidos de alta eficiencia en fase reversa (columna: Symmetry C-18) con un sistema de elución isocrática de acetonitrilo: agua (2:3) y un flujo de 0.4 mL/min. De la subfracción **X-4** se obtuvieron dos picos con tiempos de retención de  $t_R$  58.0 min (pico **I**) y  $t_R$  61.4 min (Pico **II**) (**Figura 22**). Este cromatograma se reprodujo cuando se escaló a nivel preparativo. Los picos I y II se colectaron mediante la técnica de corte de núcleo y se reinyectados independientemente en la columna utilizando el modo de reciclaje durante 5-10 ciclos consecutivos hasta obtener una homogeneidad cromatográfica. Esta técnica permitió la resolución de los compuestos puros **8** y **9**.



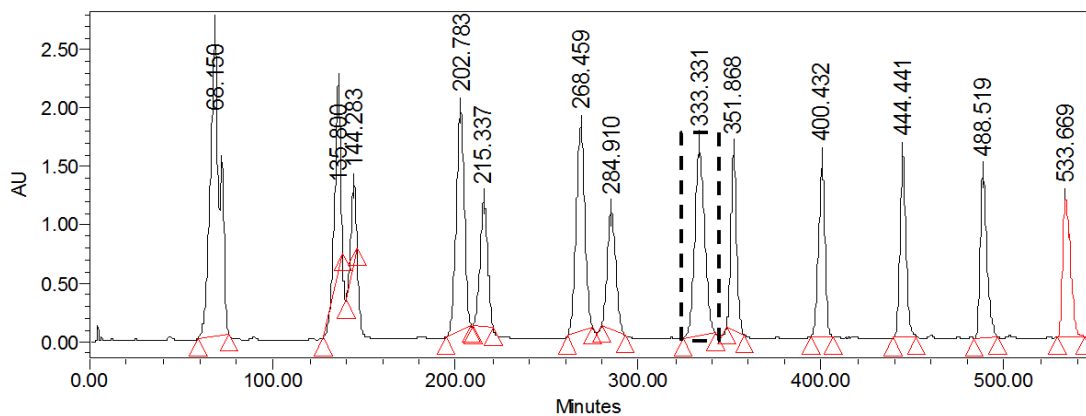
**Figura 22.** Cromatograma de líquidos a nivel preparativo de la fracción X-4. Condiciones cromatográficas: columna de fase reversa C-18 (21.2 × 250 mm, 5  $\mu$ m); detector: arreglo de diodos (254 nm); fase móvil: acetonitrilo: agua (2:3); flujo de elución: 9 mL/min; volumen de inyección de la muestra: 500  $\mu$ L (50 mg/100  $\mu$ L).

La subfracción **XII-7** se resolvió por CLAE utilizando las condiciones analíticas anteriormente descritas (**Figura 23**). Los picos generados a nivel preparativo correspondieron a los siguientes tiempos de retención: IV,  $t_R$  = 17.9 min; V,  $t_R$  = 19.5 min; VI,  $t_R$  = 31.6min; VII,  $t_R$  = 33.9 min. Cada uno de los picos obtenidos se reinyectó y purificó por la técnica de “rasurado de pico” y “reciclaje de muestra” (**Figura 24**), variando la fase móvil a acetonitrilo: agua (7:3) para obtener una mayor resolución de

los picos. Este cambió en las condiciones cromatográficas permitió la obtención de los compuestos puros **10**, **11**, **4**, y **5**, respectivamente.



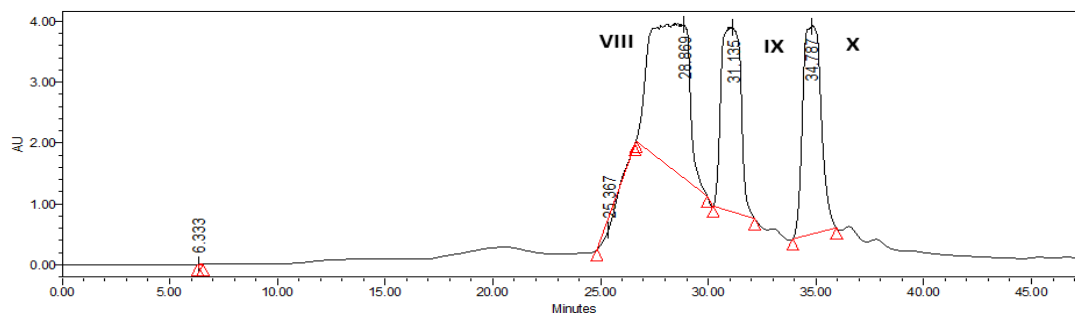
**Figura 23.** Cromatograma de líquidos a nivel preparativo de la fracción XII-7. Condiciones cromatográficas: columna de fase reversa C18 (19 × 300 mm, 7 μm); detector: arreglo de diodos, λ: 254nm; fase móvil: Acetonitrilo: Agua (6:4); flujo de elución: 9 mL/min; volumen de inyección de la muestra: 500μL (50mg/100 μL).



**Figura 24.** Purificación del pico **VII**, a través de la técnica “rasurado de pico” y “reciclaje de muestra”. Condiciones cromatográficas: columna de fase reversa C18 (19 × 300 mm, 7 μm); detector: arreglo de diodos, λ: 254nm; fase móvil: Acetonitrilo: Agua (7:3); flujo de elución: 9 mL/min; volumen de inyección de la muestra: 500μL (50mg/100 μL).



A partir de la fracción **XV-6** se obtuvieron los compuestos puros **12**, **6** y **7** con tiempos de retención de VIII:  $t_R$  28.8 min, IX:  $t_R$  31.1 min, X:  $t_R$  34.7 min respectivamente (**Figura 25**).



**Figura 25.** Cromatograma de líquidos a nivel preparativo de la fracción **XV-6**. Condiciones cromatográficas: columna de fase reversa C18 (19 × 300 mm, 7 μm); detector: arreglo de diodos, λ: 254nm; fase móvil: Acetonitrilo: Agua (6:4); flujo de elución: 9 mL/min; volumen de inyección de la muestra: 500μL (50mg/100 μL).

### 6.2.2 Caracterización de los compuestos 4-7

El compuesto obtenido a partir del pico VI se obtuvo como un sólido blanco con punto de fusión de 124-125 °C y su fórmula molecular fue determinada como  $C_{22}H_{25}O_7$  con un ion cuasimolecular de  $m/z$  401.1595  $[M + H]^+$  observado en su espectro de masas (HRMS-FAB<sup>+</sup>). La estructura de este compuesto fue determinada por comparación de los datos espectroscópicos obtenidos en la RMN  $^1H$  y  $^{13}C$  (Cuadro 5) con los descritos en la literatura para el compuesto **4**.<sup>52</sup> Este producto fue nombrado como brevipólida **I** ya que no existía ningún nombre trivial para este producto natural.

El compuesto obtenido a partir del pico VII se obtuvo como un sólido blanco con punto de fusión de 114-116 °C y su fórmula molecular fue determinada como  $C_{22}H_{25}O_7$

con un ion cuasimolecular de  $m/z$  401.1595  $[M + H]^+$  observado en su espectro de masas (HRMS-FAB<sup>+</sup>). La estructura de este compuesto se determinó por comparación de los datos espectroscópicos obtenidos en la RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C con los descritos en la literatura para el compuesto **5**<sup>52</sup> y fue nombrado como la brevipólida **H**. La principal diferencia espectroscópica entre los compuestos **4** y **5** son los valores en los desplazamientos químicos de protón y carbono para el doble enlace, para el compuesto **4**, se observan desplazamientos químicos de 7.94 (1H, d,  $J = 12.7$  Hz, H-7'') y 5.91 (1H, d,  $J = 12.7$  Hz, H-8''), en tanto que para el compuesto **5** fueron de 7.70 (1H, d,  $J = 15.9$  Hz, H-7'') y 6.38 (1H, d,  $J = 15.9$  Hz, H-8''). Las constantes de acoplamiento de los protones olefínicos indicaron que estos productos naturales representan un par de isómeros geométricos *cis* y *trans*, respectivamente (Cuadro 5).

El compuesto obtenido a partir del pico IX se obtuvo como un aceite incoloro, su fórmula molecular se determinó como C<sub>22</sub>H<sub>23</sub>O<sub>7</sub> con un ion cuasimolecular de  $m/z$  387.1455  $[M + H]^+$  observado en su espectro de masas (HRMS-FAB<sup>+</sup>). La estructura de este compuesto se caracterizó por comparación de los datos espectroscópicos obtenidos en la RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C (Cuadro 5) con los datos reportados en la literatura para el compuesto **6**,<sup>51,52</sup> el cual fue nombrado como brevipólida **F**. Este compuesto difiere del producto **5** por la ausencia de la señal debida al grupo metoxilo en 3.84 ppm.

A partir del pico X se obtuvo un compuesto con una estructura inédita en la literatura. Este compuesto se obtuvo como un aceite incoloro. La fórmula molecular del compuesto **7** se estableció como C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>O<sub>8</sub> por HRMS-FAB<sup>+</sup> con un ion cuasimolecular de  $m/z$  416.1467  $[M + H]^+$ . En el espectro de RMN <sup>13</sup>C (Cuadro 5) se observaron 20 señales. En el experimento DEPTQ-135 (**Figura 27**), éstas corresponden a dos metilos (uno alifático y uno base de oxígeno), dos metilenos, once metinos (tres alifáticos, dos base de oxígeno, tres aromáticos, tres vinílicos), la señal para el metilo vinílico en 146.1 corresponde a los carbonos sobrepuestos C-4 y C7'' y seis carbonos cuaternarios: uno corresponde al carbonilo de la lactona, dos a grupo carbonilo del éster en la cadena y tres corresponden al sistema aromático. En los espectros de RMN <sup>1</sup>H (**Figura 26**) se pueden observar las señales características del sistema  $\delta$ -lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada: las señales de

un sistema de multiplicidades de tipo ABXY para los núcleos H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>5ax</sub> y H<sub>5ec</sub>; se detectaron un par de señales para protones olefínicos en  $\delta$  6.02 (1H, ddd,  $J = 9.7, 2.2$  y  $0.9$  Hz, H<sub>3</sub>) y  $\delta$  6.98 (1H, ddd,  $J = 9.7, 6.4$  y  $2.2$  Hz, H<sub>4</sub>); dos protones alílicos no equivalentes (H<sub>5</sub>) en  $\delta$  2.70 (1H, dddd,  $J = 18.5, 12.3, 2.2$  y  $2.2$  Hz) y  $\delta$  2.52 (1H, dddd,  $J = 18.5, 6.4, 3.8$  y  $0.9$  Hz) con un valor de la constante de acoplamiento cercano a 18.5 Hz que indicó una interacción geminal ( $J_{5ax-5ec}$ ). Estos se encuentran acoplados, a su vez, con la señal en  $\delta$  4.52 (H-6) con valores de  $J_{5ax-6} = 12.3$  Hz y  $J_{5ec-6} = 3.8$  Hz, indicando una orientación pseudoecuatorial para la cadena lateral de heptilo que sustituye esta posición. En el espectro de RMN <sup>13</sup>C (**Figura 27, Espectro A8**, ver apéndice 2) se observaron también las señales características del sistema  $\delta$ -lactona  $\alpha, \beta$ -insaturada con la señal del carbonilo C-2 ( $\delta$  164.0) y el sistema vinílico en C-3 ( $\delta$  6.02) y C-4 ( $\delta$  6.98).

Para el sustituyente heptilo en C-6 de la 5,6 dihidro- $\alpha$ -pirona, la multiplicidad observada para los protones encontrados a campo alto en  $\delta$  2.28 (H-4'), 1.60 (H-2'), 1.34 (H-3'<sub>proS</sub>), y 1.12 (H-3'<sub>proR</sub>) fueron atribuidos a la presencia de un anillo de ciclopropano; también, se observaron las señales del grupo isoferuilo en  $\delta_H$  7.13 (1H, d,  $J = 1.9$  Hz, H-2"), 7.03 (1H, dd,  $J = 8.3, 1.9$  Hz, H-6") y 6.84 (1H, d,  $J = 8.3$  Hz, H-5"). Se identificó una cadena de siete átomos de carbono, la cual fue identificada a través de un doblete del grupo metilo terminal centrado en  $\delta_H$  1.60 (3H, d,  $J = 7.0$  Hz, H-7') el cual hace parte de un sistema AX<sub>3</sub> con una señal desplazada hacia campo bajo, correspondiente a un grupo metino base de oxígeno C-6' ( $\delta_H$  5.30), también se observó la correlación <sup>3</sup>J<sub>C-H</sub> del metilo terminal con la señal con el grupo carbonilo centrado en  $\delta$  206.7 atribuido al C-5', corroborando la sustitución en el centro estereogénico C-6' por un grupo éster. Con el experimento COSY se observó la correlación entre los protones H-6 y H-2' con el H-1' indicando que la lactona y el anillo de ciclopropano están conectados a través del centro C-1' ( $\delta$  71.8), esta secuencia también fue confirmada en el experimento bidimensional HMBC (**Espectro A10**, ver apéndice 2).

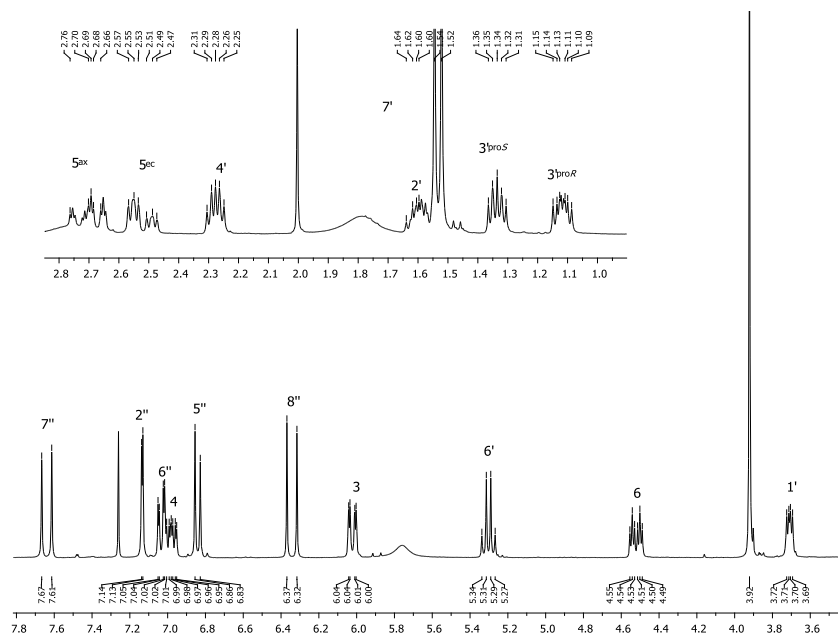


Figura 26. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto **7** en  $\text{CDCl}_3$  (300 MHz).

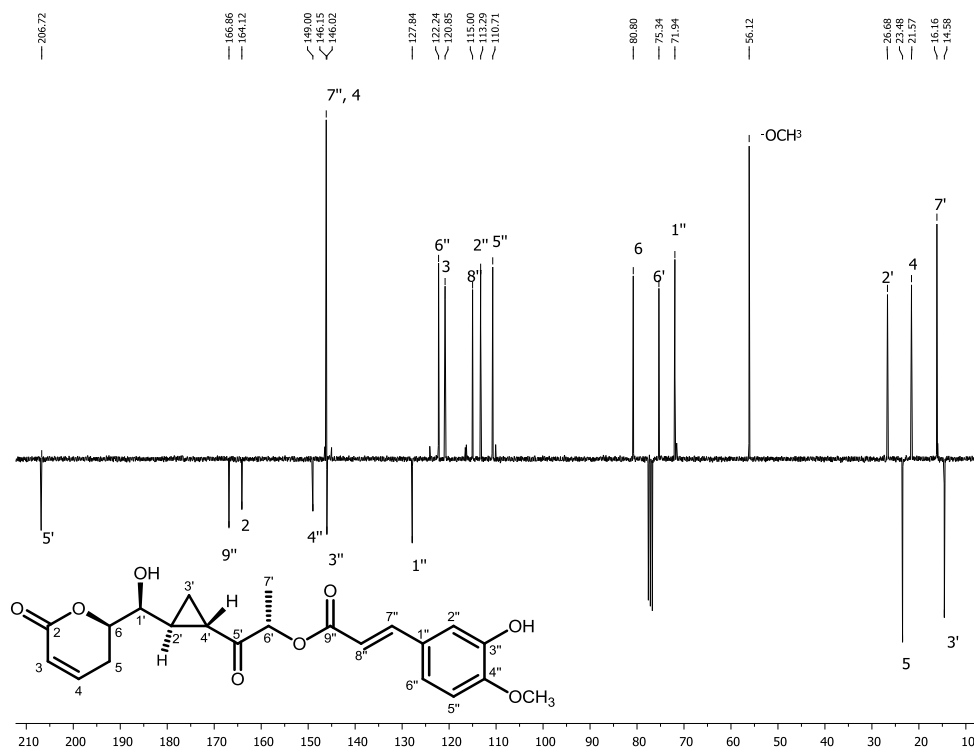


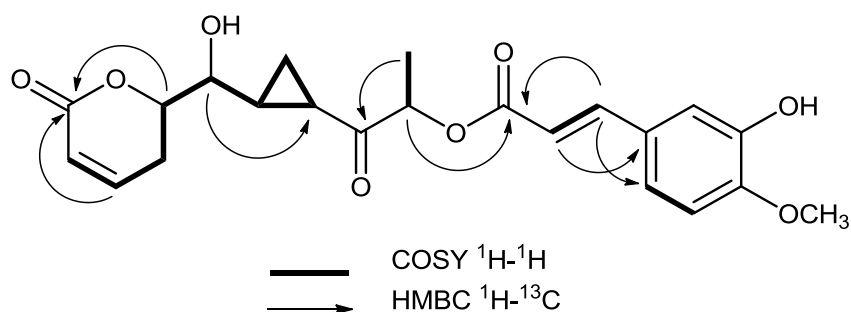
Figura 27. Espectro DEPTQ-135 del compuesto **7** en  $\text{CDCl}_3$  (300 MHz).

**Cuadro 5.** Desplazamientos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  (300MHz) y  $^{13}\text{C}$  (75MHz) para los compuestos **4-7** en  $\text{CDCl}_3$ .

Position	Brevipólida I(4)		Brevipólida H (5) <sup>a</sup>		Brevipólida G (6)		Brevipólida G (7)	
	$\delta_{\text{H}}, J$ en Hz	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}, J$ en Hz	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}, J$ en Hz	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}, J$ en Hz	$\delta_{\text{C}}$
2	---	160.7	---	163.9	---	164.2	---	164.0
3	6.02 ddd (9.7, 2.5, 0.8)	120.7	6.04 ddd (9.7, 2.0, 0.8)	120.8	6.04 ddd (9.7, 2.5, 0.8)	120.7	6.02 ddd (9.7, 2.2, 0.9)	120.8
4	6.92 ddd (9.7, 6.5, 2.2)	146.0	7.00 ddd (9.7, 6.5, 2.2)	146.0	6.98 ddd (9.7, 6.2, 2.2)	146.0	6.98 ddd (9.7, 6.4, 2.2)	146.1
5 <sub>ax</sub>	2.68 dddd (18.5, 12.3, 2.5, 2.2)	23.3	2.71 dddd (18.6, 12.3, 2.2, 2.0)	23.3	2.71 dddd (18.5, 12.3, 2.5, 2.2)	23.3	2.70 dddd (18.5, 12.3, 2.2, 2.2)	23.4
5 <sub>eq</sub>	2.53 dddd (18.5, 6.5, 3.8, 0.8)		2.53 dddd (18.6, 6.5, 4.0, 0.8)		2.53 dddd (18.5, 6.2, 4.0, 0.8)		2.52 dddd (18.5, 6.4, 3.8, 0.9)	
6	4.51 ddd (12.3, 3.8, 3.7)	80.7	4.53 ddd (12.3, 4.0, 3.8)	80.7	4.54 ddd (12.3, 4.0, 3.8)	80.7	4.52 ddd (12.3, 3.8, 3.8)	80.7
1'	3.71 dd (6.3, 3.8)	71.5	3.73 dd (6.3, 3.8)	71.7	3.71 dd (6.3, 3.8)	71.7	3.70 dd (6.3, 3.8)	71.8
2'	1.58 dddd (8.9, 6.3, 6.3, 3.4)	26.3	1.60 dddd (8.9, 6.3, 6.3, 3.4)	26.6	1.63 dddd (8.9, 6.3, 6.3, 3.4)	26.6	1.60 dddd (8.9, 6.3, 6.3, 3.4)	26.6
3' <sub>proS</sub>	1.32 ddd (8.9, 4.0, 3.9)	14.4	1.35 ddd (8.9, 4.0, 3.9)	14.4	1.37 ddd (8.9, 4.0, 4.0)	14.4	1.12 ddd (8.9, 6.3, 4.0)	14.5
3' <sub>proR</sub>	1.10 ddd (8.1, 6.3, 4.0)		1.12 ddd (8.0, 6.3, 4.0)		1.14 ddd (8.3, 6.3, 4.0)		1.34 ddd (8.5, 4.0, 3.9)	
4'	2.26 ddd (8.1, 3.9, 3.4)	21.4	2.28 ddd (8.0, 3.9, 3.4)	21.4	2.29 ddd (8.3, 3.9, 3.4)	21.4	2.28 ddd (8.5, 3.9, 3.4)	21.5
5'	---	206.7	---	206.7	---	206.7	---	206.7
6'	5.24 q (7.0)	75.1	5.30 q (7.0)	75.2	5.31 q (7.0)	75.2	5.30 q (7.0)	75.2
7'	1.48 d (7.0)	16.0	1.54 d (7.0)	16.1	1.54 d (7.0)	16.1	1.60 d (7.0)	16.1
1''	---	127.1	---	126.9	---	126.9	---	127.7
2''	7.70 d (8.9)	127.1	7.49 d (8.9)	129.9	7.39 d (8.5)	129.9	7.13 d (1.9)	113.2
3''	6.89 d (8.9)	114.4	6.91 d (8.9)	114.4	6.83 d (8.5)	114.4	---	145.9
4''	---	160.6	---	161.6	---	161.6	---	148.9
5''	6.89 d (8.9)	114.4	6.91 d (8.9)	114.4	6.83 d (8.5)	114.4	6.84 d (8.3)	110.6
6''	7.70 d (8.9)	127.1	7.49 d (8.9)	129.9	7.39 d (8.5)	129.9	7.03 dd (8.3, 1.9)	122.1
7''	6.94 d (12.7)	145.2	7.70 d (16.0)	145.8	7.64 d (15.9)	145.8	7.64 d (15.9)	146.1
8''	5.91 d (12.7)	115.8	6.38 d (16.0)	113.4	6.31 d (15.9)	113.4	6.34 d (15.9)	114.9
9''	---	165.7	---	166.8	---	166.8	---	166.7
OCH <sub>3</sub>	3.83 s	55.3	3.84 s	55.4	---	---	3.92 s	56.0

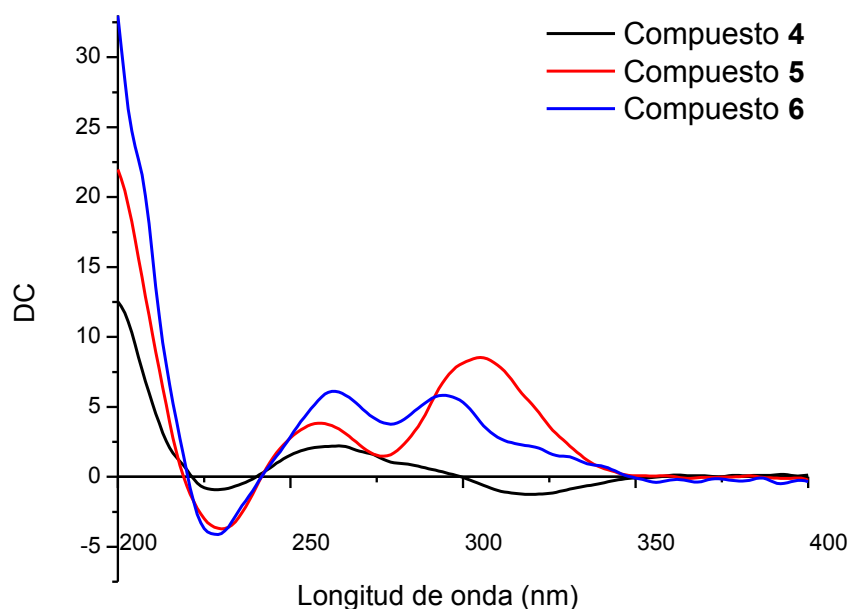
<sup>a</sup> Determinado a  $^1\text{H}$  (400MHz) y  $^{13}\text{C}$  (100MHz)

Todos los hidrógenos y sus respectivos carbonos se asignaron en forma secuencial a través de los espectros COSY y HMBC (**Figura 28, Espectro A9 y A10**, ver apéndice 2). El compuesto **7** presenta el mismo esqueleto estructural que las brevipólidas **4-6** descritas anteriormente. La única diferencia radica en que éste contiene un sistema trisustituido en el anillo aromático con un grupo metoxilo en posición *para* y un hidroxilo en posición *meta*. La fusión *trans* del anillo de ciclopropano se estableció mediante las correlaciones observadas en el espectro NOESY las cuales concuerdan con los compuestos descritos en la literatura.<sup>51,52</sup>

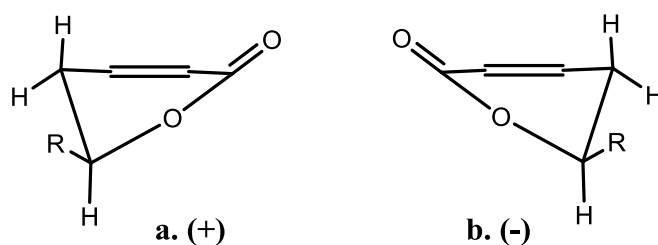


**Figura 28.** Correlaciones homo y heteronuclear observadas para el compuesto **7**.

Para determinar la estereoquímica absoluta del centro estereogénico  $\text{C}_6$  para este grupo de brevipólidas (**4-7**), en primer lugar, se estableció una configuración relativa *pseudoecuatorial* para la cadena lateral de acuerdo con los valores observados para las constantes de acoplamiento entre los protones  $\text{H}_5$  y  $\text{H}_6$  ( $J_{5\text{ax},6} = 12.3$  Hz y  $J_{5\text{ec},6} = 3.8$  Hz). Al aplicar la regla de Sneath,<sup>83</sup> se estableció la estereoquímica absoluta *R* al centro estereogénico  $\text{C}_6$ , mediante la correlación del efecto Cotton positivo obtenido en las curvas de dicroísmo circular ( $\lambda_{\text{max}} 256\text{--}260\text{nm}$ , **Figura 29**) para la transición  $n \rightarrow \pi^*$  del carbonilo de la pirona y cuya conformación correspondería al conformero **a** de la **Figura 30**.

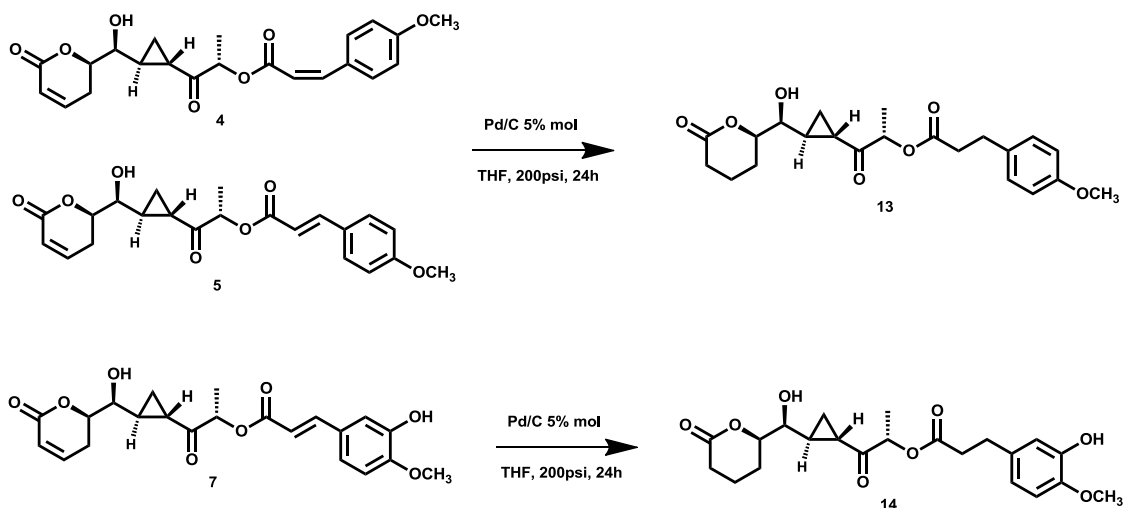


**Figura 29.** Espectro de dicroísmo circular para los compuestos 4-7.



**Figura 30.** Conformaciones posibles para el núcleo de 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona que determinan el signo del efecto Cotton establecido por la regla de Snatzke.

Para correlacionar la estereoquímica de todos los centros quirales en estos cuatro compuestos se llevaron a cabo algunas reacciones. Para los compuestos **4** y **5**, se realizó una reacción de hidrogenación sobre los dobles enlaces en el anillo de pirona y el doble enlace de la cadena, a partir de la reacción con los dos compuestos se obtuvo el producto **13** con las mismas propiedades físicas y espectroscópicas. Esta misma reducción se realizó para el compuesto **7**, generando como producto al compuesto **14** (**Figura 31**).



**Figura 31.** Reacción de hidrogenación.

Para correlacionar la estructura de los compuestos **4** y **5** con **7** se llevó a cabo una reacción de saponificación de los compuestos hidrogenados **13** y **14**, permitiendo la obtención del mismo ácido dodecanoico (**17**) funcionalizado (**Figura 32**) ya que cada uno de los productos de reacción presentó la misma rotación óptica. El centro quiral C-6' en todas las 6-heptenil-5,6 dihydro- $\alpha$ -pironas se ha caracterizado como *S*, lo que parece constituir un rasgo biogénico para este tipo de compuestos.<sup>47</sup> A partir del compuesto hidrogenado **15** se realizó la reacción de derivatización con los ésteres *R*- y *S*-MTPA (**Figura 33**), teniendo en cuenta los modelos descritos para esta metodología se obtuvo el valor de  $\Delta\delta = \delta_{S\text{-MTPA}} - \delta_{R\text{-MTP}}$  (**Figura 34**),<sup>83,84</sup> por comparación de los desplazamientos químicos para cada una de las señales en los espectros de RMN <sup>1</sup>H de los ésteres MTPA-(*R*) y MTPA-(*S*) con lo cual se estableció la configuración del centro quiral C-1' como *S*.



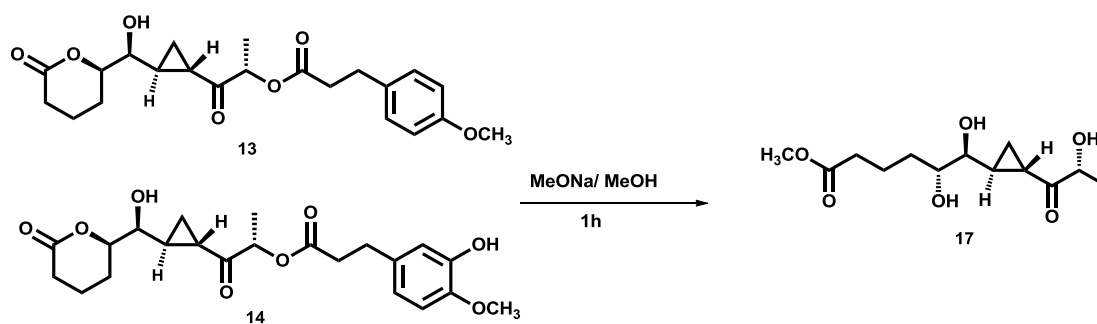


Figura 32. Reacción de saponificación.

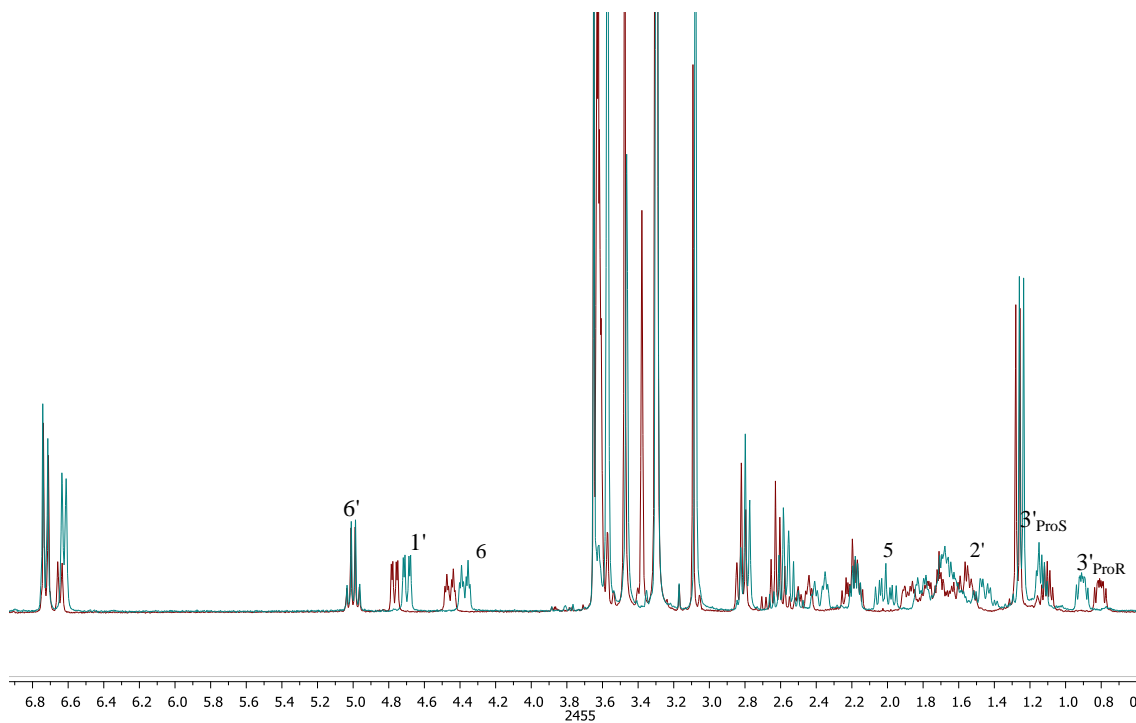
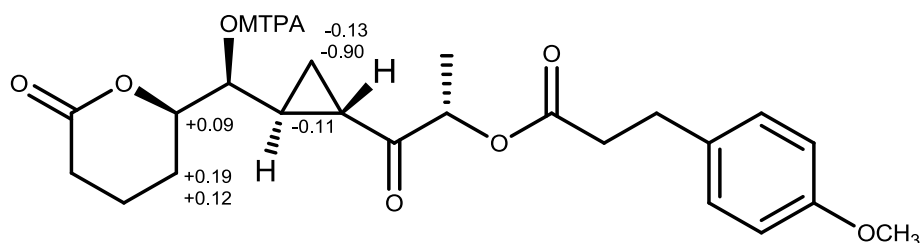
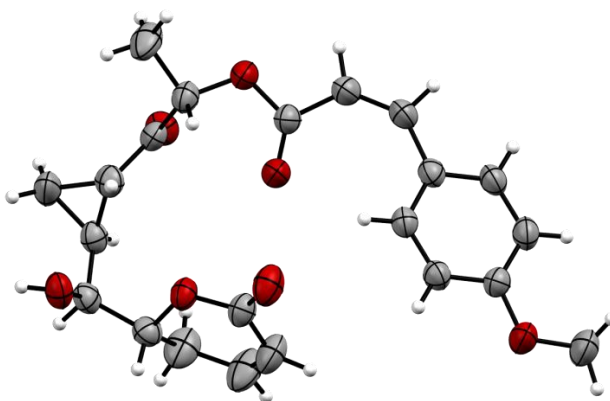


Figura 33. Espectro de RMN <sup>1</sup>H de los ésteres *R*- y *S*-MTPA del compuesto hidrogenado **13** en CDCl<sub>3</sub> (300 MHz).



**Figura 34.** Valores de  $\Delta\delta$  ( $\delta_{S\text{-MTPA}} - \delta_{R\text{-MTPA}}$ ) para los éster de Mosher del compuesto **13**.

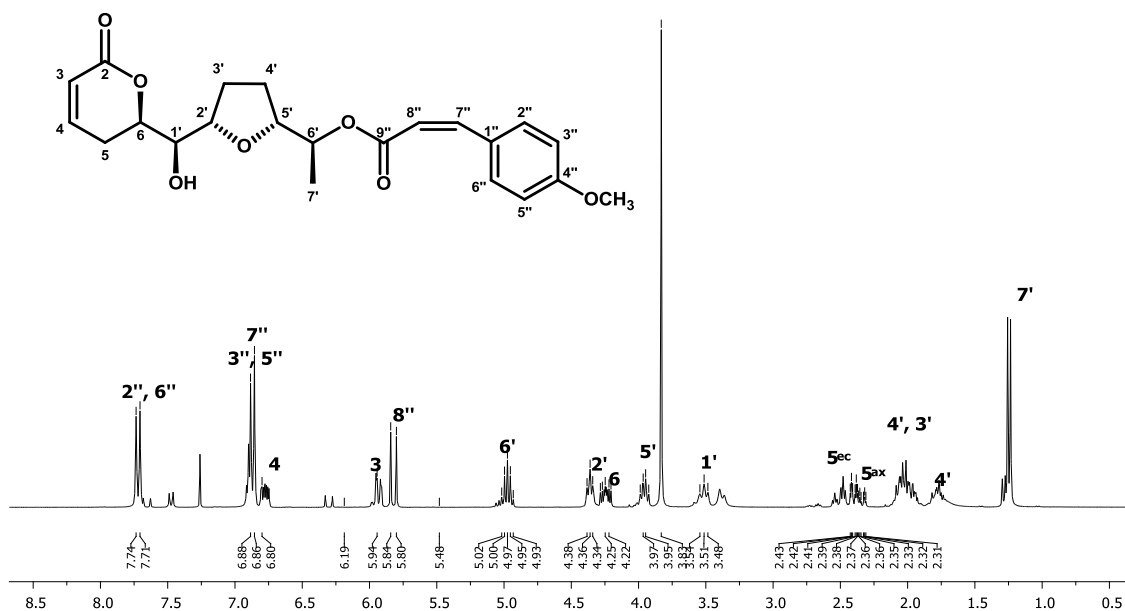
Finalmente, se pudo establecer la configuración absoluta de los compuestos **4-7** utilizando la metodología descrita anteriormente. En resumen, por medio del CD se determinó la configuración absoluta del centro C-6 (**Figura 30a**) como *R*, para el centro estereogénico C-1' se estableció la configuración absoluta como *S* utilizando el método de los ésteres de Mosher. Asimismo, con la estructura obtenida por medio de la difracción de rayos X (**Figura 35**), se confirmó la configuración absoluta *S* para los centros quirales C-2' y C-4', así como la fusión *trans* del ciclopropano, además se logró establecer la configuración del centro quiral C-6' como *S* ya que no existían evidencias experimentales para este centro quiral.



**Figura 35.** Diagrama ORTEP del compuesto **4**.

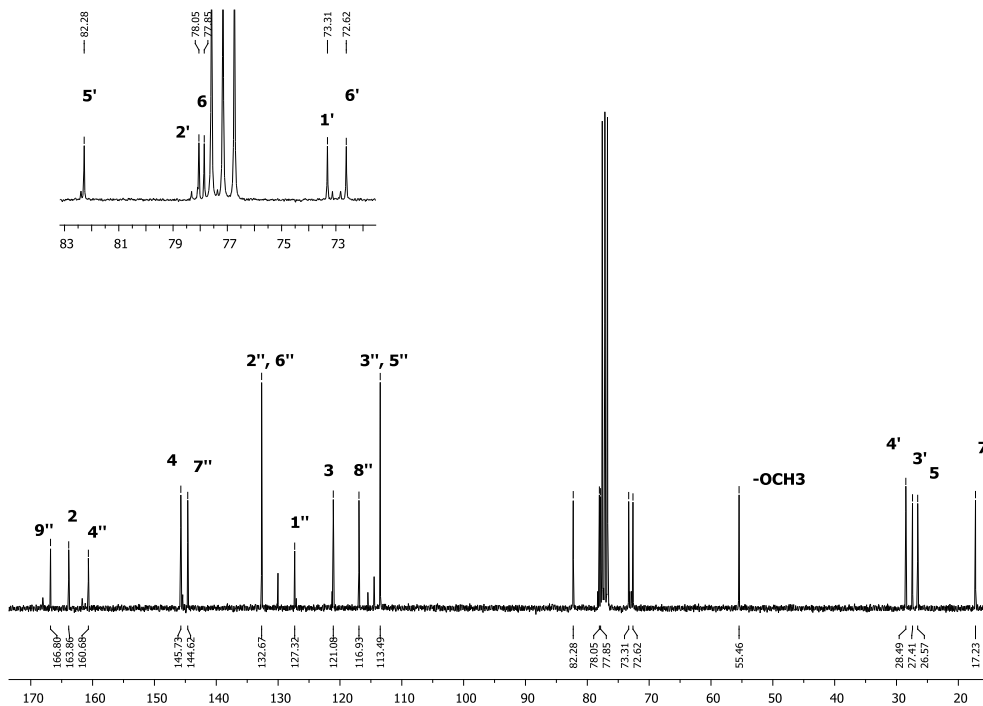
### 6.2.3 Caracterización de los compuestos 8-12

A partir del pico I se obtuvo un aceite incoloro y la fórmula molecular para este compuesto puro fue asignada mediante espectrometría de masas de alta resolución FAB en modo positivo como  $C_{22}H_{27}O_7$  a través del ion cuasimolecular  $[M + 1]^+$  de  $m/z$  403.1729 (HRMS-FAB<sup>+</sup>). El espectro de RMN  $^1H$  (**Figura 36**) muestra un sistema AB para un anillo aromático *para* sustituido centrado en  $\delta_H$  7.72 (2H, d,  $J = 8.7$  Hz, H-2'', H-6'') y 6.87 (2H, d,  $J = 8.7$  Hz, H-3'', H-5''); las señales en 6.88 (1H, d,  $J = 15.9$  Hz, H-7'') y 5.82 (1H, d,  $J = 15.9$  Hz, H-8'') sugieren la presencia de un doble enlace *cis*. También, se observan las señales correspondientes al sistema  $\alpha,\beta$  insaturado del anillo de lactona en 5.93 (1H, d,  $J = 9.8, 1.5$  Hz, H-3) y 6.78 (1H, ddd,  $J = 9.8, 5.8, 2.7$  Hz, H-4). Se observan señales adicionales a campo bajo correspondientes a cuatro grupos metinos base de oxígeno, 4.97 (1H, q,  $J = 6.5$ , H-6'),  $\delta_H$  4.24 (ddd,  $J = 10.9, 8.4, 4.5$  Hz, H-6) y 4.36 (t,  $J = 6.4$  Hz, H-2') y 3.96 (1H, c,  $J = 6.1$ , H-5'). La señal en  $\delta_H$  3.83 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>) sugiere la presencia de un grupo metoxilo.



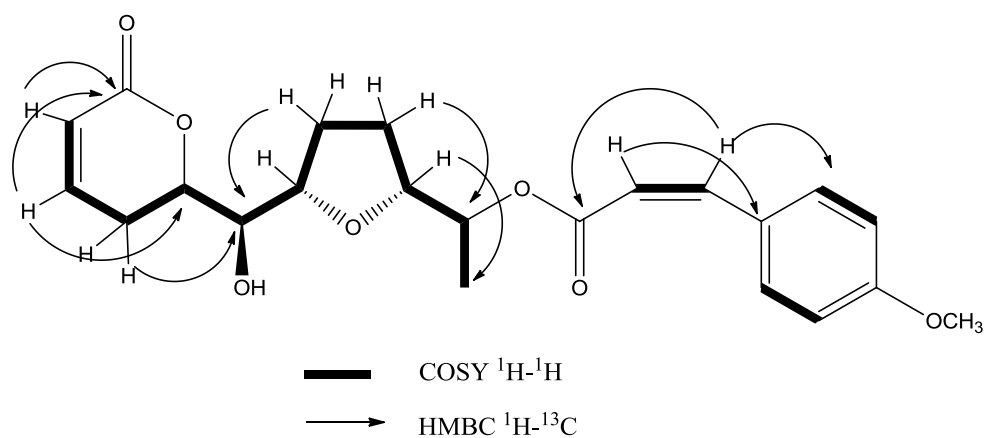
**Figura 36.** Espectro de RMN  $^1H$  del compuesto **8** en  $CDCl_3$  (300 MHz).

Con el experimento COSY se observó la correlación entre los protones de los metilenos que se encuentran a campo alto,  $\delta_H$  2.06, 1.77 (m, H-4') y 1.97 (m, H-3'), y los metinos en 4.36 y 3.96 ppm, sugiriendo la presencia de un anillo de tetrahydrofurano. También, se observa la correlación de H-6 y H-2' con el H-1' indicando que la lactona y el anillo de tetrahydrofurano están conectados a través del centro C-1' (ver apéndice 2, **Espectro A12**). Consistente con los datos de RMN  $^1H$ , los datos espectroscópicos de  $^{13}C$  (**Figura 37**) y DEPTQ-135, muestran las señales de un anillo aromático *para* sustituido, a  $\delta_C$  160.7 (C-4''), 127.3 (C-1''), 132.7 (C-2'' y C-6''), y 113.5 (C-3'' y C-5''), dos dobles enlaces a  $\delta_C$  144.6 (C-7''), 145.7 (C-4), 121.1 (C-3), y 116.9 (C-8''), cinco carbonos metinos base de oxígeno en  $\delta_C$  82.2(C-5'), 78.0 (C-2'), 77.8 (C-6), 73.3(C-1') y 72.6 (C-6'), tres carbonos metilenos  $\delta_C$  28.5(C-4'), 27.4 (C-3'), 26.6 (C-5), y dos metilos  $\delta_C$  55.5 (OCH<sub>3</sub>) y 17.2 (C-7'). Así como dos señales más de carbonos cuaternarios  $\delta_C$  166.8 (C-9''), 163.9 (C-2), que fueron asignados al grupo carbonilo del éster y al grupo carbonilo de la lactona  $\alpha, \beta$  insaturada.

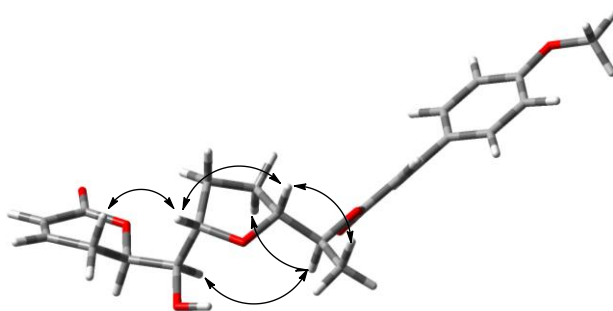


**Figura 37.** Espectro de RMN  $^{13}C$  del compuesto **8** en  $CDCl_3$  (75 MHz)

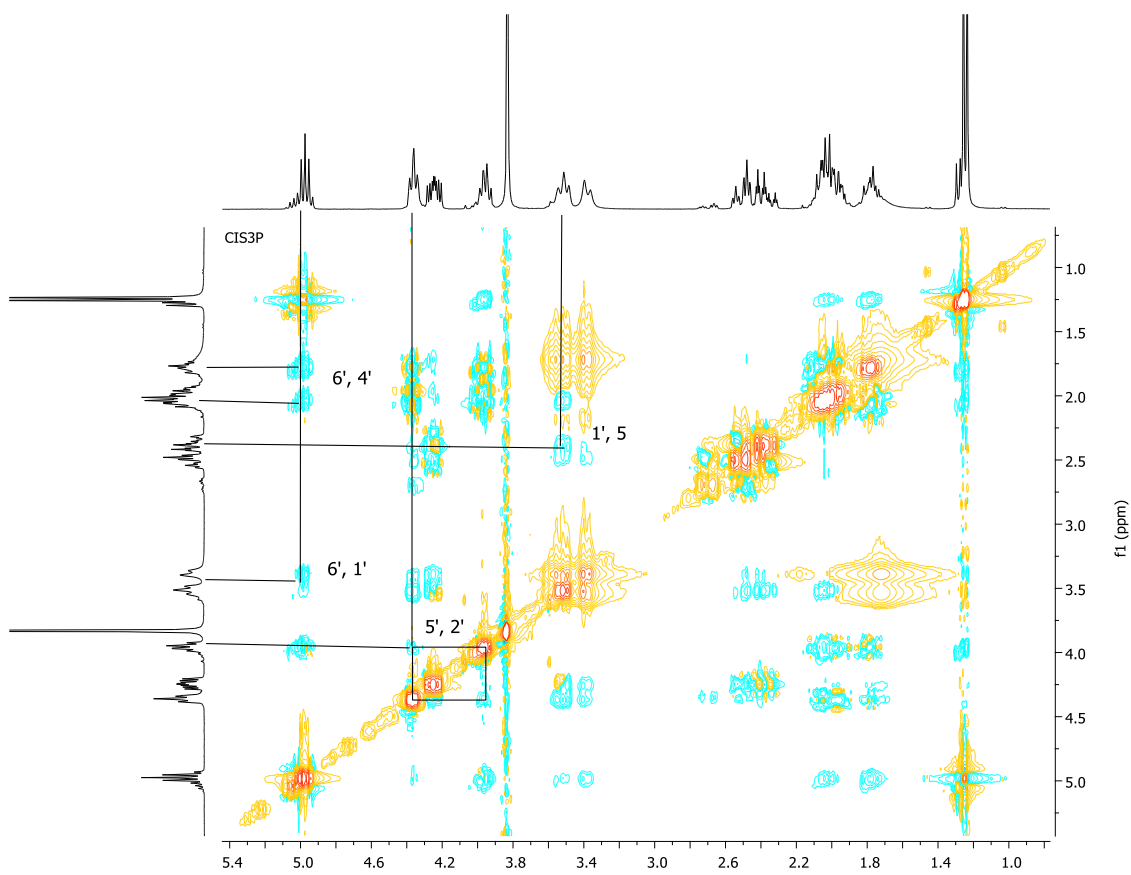
Las señales de los carbonos cuaternarios 160.7 (C-4"), 127.3 (C-1"),  $\delta_C$  166.8 (C-9"), 163.8 (C-2) fueron confirmadas a través de sus correlaciones observadas en el experimento HMBC (**Espectro A14**, ver Apéndice 2) con los protones -OCH<sub>3</sub>, H-6", H-2", H-7" y H-4, respectivamente. Así, se comprobó que el sustituyente en posición *para* en el anillo aromático es un grupo metoxilo. El uso de esta técnica permitió establecer la conectividad a larga distancia ( $^{2,3}J_{C-H}$ ) y corroborar la estructura establecida para este compuesto **8**. La **Figura 38** ilustra las correlaciones observadas. Con ayuda del experimento bidimensional NOESY se pudo establecer la estereoquímica del anillo tetrahidrofuranico como *cis*, debido a que se observa la interacción entre los protones H-2' y H-5' (**Figura 39**).



**Figura 38.** Correlaciones homo y heteronuclear observadas para el compuesto **8**.



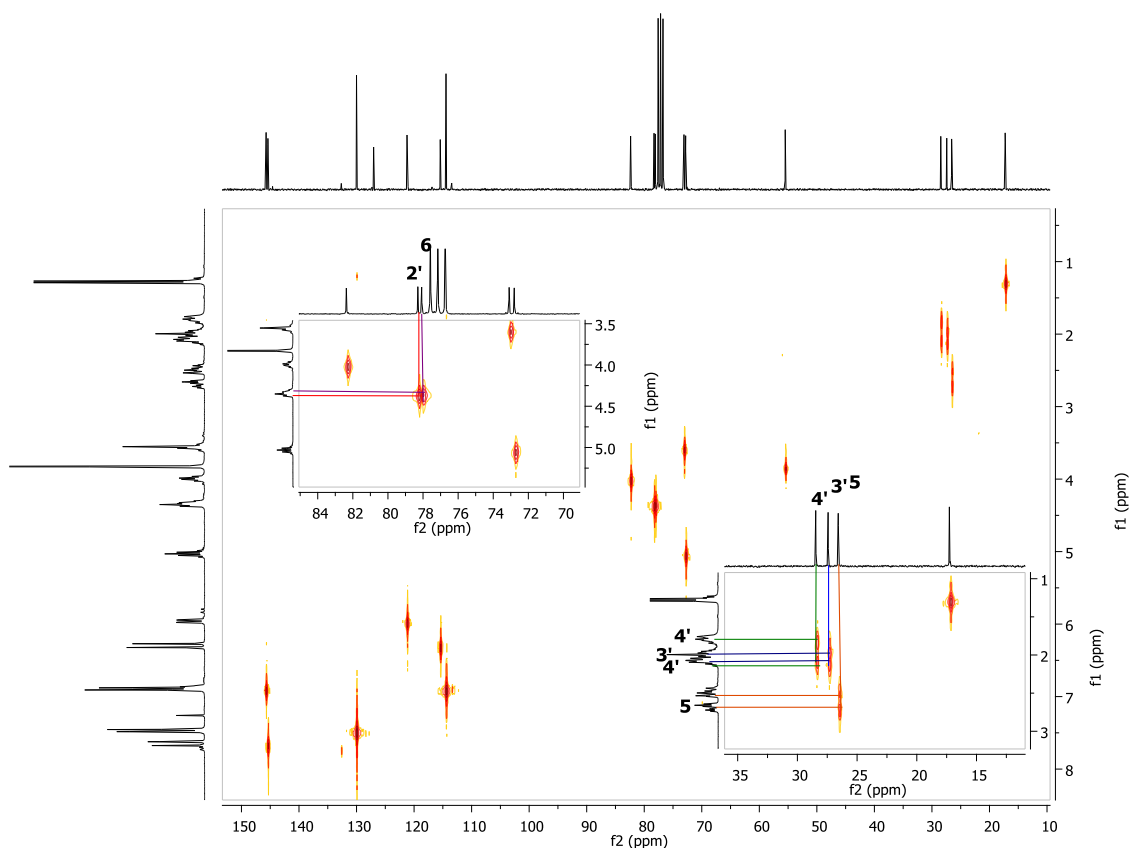
**Figura 39** Correlaciones NOE observadas para el compuesto **8**.



**Figura 40.** Espectro NOESY del compuesto **8** en CDCl<sub>3</sub>.

Por otra parte, el compuesto obtenido a partir del pico I presenta un ion cuasimolecular  $[M + 1]^+$  de  $m/z$  403.1735 en HRMS-FAB<sup>+</sup> con una fórmula  $C_{22}H_{27}O_7$ , consistente con la estructura establecida para el compuesto **9**. La principal diferencia entre el compuesto **8** y **9** se observa en el desplazamiento químico y constante de acoplamiento para los protones que corresponden al doble enlace de los protones 7'' y 8'' con un desplazamiento de  $\delta_H$  7.65 (1H, d,  $J = 15.9$  Hz, H-7'';  $\delta_C$  145.4) y  $\delta_H$  6.30 (1H, d,  $J = 12.7$  Hz, H-8'';  $\delta_C$  115.5); la constante de acoplamiento para los protones 7'' y 8'' de  $J = 15.9$  Hz indica que el compuesto **9** es el isómero geométrico *trans* del compuesto **8** (*cis*). En el espectro RMN  $^1H$  para el isómero *trans*, se observan una señal donde se encuentran solapadas los protones H-6 y H-2' en  $\delta_H$  4.34, que a diferencia del compuesto **8** (*cis*) se observa dos señales bien definidas en  $\delta_H$  4.24 (ddd,  $J = 10.9, 8.4, 4.5$  Hz, H-6) y 4.36 (t,  $J = 6.4$  Hz, H 2') (**Cuadro 6 y 7 Espectro A15**, ver Apéndice 2).

Con ayuda del experimento bidimensional heteronuclear  $^{13}C$ - $^1H$  a un enlace de distancia ( $^1J_{C-H}$ ) HETCOR, se pudo establecer la correlación de cada uno de los protones metilénicos encontrados a campo alto con su correspondiente carbono. También, se pudo identificar y asignar los carbonos correspondientes para dos metinos base de oxígeno que presentan señales solapadas en el espectro de RMN  $^1H$  correspondientes a los protones H-6 ( $\delta_C$  78.1) y H-2' ( $\delta_C$  78.3) que se encuentran en  $\delta_H$  4.34 ppm. La señal correspondiente al H-4 del doble enlace que hace parte del anillo de pirona también se encuentra solapado con la señal de los hidrógenos H-3'' y H-5'' que hacen parte del sistema aromático, esta técnica permitió la identificación de cada uno de los protones y sus respectivos carbonos (**Figura 41**).



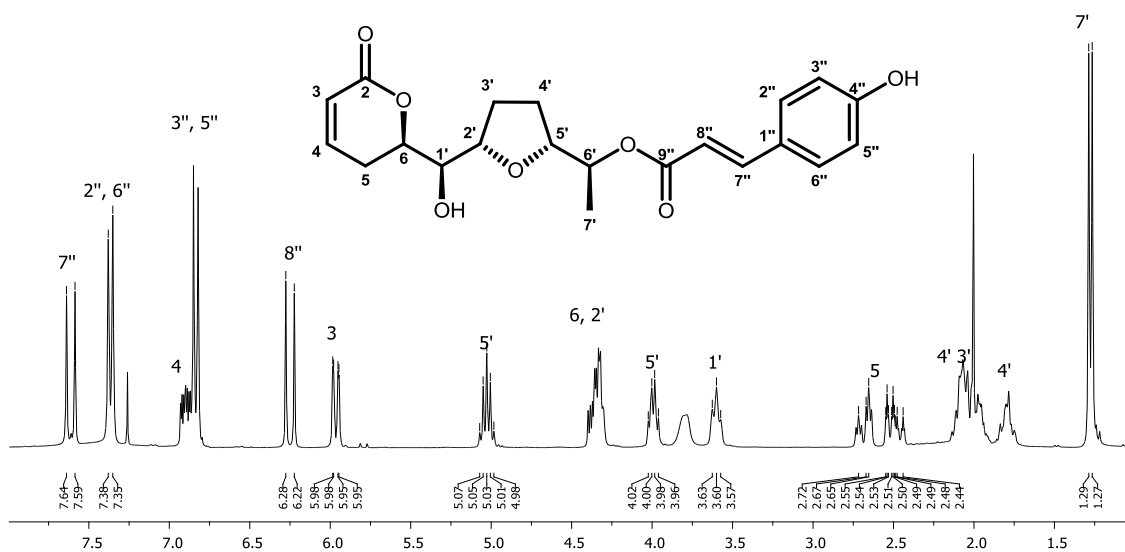
**Figura 41.** Espectro HETCOR del compuesto **9** en  $\text{CDCl}_3$

A partir del pico IV, se obtuvo un aceite incoloro que en su espectro de HRMS-FAB<sup>+</sup> se observó un ion cuasimolecular de  $m/z$  389.1578  $[\text{M} + \text{H}]^+$  consistente con la fórmula  $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{O}_7$ , el cual fue atribuido a la estructura del compuesto **10**. La principal diferencia espectroscópica entre los compuesto **9** y **10** es la ausencia en la RMN  $^1\text{H}$  de un singlete en  $\delta_{\text{H}}$  3.83 ppm que corresponde a la presencia de un grupo metoxilo en el anillo aromático (**Figura 42**). Para el compuesto **10** se observa el sistema aromático *para* sustituido y de acuerdo con la fórmula molecular establecida y el desplazamiento en los protones correspondientes al anillo hay un sustituyente hidroxilo en esta posición. Las señales en 7.62 (1H, d,  $J = 15.9$  Hz, H-7'') y 6.26 (1H, d,  $J = 15.9$ Hz, H-8'') sugieren la presencia de un doble enlace *trans*. También, se observan las señales correspondientes al sistema  $\alpha,\beta$  insaturado del anillo de lactona en 5.97 (1H, d,  $J = 9.8, 1.6$ Hz, H-3) y 6.91



(ddd,  $J = 9.8, 5.9, 2.6\text{Hz}$ , H-4). El resto de las señales concuerdan con el esqueleto establecido para el compuesto **9** (Cuadro 6).

A partir del pico V, se obtuvo un aceite incoloro en su espectro de HRMS-FAB<sup>+</sup> se observó un ion cuasimolecular de  $m/z$  389.1572  $[\text{M} + \text{H}]^+$  consistente con la fórmula  $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{O}_7$ , lo que indica que el compuesto **11** es el isómero geométrico *cis* del compuesto **10** (*trans*).



**Figura 42.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H del compuesto **10** en CDCl<sub>3</sub> (300 MHz).

El compuesto obtenido a partir del pico VIII se obtuvo como un aceite incoloro y su fórmula molecular fue determinada como  $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{O}_8$  mediante el ion cuasimolecular observado en su espectro de masas HRMS-FAB<sup>+</sup> de  $m/z$  405.1551  $[\text{M}+1]^+$  y su estructura fue establecida como la representada para el compuesto **12**. Los espectros de RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C (**Espectro A24 y A26**, Apéndice 2) confirmaron la fórmula molecular y demostraron la presencia de un grupo metilo, tres metilenos, doce grupos metinos y cinco carbonos cuaternarios (Cuadro 6). En el espectro de RMN <sup>1</sup>H, se observan las

señales para un anillo aromático trisustituido con grupos hidroxilos en las posiciones *meta* y *para* con desplazamientos de  $\delta$ 7.12 (1H, s, H-2"), 7.02 (1H, dd,  $J = 8.3$  Hz, H-6") y 6.84 (1H, d,  $J = 8.1$  Hz, H-5"). Esta es la principal diferencia entre con los compuestos anteriormente descritos. Para este compuesto, se presentan los desplazamientos en la RMN  $^1\text{H}$  en  $\text{CDCl}_3$  y en  $\text{CD}_3\text{CN}$ , ya que en este último se observó una mejor dispersión de las señales que facilitó la identificación de cada una de multiplicidades (Cuadro 6).

**Cuadro 6.** Desplazamientos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  (300MHz) para los compuestos **8-12** tomados en  $\text{CDCl}_3$ 

Posición	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (J en Hz)	$\delta_{\text{H}}$ (J en Hz)	$\delta_{\text{H}}$ (J en Hz)	$\delta_{\text{H}}$ (J en Hz)	$\delta_{\text{H}}$ (J en Hz) $\text{CDCl}_3$	$\text{CD}_3\text{CN}$
<b>3</b>	5.93 dd (9.8, 1.5)	5.96 dd (9.8, 1.6)	5.97 dd (9.8, 1.6)	5.93 dd (9.8, 1.6)	6.00 d (9.8)	5.88 dd(9.6, 1.5)
<b>4</b>	6.78 ddd (9.8, 5.8, 2.7)	6.88 <sup>a</sup>	6.88 ddd (9.8, 5.9, 2.6)	6.77 ddd (9.8, 5.8, 3.0)	6.98 <sup>c</sup>	6.94 ddd(9.6, 4.4, 2.0)
<b>5<sub>ec</sub></b>	2.51 ddd (18.7, 5.4, 2.7)	2.70 ddd (18.8, 5.4, 0.9)	2.70 ddd (18.8, 4.9, 1.3)	2.47 ddd (18.4, 5.1, 1.3)	2.60 m	2.50 m
<b>5<sub>ax</sub></b>	2.37 ddd (18.7, 11.1, 2.7)	2.48 ddd (18.8, 11.0, 2.6)	2.50 ddd (18.8, 11.1, 2.6)	2.34 ddd (18.4, 11.0, 2.6)		
<b>6</b>	4.24 ddd (11.1, 8.4, 4.5)	4.34 <sup>b</sup>	4.36 <sup>b</sup>	4.23 ddd (11.0, 8.4, 4.5)	4.40 <sup>c</sup>	4.36 dt (11.0, 6.0)
<b>1'</b>	3.46 t sa	3.56 dd (8.0, 1.7) <sup>c</sup>	3.59 dd (8.2, 1.8) <sup>c</sup>	3.51 dd (8.5, 1.4) <sup>c</sup>	3.75 sa	3.60 sa
<b>2'</b>	4.36 dd (6.4, 6.4)	4.34 <sup>b</sup>	4.36 <sup>b</sup>	4.36 dd (6.8, 6.8)	4.23 s.a	4.10 td (7.0, 3.0)
<b>3'</b>	1.97 m	1.97 m	1.99 m	1.97 m	1.99 m	1.99 m
<b>4'</b>	2.06 m	2.08 m	2.10 m	2.08 m	2.06 m	2.03 m
	1.77 m	1.80 m	1.80 m	1.76 m	1.82 m	1.77 m
<b>5'</b>	3.96 c ( 6.9)	4.00 c ( 7.1)	4.00 c ( 7.1)	3.95 c (7.1)	4.03 c ( 6.9)	3.95 c (6.8)
<b>6'</b>	4.97 q (6.4)	5.03 q (6.5)	5.04 q (6.5)	4.97 q (6.5)	5.00 q (6.5)	4.97 q (6.5)
<b>7'</b>	1.25 d (6.4)	1.28 d (6.5)	1.29 d (6.5)	1.24 d (6.5)	1.31 d (6.5)	1.24 d (6.5)
<b>2''</b>	7.72 d (8.7)	7.47 d (8.7)	7.38 d (8.6)	7.67 d (8.6)	7.18 s	7.12 s
<b>3''</b>	6.87 d (8.7)	6.88 d (8.7) <sup>a</sup>	6.84 d (8.6)	6.82 d (8.6)		
<b>5''</b>	6.87 d (8.7)	6.88d (8.7) <sup>a</sup>	6.84d (8.6)	6.82d (8.6)	6.94 <sup>c</sup>	7.02 d (8.1)
<b>6''</b>	7.72 d (8.7)	7.47 d (8.7)	7.38 d (8.6)	7.67 d (8.6)	6.86 <sup>c</sup>	6.84 d (8.1)
<b>7''</b>	6.88d (12.8)	7.65 d (15.9)	7.62 d (15.9)	6.83 d (12.8)	7.57 d (15.9)	7.58 d (15.9)
<b>8''</b>	5.82 d (12.8)	6.30 d (15.9)	6.26 d (15.9)	5.82 d (12.8)	6.24 d (15.9)	6.29 d (15.9)
<b>-OCH<sub>3</sub></b>	3.83 s	3.83 s				

<sup>a,b.</sup> Señal sobrepuesta <sup>c</sup> Determinado en  $\text{CDCl}_3 + \text{D}_2\text{O}$

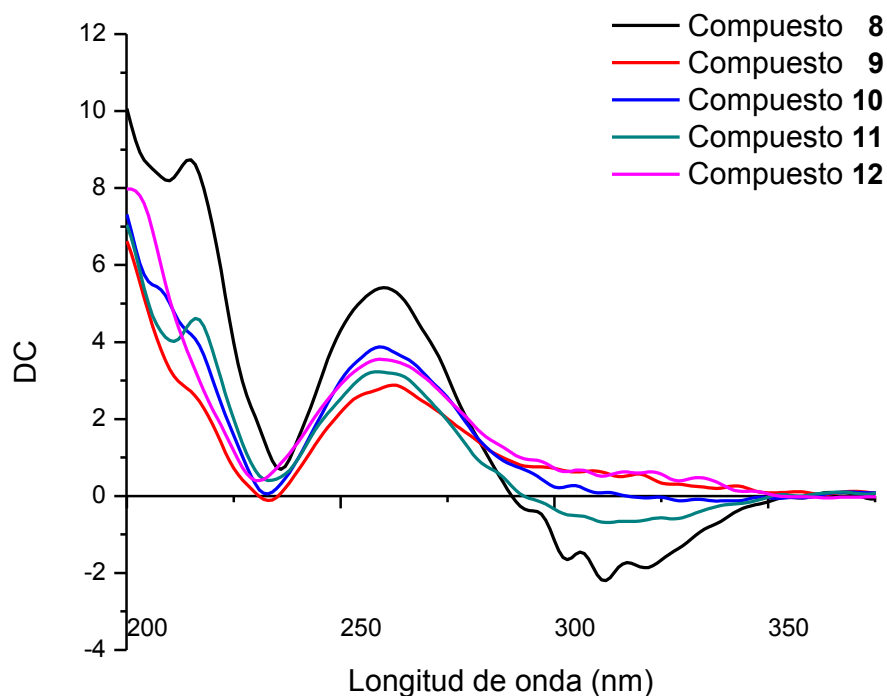
**Cuadro 7.** Desplazamientos químicos de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75MHz) para los compuestos **8-12** tomados en  $\text{CDCl}_3$ 

Posición	<b>8</b> $\delta\text{ppm } ^{13}\text{C}$	<b>9</b> $\delta\text{ppm } ^{13}\text{C}$	<b>10</b> $\delta\text{ppm } ^{13}\text{C}$	<b>11</b> $\delta\text{ppm } ^{13}\text{C}$	<b>12</b> $\delta\text{ppm } ^{13}\text{C}$
<b>2</b>	163.9	163.2	164.1	164.3	164.8
<b>3</b>	121.1	121.2	121.1	121.0	121.0
<b>4</b>	145.7	145.7	146.1	146.1	146.5
<b>5</b>	26.6	26.6	26.6	26.6	25.6
<b>6</b>	77.8	78.1	78.2	77.8	78.4
<b>1'</b>	73.3	73.1	73.2	73.3	73.4
<b>2'</b>	78.0	78.2	78.3	78.0	78.5
<b>3'</b>	27.4	27.4	27.5	27.3	27.7
<b>4'</b>	28.5	28.5	28.5	28.5	28.3
<b>5'</b>	82.2	82.4	82.5	82.2	82.5
<b>6'</b>	72.6	72.8	73.2	72.8	72.4
<b>7'</b>	17.2	17.3	17.3	17.2	17.5
<b>1''</b>	127.3	127.0	126.7	127.0	127.1
<b>2''</b>	132.7	130.0	130.3	132.9	114.5
<b>3''</b>	113.5	114.5	116.1	115.1	144.4
<b>4''</b>	160.7	161.6	158.7	157.5	147.3
<b>5''</b>	113.5	114.5	116.1	113.5	115.4
<b>6''</b>	132.7	130.0	130.3	132.9	122.3
<b>7''</b>	144.6	145.4	145.8	144.6	146.1
<b>8''</b>	116.9	115.5	115.0	116.8	114.7
<b>9''</b>	166.8	168.0	168.3	167.3	168.0
<b>-OCH<sub>3</sub></b>	55.5	56.5	-	-	-

Para determinar la configuración absoluta del centro estereogénico  $\text{C}_6$ , se determinó, en primer lugar, una configuración relativa *pseudo*-ecuatorial para la cadena lateral de acuerdo con los valores observados para las constantes de acoplamiento entre los protones  $\text{H}_5$  y  $\text{H}_6$  ( $J_{5\text{ax},6} = 11 \text{ Hz}$  y  $J_{5\text{ec},6} = 4.7 \text{ Hz}$ ). De esta manera, el anillo de la 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona podría adoptar cualquiera de las dos conformaciones ilustradas en la Figura 30.

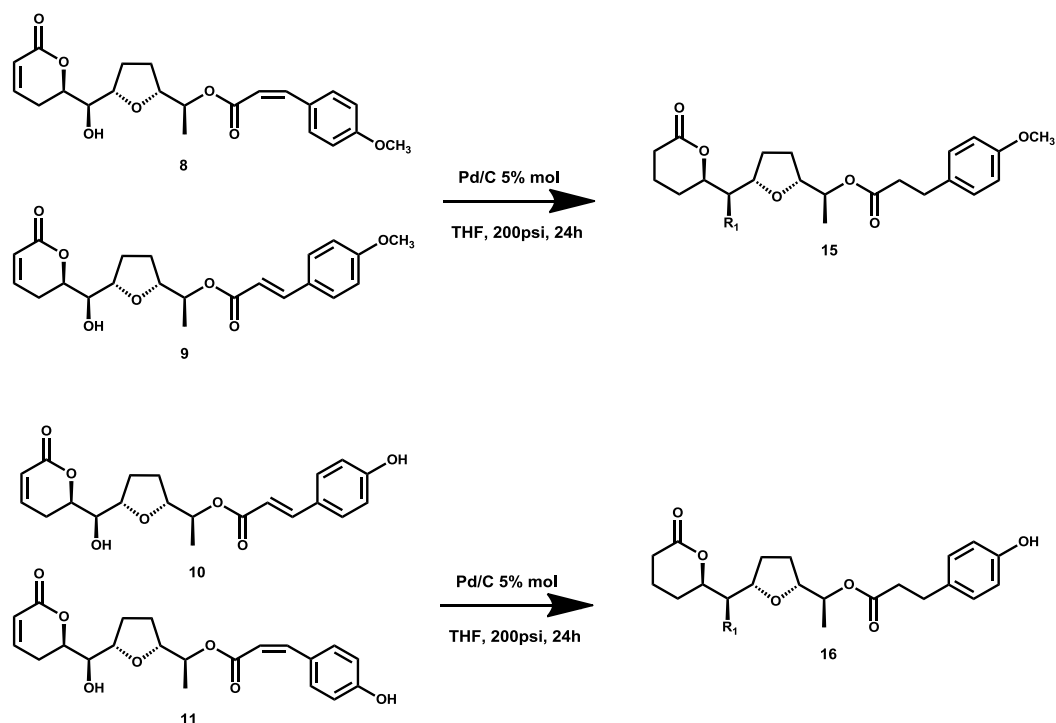
Al aplicar la regla de Sznatzke,<sup>83</sup> se estableció la estereoquímica absoluta *R* al centro estereogénico  $\text{C}_6$  para los compuestos **8-12**, mediante la correlación del efecto Cotton positivo observado en las curvas de dicroísmo circular ( $\lambda_{\text{max}} 256\text{--}260 \text{ nm}$ , **Figura 43**) para la transición  $n \rightarrow \pi^*$  del carbonilo de la pirona y cuya conformación

correspondería al conformero **a**. La configuración absoluta  $C_6$  (*R*) se fundamenta, de manera adicional, en consideraciones biogénicas ya que todas las 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas naturales aisladas de las labiadas presentan la misma configuración absoluta, deducida por evidencias adicionales de tipo químico-degradativas y cristalográficas.<sup>47</sup>



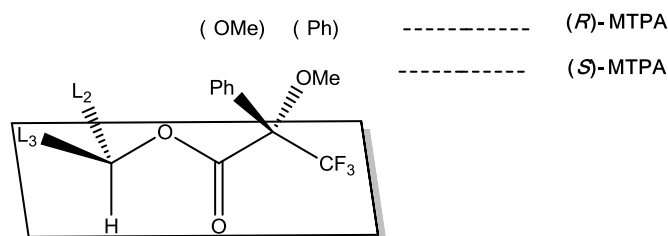
**Figura 43.** Espectro de dicroísmo circular para los compuestos **8-12**.

Para comprobar que los isómeros geométricos con una conformación *cis* (**8** y **11**) en el residuo de cinamato presentaban la misma estereoquímica de los isómeros *trans* (**9**, **10**) en todos los centros quirales, se llevó a cabo una reacción de reducción de los dobles enlaces. Así, se obtuvo un producto tetrahidrogenado con las mismas propiedades físicas y espectroscópicas en cada par de isómeros (**Figura 44**).



**Figura 44.** Reacción de hidrogenación para los compuestos **8-11**.

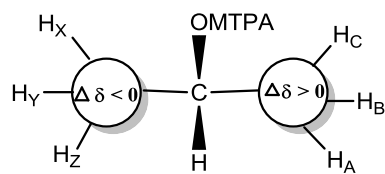
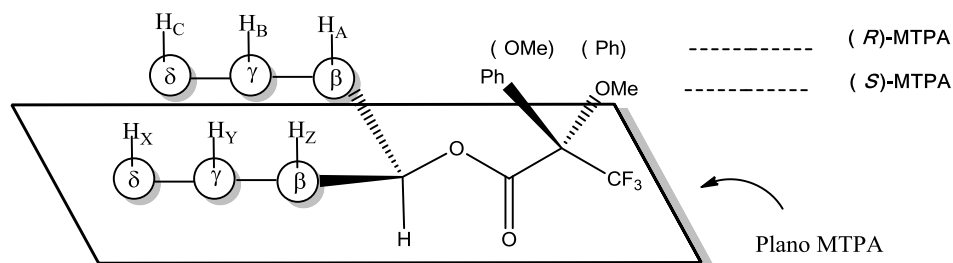
La configuración absoluta para el C-1' se asignó como *R*, utilizando el método de derivatización para generar los ésteres de Mosher (MTPA).<sup>65</sup> Este procedimiento se llevó a cabo tanto para el producto natural **9** como para el producto de hidrogenación **15**. El registro de las señales se realizó a partir de la mezcla de reacción en el tubo de resonancia y cada uno de los protones fue identificado a través de las correlaciones observadas en el experimento bidimensional COSY.<sup>85</sup> Al considerar los modelos configuracionales descritos para esta metodología se obtuvo el valor de  $\Delta\delta$  (MTPA;  $\delta_S$ -éster -  $\delta_R$ -éster),<sup>83,84</sup> por comparación de los espectros de RMN <sup>1</sup>H de los dos ésteres (*R*)- y (*S*)-MTPA (ver apéndice, **Espectro A40**). En este método debido al efecto diamagnético del anillo aromático, el sustituyente L<sub>2</sub> del éster (*R*)-MTPA presentaría su señal a campos más altos que la correspondiente al éster (*S*)-MTPA de acuerdo al modelo de correlación configuracional ilustrado en la **Figura 45**.



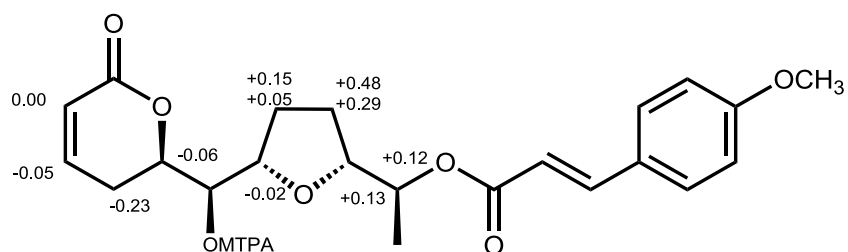
**Figura 45.** Modelo de correlación configuracional para los ésteres (*R*) y (*S*)-MTPA.

El efecto anisotrópico del grupo fenilo del MTPA afecta los protones que se encuentran hasta 10 nanómetros de distancia. Kakisawa<sup>72,73</sup> ideó un método para determinar configuraciones absolutas que consiste en:

- asignar todos los protones que se puedan para los ésteres de (*R*)-(*S*)-MTPA;
- obtener los valores de  $\Delta\delta = \delta_{S\text{-MTPA}} - \delta_{R\text{-MTPA}}$ ;
- ubicar los protones con  $\Delta\delta > 0$  a la derecha y los  $\Delta\delta < 0$  a la izquierda del modelo A de acuerdo con la representación configuracional ilustrada en la **Figura 46**.
- construir un modelo del compuesto y confirmar que todos los hidrógenos asignados con valores de  $\Delta\delta$  positivos y negativos estén en los costados derecho e izquierdo del plano MTPA, respectivamente. Los valores absolutos de  $\Delta\delta$  deben reflejar cualitativamente la distancia al MTPA. Cuando estas condiciones se satisfacen, el modelo A revelará la configuración absoluta del compuesto en cuestión. Por ejemplo, al aplicar el modelo de Kakisawa al compuesto esterificado a partir del producto natural **9** se obtuvieron los valores de  $\Delta\delta$  que se muestran en la **Figura 47**.


**Modelo A**

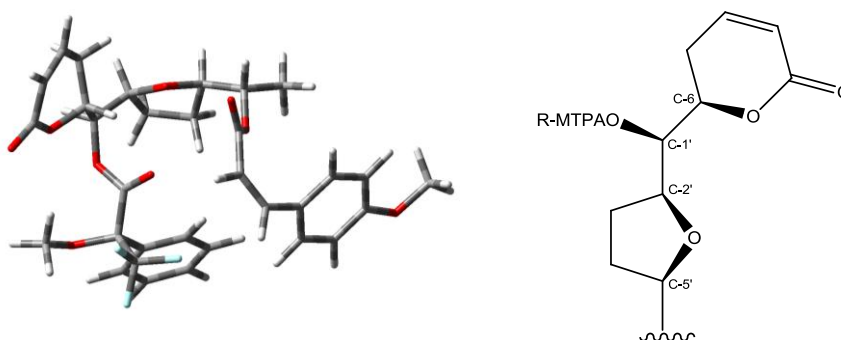
**Figura 46.** Modelo de correlación configuracional del plano MTPA y modelo para determinar la configuración absoluta de alcoholes secundarios.



**Figura 47.** Valores de  $\Delta\delta$  ( $\delta_{S\text{-MTPA}} - \delta_{R\text{-MTPA}}$ ) para los ésteres de Mosher del compuesto **9**.



Los valores obtenidos para los compuestos esterificados a partir de los compuestos **9** y **15** se resumen en la **Cuadro 8**. Los valores de  $\Delta\delta$  para los protones H-6 y H-2' no reflejan en forma cualitativa su distancia vecinal al MTPA y se observa un valor irregular de muy baja magnitud para estas dos señales alfa al plano del MTPA. Estudios previos que involucraron a un extenso grupo de acetogeninas, conteniendo grupos tetrahidrofuránicos vecinales a grupos hidroxilos secundarios, demostraron el mismo comportamiento anómalo para las señales H-2 y H-5 de los tetrahidrofuranos 2,5-disustituídos que constituyen el rasgo estructural de estos productos naturales citotóxicos.<sup>65</sup> Probablemente, se debe a las interacciones electrónicas 1,3 oxígeno-hidrógeno que se incrementan en estos compuestos por las restricciones conformacionales que resultan de la esterificación del grupo hidroxilo en C-1' (**Figura 48**) y, en consecuencia, minimizan los efectos electrónicos inducidos por los sustituyentes de la entidad quiral de Mosher. Estos valores irregulares de  $\Delta\delta$  no se deben considerar para la preparación del modelo de correlación configuracional<sup>86</sup> pero sí ayudan a establecer la configuración relativa<sup>65</sup> (*eritro* o *treo*) que deben guardar los grupos oxigenados involucrados, i.e., la disposición de los oxígenos entre los centros C-6/C-1' y C-1'/C-2' (**Figura 48**)



**Figura 48.** Proyección para el éster de Mosher del compuesto **9**.

**Cuadro 8.** Desplazamiento químico RMN  $^1\text{H}$  de las señales diagnósticas de los derivados de éster (S)- y (R)-MTPA del compuesto **9** y el derivado hidrogenado **13**.

Éster MTPA		Desplazamiento químico de protón ( $\Delta\delta = \delta_{S\text{-MTPA}} - \delta_{R\text{-MTPA}}$ )								
		H-4 $\Delta\delta$	H-5 $\Delta\delta$	H-6 $\Delta\delta$	H-2' $\Delta\delta$	H-3' $\Delta\delta$	H-4' $\Delta\delta$	H-5' $\Delta\delta$	H-6' $\Delta\delta$	C1'
<b>9</b>	<b>S</b>	6.57	2.10	4.49	3.99	1.61	1.61	3.86	4.91	
		-0.05	-0.23	-0.06	-0.02	1.83	1.83	+0.13	+0.12	<b>R</b>
	<b>R</b>	6.62	2.33	4.55	4.01	+0.15	+0.48	3.73	4.79	
						+0.05	+0.29			
					1.46	1.13				
					1.78	1.54				
<b>13</b>	<b>S</b>	1.41	1.93	4.31	3.89	1.53		3.75	4.91	
		-0.11	-0.20	-0.08	-0.05	0.00	-----	+0.10	+0.06	<b>R</b>
		1.52	2.13	4.39	3.94	1.53		3.65	4.79	

Para esta serie de compuestos con un anillo de tetrahidrofurano en su estructura se pudo establecer la configuración absoluta utilizando diferentes técnicas. El dicroísmo circular confirmó la estereoquímica absoluta para el centro C-6 como *R*; utilizando la metodología descrita para los ésteres de Mosher se estableció la configuración del centro C-1' como *R*; para C-2' se estableció la configuración absoluta *S* ya que debe existir una configuración relativa *treo* entre los dos oxígenos en C-1' y C-2' a través de la irregularidad observada en el  $\Delta\delta$  ( $\delta_{S\text{-MTPA}} - \delta_{R\text{-MTPA}}$ ) para H-2' en el derivado MTPA; los efectos NOEs observados entre H-2' y H-5' permitieron evidenciar fusión *cis* del anillo de tetrahidrofurano y, por lo tanto, la estereoquímica absoluta para el centro quiral C-5' corresponde al descriptor *R*. Asimismo, se estableció la configuración absoluta para el centro C-6' como *S* apoyado en las evidencias biogénicas para este tipo de compuestos y la configuración absoluta obtenida a partir de los rayos X para las brevipólidas que contienen el ciclopropano.

Siguiendo la secuencia de los compuestos que se describieron anteriormente para la serie de las brevipólidas de la especie *Hyptis brevipes*, el compuesto **8** se nombró como:

brevipólida **K** [(Z)-(S)-1-((2R, 5S)-5-((R)-hidroxi((R)-6-oxo-3,6-dihidro-2H-pyran-2-il)metil)tetrahidrofuran-2-il)etil-3-(4-metoxifenil)acrilato; el compuesto **9** como la

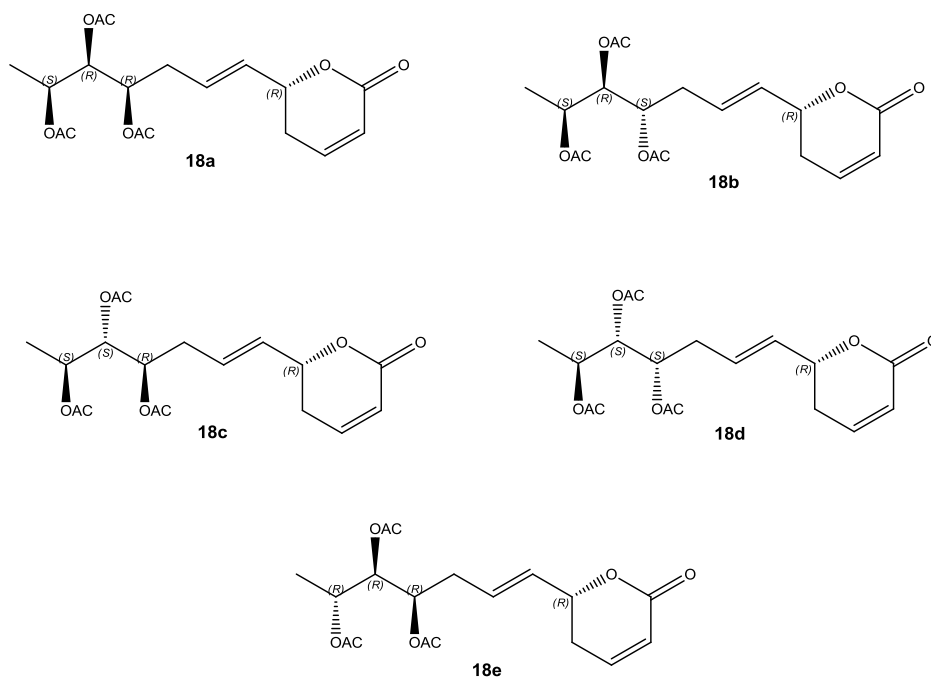
brevipólida **L** [(*E*)-(*S*)-1-(2*R*,5*S*)-5-((*R*)-hidroxi((*R*)-6-oxo-3,6-dihidro-2H-pyran-2-il)-metil)tetrahidrofuran-2-il)etil-3-(4-metoxifenil)acrilato]; el compuesto **10** se designó con el nombre de brevipólida **M** [(*E*)-(*S*)-1-((2*R*,5*S*)-5-((*R*)-hidroxi((*R*)-6-oxo-3,6-dihidro-2H-pyran-2-yl)metil)tetrahidrofuran-2-il)etil-3-(4-hidroxifenil)acrilato]; como la brevipólida **N** al compuesto **11** [(*Z*)-(*S*)-1-((2*R*,5*S*)-5-((*R*)-hidroxi((*R*)-6-oxo-3,6-dihidro-2H-pyran-2-yl)metil)tetrahidrofuran-2-il)etil 3-(4-hidroxifenil)acrilato]; y, por último, como la brevipólida **O** al compuesto **12** [(*E*)-(*S*)-1-((2*R*,5*S*)-5-((*R*)-hidroxi((*R*)-6-oxo-3,6-dihidro-2H-pyran-2-il)metil)tetrahidrofuran-2-yl)etil-3-(3,4-hidroxifenil)acrilato].

### 6.3 Análisis conformacional de 6-alquenil-5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas.

#### 6.3.1 Sinargentólida A.

Este estudio se inició con la revisión estructural de la sinargentólida A, este compuesto fue aislado de la especie *Syncolostemon argenteus* por Davis-Coleman en 1997,<sup>86</sup> en este trabajo establecieron la estereoquímica absoluta para este compuesto como 6*R*, 4'*R*, 5'*R*, 6'*S*, la cual corresponde a la estructura del compuesto 18a (**Figura 49**); en 2005 se llevó a cabo la síntesis total de este compuesto<sup>87</sup> teniendo en cuenta la estereoquímica propuesta para el producto natural, pero no concordó con los datos espectroscópicos, la principal diferencia se observa en el espectro de RMN <sup>1</sup>H en la región entre 4.8 y 5.2 ppm en donde el producto natural presenta cuatro señales y el producto sintético solo tres. Debido a esto, diversos grupos se enfocaron en establecer la configuración absoluta correcta para la sinargentólida A, en 2009 Sabitha y colaboradores<sup>88</sup> realizaron la corrección de la configuración absoluta proponiendo una configuración 6*R*, 4'*R*, 5'*R*, 6'*R* (**Figura 49, 18e**) como la configuración correcta, en este caso el espectro de RMN <sup>1</sup>H concuerda en forma cualitativa ya que las señales en la RMN H<sup>1</sup> son muy parecidas en cuanto a su desplazamiento químico, pero no a su multiplicidad que pasó desapercibida para este grupo de químicos orgánicos sintéticos. También, para esta propuesta no se consideró la observación biogenética de todas las 6-

alquenil-5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas descritas en la familia de las labiadas presentan la configuración absoluta *S* para el carbono quiral C-6'. A partir de este estudio, numerosos grupos han desarrollado diferentes rutas de síntesis para la sinargentólida A con la estereoquímica incorrecta.<sup>89</sup> Por lo tanto, uno de los objetivos del presente proyecto fue realizar la revisión de la configuración absoluta de la sinargentólida A aplicando el protocolo de modelado molecular desarrollado por nuestro grupo de investigación y que se ha utilizado en forma exitosa para caracterizar la configuración absoluta de moléculas flexibles polioxigenadas como las 6-alquenil-5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas, e.g., la hiputicina<sup>56</sup> y la espicigerólida<sup>71</sup> (**Figura 8**).



**Figura 49.** Posibles estereoisómeros de la sinargentólida A.

Para elucidar la estereoquímica correcta de este compuesto, se inició la búsqueda conformacional con el programa Spartan'04 utilizando el campo de fuerza de mecánica molecular MMFF94 (**Molecular Mechanics Force Field**) considerando los siguientes criterios: Se consideraron cuatro posibles estereoisómeros (**18a-d**) partiendo del hecho de que el centro quiral en C-6' ha sido *S* en todos los casos descritos en la literatura para

6-alquenal-5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas de origen vegetal y se incluyó el estereoisómero que se propone en la literatura como el correcto (**18e**).

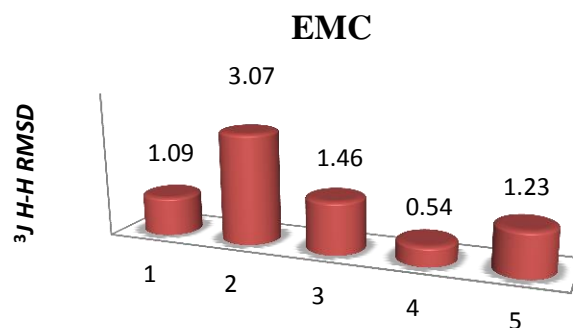
De los conformeros generados (108) para cada uno de los estereoisómeros se eliminaron los que presentaron interacciones 1,3 Oxígeno//Oxígeno los cuales corresponden a conformeros altamente inestables. Posteriormente, los conformeros restantes (92, 86, 57, 53 y 60) para cada estereoisómero se optimizaron geoméricamente empleando el programa Gaussian 03 (Gaussian, Inc.) utilizando la teoría de funcionales de la densidad (DFT) a nivel B3LYP/DGDZVP. Para las estructuras optimizadas geoméricamente, se calcularon sus frecuencias vibracionales y sus parámetros termodinámicos a 278 K y 1 atm. En este punto, se realizó una selección de conformeros. Como criterio de selección se empleó la energía relativa respecto al  $\Delta G$  considerando una ventana energética de 0 a 4 Kcal mol<sup>-1</sup>. (**Cuadros A2-A6**, Apéndice 2). Las constantes de acoplamiento  $J_{H-H}$  para las estructuras optimizadas con DFT (52, 35, 41, 37 y 23 conformeros, respectivamente) se calcularon empleando el método GIAO tal como se encuentra implementado en el programa Gaussian 03 utilizando el comando *spin-spin* durante los cálculos de RMN.

En el Cuadro 9 se presenta un resumen de los valores de las constantes de acoplamiento corregidas obtenidas para cada estereoisómero, las cuales fueron obtenidas efectuando la sumatoria del producto de la fracción molar para cada conformero por su constante de acoplamiento individual. Para realizar la comparación de las constantes de acoplamiento teóricas con las experimentales se calculó el error medio cuadrático para obtener la correlación de los cálculos obtenidos y reveló que la estereoquímica 4'S,5'S,6'S (**18d**) es la más probable para la sinargentólida A, ya que presenta una desviación menor que la obtenida para los otros estereoisómeros (**Figura 50**). En la **Figura 51**, se muestran los 6 conformeros de mínima energía encontrados para el estereoisómero **18d** que correspondería a la estereoquímica correcta para la sinargentólida A. La conformación **18d-1** contribuye con el 39% de la población de Boltzman y presenta una orientación de zig-zag para la cadena de heptenilo<sup>90</sup> con los

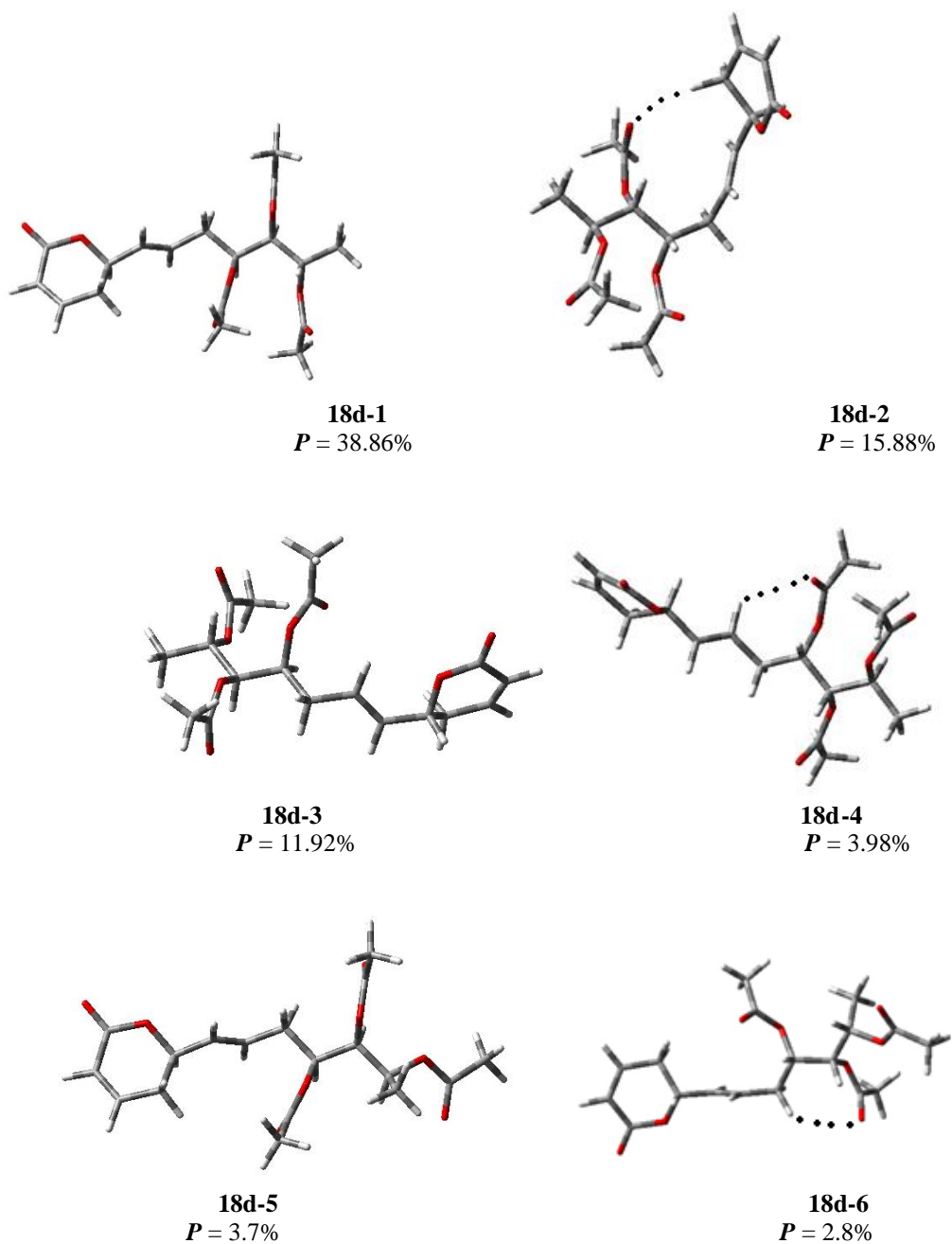
sustituyentes acetoxilo en un disposición *anticlinal* entre C-4'/C-5' y *synclinal* para C-4'/C-6'. En este sistema, se observó la presencia de puentes de hidrógeno débiles entre el protón axial  $\gamma$  de la lactona y el oxígeno del carbono carbonílico de la posición C-5' (2.83Å isómero **18d-2**) que contribuye a la estabilización de este segundo conformero de mínima energía. La importancia de estas interacciones en la estabilización de los conformeros de mínima energía en los sistemas de 6-alquenil-5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas se describió previamente.<sup>53</sup>

**Cuadro 9.** Correlación entre las constantes de acoplamiento del producto natural con los estereoisómeros posibles para la sinargentólida A

$J_{H-H}$	Producto Natural	18a	18b	18c	18d	18e
$J_{6,1'}$	5.70	6.87	6.69	7.62	6.04	4.50
$J_{1',2'}$	15.7	15.24	15.24	15.34	15.40	15.20
$J_{2',3'proS}$	6.40	6.50	7.99	5.67	7.15	9.25
$J_{2',3'proR}$	7.40	7.43	6.69	8.73	7.43	5.61
$J_{3'proS,4'}$	9.00	8.28	3.46	7.28	8.55	8.80
$J_{3'proR,4'}$	3.60	4.00	6.10	5.28	3.73	4.30
$J_{4',5'}$	3.60	5.28	7.92	5.46	3.00	2.02
$J_{5',6'}$	7.20	5.10	3.28	5.92	8.00	9.09

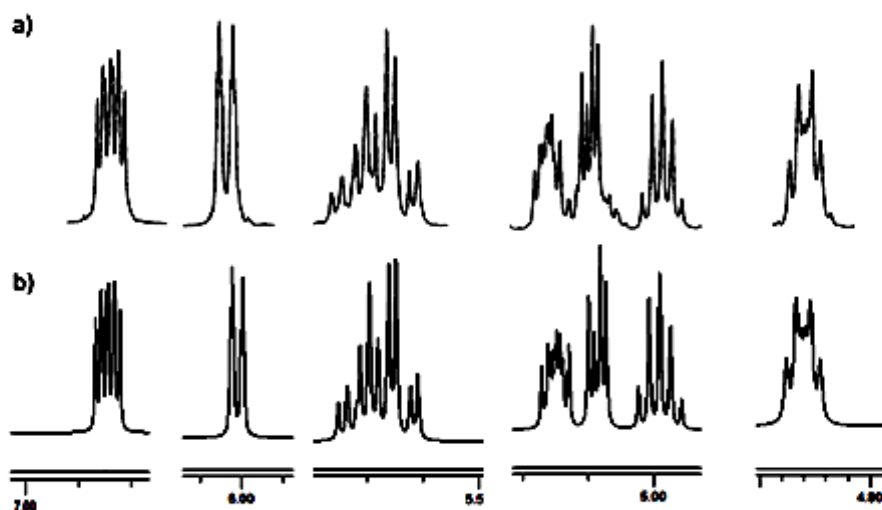


**Figura 50.** Comparación del error medio cuadrático para las constantes de acoplamiento calculadas (DFT) y experimentales para los estereoisómeros de la sinargentólida A.



**Figura 51.** Conformeros de mínima energía y su participación ( $P = \%$ ) en la población de Boltzman para el estereoisómero **18d** de la sinargentólida A.

Por último, se realizó la simulación espectral con las constantes de acoplamiento obtenidas para el estereoisómero 18d. Éstas fueron muy útiles para confirmar la conectividad de la molécula y corroborar la estereoquímica correcta para la sinargentólida A a través de la comparación del espectro de RMN  $^1\text{H}$  publicado para el producto natural <sup>86</sup> con el simulado utilizando las constantes de acoplamiento ( $^3J_{\text{H-H}}$ ) para la estructura optimizada mediante DFT (**Figura 52**).



**Figura 52.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  a) experimental y b) simulado de la sinargentólida A.

### 6.3.2 5'-epi-olguina y 5-desacetoxi-5'-epi-olguina.

Con el objetivo de validar el protocolo para el análisis conformacional desarrollado para las 6-alquenil-5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas,<sup>56,71,90</sup> compuestos con una alta flexibilidad estructural, se decidió hacer el estudio conformacional y el cálculo de las constantes de acoplamiento para la 5'-epiolguina (**1**) y la 5-desacetoxi-5'-epiolguina (**2**) y sus respectivos epímeros en la posición del C-5' (**Figura 53**), debido a que la configuración absoluta de estos dos compuestos ya había sido previamente establecida por CD y correlación con la difracción de rayos X.<sup>48</sup> Considerando nuevamente la estereoquímica del carbono C-6'



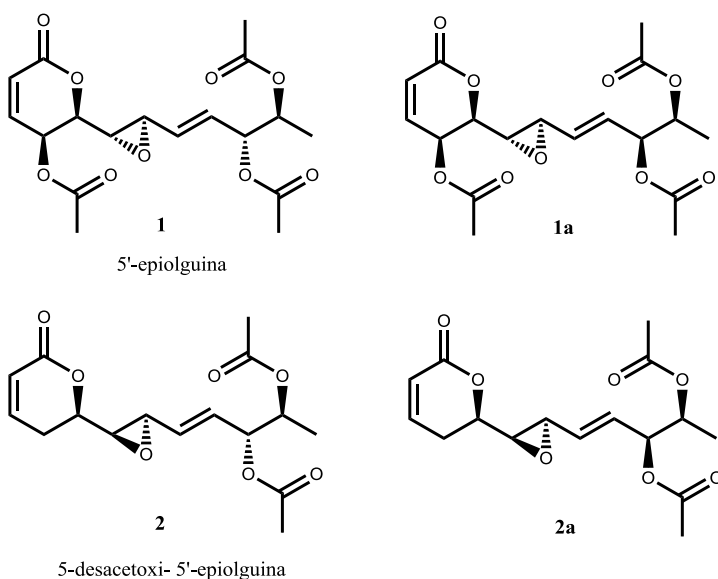
como *S*. De los datos obtenidos, se pudo hacer una excelente correlación para la identificación del estereoisómero correcto y, de esta forma, validar el protocolo experimental desarrollado.

Para llevar a cabo este estudio, se siguió el procedimiento descrito en el apartado **5.11**. A partir de la optimización geométrica de los confórmeros obtenidos se seleccionaron 15 y 18 confórmeros para los compuestos **1** y **1a**, respectivamente, y 23 confórmeros para los compuestos **2** y **2a**, teniendo en cuenta el rango de energía libre de Gibbs de 0.0 a 3.3 kcal mol (**Cuadros A7-A10**, Apéndice 2); con los confórmeros seleccionados, se calcularon las constantes de acoplamiento y se realizó la comparación con los productos naturales. A partir de estos resultados se puede observar en los Cuadros 10 y 11 que hay una buena correlación de los datos obtenidos, la comparación entre las constantes de acoplamiento teóricas contra las calculadas se llevó a cabo empleando el estadístico del error medio cuadrático. Este parámetro permitió corroborar la estereoquímica correcta para la 5'-epiolguina (**1**) y la 5-desacetoxi-5'-epiolguina (**2**) debido a que estas estructuras presentan una menor diferencia entre las constantes calculadas y observadas, encontrándose valores de error de 0.15 y 0.45, respectivamente.

**Cuadro 10.** Correlación entre las constantes de acoplamiento del producto natural 5'-epiolguina y los datos teóricos de **1** y **1a**.

Compuesto	$J_{6,1'}$	$J_{1',2'}$	$J_{2',3}$	$J_{3',4'}$	$J_{4',5'}$	$J_{5',6'}$	EMC <sup>a</sup>
<b>1</b>	8.73	3.51	4.34	15.63	5.68	3.64	0.25
<b>1a</b>	8.78	3.54	8.52	15.55	8.49	8.31	2.81
Producto Natural	8.40	4.03	4.36	15.68	5.70	3.60	

<sup>a</sup> Error medio cuadrático obtenido de la comparación de las constantes de acoplamiento calculadas y observadas



**Figura 53.** Estructuras de la 5'-epi-olguina (**1**), 5-desacetoxi-5'-epi-olguina (**2**) y sus respectivos epímeros en la posición 5'.

**Cuadro 11.** Correlación entre las constantes de acoplamiento del producto natural 5-desacetoxi-5'-epiolguina y los datos teóricos de **2** y **2a**.

Compuesto	$J_{6,1'}$	$J_{1',2'}$	$J_{2',3}$	$J_{3',4'}$	$J_{4',5'}$	$J_{5',6'}$	EMC <sup>a</sup>
<b>2</b>	8.71	3.42	5.83	15.64	6.57	4.22	0.45
<b>2a</b>	8.56	3.40	5.59	15.41	7.73	6.58	1.23
Producto Natural <sup>b</sup>	8.20	4.10	5.20	15.80	6.30	4.10	

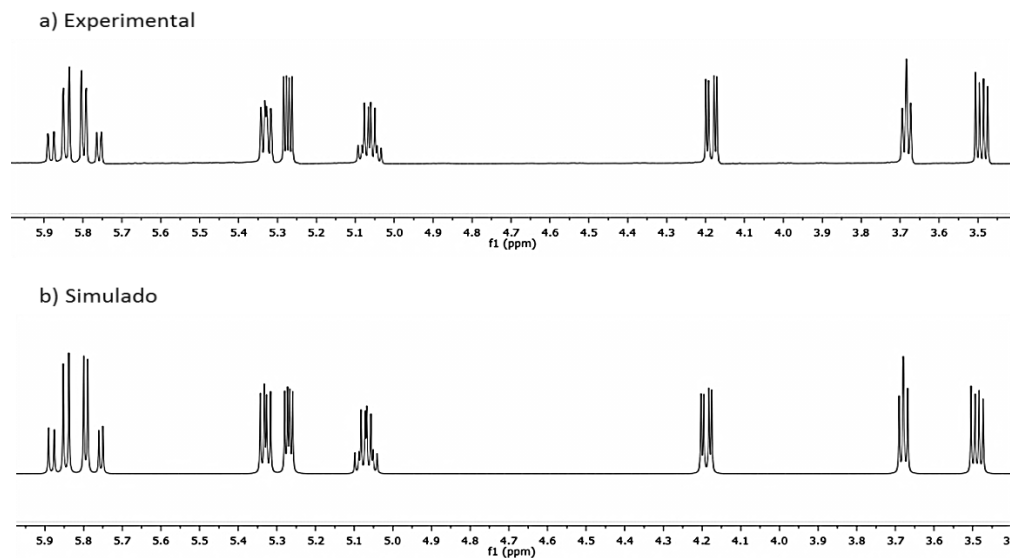
<sup>a</sup> Error medio cuadrático obtenido de la comparación de las constantes de acoplamiento calculadas y observadas. <sup>b</sup> Obtenidas por simulación espectral.

A partir de los datos obtenidos para las constantes de acoplamiento de los compuestos **1** y **2** (**Cuadro 12**), se realizó la simulación espectral con el objetivo de reproducir el espectro de RMN <sup>1</sup>H de los productos naturales (**Figuras 54** y **55**), donde se puede observar la excelente correlación obtenida de los datos teóricos calculados para estos

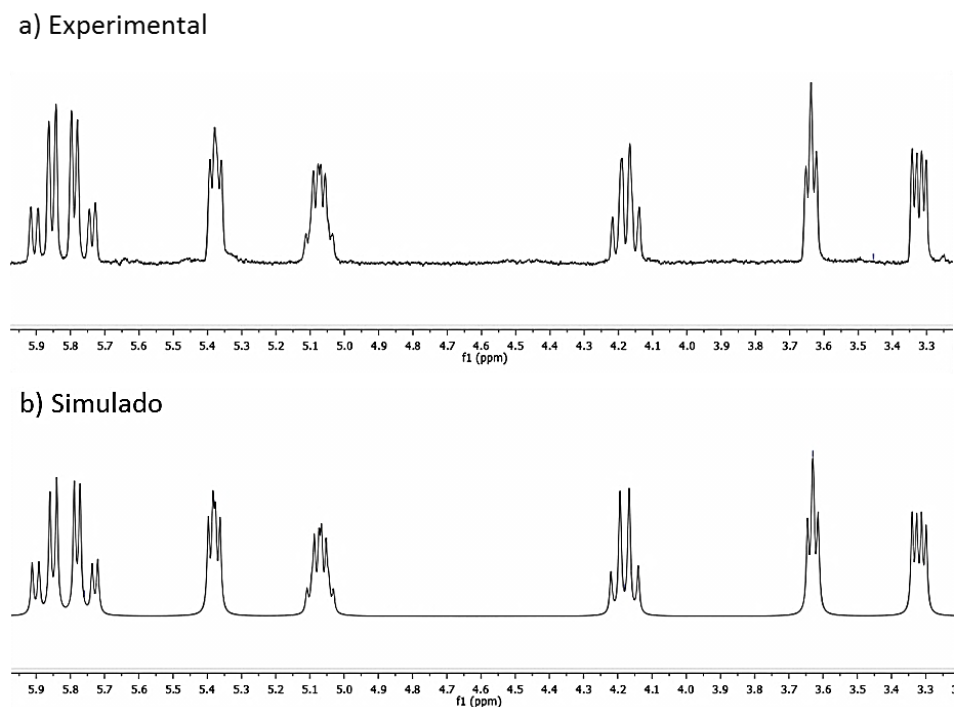
dos compuestos y corroborar las estructuras descritas para estos compuestos. Estos resultados permitieron consolidar el método de análisis conformacional y estereoquímico para estructuras flexibles que será de utilidad para el establecimiento de la estereoquímica absoluta de moléculas conteniendo varios centros quirales como las 6-heptenil-5,6-dihidro-2*H*-piran-2-onas.

**Cuadro 12.** Constantes de acoplamiento observadas para la 5'-epiolguina y 5-desacetoxi-5'-epiolguina.

H	5'-epiolguina (1)	5-desacetoxi-5'-epiolguina (2)
6	5.20 (1H, dd, $J_{5,6}=3.00$ $J_{6,1}=8.40$ )	4.18 (1H, dddd, $J_{5\text{pro}R,6}=7.50$ , $J_{5\text{pro}S,6}=8.22$ , $J_{6,1}=8.20$ )
1'	5.76 (1H, dd, $J_{6,1}=8.40$ , $J_{1',2}=4.03$ )	3.28 (1H, dd, $J_{6,1}=7.50$ , $J_{1',2}=4.10$ )
2'	5.51 (1H, dd, $J_{1',2}=4.03$ , $J_{2',3}=4.36$ )	3.60 (1H, dd, $J_{1',2}=4.10$ , $J_{2',3}=5.20$ )
3'	5.52 (1H, dd, $J_{2',3}=4.36$ , $J_{3',4}=15.60$ )	5.76 (1H, dd, $J_{2',3}=5.20$ , $J_{3',4}=15.80$ )
4'	2.01 (1H, dd, $J_{3',4}=15.60$ , $J_{4',5}=5.70$ )	5.87 (1H, dd, $J_{3',4}=15.85$ , $J_{4',5}=6.30$ )
5'	4.90 (1H, dd, $J_{4',5}=5.70$ , $J_{5',6}=3.60$ )	5.34 (1H, dd, $J_{4,5}=6.30$ , $J_{5',6}=4.10$ )
6'	4.97 (1H, dq, $J_{5',6}=3.60$ , $J_{6',7}=6.30$ )	5.07 (1H, dq, $J_{5',6}=4.10$ , $J_{6',7}=6.40$ )
7'	1.20 (3H, d, $J_{6',7}=6.30$ )	1.18 (3H, d, $J_{6',7}=6.40$ )
OAc	2.04 s, 2.09 s	2.03 s, 2.07 s, 2.14 s



**Figura 54.** RMN  $^1\text{H}$  (a) experimental y (b) simulado: 5'-epiolguina (1).



**Figura 55.** RMN  $^1\text{H}$  (a) experimental y (b) simulado: 5-desacetoxy-5'-epioguina (**2**).

### 6.3.3 Brevipólidas.

Para las 6-heptenil-5,6-dihidro-2*H*-piran-2-onas aisladas de la especie *H. brevipes*, también se realizó el análisis conformacional y se calcularon las constantes de acoplamiento para las brevipólidas I (**4**) y H (**5**) para corroborar la configuración absoluta de sus centros quirales. Para estos compuestos se realizó una búsqueda sistemática por mecánica molecular para realizar una selección de conformeros donde se eliminaron los que presentaron conformaciones con interacciones estéricas desfavorables. Los conformeros restantes fueron optimizados geoméricamente y tomando en cuenta el rango de energía libre de Gibbs de 0.0 a 3.3 kcal (**Cuadro 13** y **14**) se escogieron veinte conformeros para el compuesto **4** y dieciséis conformeros para el compuesto **5** para estimar sus constantes de acoplamiento ( $^3J_{\text{HH}}$ ). En los Cuadros 13 y 14 se muestra la comparación de las constantes de acoplamiento teóricas contra las

experimentales para estos dos compuestos, observándose una muy buena correlación con errores de 0.30 para el compuesto **4** y 0.15 para el compuesto **9**, lo cual confirma la estereoquímica propuesta para el núcleo de las brevipólidas. Los conformeros de mínima energía para el compuesto **4** mostrados en la Figura 56 presentan valores similares a los observados en la estructura obtenida por difracción de rayos X en los ángulos diedros para los átomos 6H-C6-1C-1H ( $-60^\circ$ ), 1H-C1-2C-2H ( $-62^\circ$ ), 2H-C2-4C-4H ( $-148^\circ$ ), lo cual está reflejado en una buena correlación en los valores de las constantes de acoplamiento calculadas. También, se puede observar para los conformeros **4a**, **c** y **d** una conformación similar a la obtenida por difracción de rayos X. Estas conformaciones difieren en un giro del anillo de pirona que está estabilizado por la formación de un enlace de hidrógeno (2.40 Å) entre H-5<sub>ec</sub> del anillo de pirona y el oxígeno del carbonilo C5' de la cadena (H5<sub>ec</sub>...C5'). En el caso de la estructura de rayos X, la conformación está favorecida por un enlace de hidrógeno débil entre el grupo carbonilo del anillo de pirona C-2 y el H-5'' del anillo aromático (2.89 Å).

Adicionalmente, los conformeros de mínima energía más relevantes **4a-f**, que aportan con el 88% de la población conformacional, fueron utilizados para correlacionar las interacciones observadas en el espectro bidimensional NOESY (**Espectro A3**, Apéndice 2). En el mínimo global **4a** se observan las correlaciones entre H<sub>6</sub>-H<sub>1'</sub>, H<sub>1'</sub>-H<sub>3'proR</sub>, y H<sub>4</sub>-H<sub>6'</sub>; mientras que en el segundo mínimo se observan las interacciones complementarias entre H<sub>5ec</sub>-H<sub>2'</sub> y H<sub>1'</sub>-H<sub>4'</sub>. Las características de RMN son consistentes a lo largo de la serie de brevipólidas, lo que indica que el comportamiento conformacional en solución de los compuestos **4-7** es el mismo. Aunque estos compuestos difieren estructuralmente de las 6-alquenil-5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas por la falta de un doble enlace en la cadena lateral, el protocolo empleado demostró una excelente correlación para este tipo de compuestos flexibles.

**Cuadro 13.** DFT B3LYP/DGDZVP energía libre,<sup>a</sup> población<sup>b</sup> y comparación entre las constantes de acoplamiento  $J^1\text{H}-^1\text{H}^c$  calculadas por DFT y las experimentales para la brevipólida I (**4**).

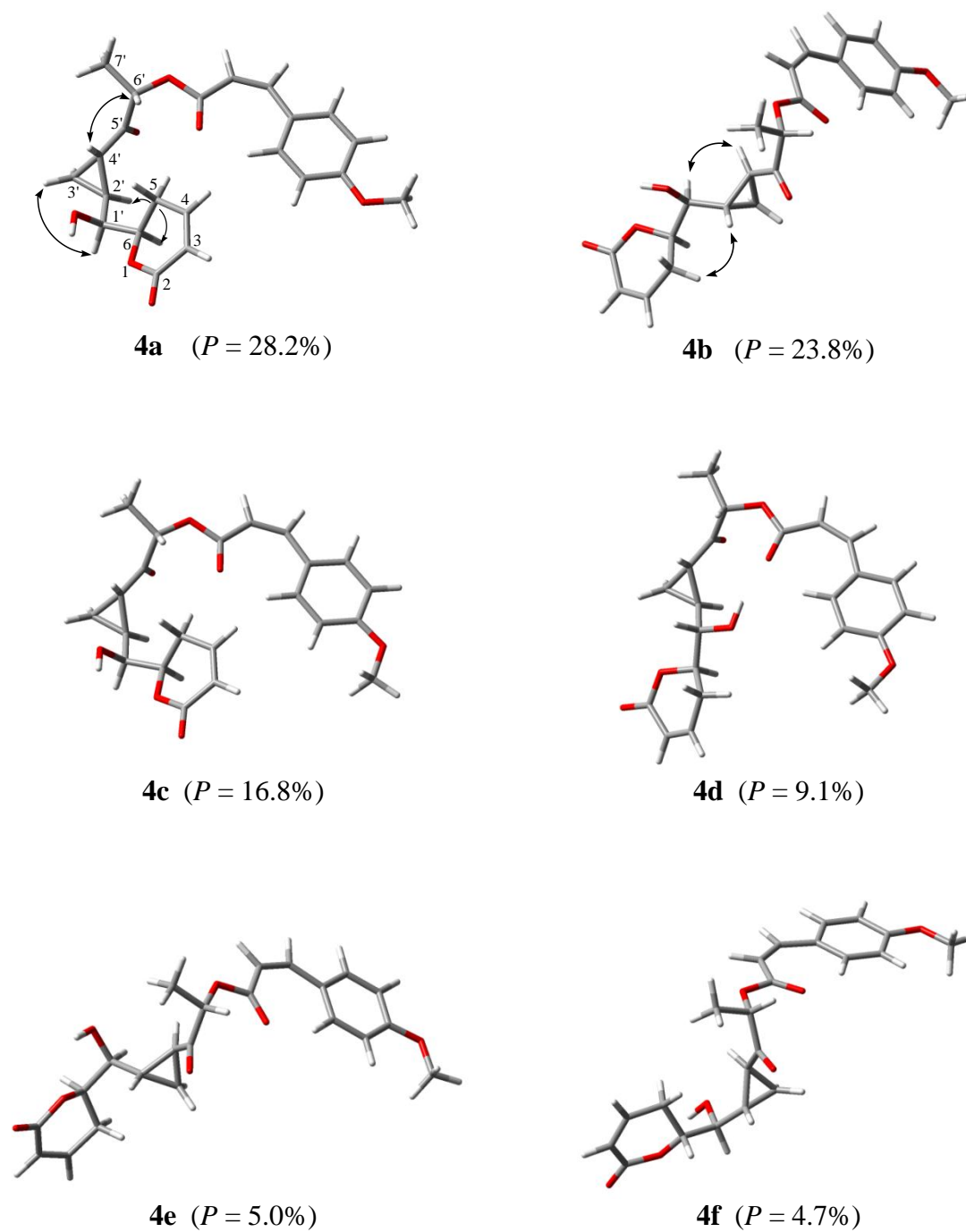
Confórmero	$\Delta G^a$	$P^b$	$J_{3-4}$	$J_{4-5ec}$	$J_{4-5ax}$	$J_{5ec-6}$	$J_{5ax-6}$	$J_{6-1'}$	$J_{1'-2'}$	$J_{2'-3'proS}$	$J_{2'-3'proR}$	$J_{2'-4'}$	$J_{3'proS-4'}$	$J_{3'proR-4'}$
<b>4.1</b>	0.000	28.2	9.75	7.16	2.41	3.94	12.82	2.54	1.20	9.70	6.26	3.19	3.92	8.23
<b>4.2</b>	0.100	23.8	9.81	6.95	2.34	3.98	12.62	2.74	10.38	9.02	6.61	2.91	3.99	8.81
<b>4.3</b>	0.307	16.8	9.74	7.14	2.42	4.00	12.81	2.47	10.27	9.71	6.07	3.19	3.93	8.20
<b>4.4</b>	0.671	9.1	9.80	6.85	2.27	3.67	12.35	8.65	9.36	9.68	6.08	2.68	4.71	7.67
<b>4.5</b>	1.029	5.0	9.81	6.73	2.31	3.56	13.65	8.04	1.12	8.88	6.28	3.23	3.55	8.73
<b>4.6</b>	1.060	4.7	9.79	6.97	2.36	4.01	12.72	2.63	9.24	9.59	6.02	3.81	3.43	9.77
<b>4.7</b>	1.349	2.9	9.79	6.97	2.36	4.01	12.72	2.66	8.99	9.59	6.04	3.86	3.43	9.87
<b>4.8</b>	1.474	2.3	9.79	6.83	2.26	3.69	12.36	8.60	9.55	9.54	5.74	3.10	3.66	9.41
<b>4.9</b>	1.669	1.7	9.73	6.71	2.29	3.55	14.05	2.45	9.81	8.99	5.54	3.17	5.21	7.34
<b>4.10</b>	1.682	1.6	9.81	6.96	2.35	3.97	12.61	2.63	10.53	8.98	5.52	2.70	3.87	8.12
<b>4.11</b>	2.184	0.7	9.82	6.82	2.30	3.39	13.75	2.94	1.63	9.51	5.90	3.94	3.58	9.57
<b>4.12</b>	2.334	0.5	9.80	6.81	2.26	3.82	12.38	8.78	2.19	9.53	6.21	3.75	3.96	8.90
<b>4.13</b>	2.391	0.5	9.78	6.88	2.36	3.90	12.73	1.44	10.81	9.10	5.84	3.06	3.46	9.15
<b>4.14</b>	2.397	0.5	9.80	6.81	2.26	3.83	12.38	8.76	2.20	9.54	6.22	3.74	3.98	8.87
<b>4.15</b>	2.566	0.4	9.80	6.82	2.26	3.78	12.40	8.74	2.35	9.52	6.18	3.66	4.13	8.70
<b>4.16</b>	2.610	0.3	9.81	6.82	2.27	3.82	12.39	8.75	2.40	9.50	6.17	3.68	4.10	8.73
<b>4.17</b>	2.679	0.3	9.82	6.79	2.30	3.46	13.78	2.89	1.52	9.51	5.90	3.86	3.60	9.49
<b>4.18</b>	2.698	0.3	9.81	6.81	2.26	3.88	12.39	8.77	2.02	9.56	6.23	3.70	3.97	8.86
<b>4.19</b>	2.905	0.2	9.82	7.00	2.45	3.16	13.87	3.89	2.90	9.55	5.60	3.25	4.46	7.76
<b>4.20</b>	3.545	0.1	9.73	6.92	2.30	3.59	12.96	1.21	11.18	9.12	5.18	3.34	3.80	9.44
<b>Teóricas<sup>d</sup></b>			9.78	7.01	2.36	3.90	12.77	3.68	6.83	9.45	6.23	3.13	3.97	8.50
<b>Experimentales</b>			9.70	6.50	2.20	3.80	12.30	3.80	6.30	8.90	6.00	3.40	3.90	8.10

<sup>a</sup>En kcal mol<sup>-1</sup> obtenidas a nivel B3LYP/DGDZVP. <sup>b</sup>En porcentaje a partir de los valores de  $\Delta G$  a 298 K y 1 atm. <sup>c</sup>En Hz calculadas por DFT-GIAO a partir de las estructuras optimizadas a nivel B3LYP/DGDZVP. <sup>d</sup> $\sum_i J^i \times P^i$ , donde  $J^i$  es el valor de la constante de acoplamiento para cada confórmero y  $P^i$  es la población para el *i*ésimo confórmero.

**Cuadro 14.** DFT B3LYP/DGDZVP energía libre,<sup>a</sup> población<sup>b</sup> y comparación entre las constantes de acoplamiento  $J^1\text{H}-^1\text{H}$ <sup>c</sup> calculadas por DFT y las experimentales para la brevipólida H (5).

Confórmero	$\Delta G^a$	$P^b$	$J_{3-4}$	$J_{4-5ec}$	$J_{4-5ax}$	$J_{5ec-6}$	$J_{5ax-6}$	$J_{6-1'}$	$J_{1'-2'}$	$J_{2'-3'proS}$	$J_{2'-3'proR}$	$J_{2'-4'}$	$J_{3'proS-4'}$	$J_{3'proR-4'}$
<b>5.1</b>	0.000	30.8	9.83	6.95	2.36	4.08	12.61	3.81	7.62	8.92	6.46	2.64	3.92	8.03
<b>5.2</b>	0.068	27.4	9.80	6.85	2.25	3.63	12.35	4.55	8.61	9.56	5.75	3.07	3.62	8.34
<b>5.3</b>	0.752	8.6	9.78	6.70	2.28	3.64	13.88	3.86	2.32	9.01	5.71	3.09	5.06	7.12
<b>5.4</b>	0.856	7.3	9.78	6.89	2.35	3.91	12.76	3.92	1.44	9.09	5.84	3.08	3.43	9.27
<b>5.5</b>	0.901	6.7	9.82	6.64	2.31	3.44	13.78	2.78	3.00	9.50	5.96	4.04	3.50	9.75
<b>5.6</b>	1.009	5.6	9.83	6.78	2.30	3.53	13.83	2.73	2.73	9.49	5.91	3.87	3.61	9.54
<b>5.7</b>	1.242	3.8	9.80	6.81	2.26	3.80	12.39	3.76	8.76	9.54	6.21	3.68	4.03	8.80
<b>5.8</b>	1.536	2.3	9.80	6.81	2.27	3.80	12.39	3.80	8.76	9.55	6.21	3.69	4.00	8.84
<b>5.9</b>	1.537	2.3	9.80	6.81	2.27	3.80	12.39	3.80	8.76	9.55	6.21	3.69	4.00	8.84
<b>5.10</b>	1.684	1.8	9.73	6.92	2.30	3.60	12.94	3.86	1.23	9.13	5.22	3.37	3.74	9.53
<b>5.11</b>	2.086	0.9	9.83	6.99	2.42	3.21	13.97	2.98	3.81	9.54	6.05	3.22	4.47	8.45
<b>5.12</b>	2.326	0.6	9.83	6.98	2.43	3.28	14.02	3.03	3.63	9.53	6.06	3.25	4.53	8.57
<b>5.13</b>	2.373	0.6	10.12	6.88	2.94	3.12	12.51	2.57	3.04	9.51	6.05	3.24	3.84	8.47
<b>5.14</b>	2.389	0.5	10.12	6.84	2.96	3.16	12.42	2.52	3.00	9.51	6.07	3.28	3.78	8.55
<b>5.15</b>	2.594	0.4	9.78	6.78	2.23	3.85	12.88	3.77	8.94	9.54	6.49	3.45	4.29	7.86
<b>5.16</b>	2.637	0.4	9.81	6.81	2.24	3.89	12.74	3.64	8.95	9.60	6.58	3.50	4.24	7.97
<b>Teóricas<sup>d</sup></b>			9.81	6.85	2.46	3.77	12.82	3.87	6.28	9.15	6.15	3.42	4.01	8.29
<b>Experimentales</b>			9.70	6.50	2.50	3.80	12.30	3.80	6.20	8.90	6.20	3.40	4.00	8.00

<sup>a</sup>En kcal mol<sup>-1</sup> obtenidas a nivel B3LYP/DGDZVP. <sup>b</sup>En porcentaje a partir de los valores de  $\Delta G$  a 298 K y 1 atm. <sup>c</sup>En Hz calculadas por DFT-GIAO a partir de las estructuras optimizadas a nivel B3LYP/DGDZVP. <sup>d</sup> $\sum_i J^i \times P^i$ , donde  $J^i$  es el valor de la constante de acoplamiento para cada confórmero y  $P^i$  es la población para el  $i$ ésimo confórmero.



**Figura 56.** Conórmeros de mínima energía que aportan un 88% de la población conformacional de la brevipólida I (**4**). Correlaciones NOESY observadas en el mínimo global **4a** y en el segundo de más baja energía **4b**.



De forma general en los espectros de dicroísmo circular obtenidos para todos los isómeros geométrico *cis* (**4**, **8**, **9**) se observa una transición negativa entre 312-319 nm y para los compuestos *trans* se observa un efecto Cotton positivo en 305 nm pero con una intensidad variable. La intensidad del efecto Cotton para esta señal está asociada al grupo cinamoilo que sustituye al centro quiral C-6<sup>91</sup> y se ve disminuida en los isómeros *cis* por la presencia, como contaminante, de su isómero *trans*.

Debido a esto se decidió calcular el dicroísmo circular para los compuestos **9** y **10** y su correspondiente epímero hipotético en la posición C-6' para contar con una evidencia adicional que confirmara la estereoquímica absoluta para este centro quiral. El análisis se inició a partir de los conformeros optimizados geoméricamente y se calculó el dicroísmo circular electrónico teórico<sup>80</sup> utilizando el comando TD-B3LYP/DGDZVP. En el Cuadro 15 se muestran los valores obtenidos del dicroísmo circular para los seis conformeros de mínima energía. Para la transición electrónica entre 316-318 nm, (**Cuadro A11**, **Apéndice 2**) se obtuvo un valor negativo para el compuesto **4** (C-6' *S*) que concuerda con lo obtenido experimentalmente (**Figura 29**). Los datos obtenidos para el epímero hipotético C-6'(*R*) tienen valores opuestos, confirmando así la estereoquímica *S* para el centro estereogénico C-6'.

También, se realizó el análisis conformacional y se calcularon las constantes de acoplamiento de la brevipólida K (**8**) para corroborar la configuración absoluta de sus centros quirales. Para este compuesto se realizó una búsqueda sistemática por mecánica molecular para realizar una selección de conformeros donde se eliminaron los que presentaron conformaciones con interacciones estéricas desfavorables. Los conformeros restantes fueron optimizados geoméricamente y tomando en cuenta el rango de energía libre de Gibbs de 0.0 a 3.3 kcal (**Cuadro 16**) se escogieron diecinueve conformeros para para estimar sus constantes de acoplamiento (<sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub>). En el Cuadro 16 se muestra la comparación de las constantes de acoplamiento teóricas contra las experimentales para este compuesto, observándose una buena correlación con errores de 0.47, lo cual confirma la estereoquímica propuesta para el núcleo de las brevipólidas con un anillo de tetrahidrofurano en su estructura.

**Cuadro 15.** Valores obtenidos para la transición electrónica de más baja energía  $n \rightarrow \pi^*$  para el compuesto **4** y su epímero hipotético en C6'(R) utilizando DFT-B3LYP/DGDZVP.

Confórmero ( <i>P</i> ) <sup>a</sup>	$\Delta E^b$	$\lambda_{\max}^c$	$f^d$	$R_{\text{velocity}}^e$	$R_{\text{length}}^f$
<b>4a</b> (28.2)	3.929	316	0.662	-1.26	-2.30
<b>4b</b> (23.8)	3.899	318	0.661	-136.87	-134.59
<b>4c</b> (16.8)	3.886	319	0.572	-4.55	-4.03
<b>4d</b> (9.1)	3.827	324	0.565	-88.65	-89.75
<b>4e</b> (5.0)	3.906	317	0.660	-108.73	-107.05
<b>4f</b> (4.7)	3.896	318	0.670	-127.95	-126.58
<b>C<sub>6</sub>R-4a</b> (39.2)	3.915	317	0.692	82.15	79.61
<b>C<sub>6</sub>R-4b</b> (29.5)	3.774	328	0.577	128.06	127.54
<b>C<sub>6</sub>R-4c</b> (11.5)	3.942	315	0.667	60.00	57.20
<b>C<sub>6</sub>R-4d</b> (8.0)	3.859	321	0.573	123.14	119.62
<b>C<sub>6</sub>R-4e</b> (3.6)	3.920	316	0.696	55.14	55.82
<b>C<sub>6</sub>R-4f</b> (2.7)	3.966	313	0.748	42.27	42.77

<sup>a</sup> Población conformacional dada entre paréntesis. <sup>b</sup> Energía de excitación en eV. <sup>c</sup> Longitud de onda en nm. <sup>d</sup> Oscilador de fuerza. <sup>e</sup> fuerza rotatoria en velocidad( $\times 10^{-40}$  erg·esu·cm·Gauss<sup>-1</sup>). <sup>f</sup> Fuerza rotatoria longitudinal( $\times 10^{-40}$  erg·esu·cm·Gauss<sup>-1</sup>)

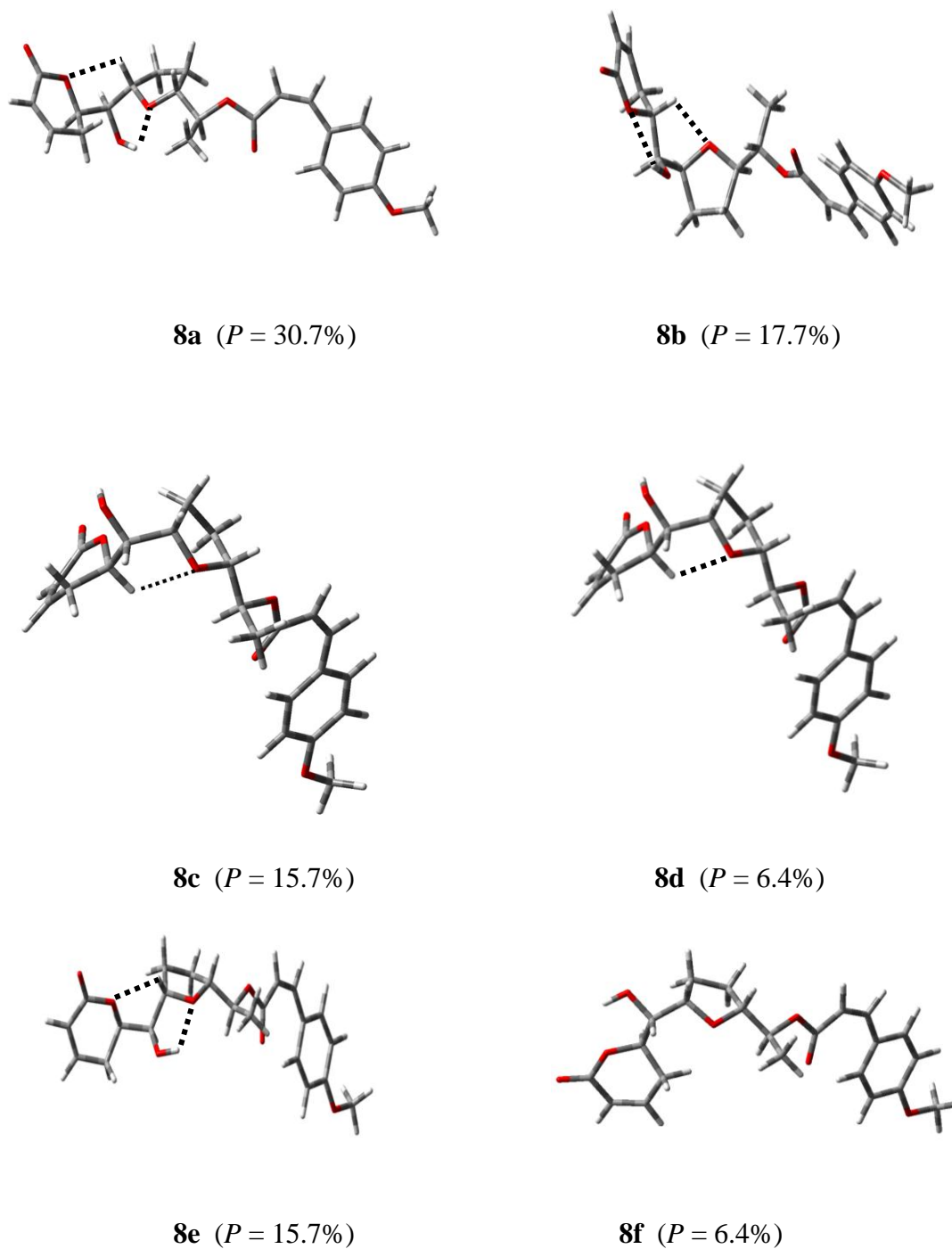
En la Figura 57, se muestran los seis confórmeros de mínima energía para el compuesto **8** que aportan el 80.9% de la población conformacional. En los confórmeros **a** y **e** se puede observar que el anillo de pirona está estabilizado por la formación de puentes de hidrogeno entre el oxígeno del C-6 y el hidrógeno 2' del tetrahydrofurano ( $O_{C-6} \cdots H_{2'}$ , 2.40-2.50 Å) así como entre el grupo hidroxilo y el oxígeno del tetrahydrofurano ( $OH \cdots 2.1$  Å). En los confórmeros **8b**, **8d** y **8f** se observa la estabilización de la moléculas mediante puentes de hidrógeno formados entre el grupo hidroxilo del C-1' y el oxígeno del anillo de pirona del carbono C-6 ( $O \cdots OH$ , 2.20 Å).

**Cuadro 16.** DFT B3LYP/DGDZVP energía libre,<sup>a</sup> población<sup>b</sup> y comparación entre las constantes de acoplamiento  $J^1\text{H}-^1\text{H}$ <sup>c</sup> calculadas por DFT y las experimentales para la brevipólida K (**8**).

Confórmero	$\Delta G^a$	$P^b$	$J_{3-4}$	$J_{4-5ec}$	$J_{4-5ax}$	$J_{5ec-6}$	$J_{5ax-6}$	$J_{6-1'}$	$J_{1'-2'}$	$J_{4'-5'}$	$J_{5'-6'}$
<b>8.1</b>	0.000	30.7	9.78	6.87	2.35	3.80	12.73	10.15	0.27	9.23	9.44
<b>8.2</b>	0.068	17.7	9.83	6.95	2.25	3.81	12.98	8.27	2.36	5.35	9.12
<b>8.3</b>	0.752	15.7	9.78	6.92	2.38	3.73	13.29	8.95	0.35	5.77	2.91
<b>8.4</b>	0.856	6.4	9.88	6.73	2.33	4.14	12.99	2.42	5.34	4.58	9.11
<b>8.5</b>	0.901	6.0	9.83	6.73	2.37	3.77	12.80	2.28	9.44	4.74	9.17
<b>8.6</b>	1.009	4.4	9.80	7.06	2.30	3.75	12.73	9.02	4.87	5.82	9.18
<b>8.7</b>	1.242	3.1	9.78	6.83	2.26	3.65	13.35	4.98	9.91	5.88	2.66
<b>8.8</b>	1.536	3.0	9.79	6.82	2.26	3.75	13.34	5.07	9.91	4.93	9.24
<b>8.9</b>	1.537	2.8	9.81	6.70	2.34	3.83	12.86	0.88	0.42	6.66	9.12
<b>8.10</b>	1.684	2.4	9.84	6.95	2.25	3.82	12.97	8.30	2.60	5.03	0.85
<b>8.11</b>	2.086	1.7	9.80	6.88	2.37	3.82	13.17	5.03	0.28	9.47	1.37
<b>8.12</b>	2.326	1.7	9.80	6.88	2.37	3.82	13.17	5.03	0.28	9.50	1.37
<b>8.13</b>	2.373	1.6	9.81	7.17	2.35	3.92	12.97	8.93	4.42	10.89	1.46
<b>8.14</b>	2.389	1.1	9.84	6.71	2.38	3.84	12.81	2.28	9.27	4.73	1.13
<b>8.15</b>	2.594	0.7	9.79	6.83	2.26	3.69	13.32	4.93	9.81	4.85	1.33
<b>8.16</b>	2.637	0.4	9.88	6.73	2.34	4.10	13.08	6.02	5.73	4.69	1.18
<b>8.17</b>		0.3	9.81	6.68	2.36	3.80	12.81	1.42	0.17	5.47	2.69
<b>8.18</b>		0.1	9.81	6.69	2.32	3.85	12.81	0.42	0.84	5.26	0.86
<b>8.19</b>		0.1	9.75	6.94	2.21	3.72	12.90	8.04	1.29	4.94	9.05
<b>Teóricas<sup>d</sup></b>			9.80	6.80	2.32	3.80	12.90	7.62	2.62	6.80	7.20
<b>Experimentales</b>			9.80	5.80	2.70	4.50	11.10	8.00	1.80	6.90	6.90

<sup>a</sup>En kcal mol<sup>-1</sup> obtenidas a nivel B3LYP/DGDZVP. <sup>b</sup>En porcentaje a partir de los valores de  $\Delta G$  a 298 K y 1 atm. <sup>c</sup>En Hz calculadas por DFT-GIAO a partir de las estructuras optimizadas a nivel B3LYP/DGDZVP. <sup>d</sup> $\sum_i J^i \times P^i$ , donde  $J^i$  es el valor de la constante de acoplamiento para cada confórmero y  $P^i$  es la población para el  $i$ ésimo confórmero.

También, se observan interacciones entre el hidrógeno 6 del anillo de pirona y el oxígeno del tetrahidrofurano ( $\text{H}_6 \cdots \text{O}$ , 2.50 Å). Al igual que en el caso de las brevipólidas con un anillo de ciclopropano, en los confórmeros de mínima energía se pueden identificar las interacciones observadas en el espectro bidimensional NOESY (**Figura 40**). En el mínimo global **8a** se observan las correlaciones entre  $\text{H}_2$ – $\text{H}_5$ ,  $\text{H}_5$ – $\text{H}_7$  y  $\text{H}_6$ – $\text{H}_4$ . Mientras que en los confórmeros **8c** y **8e** se observa las interacciones complementaria entre  $\text{H}_6$ – $\text{H}_1$ .



**Figura 57.** Confórmeros de mínima energía que aportan un 80% de la población conformacional de la brevipólida K (**8**)

A partir de los conformeros de mínima energía para el compuesto **8**, también se calculó el dicroísmo circular para la transición de más baja energía (305-310nm) obteniéndose un valor negativo que concuerda con lo obtenido experimentalmente (**Figura 43**). De esta forma, se confirma la estereoquímica *S* para el centro estereogénico C-6'. Estos resultados están de acuerdo con los resultados previamente descritos para las brevipólidas **F-I**.

**Cuadro 17.** Valores obtenidos para la transición electrónica de más baja energía  $n \rightarrow \pi^*$  para el compuesto **8** utilizando DFT- B3LYP/DGDZVP.

Conformero ( <i>P</i> ) <sup>a</sup>	$\Delta E^b$	$\lambda_{\max}^c$	$f^d$	$R_{\text{velocity}}^e$	$R_{\text{length}}^f$
<b>8a</b> (30.7)	3.981	311	0.774	-0.47	-0.66
<b>8b</b> (17.7)	4.014	308	0.751	-4.98	-6.11
<b>8c</b> (15.7)	3.953	313	0.759	-32.92	-32.00
<b>8d</b> (6.4)	4.006	309	0.743	-29.80	-32.33
<b>8e</b> (6.0)	3.993	310	0.762	-29.69	-33.52
<b>8f</b> (4.4)	3.988	310	0.755	-30.37	-30.81

#### 6.4. Evaluación de Citotoxicidad.

Los compuestos obtenidos de la especie *Hyptis brevipes* fueron evaluados en un ensayo de citotoxicidad utilizando seis líneas celulares derivadas de tumores humanos: HTC-15 (carcinoma de colon), MCF-7 (carcinoma de mama), KB (carcinoma nasofaríngeo), PC-3 (carcinoma de próstata), HeLa (carcinoma de cérvix) y Hep-2 (carcinoma de laringe). Todos los compuestos demostraron una citotoxicidad que va de moderada a buena mostrando una pequeña selectividad hacia el carcinoma nasofaríngeo (KB) y carcinoma de cérvix (Hela) con valores de IC<sub>50</sub> (μg/mL) que van de 0.3 a 2.9 y 0.07 a 3.7 respectivamente (**Cuadro 18**).

**Cuadro 18.** Citotoxicidad para las brevipólidas.

Compuesto	IC <sub>50</sub> (µg/mL)					
	HCT-15	MCF-7	KB	PC-3	HeLa	Hep-2
<b>4</b>	5.6	7.1	1.9	4.7	4.4	6.3
<b>5</b>	6.8	5.2	2.0	5.4	5.8	8.3
<b>6</b>	8.4	5.1	0.3	5.1	0.07	3.4
<b>7</b>	10.7	3.5	1.2	5.8	2.3	6.1
<b>8</b>	6.4	4.1	5.0	4.4	1.7	13.7
<b>9</b>	6.5	3.6	2.9	3.4	1.3	3.0
<b>10</b>	5.6	5.2	0.7	3.0	2.4	2.3
<b>11</b>	9.2	7.5	1.4	5.2	3.7	5.3
<b>12</b>	6.5	7.7	2.0	11.4	2.8	3.8
<b>Flavona</b>	6.9	2.2	0.4	5.9	1.0	5.9
<b>vinblastina</b>	0.002	0.004	0.005	0.001	0.001	0.006

## 7. CONCLUSIONES

1. El estudio fitoquímico del extracto clorofórmico de las partes aéreas de la especie *Hyptis spicigera* permitió la separación, la identificación y la elucidación estructural de la 5-epiolguina (**1**), la 5-desacetoxi-5'-epiolguina (**2**) y el producto de apertura del epóxido de la 5-desacetoxi-5'-epiolguina (**3**).
2. De la especie *Hyptis brevipes*, se obtuvieron cuatro 6-alkil-5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas con un anillo ciclopropano en la cadena de heptilo que sustituye la posición C-6 de la  $\delta$ -lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada (**4-7**) los cuales fueron nombrados como las brevipólidas **F-I**. El compuesto **7** representa una estructura novedosa en la literatura. El éxito en la purificación de estos compuestos dependió exclusivamente del empleo de la cromatografía de líquidos de alta eficiencia, utilizando el modo de corte de núcleo y reciclaje de la muestra ya que los compuestos en estudio se presentaron en forma de mezclas isoméricas, dificultando su purificación mediante el empleo de las técnicas convencionales.
3. De la especie *Hyptis brevipes*, se obtuvieron cinco compuestos adicionales de estructura novedosa nombrados como las brevipólidas **K-O** y que corresponden a derivados de 6-alkil-5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas con un anillo de tetrahydrofurano en su esqueleto (**8-12**).
4. La utilización de diferentes técnicas espectroscópicas, quirópticas y algunas correlaciones y derivatizaciones químicas, que incluyeron la preparación de derivados de los ésteres de Mosher permitió la determinación de la configuración absoluta para las pironas obtenidas de la especie *Hyptis brevipes*, la cual fue confirmada por difracción de rayos X.

5. Las conformaciones de las 6-alkil-5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas polioxigenadas se representan adecuadamente por los modelos moleculares obtenidos del análisis conformacional empleando la teoría de funcionales de la densidad a nivel B3LYP/DGDZVP.
6. Utilizando el protocolo de modelado molecular para el cálculo de las constantes de acoplamiento vecinales teóricas ( $^3J_{HH}$ ) en la RMN  $^1H$ , se propuso la configuración absoluta correcta para la synargentólida A como 6*R*,4'*S*,5'*S*, debido a la excelente correlación encontrada entre los valores calculados y los datos experimentales informados para este compuesto, permitiendo la simulación de su espectro de RMN  $^1H$ .
7. Se validó la metodología desarrollada para el cálculo de las constantes de acoplamiento teóricas utilizando las pironas obtenidas de la especie *Hyptis spicigera*
8. Se confirmó la configuración absoluta de las pironas obtenidas de la especie de *Hyptis brevipes* utilizando el protocolo de modelado molecular para el cálculo de las constantes de acoplamiento vecinales teóricas ( $^3J_{HH}$ ) en la RMN  $^1H$ . La similitud encontrada para estos valores con los registrados experimentalmente constituye una herramienta de utilidad para el establecimiento de la configuración absoluta en moléculas flexibles. Por medio del cálculo teórico del diroísmo circular electrónico se pudo corroborar la estereoquímica *S* del carbono C-6', el cual constituye una característica biogenético de todas las 6-alkenil-5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas pertenecientes a la familia Lamiaceae.
9. Los compuestos **5-12** presentaron una actividad citotóxica selectiva ( $IC_{50} < 5$   $\mu g/mL$ ) contra la línea celular de carcinoma nasofaríngeo KB y carcinoma de cérvix Hela.



## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. Kinghorn, A. D.; Farnsworth, N. R.; Beecher, C. W. W.; Soejarto, D. D.; Cordell, G. A.; Pezzuto, J. M.; Wall, M. E.; Wani, M. C.; Brow, D. M.; O'Neill, M. J.; Lewis, J. A. y Besterman, J. M. Plant Secondary Metabolites as Potential Anticancer Agents and Cancer Chemopreventives. *Int. J. Pharmacogn.* **1995**, *33* Supplement, 48-58.
2. a) Wagner, H. pharmaceutical and economic use of the Labiatae and Rutaceae families. *Revista Latinoamericana de Química* **1977**, *8*, 16-25. b) Lawrence, B.M. Chemical components of labiate oils and their exploitation. *Advance in Labiate Science*. Royal Botanical Gardens, Kew, Inglaterra. **1992**, 399-436.
3. a) Pereda-Miranda, R. In *Phytochemistry of Medicinal Plants*; Arnason, J. T.; Mata, R.; Romeo, J. T.; Eds.; Plenum: New York, **1995**, 83-112. b) Cantino, P.D.; Harley, R.M. & Wagstaff, S.J. Genera of lamiaceae: status and clasification. In R.M. Harley & Reynolds, *Advances in Labiate Science*. **1992**, 511-522. Royal Botanic Gardens, Kew.
4. Judd, W.S.; Cambell, E.A.; Kellogg, P.F.; Stevens, C.D.; Donoghue, M.J.. Plant sustematics. A phylogenetic approach. **2002**, 2<sup>a</sup> Ed. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts. 576p.
5. Cantino P.D. Evidence for a polyphyletic origin of the labiatae. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. **1992**, *79*, 361-379.
6. Ramamoothy, T.P.; Bye, R.; Lot, A.; Fa, J.; Lamiaceae de México: diversidad distribución, endemismo y evolución. En: *Diversidad Biológica de México, Orígenes y distribución*. Instituto de Biología UNAM, México. **1998**, 501-526.
7. Falcão, D. Q. & Menezes, F. S. The *Hyptis* genus: an ethnopharmacological and chemical review. *Rev. Bras. Farm*, **2003**, *84*, 69-74,.
8. Misra, T.N.; Singh, R.S.; Ojha, T.N.; Upadhyay, J. Chemical constituents of *Hyptis suaveolens*. Part I. Spectral and biological studies on a triterpene acid. *Journal of Natural Products*, **1981**, *44*, 735-738.

9. Mukherjee, K.S.; Mukherjee, R.K.; Ghosh, P.K. Chemistry of *Hyptis suaveolens*: a pentacyclic triterpene. *Journal of Natural Products*, **1984**, *47*, 377-378.
10. Martínez, M. *Las plantas medicinales de México*, 6<sup>a</sup> ed., Ed. Botas, México, **1993**, pp 216, 412, 488,508.
11. Palsson, K. y Jaenson, T.G.T. Comparison of plant products and pyrethroid-treated bed nets for protection against mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Guinea Bissau, West Africa. *Journal of medical Entomology*. **1999**, *36*, 144-148.
12. Lee, K.H.; Lin, Y.M.; Wu, T.S.; Zhang, De C.; Yamagishi, T.; Hayashi, T.; Hall, I.H.; Chang, J.J.; Wu, R.Y.; Yang, T.H. Antitumor agents. LXXXVIII. The cytotoxic principles of *Prunella vulgaris*, *Psychotria serpens*, and *Hyptis capitata*: ursolic acid and related derivatives. *Planta Med.*, **1988**, *54*,308-311.
13. Almtorp, G.T.; Hazell, A.C.; Torssell, K.B.G.A lignan and pyrone and other Constituents from *Hyptis capitata* . *Phytochemistry*, **1991**, *30*, 2753-2756.
14. Villavicencio Gonzáles, J.M.. Purificación y caracterización de la Pectinólidas A-C, principales constituyentes citotóxicos y antimicrobianos de *Hyptis pectinata* (L.) Poit. Tesis de maestría, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México, **1993**.
15. a) Rojas, A.; Hernandez, L.; Pereda-Miranda, R.; Mata, R. Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. *Journal of ethnopharmacology*, **1992**, *35*, 275-283. b) Novelo, M.; Cruz, J. G.; Hernandez, L.; Pereda-Miranda, R.; Chai, H.; Mar,W.; Pezzuto, J.M. Chemical studies on Mexican *Hyptis species*. VI. Biologically active natural products from Mexican medicinal plants. II. Cytotoxic constituents from *Hyptis verticillata*. *Journal of Natural Products*, **1993**, *56*, 1728-1736.
16. Almtorp, G.T.; Hazell, A.C.; Torssell, K.B.G.A lignan and pyrone and other constituents from *Hyptis capitata*. *Phytochemistry*, **1991**, *30*, 2753-2756.
17. Malan, K.A.; Pelissier, Y.; Bessiere, J.M.; Pellerin, F. Variation in the chemical composition of the essential oil of *Hyptis pectinata*, L. Poit. *Plant. Med. Phytother.*, **1989**, *23*, 86-89.
18. Pereda-Miranda, R.; Hernández, L.; Villavicencio, M. J.; Novelo, M.; Ibarra, P.; Chai, H.; Pezzuto, Structure and stereochemistry of pectinolides A-C, novel

- antimicrobial and cytotoxic 5,6-dihydro- $\alpha$ -pyrones from *Hyptis pectinata* J. M. J. *Nat. Prod.* **1993**, *56*, 583–593
19. Pereda-Miranda, R.; Gascon-Figueroa, M. Chemistry of *Hyptis mutabilis*: New pentacyclic triterpenoids. *Journal of Natural Products*, **1988**, *51*, 996-998.
  20. Barbosa P.P.P.; Barbosa, C.P. Studies on the antiulcerogenic activity of the essential oil of *Hyptis mutabilis* Briq. in rats. *Phytotherapy Research*, **1992**, *6*, 114-115.
  21. Pereda-Miranda, R.; Delgado, G. Chemical studies on Mexican *Hyptis species*. Part 2. Triterpenoids and flavonoids from *Hyptis albida*. *Journal of Natural Products*, **1990**, *53*, 182-185.
  22. Novelo, M.; Cruz, J.; G., Hernández, L.; Pereda-Miranda, R.; Chai, H.; Mar, W., & Pezzuto, J. M. Cytotoxic Constituents from *Hyptis verticillata*. *Journal of Natural Products*, **1993**, *56*, 1728-1736
  23. Pereda-Miranda, R.; Fragoso-Serrano, M.; Cerda-García-Rojas, C. M., Application of molecular mechanics in the total stereochemical elucidation of spicigerolide, a cytotoxic 6-tetraacetyloxyheptenyl-5,6-dihydro- $\alpha$ -pyrone from *Hyptis spicigera*. *Tetrahedron* **2001**, *57*, (1), 47-53.
  24. Epling, C. Revisión del genero *Hyptis* (Labiatae). *Revista del Museo de la Plata*. Tomo VII, sec. Botanica, Argentina, **1949**, pp143-497.
  25. Kini, F.J.P.; Aycard, E.M.; Gaydou, B.; Kam, and I. Bombarda, *J. Essent. Oil Res.*, **1993**, *5*, 219.
  26. Fragoso-Serrano, M.; González-Chimeo, E.; Pereda-Miranda, R., Novel Labdane Diterpenes from the Insecticidal Plant *Hyptis spicigera*. *Journal of Natural Products* **1998**, *62*, 45-50.
  27. Takayama, C.; Meira de-Faria, F.; Alves de Almeida, A.C.; Oliveira Valim-Araujo, D. de A.; Souza Rehen, C.; Dunder R. J.; Rabelo Socca, E.A.; Manzo, L. P.; Leite Rozza, A.; Salvador, M.J.; Pellizzon, C.H.; Hiruma-Lima, C. A.; -Ferreira, A. L.; Monteiro Souza-Brito, A. R.; Gastroprotective and ulcer healing effects of essential oil from *Hyptis spicigera* Lam. (Lamiaceae). *Journal of Ethnopharmacology* **2011**, *135*, 147–155.

28. Parker, C.; Catan, B.P.; Fowler, L. Invasive plant Fact Sheets. *Weed Science*, **2007**, *55*, 386-397.
29. Bhuiyan, N.I.; Begum, J.; and Nandi, N. C. Chemical component studies on the leaf and inflorescence essential oil of *Hyptis brevipes* (Poit.). *Journal of Medicinal Plants Research* **2010**, *4*, 2128-2131.
30. Gupta, M. P.; Monge, A.; Karikas, G. A.; Lopez de Cerain, A.; Solis, P. N.; de Leon, E.; Trujillo, M.; Suarez, O.; Wilson, F.; Montenegro, G.; Noriega, Y.; Santana, A. I.; Correa, M.; Sanchez, C. *Int. J. Pharmacogn.* **1996**, *34*, 19–27.
31. Goun, E.; Cunningham, G.; Chu, D.; Nguyen, C.; Miles, D., Antibacterial and antifungal activity of Indonesian ethnomedical plants. *Fitoterapia* **2003**, *74*, 592-596.
32. Peerzada, N. (1997). "Chemical Composition of the Essential Oil of *Hyptis suaveolens*." *Molecules* **2** (11): 165-168.
33. Gowda, D. C. (1984). "Polysaccharide components of the seed-coat mucilage from *hyptis suaveolens*." *Phytochemistry* **23**(2): 337-338.
34. Tiwari, V.K.; Rajwar, G.S.; Rawat, G.S. Protein and amino acid contents of *Hyptis suaveolens* Poit. *J. Sci. Res. Plants Med.*, 1979, *1*, 48-51.
35. Piozzi, F.; Bruno, M.; Rosselli, S.; Maggio, A. The diterpenoids from the genus *Hyptis* (Lamiaceae). *Heterocycles* **2009**, *78*, 1413-1426.
36. Marletti, F.; Monache, D.F.; Marini-Bettolo, G.B.; De Araujo. M.; Calvancanti, M.; De Albuquerque, I.L.; De Lima, O.G. Diterpenoid quinones of *Hyptis fruticosa* (Labiatae). *Gazzeta Chimica Italiana*, **1976**, *106*, 119-126.
37. Delle Monache, F.; Delle Monache, G.; Gacs-Baitz, E.; De Barros Coelho, J. S.; De Albuquerque, I. L.; De Andrade Chiappeta, A., & De Mello, J. F. Umbrosone, an ortho-quinone from *Hyptis umbrosa*. *Phytochemistry*, **1990**, *29*, 3971-3972.
38. Messana, I., Ferrari, F., de Moraes e Souza, M. A., & Gács-Baitz, E. (–)-Salzol, an isopimarane diterpene, and a chalcone from *Hyptis salzmanii*. *Phytochemistry*, **1990**, *29*(1), 329-332.
39. Chukwujekwu, J. C.; Smith, P.; Coombes, P. H.; Mulholland, D. A., & van Staden, J. Antiplasmodial diterpenoid from the leaves of *Hyptis suaveolens*. *Journal of Ethnopharmacology*, **2005**, *102*, 295-29

40. Urones, J. G.; Marcos, I. S.; Diez, D.; Cubilla R, L., Tricyclic diterpenes from *Hyptis dilatata*. *Phytochemistry* **1998**, 48, (6), 1035-1038.
41. Yamagishi, T.; Zhang, D.-C.; Chang, J.-J.; McPhail, D. R.; McPhail, A. T.; Lee, K.-H., The cytotoxic principles of *Hyptis capitata* and the structures of the new triterpenes hyptatic acid-A and -B. *Phytochemistry* **1988**, 27, (10), 3213-3216.
42. Charlton, J. L. Antiviral Activity of Lignans. *Journal of Natural Products*, **1998**, 61, 1447-1451
43. Van Uden, W.; Homan, B.; Woerdenbag, H. J.; Pras, N.; Malingré, T. M.; Wichers, H. J., & Harkes, M. Isolation, Purification, and Cytotoxicity of 5-Methoxypodophyllotoxin, a Lignan from a Root Culture of *Linum flavum*. *Journal of Natural Products*, **1992**, 55, 102-110.
44. Kingston, D. G. I.; Rao, M. M., & Zucker, W. V. (1979). Plant Anticancer Agents. IX. Constituents of *Hyptis tomentosa*. *Journal of Natural Products*, 42(5), 496-499.
45. Collett, L. A.; Davies-Coleman, M. T.; Rivett, D. E. A. In Naturally occurring 6-substituted 5,6-dihydro- $\alpha$ -pyrones; Herz, W.; Falk, H.; Kirby, G. W.; Moore, R. E.; Tamm, C., Eds. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. Springer Verlag: New York, **1998**, 75, 182-209.
46. Usui, T.; Watanabe, H.; Nakayama, H.; Tada, Y.; Kanoh, N.; Kondoh, M., Asao, K.; Takio, K.; Watanabe, H.; Nishikawa, K.; Kitahara, T.; Osada, H. The Anticancer Natural Product Pironetin Selectively Targets Lys352 of  $\alpha$ -Tubulin. *Chemistry & Biology*, **2004**, 11, 799–806.
47. Davies-Coleman, M. T.; Rivett, D. E. A. In *Naturally occurring 6-substituted 5,6-dihydro- $\alpha$ -pyrones*; Herz, W.; Grisebach, H.; Kirby, G. W.; Tamm, C., Eds. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. Springer Verlag: New York, **1989**, 55, 1-35.
48. a) Alemany, A.; Marquez, C.; Pascual, C.; Valverde, S.; Perales, A.; Fayos, J.; Martinez-Ripoll, M. New compounds from *Hyptis*. X-ray crystal and molecular structures of olguine. *Tetrahedron Lett.* **1979a**, 37, 3579-3582. b) Alemany, A.; Marquez, C.; Pascual, C.; Valverde, S.; Martinez-Ripoll, M.; Fayos, J.; Perales, A. New compounds from *Hyptis*. X-ray crystal and molecular structures of anamarine. *Tetrahedron Lett.* **1979b**, 37, 3583-3586. c) Pereda-Miranda, R. García, M.

- Delgado, G. Structure and stereochemistry of four  $\alpha$ -pyrones from *Hyptis oblongifolia*. *Phytochemistry*, 1990, **29**, 2971-2974.
49. Achmad, S.; Hoyer, T.; Kjaer, A.; Makmur, L.; Norrestam, R. Molecular and crystal structure of hyptolide, a naturally occurring  $\alpha,\beta$ -unsaturated  $\delta$ -lactone. *Acta Chem. Scand. B: Org. Chem. Biochem.* **1987**, *B41*, 599-609.
50. Fragoso-Serrano, M.; Gibbons, S.; Pereda-Miranda, R. Anti-staphylococcal and cytotoxic compounds from *Hyptis pectinata*. *Planta Med.* **2005**, *71*, 278-280.
51. Deng, Y.; Balunas, M. J.; Kim, J.-A.; Lantvit, D. D.; Chin, Y.-W.; Chai, H.; Sugiarto, S.; Kardono, L. B. S.; Fong, H. H. S.; Pezzuto, J. M.; Swanson, S. M.; Carcache de Blanco, E. J.; Kinghorn, A. D., Bioactive 5,6-Dihydro- $\alpha$ -pyrone Derivatives from *Hyptis brevipes*. *Journal of Natural Products* **2009**, *72*, 1165-1169.
52. Hegde, V. R.; Pu, H.; Patel, M.; Das, P. R.; Strizki, J.; Gullo, V. P.; Chou, C.-C.; Buevich, A. V.; Chan, T.-M., Three new compounds from the plant *Lippia alva* as inhibitors of chemokine receptor 5 (CCR5). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2004**, *14*, 5339-5342
53. Gunasekera, S. P.; Gunasekera, M.; Longley, R. E.; Schulte, G. K. Discodermolide: a new bioactive polyhydroxylated lactone from the marine sponge *Discodermia dissoluta*. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 4912-4915. b) Gunasekera, S. P.; Longley, R. E.; Isbrucker, R. A. Semisynthetic Analogues of the Microtubule-Stabilizing Agent Discodermolide: Preparation and Biological Activity *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 1830-1837.
54. Díaz-Oltra, S.; Murga, J.; Falomir, E.; Carda, M.; Marco, J. A. Stereoselective synthesis of anamarine, *Tetrahedron*, **2004**, *60*, 2979-2985.
55. Falomir, E.; Murga, J.; Ruiz, P.; Carda, M.; Marco, A. J.; Pereda-Miranda, R.; Fragoso-Serrano, M.; Cerda-García-Rojas, C. M. Stereoselective Synthesis and Determination of the Cytotoxic Properties of Spicigerolide and Three of Its Stereoisomers *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 5672-5676.
56. Mendoza-Espinoza, J. A.; López-Vallejo, F.; Fragoso-Serrano, M.; Pereda-Miranda, R.; Cerda-García-Rojas, C. M., Structural Reassignment, Absolute Configuration,

- and Conformation of Hypurticin, a Highly Flexible Polyacyloxy-6-heptenyl-5,6-dihydro-2H-pyran-2-one. *Journal of Natural Products* **2009**, 72, (4), 700-708.
57. Romo de Vivar, A.; Vidales, P.; Pérez, A. L. An aliphatic  $\delta$ -lactone from *Hyptis urticoides*. *Phytochemistry*, **1991**, 30, 2417-2418.
58. Crombie L, A. Firth P. Biosynthesis of parasorbic acid (hex-2-en-5-olide) by the rowan berry (*Sorbus aucuparia* L.) *Journal of the Chemical Society C*. **1968**, 2852 - 2856.
59. Shinichi, K.; Kouichi, T.; Mituyuki, N.; Takaaki, N.; Taizo, N.; Nobuyoshi, S. Pironetin, a novel plant growth regulator produced by *Streptomyces* sp. NK10958. *The Journal of Antibiotics*, **1995**, 48, 893-895.
60. Jensen, F. Introduction to Computational Chemistry; John Wiley & Sons Ltd.: Chichester, **1999**..
61. a) Levine, I.N. Química Cuántica, 5<sup>ta</sup> ed; PEARSON EDUCATION, España, **2001**.  
b) Goodman, J. M. Chemical applications of molecular modeling; The Royal Society of Chemistry **1998**
62. Esteban, A. L.; Díez, E.; Galache, M. P.; San Fabián, J.; Casanueva, J.; Contreras, R. H., Vibrational contributions to vicinal proton–proton coupling constants<sup>3</sup> J<sub>HH</sub>. *Molecular Physics* **2010**, 108, 583-595.
63. a) Nevins, N.; Cicero, D.; Snyder, J. P., A Test of the Single-Conformation Hypothesis in the Analysis of NMR Data for Small Polar Molecules: A Force Field Comparison. *The Journal of Organic Chemistry* **1999**, 64, (11), 3979-3986. b) Stahl, B. M.; Schopfer, U.; Hoffmann, G. F. R. W., Calculation of <sup>13</sup>C NMR chemical shifts and coupling constants for the analysis of conformer populations and relative configuration in flexible molecules. *Molecular Physics* **1997**, 92, (3), 569-580.
64. Barone, G.; Gomez-Paloma, L.; Duca, D.; Silvestri, A.; Riccio, R.; Bifulco, G., Structure Validation of Natural Products by Quantum-Mechanical GIAO Calculations of <sup>13</sup>C NMR Chemical Shifts. *Chemistry – A European Journal* **2002**, 8, (14), 3233-3239.
65. Smith, S. G.; Paton, R. S.; Burton, J. W.; Goodman, J. M., Stereostructure Assignment of Flexible Five-Membered Rings by GIAO <sup>13</sup>C NMR Calculations:

- Prediction of the Stereochemistry of Elatényne. *The Journal of Organic Chemistry* **2008**, 73, (11), 4053-4062.
66. Bifulco, G.; Dambruoso, P.; Gomez-Paloma, L.; Riccio, R., Determination of Relative Configuration in Organic Compounds by NMR Spectroscopy and Computational Methods. *Chemical Reviews* **2007**, 107, (9), 3744-3779.
67. Lodewyk, M. W.; Siebert, M. R.; Tantillo, D. J., Computational Prediction of  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  Chemical Shifts: A Useful Tool for Natural Product, Mechanistic, and Synthetic Organic Chemistry. *Chemical Reviews* **2011**, 112, (3), 1839-1862.
68. Barone, G.; Gomez-Paloma, L.; Duca, D.; Silvestri, A.; Riccio, R.; Bifulco, G., Structure Validation of Natural Products by Quantum-Mechanical GIAO Calculations of  $^{13}\text{C}$  NMR Chemical Shifts. *Chemistry – A European Journal* **2002**, 8, (14), 3233-3239.
69. Ōsawa, E.; Imai, K.; Fujiyoshi-Yoneda, T.; Jaime, C.; Ma, P.; Masamune, S., On the possibility of determining stereochemistry in acyclic polyhydroxylated compounds by the combined vicinal coupling constant/molecular mechanics method. A test with alditol peracetates. *Tetrahedron*, **1991**, 47, 4579-4590.
70. a) Di Micco, S.; Chini, M. G.; Riccio, R.; Bifulco, G., Quantum Mechanical Calculation of NMR Parameters in the Stereostructural Determination of Natural Products. *European Journal of Organic Chemistry* **2010**, (8), 1411-1434. b) Saielli, G.; Nicolaou, K. C.; Ortiz, A.; Zhang, H.; Bagno, A., Addressing the Stereochemistry of Complex Organic Molecules by Density Functional Theory-NMR: Vannusal B in Retrospective. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, 133, (15), 6072-6077. c) Richter, W. E.; Pontes, R. M.; Abiko, L. A.; Gauze, G. F.; Basso, E. A., Computation of  $^3\text{J}_{\text{HH}}$  coupling constants with a combination of density functional theory and semiempirical calculations. Application to complex molecules. *Computational and Theoretical Chemistry* **2012**, 1001, (0), 7-14.
71. López-Vallejo, F.; Fragoso-Serrano, M.; Suárez-Ortiz, G. A.; Hernández-Rojas, A. C.; Cerda-García-Rojas, C. M.; Pereda-Miranda, R., Vicinal  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NMR Coupling Constants from Density Functional Theory as Reliable Tools for Stereochemical Analysis of Highly Flexible Multichiral Center Molecules. *The Journal of Organic Chemistry* **2011**, 76, 6057-6066.



72. Pereda-Miranda, R.; Hernández-Carlos, B., HPLC Isolation and structural elucidation of diastereomeric niloyl ester tetrasaccharides from Mexican scammony root. *Tetrahedron* **2002**, *58*, (16), 3145-3154.
73. Tolmacheva, N. A.; Gerus, I. I.; Dolovanyuk, V. G.; Kondratov, I. S.; Haufe, G., Synthesis of New  $\delta$ -(Polyfluoroalkyl)- $\delta$ -hydroxy- $\alpha$ -amino Acids. *European Journal of Organic Chemistry* **2009**, *29*, 5012-5019.
74. Rieser, M. J.; Hui, Y. H.; Rupprecht, J. K.; Kozlowski, J. F.; Wood, K. V.; McLaughlin, J. L.; Hanson, P. R.; Zhuang, Z.; Hoye, T. R., Determination of absolute conFiguration of stereogenic carbinol centers in annonaceous acetogenins by proton and fluorine 19-NMR analysis of Mosher ester derivatives. *Journal of the American Chemical Society* **1992**, *114*, 10203-10213.
75. O'Malley, S. J.; Tan, K. L.; Watzke, A.; Bergman, R. G.; Ellman, J. A., Total Synthesis of (+)-Lithospermic Acid by Asymmetric Intramolecular Alkylation via Catalytic C–H Bond Activation. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 13496-13497.
76. Lopez-Calahorra, F.; Velasco, D.; Castells, J.; Jaime, C., Conformational study of peracetylated aldononitriles. *The Journal of Organic Chemistry* **1990**, *55*, (11), 3530-3536
77. Halgren, T. Merck molecular force field. III. Molecular geometries and vibrational frequencies for MMFF94. *J. Comput. Chem.* **1996**, *17*, 490-641.
78. Peralta, J.E.; Scuseria, G.E.; Cheeseman, J. R.. Frisch, M.J. Basis set dependence of NMR spin–spin couplings in density functional theory calculations: first row and hydrogen atoms. *Chem. Phys.Lett.* **2003**, *375*, 452–458.
79. 20. Cerda-García-Rojas, C. M. *Centro de investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional*.
80. a) Cerda-García-Rojas, C. M.; García-Gutiérrez, H. A.; Hernández-Hernández, J. D.; Román-Marín, L. U.; Joseph-Nathan, P. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 1167–1172. b) Ding, Y., Li, X.-C.; Ferreira, D. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 327–335.

81. Figueroa-González, G.; Jacobo-Herrera, N.; Zentella-Dehesa, A.; Pereda-Miranda, R., Reversal of Multidrug Resistance by Morning Glory Resin Glycosides in Human Breast Cancer Cells. *Journal of Natural Products* **2011**, *75*, (1), 93-97.
82. (a) Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J. T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M. R. New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. *J. Natl. Cancer Inst.* 1990, *82*, 1107–1112. (b) Vichai, V.; Kirtikara, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening, *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 1112–1116.
83. Snatzke, G.; Hänsel, R., Die absolutkonfiguration der Kawa-lactone. *Tetrahedron Letters* **1968**, *9*, 1797-1799.
84. Seco, J. M.; Quiñoá, E.; Riguera, R., The Assignment of Absolute Configuration by NMR†. *Chemical Reviews* **2004**, *104*, 17-118.
85. Ohtani, I.; Kusumi, T.; Kashman, Y.; Kakisawa, H., High-field FT NMR application of Mosher's method. The absolute configurations of marine terpenoids. *Journal of the American Chemical Society* **1991**, *113*, (11), 4092-4096.
86. Ohtani, I. I.; Hotta, K.; Ichikawa, Y.; Isobe, M., Application of Modified Mosher's Method to  $\alpha$ -Aromatic Secondary Alcohols. Exception of the Rule and Conformational Analyses. *Chemistry Letters* **1995**, *24*, (7), 513-514
87. Collett, L. A.; Davies-Coleman, M. T.; Rivett, D. E. A., 5,6-Dihydro- $\alpha$ -pyrones from *Syncolostemon argenteus*. *Phytochemistry* **1998**, *48*, (4), 651-656.
88. García-Fortanet, J. M.; Murga, J.; Carda, M.; Marco, J. A. Stereoselective synthesis of the published structure of synargentolide A and of one of its stereoisomers *ARKIVOC* 2005, (*iX*), 175-188
89. Sabitha, G.; Gopal, P.; Reddy, C. N.; Yadav, J. S., First stereoselective synthesis of synargentolide A and revision of absolute stereochemistry. *Tetrahedron Letters* **2009**, *50*, (46), 6298-6302.
90. a) Prasad, K. R.; Penchalaiah, K., Stereoselective total synthesis of (+)-synargentolide A. *Tetrahedron: Asymmetry* **2010**, *21*, (23), 2853-2858. b) Kamal, A.; Balakrishna, M.; Reddy, P. V.; Faazil, S., An efficient synthesis of synargentolide A from d-mannitol. *Tetrahedron: Asymmetry* **2010**, *21*, (20), 2517-2523. c) Das, B.; Balasubramanyam, P.; Veeranjanyulu, B.; Chinna Reddy, G., An

- Efficient Stereoselective Total Synthesis of Synargentolide A and Its Epimer. *Helvetica Chimica Acta* **2011**, 94, (5), 881-884.
91. Pereda-Miranda, R.; Fragoso-Serrano, M.; Cerda-García-Rojas, C. M., Application of molecular mechanics in the total stereochemical elucidation of spicigerolide, a cytotoxic 6-tetraacetyloxyheptenyl-5,6-dihydro- $\alpha$ -pyrone from *Hyptis spicigera*. *Tetrahedron* **2001**, 57, (1), 47-53.
92. Choudhary, M. I.; Naheed, N.; Abbaskhan, A.; Ali, S.; Atta-ur-Rahman. *Phytochemistry* **2009**, 70, 1467–1473.

## 11. APÉNDICES

### Apéndice 1

#### Publicaciones generadas a partir de esta investigación

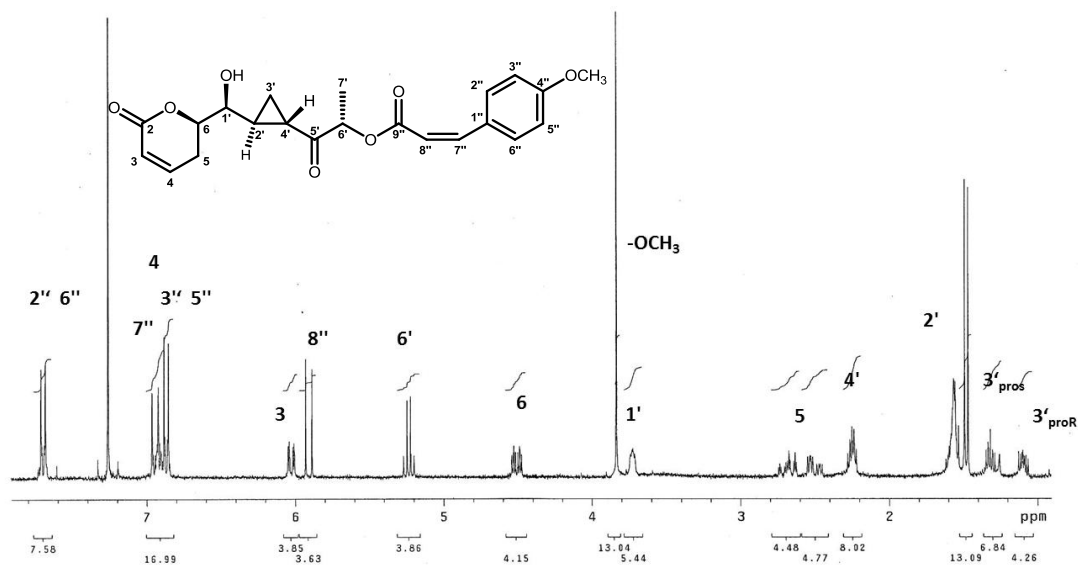
- **Suárez-Ortiz, G. A.**; Cerda-García-Rojas, C. M.; Hernández-Rojas, A.; Pereda-Miranda, R., Absolute Configuration and Conformational Analysis of Brevipolides, Bioactive 5,6-Dihydro- $\alpha$ -pyrones from *Hyptis brevipes*. *Journal of Natural Products*, **2013**, 76, (1), 72-78.
- López-Vallejo, F.; Fragoso-Serrano, M.; **Suárez-Ortiz, G. A.**; Hernández-Rojas, A. C.; Cerda-García-Rojas, C. M.; Pereda-Miranda, R., Vicinal  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NMR Coupling Constants from Density Functional Theory as Reliable Tools for Stereochemical Analysis of Highly Flexible Multichiral Center Molecules. *The Journal of Organic Chemistry* **2011**, 76, (15), 6057-6066.

#### Presentaciones en congresos

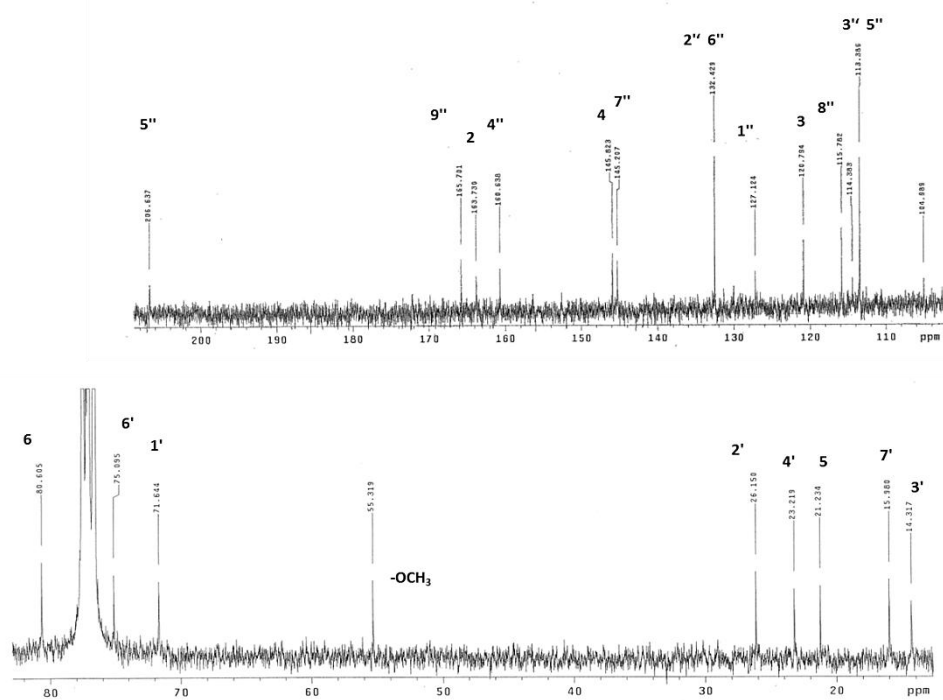
- **Suárez-Ortiz, G. A.**; Cerda-García-Rojas, C. M.; Pereda-Miranda, R. Absolute configuration and conformation of brevipolides, cytotoxic compounds from *Hyptis brevipes*, presentado en el 8th Join Meeting of the American Society of Pharmacognosy, the Pharmacognosy Society of French Speaking Persons, the Society for Medicinal Plant Research, the Phytochemical Society of Europe, and the Italian Society of Pharmacognosy, celebrado en Nueva York, E. U. A., del 28 de julio al 1 de agosto de 2012. *Planta Medica* (**2012**) 78: 1275. Resumen PJ124.
- **Suárez-Ortiz, G. A.**; Pereda-Miranda, R. Absolute Configuration of Brevipolides, Cytotoxic Compounds from *Hyptis brevipes*. QUIMIUNAM **2012**, Universidad Nacional Autónoma de México

- **Suarez-Ortiz, G. A.;** Pereda-Miranda, R. Análisis conformacional y establecimiento de la configuración absoluta de 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas citotóxicas de origen vegetal. Suárez Ortiz Gloria Alejandra y Pereda Miranda Rogelio, QUIMIUNAM **2011**, Universidad Nacional Autónoma de México.
- **Suarez-Ortiz, G. A.;** Cerda-García-Rojas, C. M.; Pereda-Miranda, R. Structural reassignment, absolute configuration, and conformation of synargentolide A by molecular modeling, presentado en la 241st ACS National Meeting & Exposition, celebrada en Anaheim, California, Estados Unidos de América, del 27 al 31 de marzo de **2011**. ACS Meeting Abstracts, American Chemical Society, Washington, D. C. Resumen COMP-173.

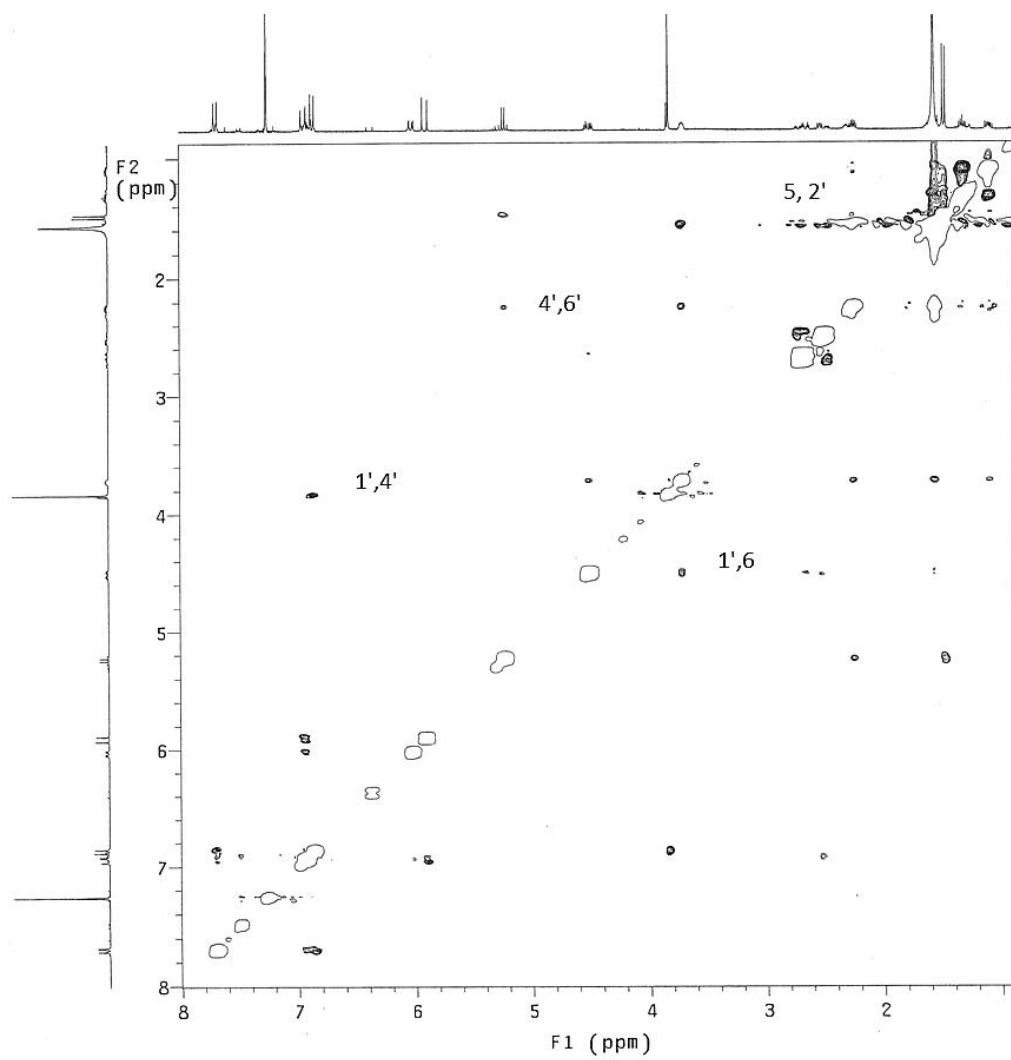
## Apéndice 2



**Espectro A1.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto **4** en  $\text{CDCl}_3$  (300 MHz).



**Espectro A2.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto **4** en  $\text{CDCl}_3$  (75 MHz).



**Espectro A3.** Espectro NOESY del compuesto 4 en CDCl<sub>3</sub>

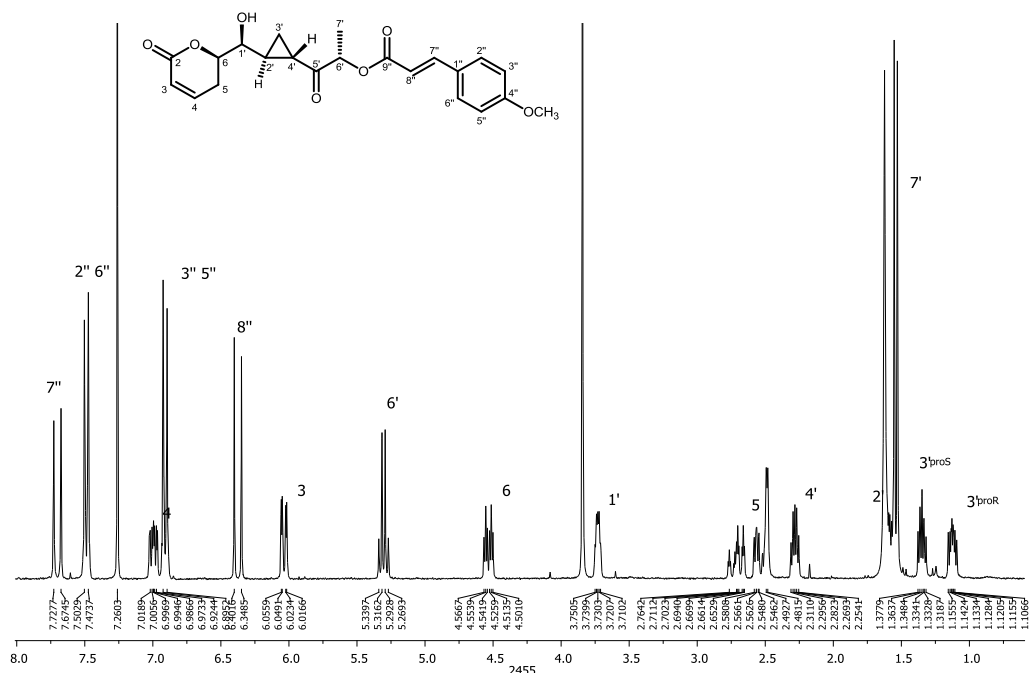
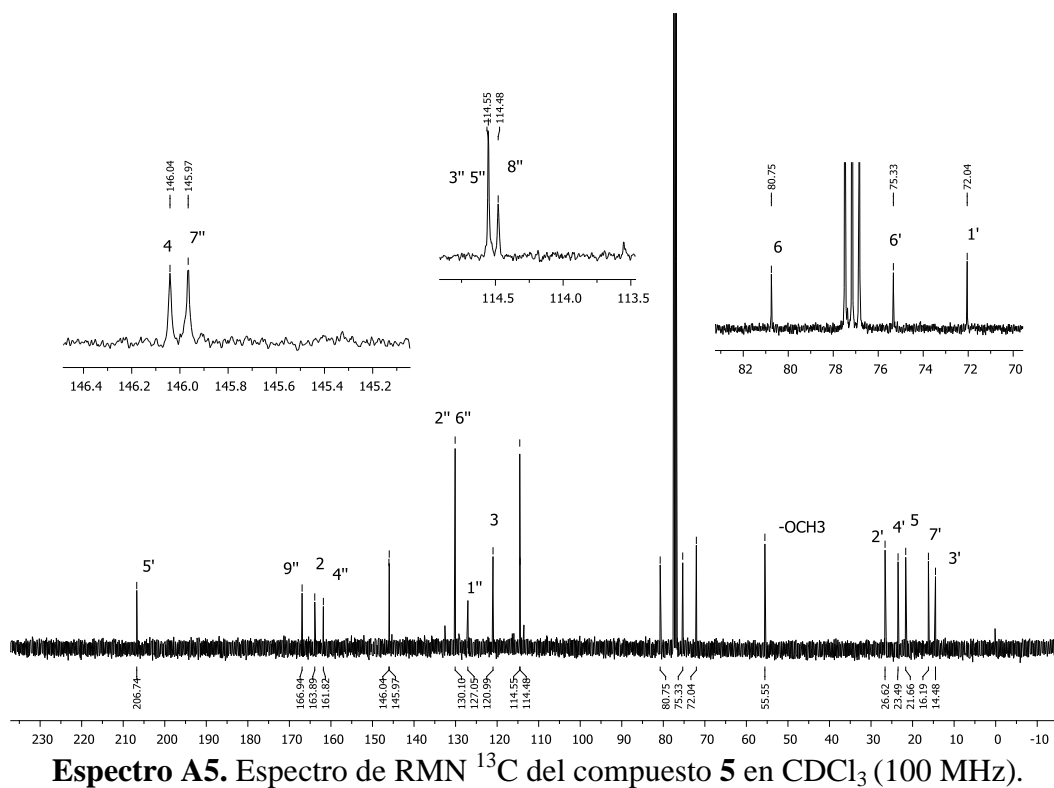
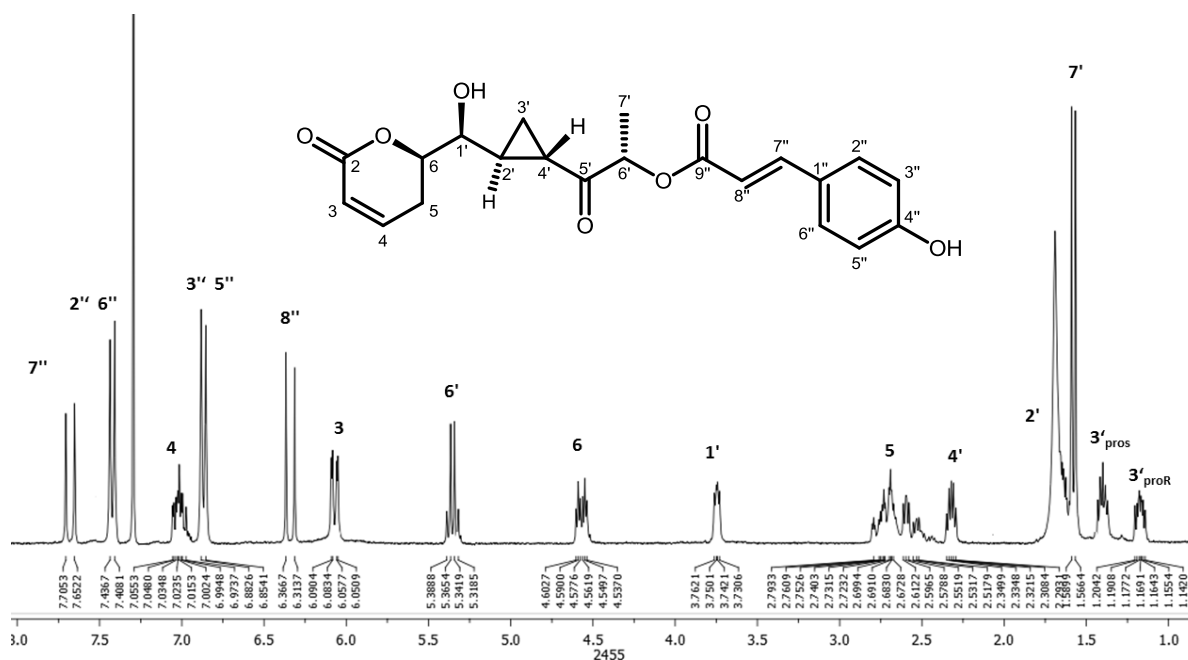


Figura A4. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto **5** en  $\text{CDCl}_3$  (400 MHz).

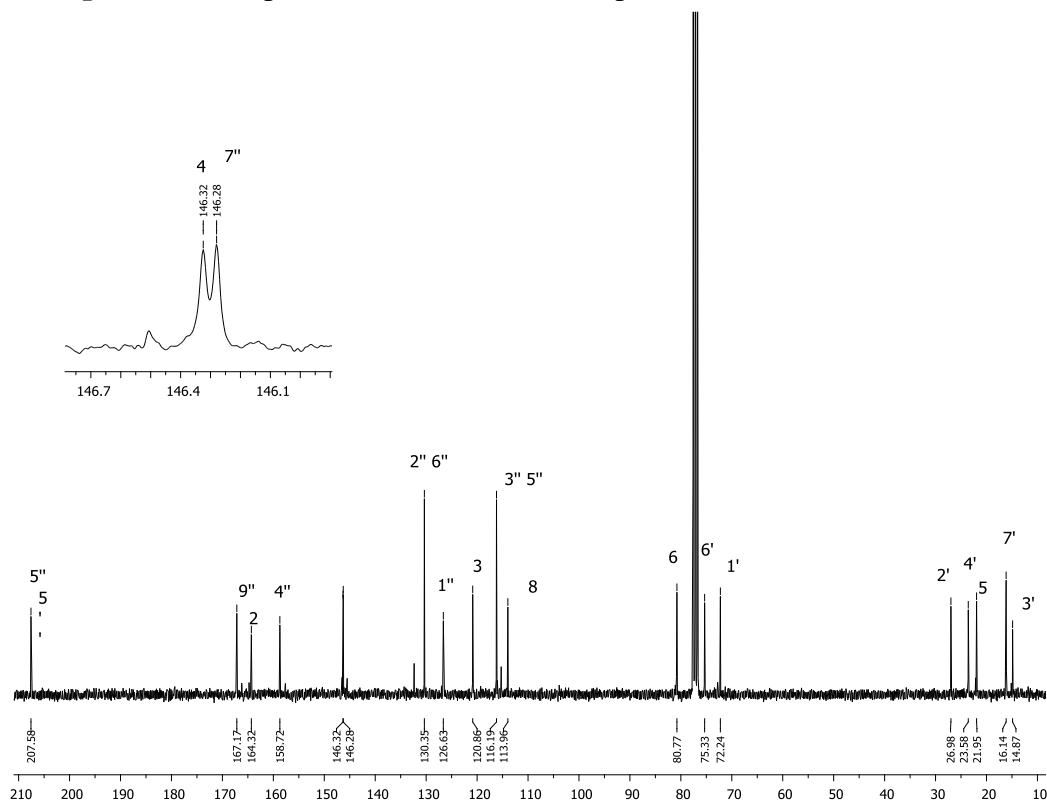


Espectro A5. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto **5** en  $\text{CDCl}_3$  (100 MHz).

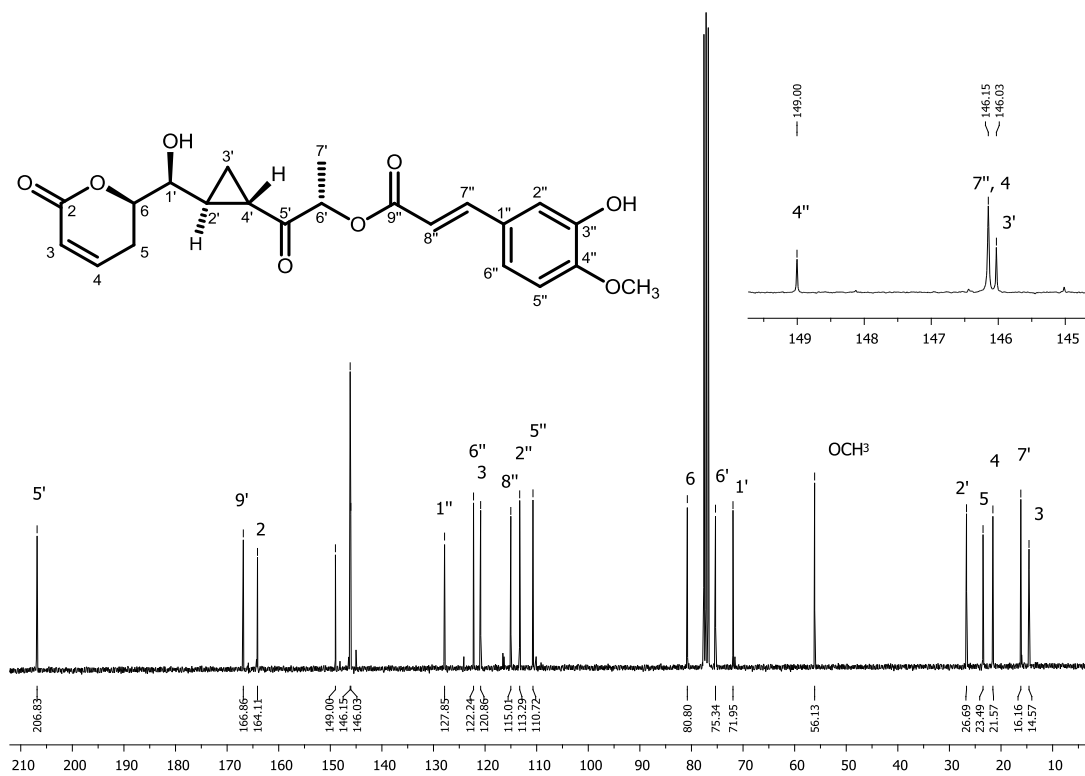




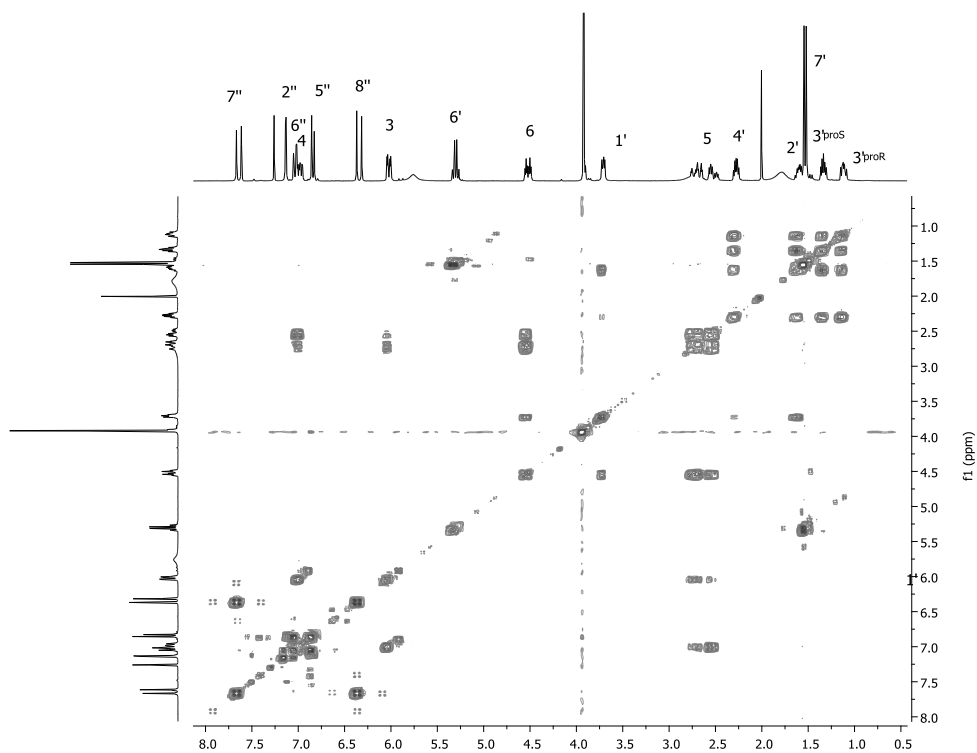
**Espectro A6.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H del compuesto **6** en CDCl<sub>3</sub> (300 MHz).



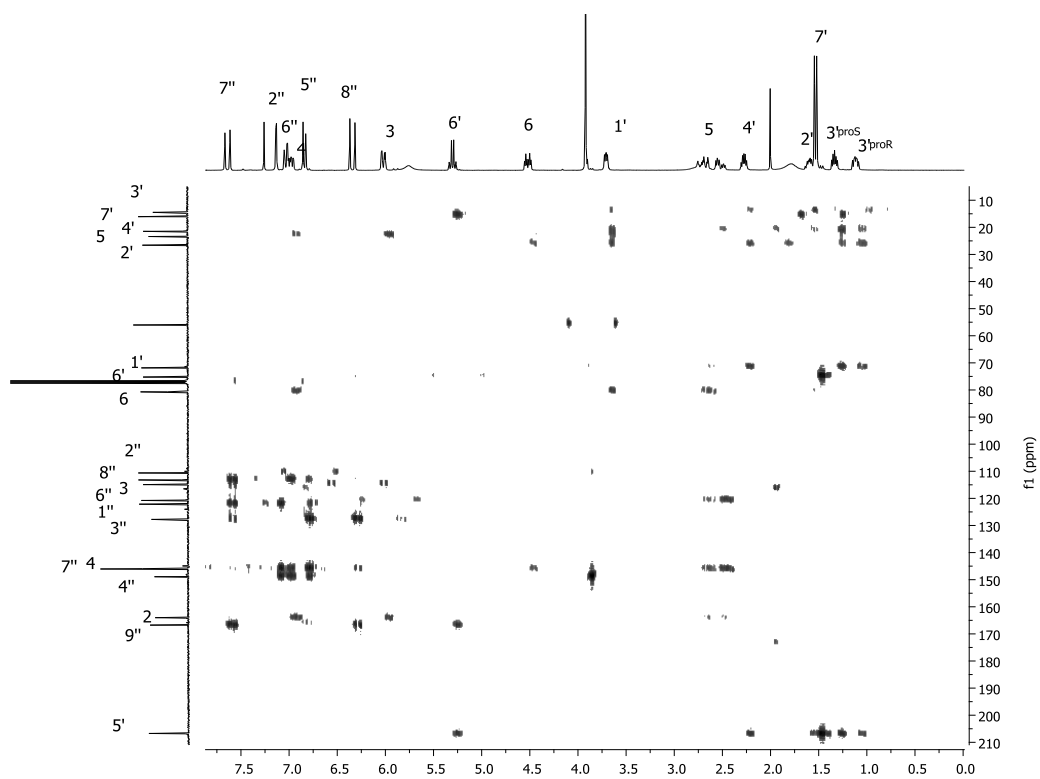
**Espectro A7.** Espectro de RMN <sup>13</sup>C del compuesto **6** en CDCl<sub>3</sub> (75 MHz).



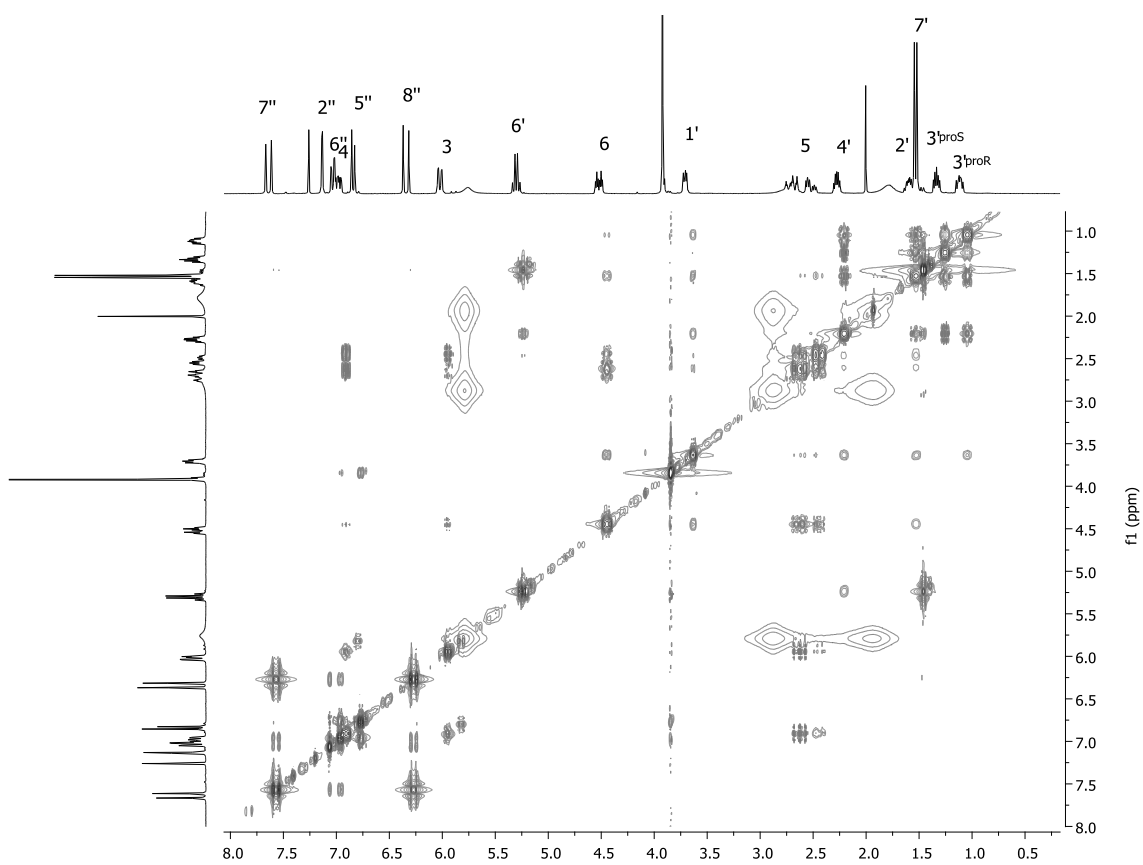
**Espectro A8.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto **7** en  $\text{CDCl}_3$  (75 MHz).



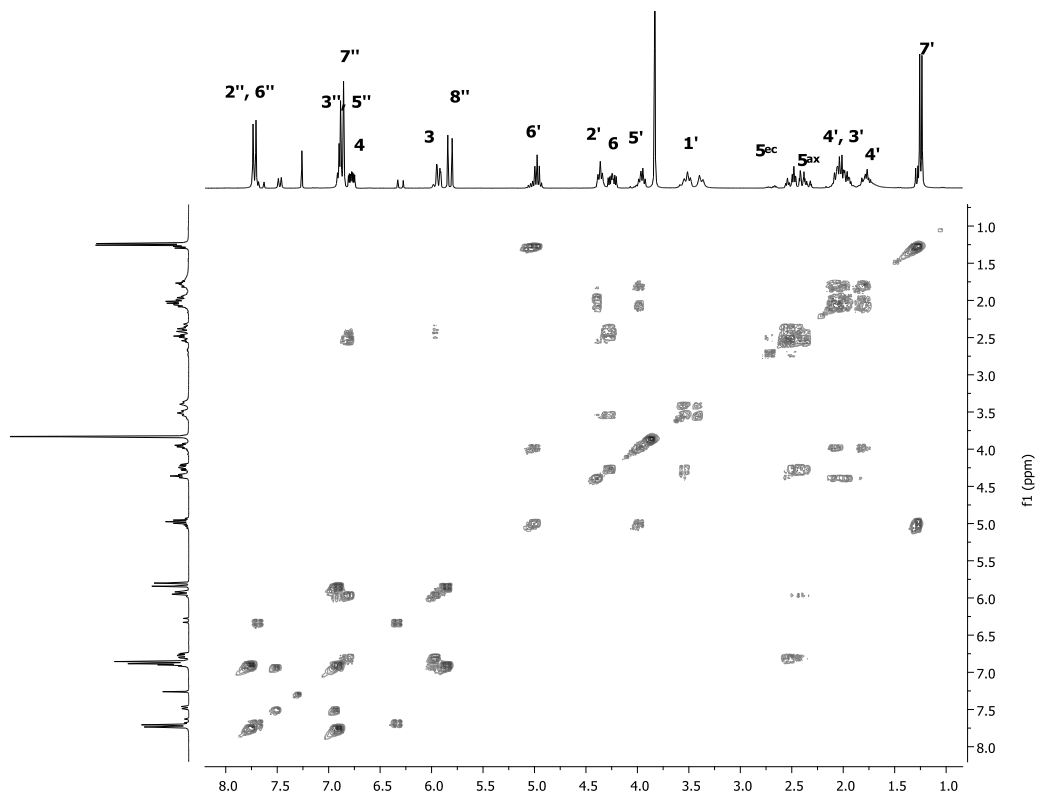
**Espectro A9.** Espectro COSY del compuesto **7** en  $\text{CDCl}_3$



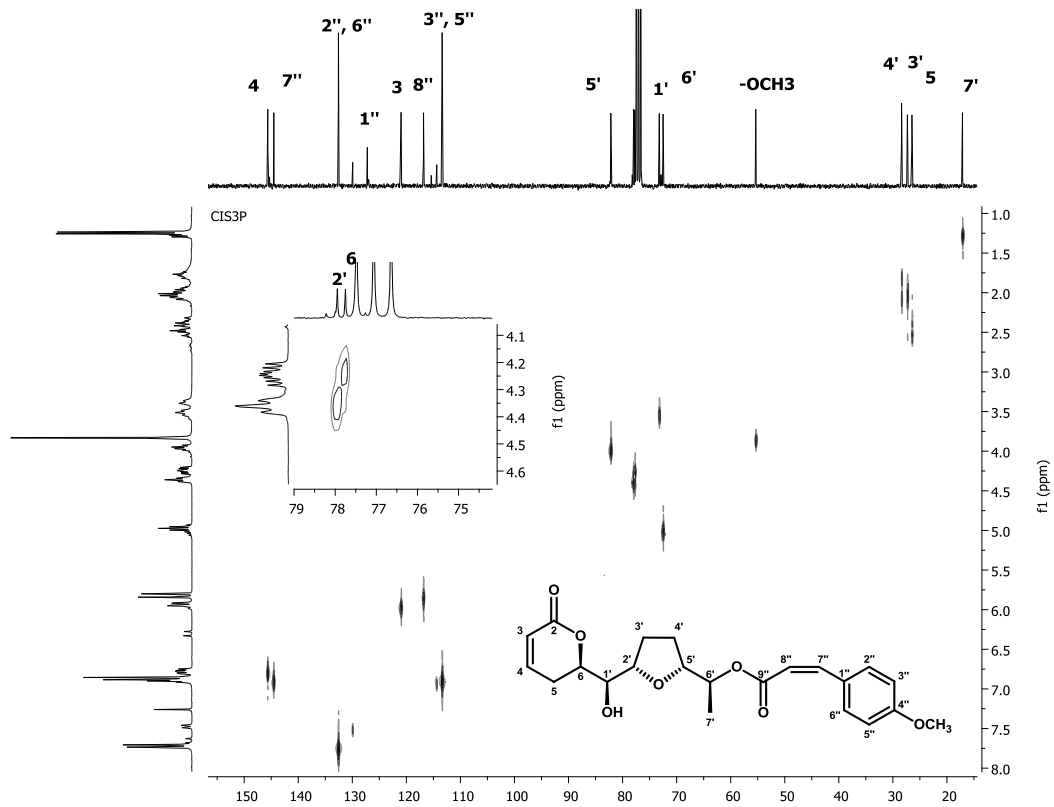
**Espectro A10.** Espectro HMBC del compuesto **7** en  $\text{CDCl}_3$



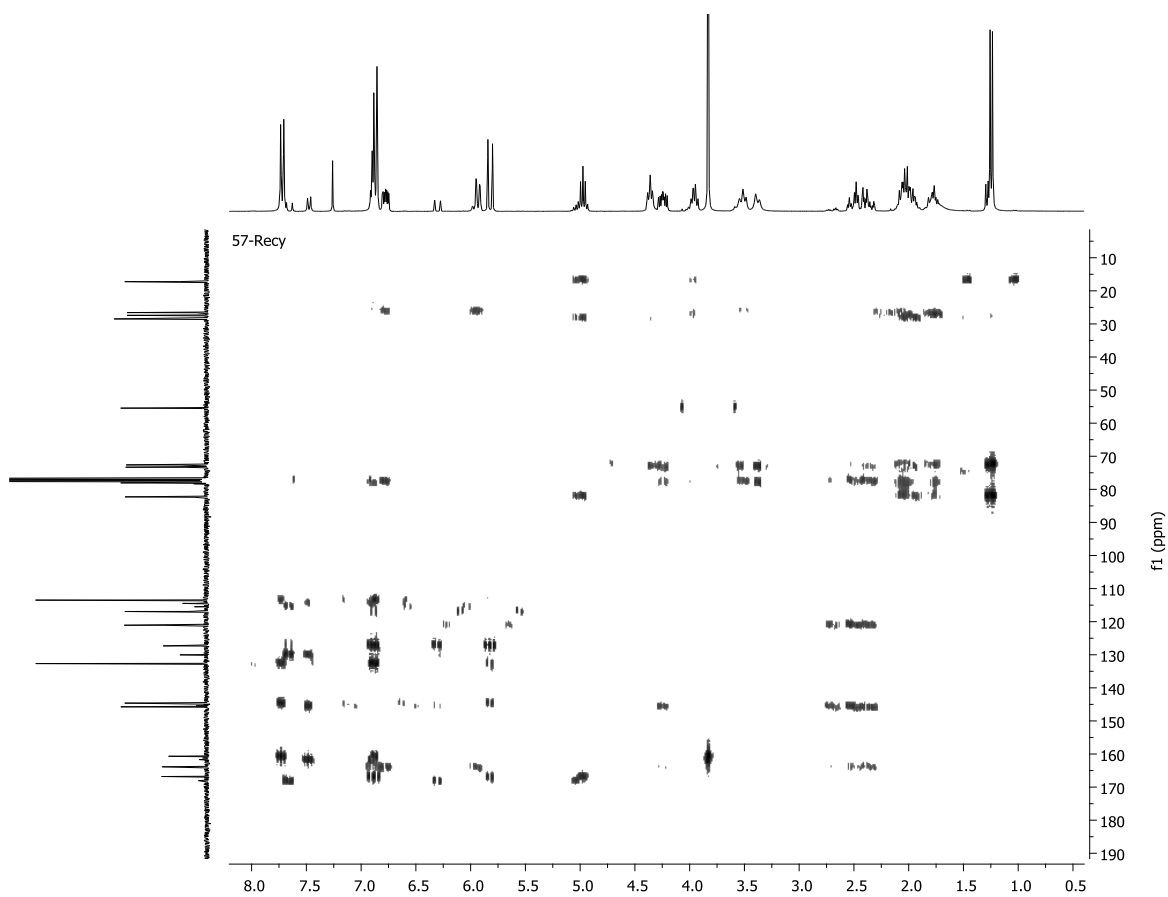
**Espectro A11.** Espectro NOESY del compuesto **7** en  $\text{CDCl}_3$



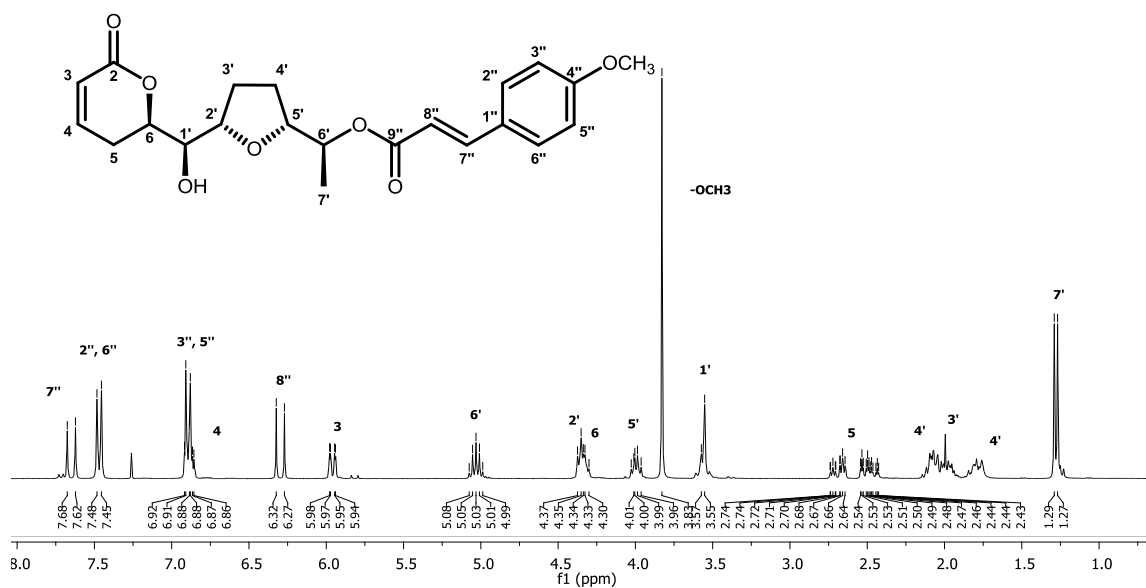
**Espectro A12.** Espectro COSY del compuesto **8** en  $\text{CDCl}_3$



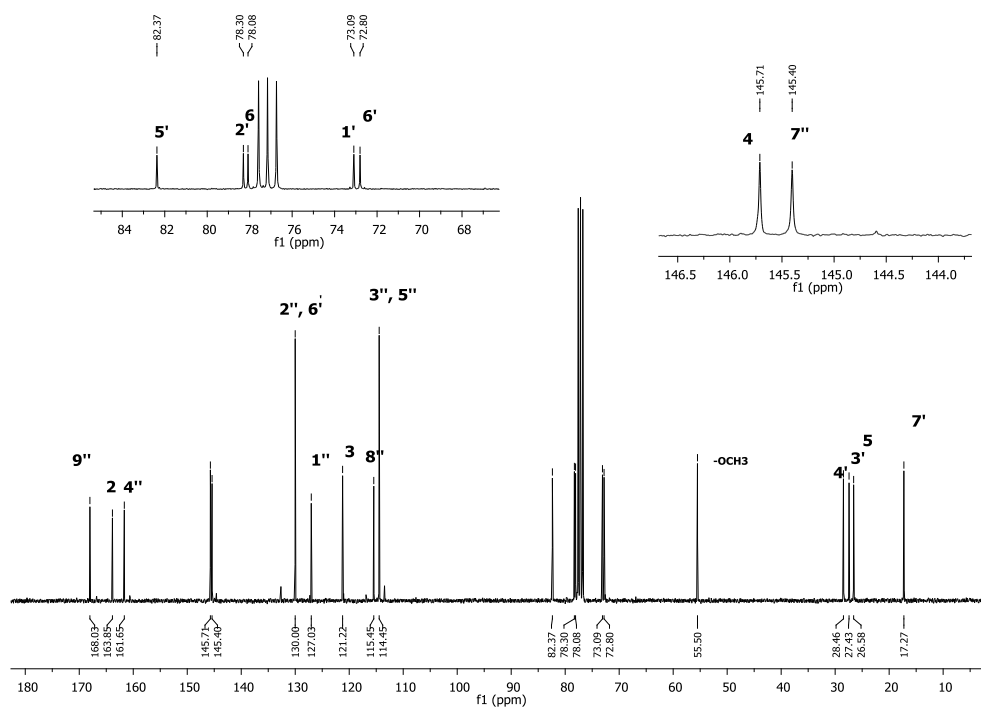
**Espectro A13.** Espectro HETCOR del compuesto **8** en  $\text{CDCl}_3$



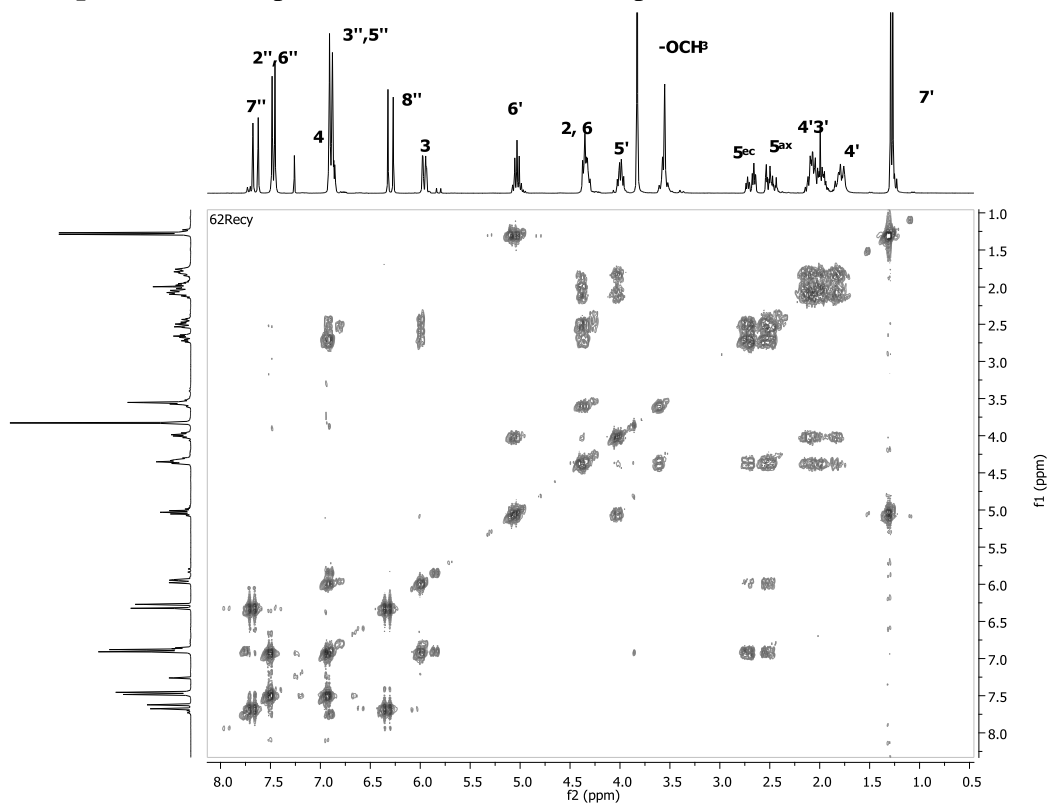
**Espectro A14.** Espectro HMBC del compuesto **8** en  $\text{CDCl}_3$



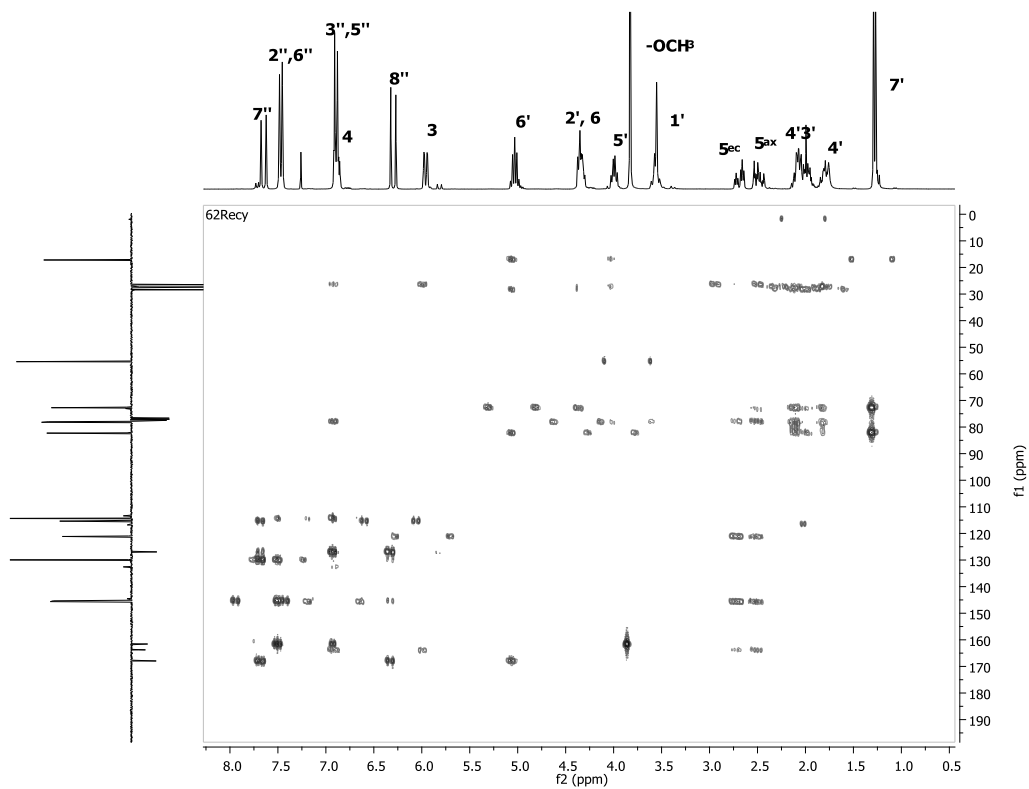
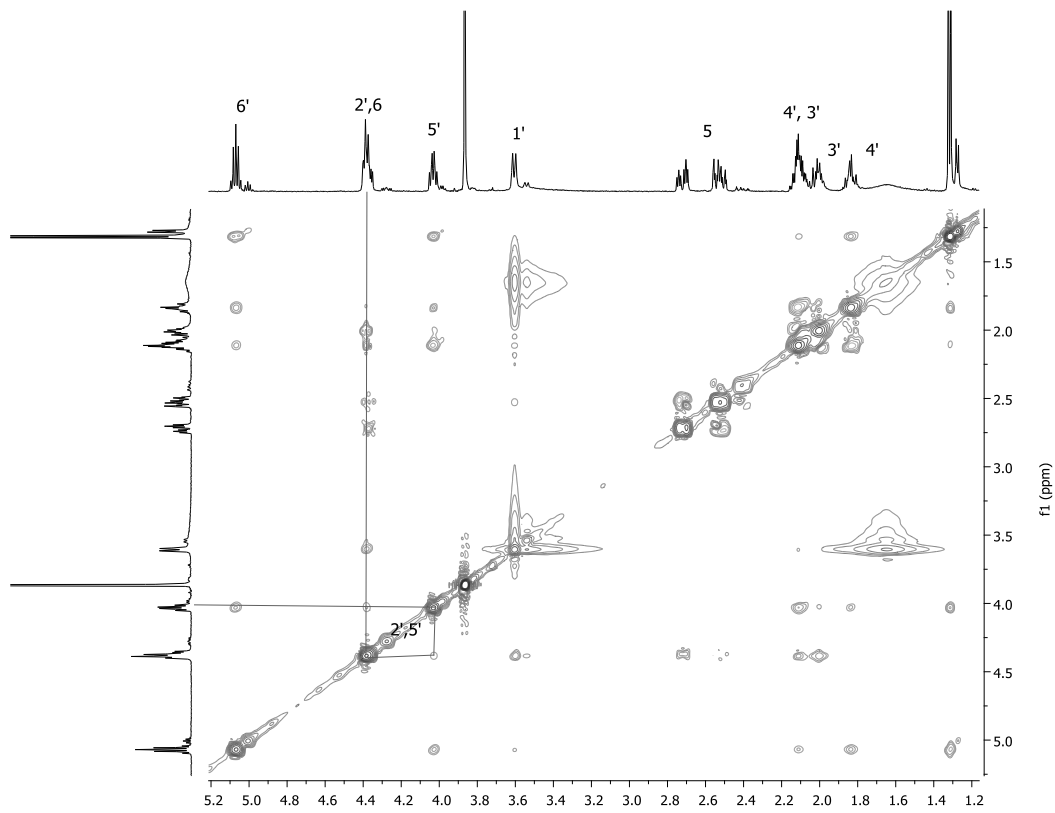
**Espectro A15.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto **9** en  $\text{CDCl}_3$  (300 MHz).

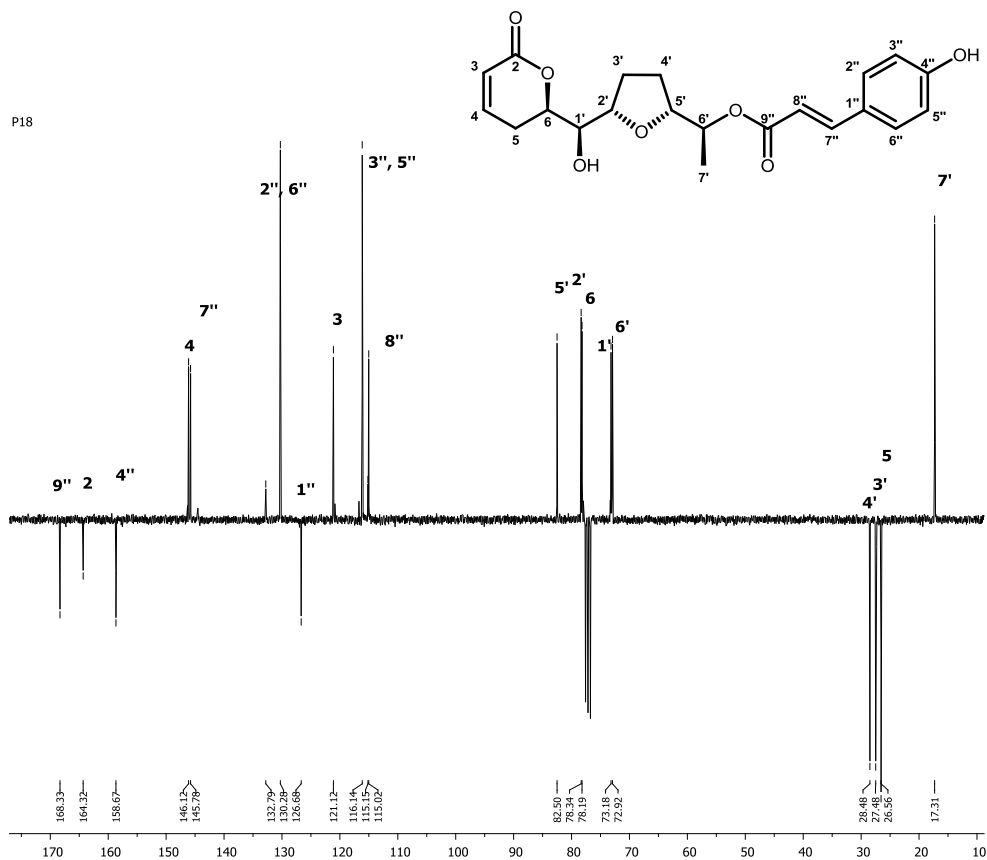


**Espectro A16.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto **9** en  $\text{CDCl}_3$  (75 MHz).

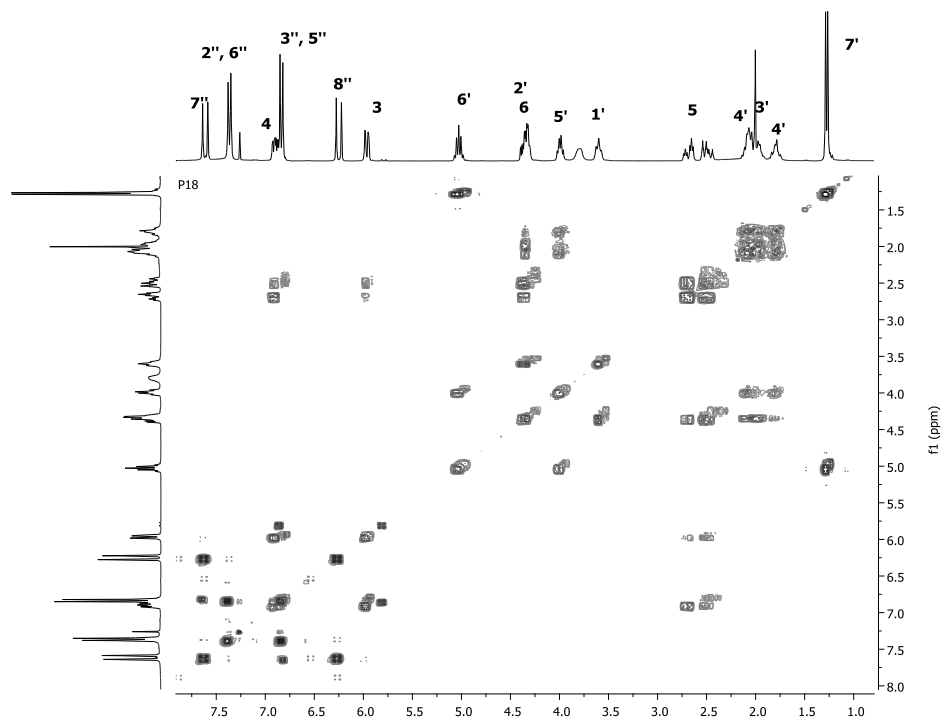


**Espectro A17.** Espectro COSY del compuesto **9** en  $\text{CDCl}_3$

Espectro A18. Espectro HMBC del compuesto **9** en  $\text{CDCl}_3$ Espectro A19. Espectro NOESY del compuesto **9** en  $\text{CDCl}_3$  (500MHz)

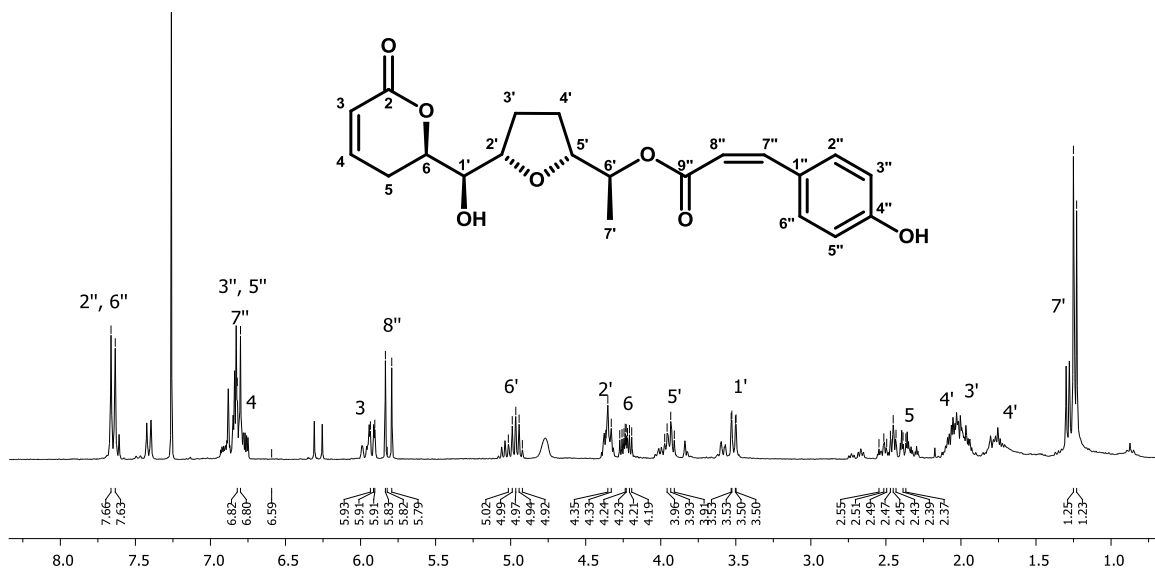


**Espectro A20.** Espectro DEPTQ-135 del compuesto **10** en  $\text{CDCl}_3$ .

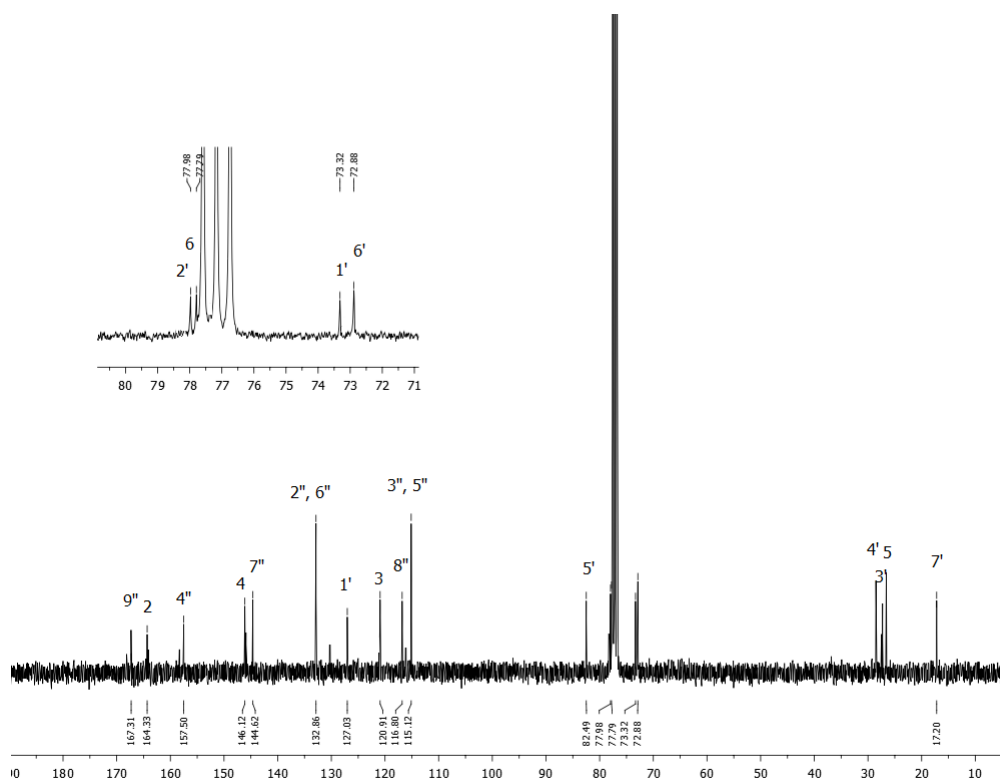


**Espectro A21.** Espectro COSY del compuesto **10** en  $\text{CDCl}_3$

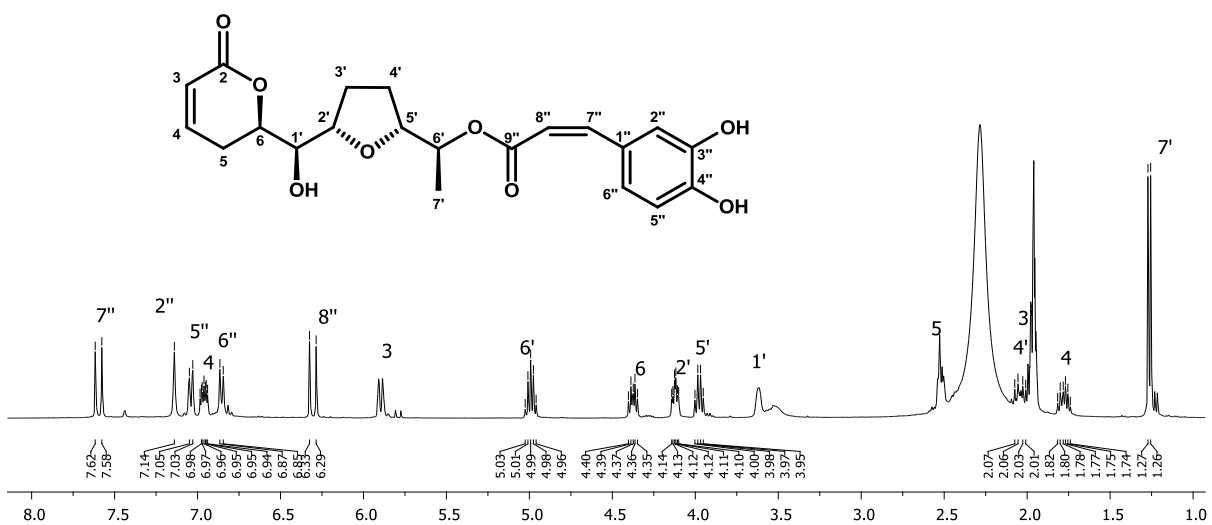




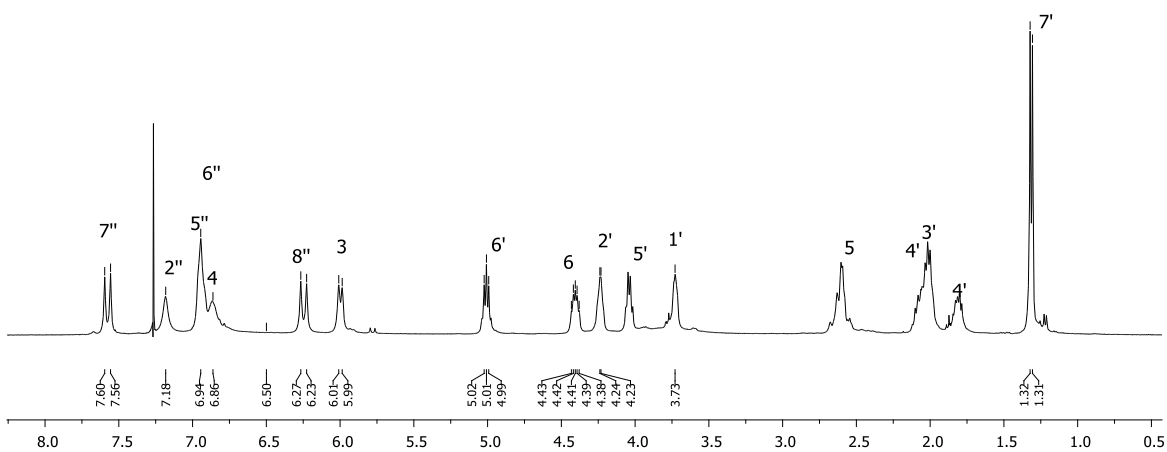
**Espectro A22.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto **11** en  $\text{CDCl}_3+\text{D}_2\text{O}$  (300 MHz).



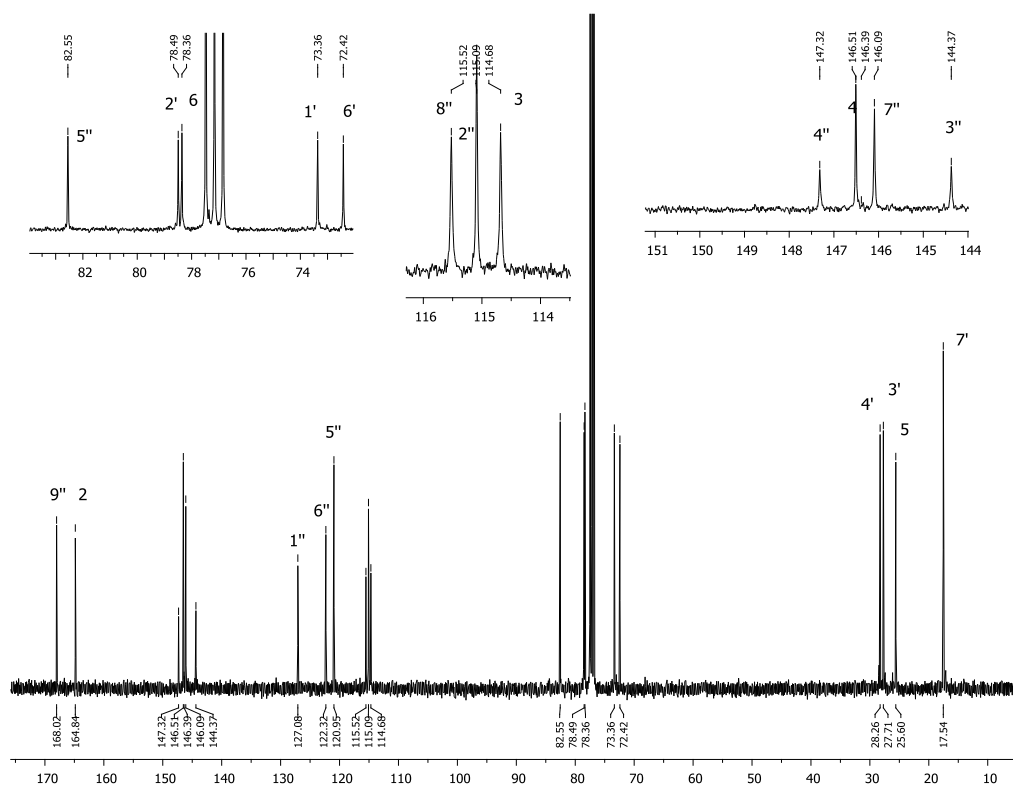
**Espectro A23.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto **11** en  $\text{CDCl}_3$  (75 MHz).



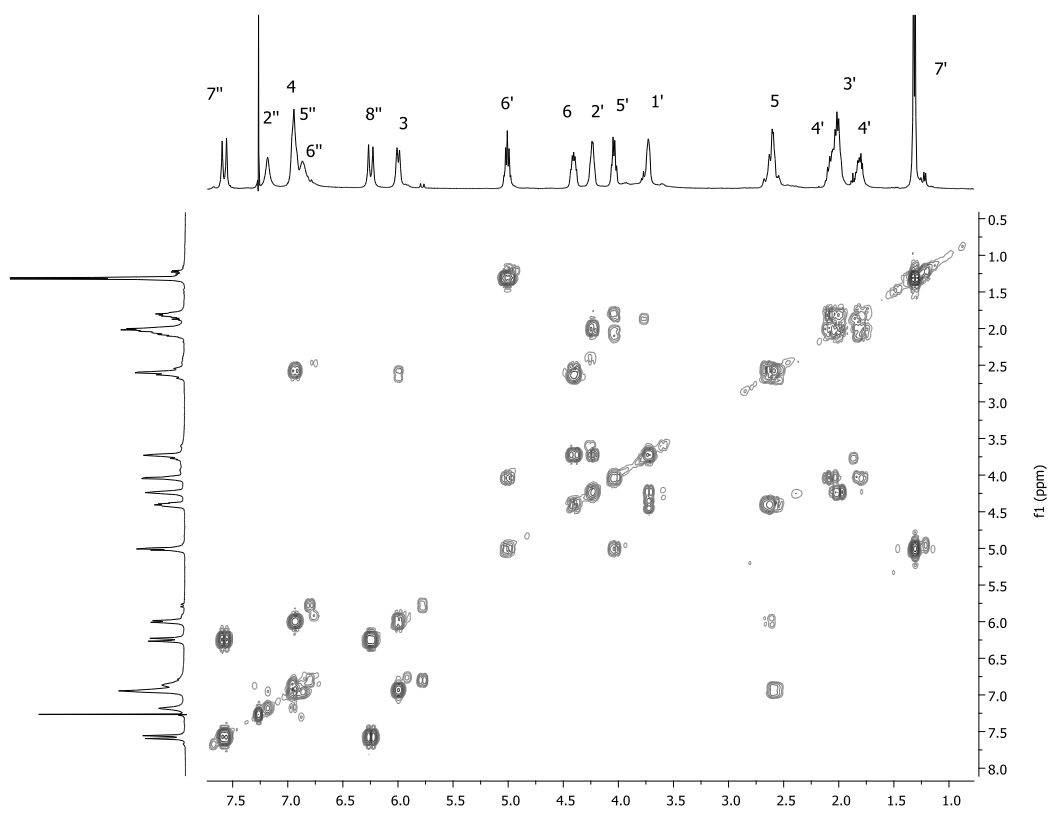
**Espectro A24.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H del compuesto **12** en CD<sub>3</sub>CN (400 MHz).



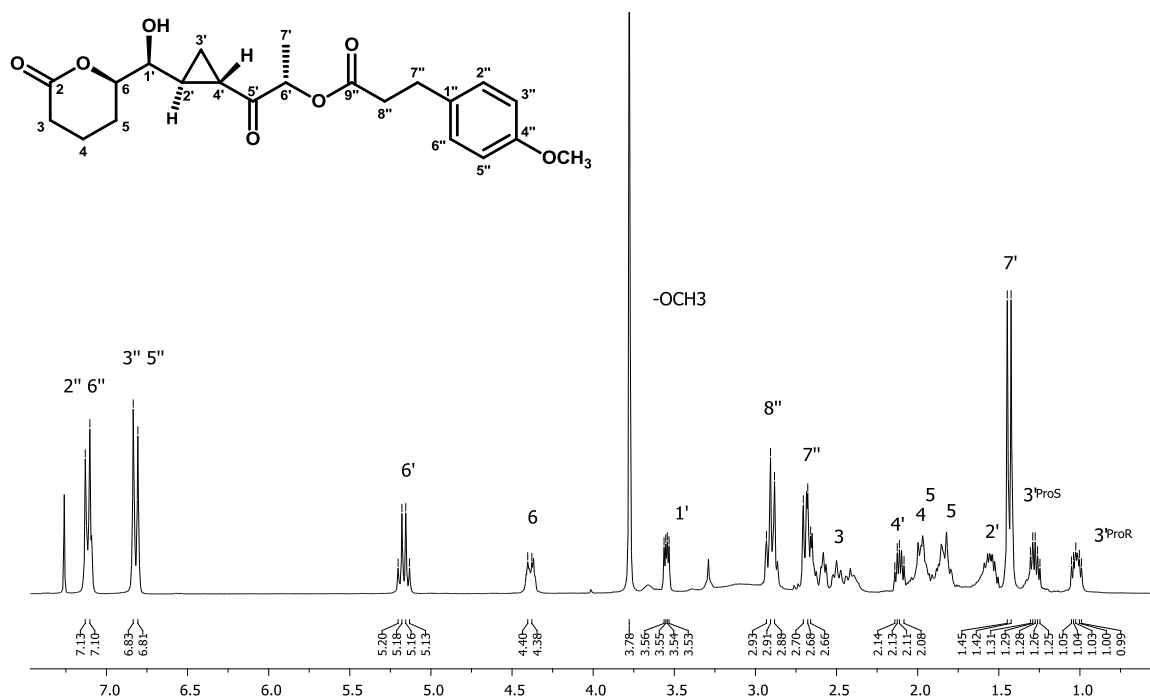
**Espectro A25.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H del compuesto **12** en CDCl<sub>3</sub> (400 MHz).



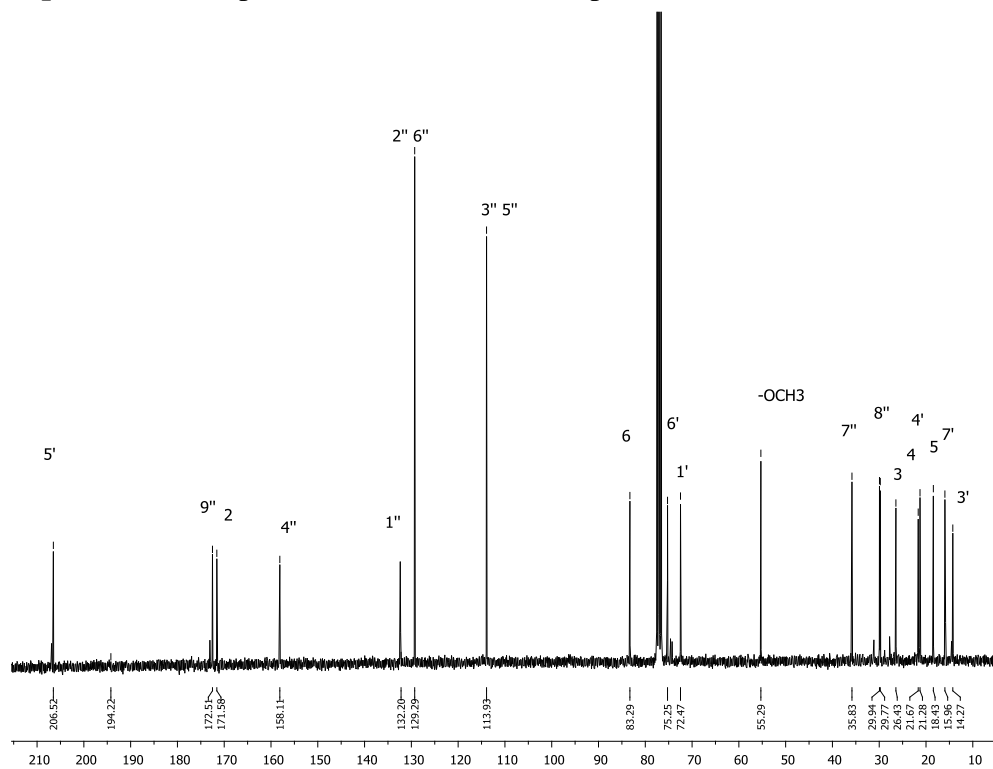
**Espectro A26.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto **12** en  $\text{CDCl}_3$  (100 MHz).



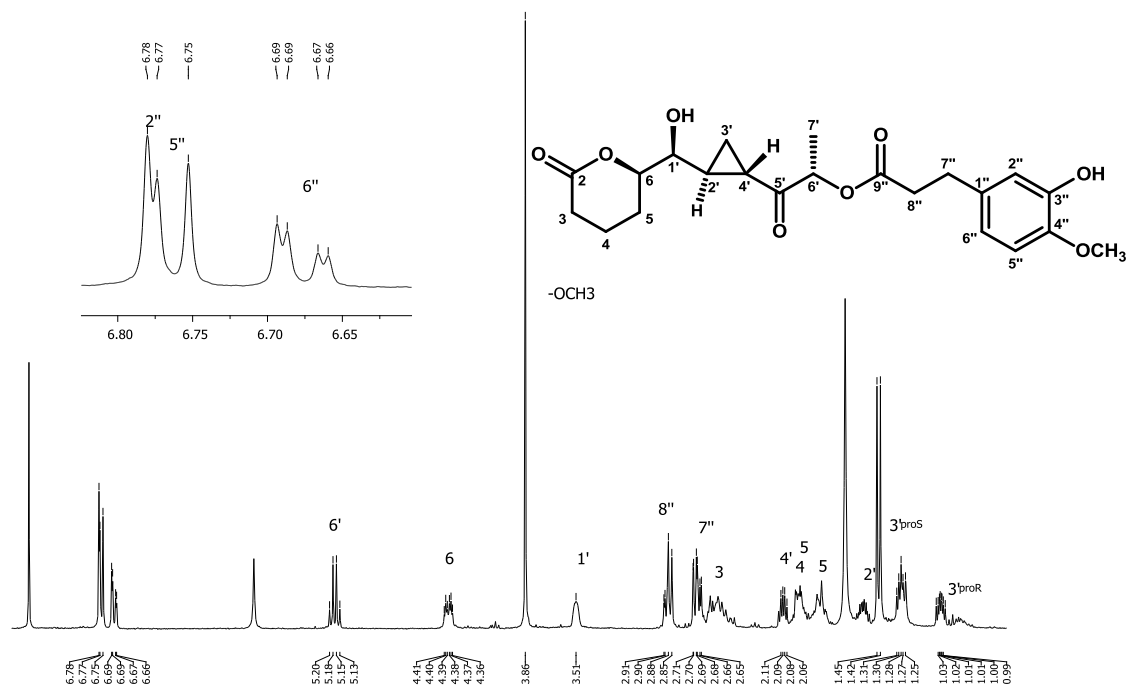
**Espectro A27.** Espectro COSY del compuesto **12** en  $\text{CDCl}_3$



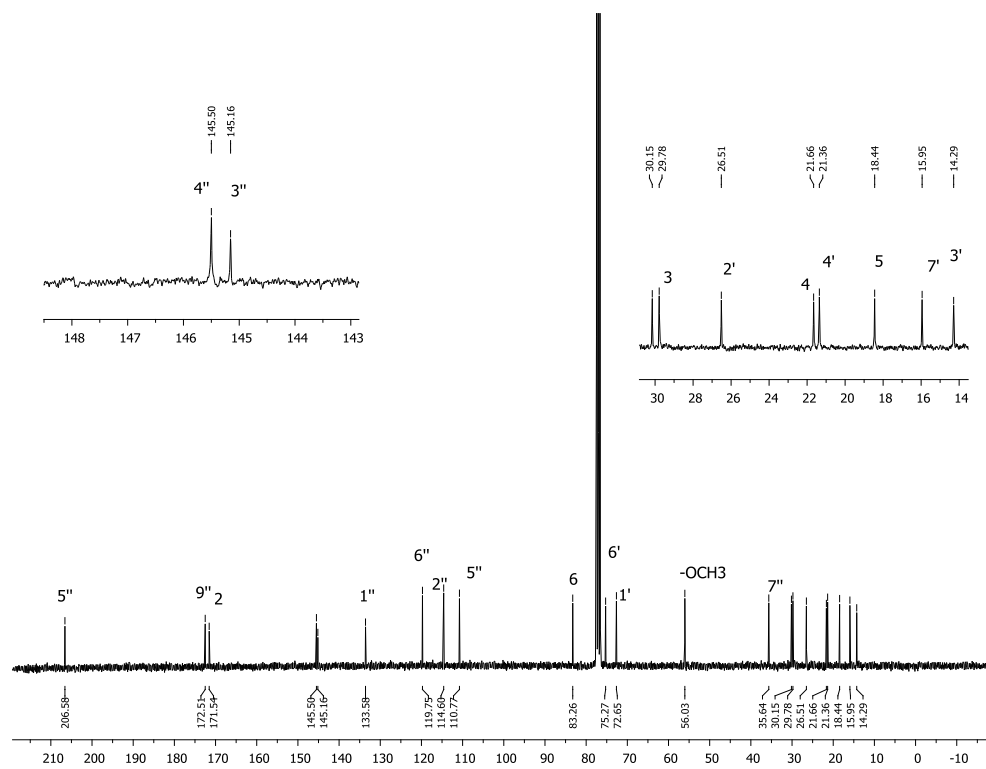
**Espectro A28.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto **13** en  $\text{CDCl}_3$  (300 MHz).



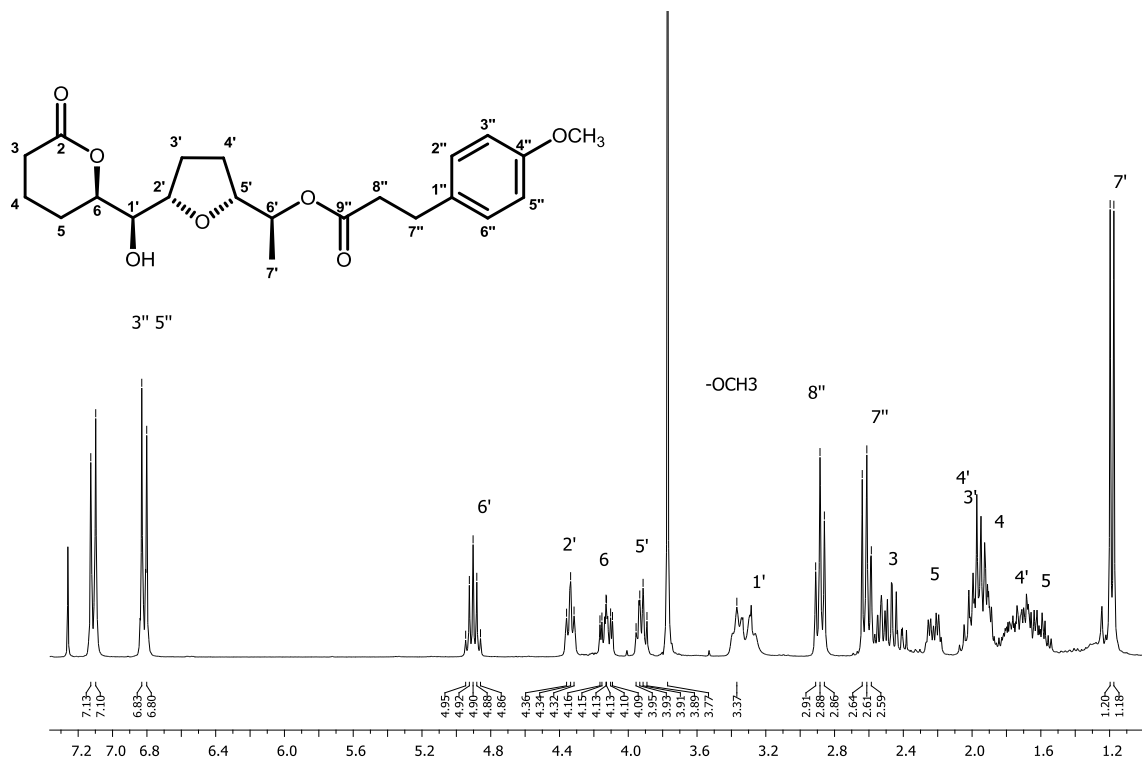
**Espectro A29.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto **13** en  $\text{CDCl}_3$  (75 MHz).



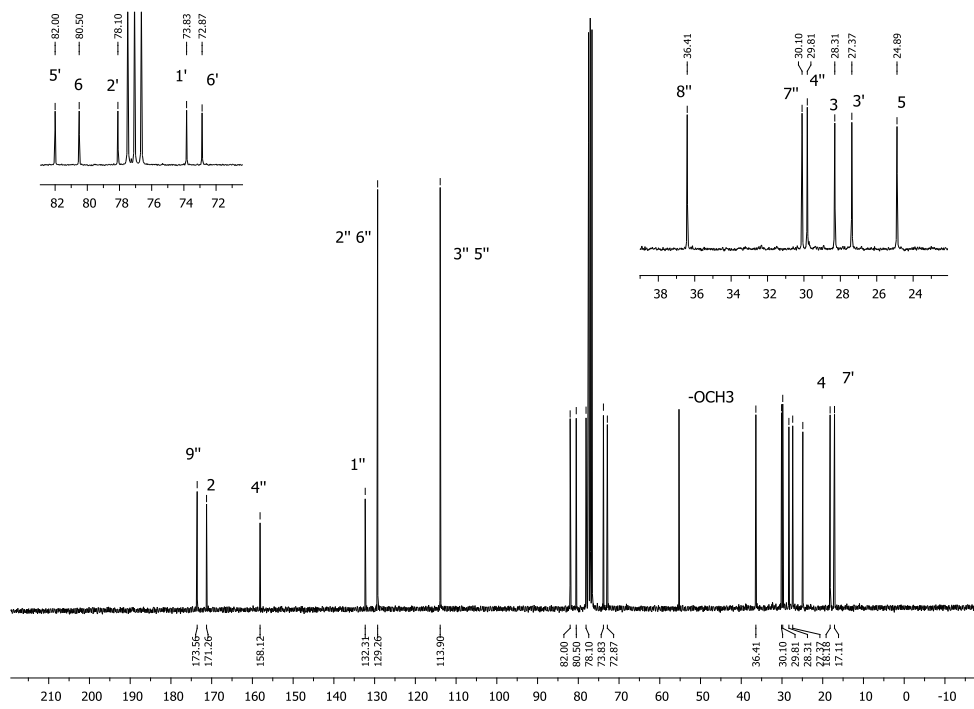
**Espectro A30.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H del compuesto **14** en CDCl<sub>3</sub> (300 MHz).



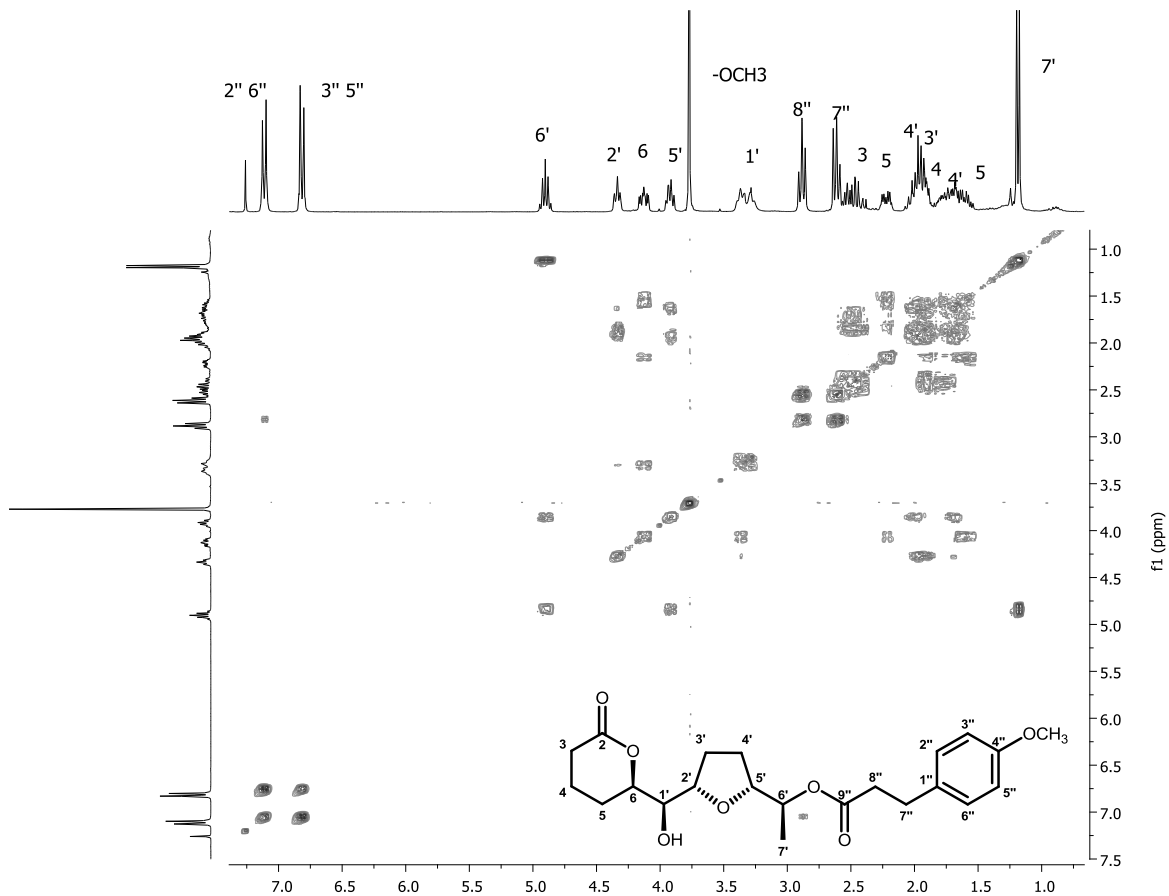
**Espectro A31.** Espectro de RMN <sup>13</sup>C del compuesto **14** en CDCl<sub>3</sub> (75 MHz)



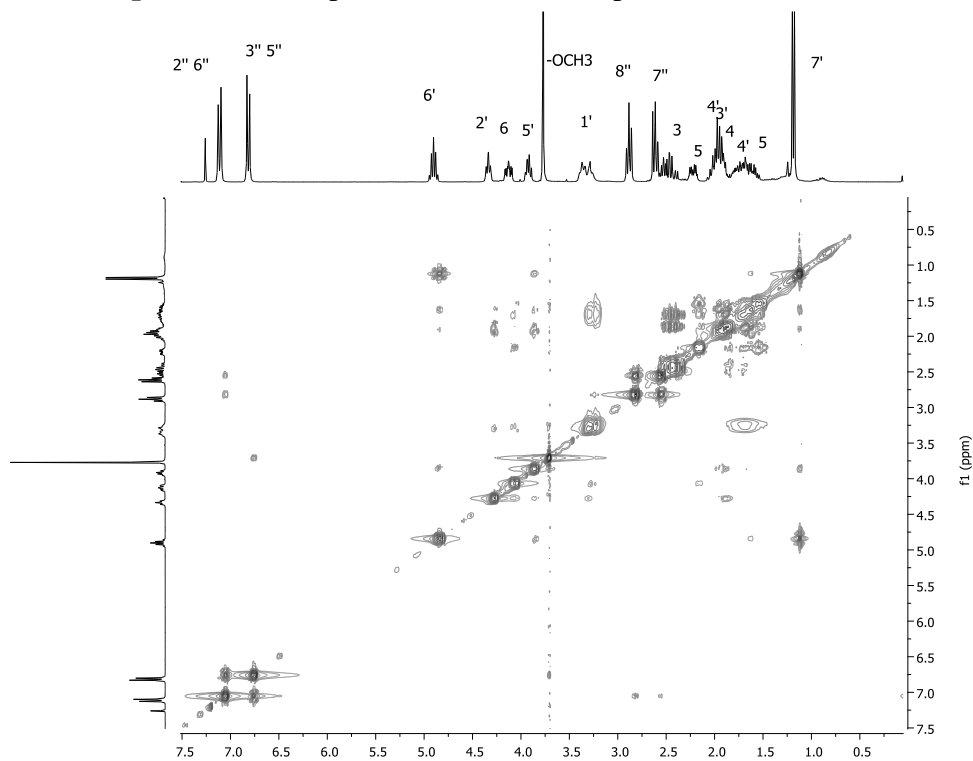
**Espectro A32.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto **15** en  $\text{CDCl}_3$  (300 MHz).



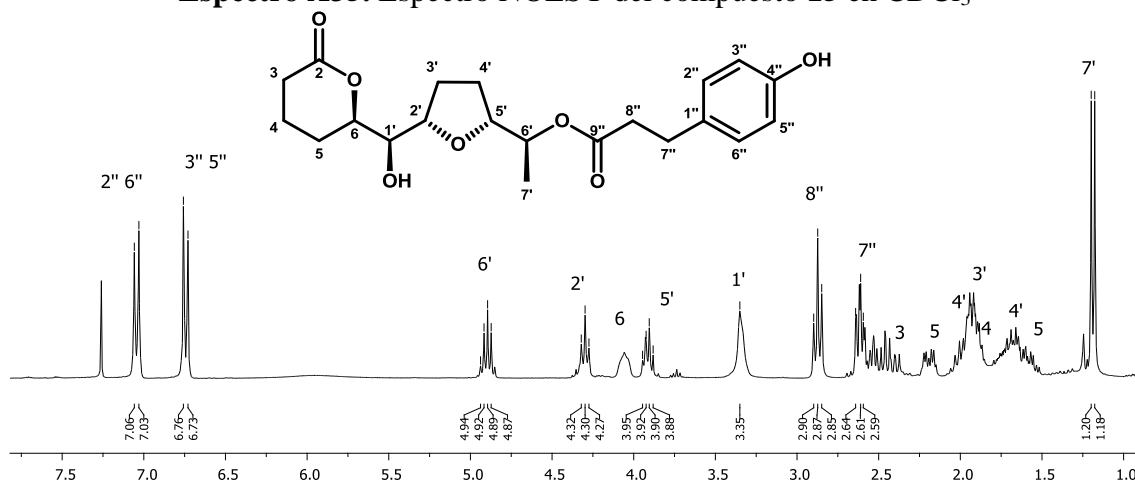
**Espectro A33.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto **15** en  $\text{CDCl}_3$  (75 MHz).



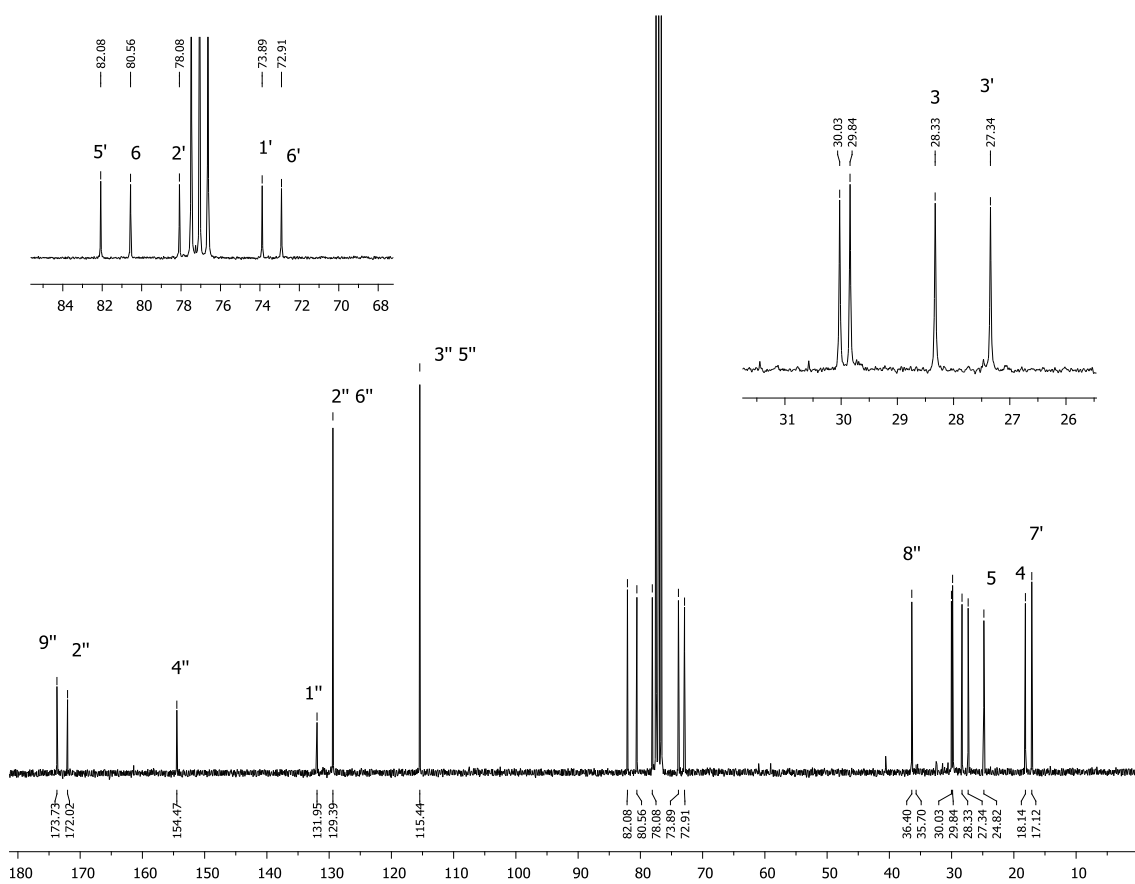
**Espectro A34.** Espectro COSY del compuesto **15** en  $\text{CDCl}_3$



**Espectro A35.** Espectro NOESY del compuesto **15** en CDCl<sub>3</sub>

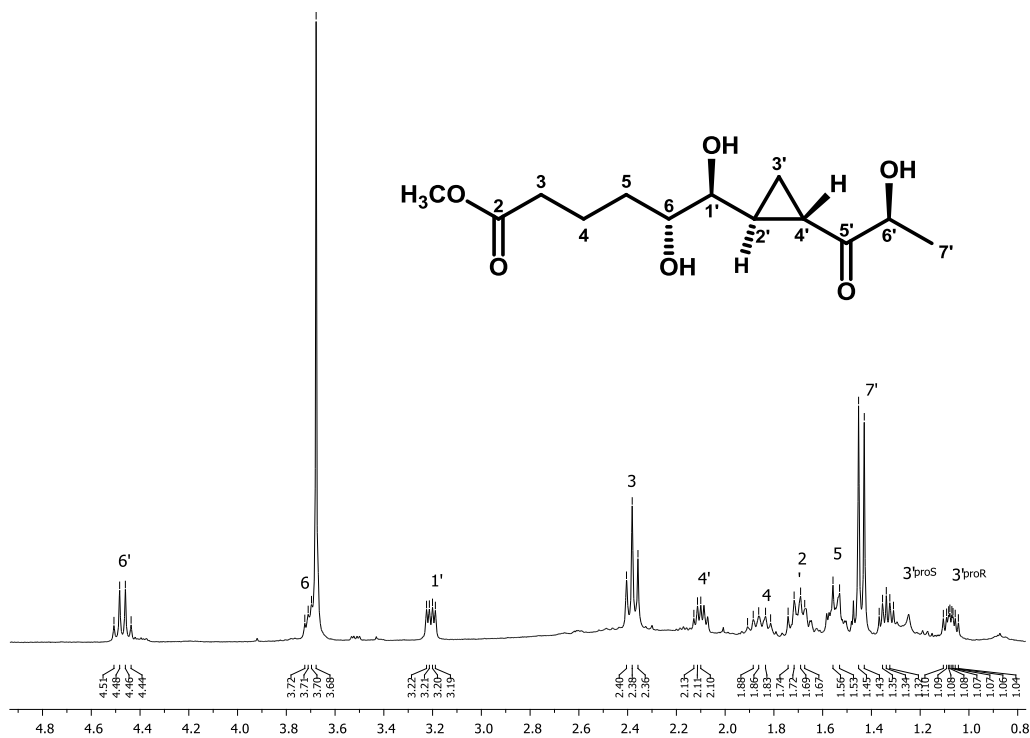


**Espectro A36.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H del compuesto **16** en CDCl<sub>3</sub> (300 MHz).

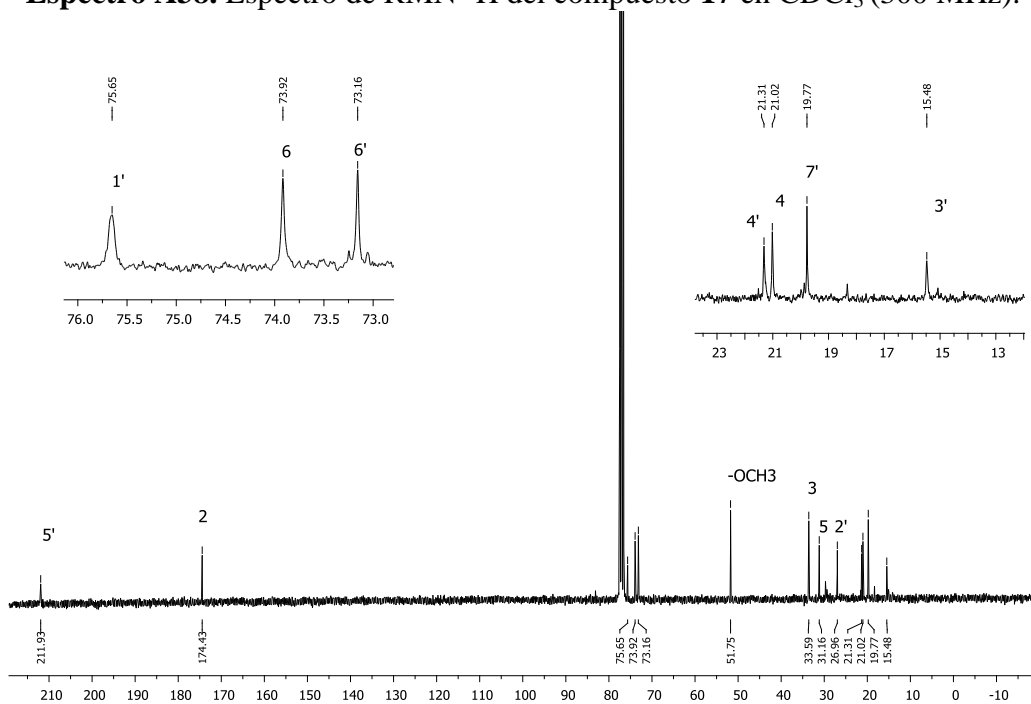


**Espectro A37.** Espectro de RMN <sup>13</sup>C del compuesto **16** en CDCl<sub>3</sub> (75 MHz).

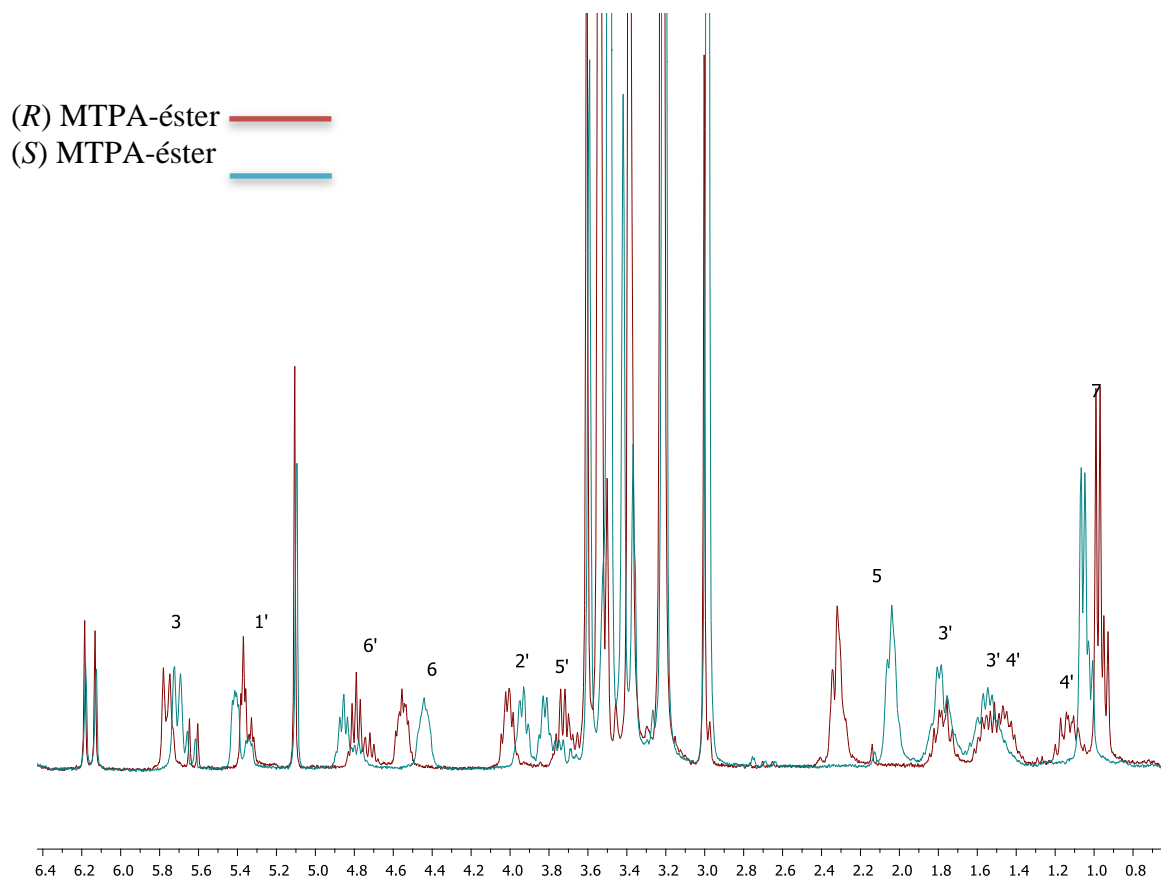




**Espectro A38.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto **17** en  $\text{CDCl}_3$  (300 MHz).



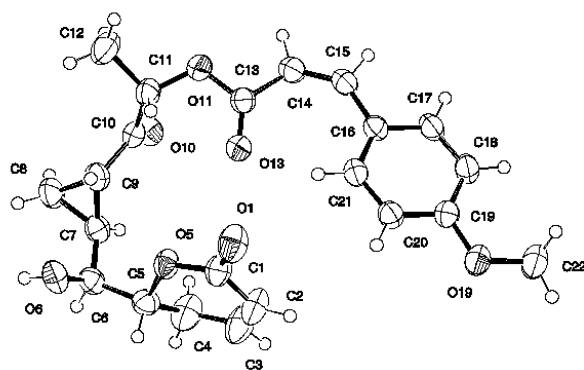
**Espectro A39.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto **17** en  $\text{CDCl}_3$  (75 MHz).



**Espectro A40.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  los esteres of *R*- and *S*-MTPA del compuesto **9** en  $\text{CDCl}_3$  (300 MHz).

**Cuadro A1** Datos cristalográficos para la brevipólida I (4)

Empirical formula	$C_{22}H_{24}O_7$	
weight	400.41	
Temperature	298(2) K	
Wavelength	0.71073 Å	
Crystal system	Monoclinic	
Space group	$P 2_1$	
Unit cell dimensions	$a = 8.9649(12)$ Å	$\alpha = 90^\circ$
	$b = 7.7800(11)$ Å	$\beta = 98.250(2)^\circ$
	$c = 14.731(2)$ Å	$\gamma = 90^\circ$
Volume	$1014.9(1)$ Å <sup>3</sup>	
Z	2	
Density (calculated)	1.308 g/cm <sup>3</sup>	
Absorption coefficient	0.097 mm <sup>-1</sup>	
$F(000)$	424	
Crystal size / colour / shape	0.46 × 0.39 × 0.14 mm/colorless/prism	
Theta range for data collection	2.30 to 27.91°.	
Index ranges	$-10 \leq h \leq 11, -10 \leq k \leq 10, -19 \leq l \leq 19$	
Reflections collected	7442	
Independent reflections	2617 [ $R(\text{int}) = 0.0408$ ]	
Completeness to theta = 59.98°	99.7 %	
Absorption correction	None	
Refinement method	Full-matrix least-squares on $F^2$	
Data / restraints / parameters	1627/1/267	
Goodness-of-fit on $F^2$	1.071	
Final $R$ indices [ $I > 2\sigma(I)$ ]	$R_1 = 0.0420, wR_2 = 0.0915$	
$R$ indices (all data)	$R_1 = 0.0525, wR_2 = 0.0960$	
Absolute structure parameter	0.1(2)	
Largest diff. peak and hole	0.144 and -0.126 e.Å <sup>-3</sup>	



**Cuadro A2.** DFT B3LYP/DGDZVP energía libre,<sup>a</sup> población<sup>b</sup> y comparación entre las constantes de acoplamiento  $J$  <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H<sup>c</sup> calculadas por DFT y las experimentales del isómero **18a** de la sinargentólida A.

Confórmero	$\Delta G^a$	P <sup>b</sup>	<sup>c</sup> J6-1'	J1'-2'	J2'-3' <sub>ProS</sub>	J2'-3' <sub>ProR</sub>	J3' <sub>ProS</sub> -4'	J3' <sub>ProR</sub> -4'	J4'-5'	J5'-6'
1	0.000	9.62	9.25	15.41	11.48	4.16	11.46	2.32	2.29	9.51
2	0.022	9.30	9.24	15.70	4.54	11.32	3.57	11.33	2.05	9.38
3	0.068	8.55	3.30	15.29	11.57	4.80	11.50	1.65	9.40	2.73
4	0.110	7.99	9.10	15.59	3.98	11.58	11.46	1.69	2.06	9.74
5	0.143	7.47	9.06	15.65	3.83	11.01	12.16	2.20	9.31	2.42
6	0.319	5.60	9.24	15.73	10.94	5.43	4.80	10.77	1.79	9.13
7	0.375	5.06	9.26	15.49	4.50	11.32	11.99	2.89	9.33	2.43
8	0.380	5.06	9.26	15.49	11.32	4.50	11.99	2.89	9.33	2.43
9	0.389	4.98	9.20	15.62	3.91	11.00	12.07	2.05	9.91	1.85
10	0.392	4.98	2.69	15.42	4.53	11.69	11.80	2.30	1.69	9.91
11	0.461	4.42	8.84	15.64	4.25	12.05	11.59	1.08	5.87	1.42
12	0.553	3.74	2.72	15.44	4.41	11.22	12.18	2.64	9.79	1.91
13	0.600	3.49	3.10	15.50	5.37	11.33	2.49	11.11	1.41	9.39
14	0.802	2.49	9.31	15.86	11.59	3.46	2.97	4.35	9.92	2.09
15	0.838	2.33	8.96	15.37	4.87	12.13	2.99	4.47	10.15	2.30
16	0.877	2.18	3.27	15.48	5.02	11.42	2.82	11.70	4.65	5.19
17	1.078	1.55	3.39	16.84	11.17	3.34	2.67	4.61	10.86	2.50
18	1.136	1.40	3.26	15.22	11.74	4.70	10.75	1.37	2.18	9.68
19	1.321	1.04	2.74	15.01	4.44	12.76	2.70	4.83	9.83	2.24
20	1.443	0.83	8.98	15.73	3.99	11.28	12.07	2.13	10.13	3.44
21	1.514	0.74	9.11	15.63	4.21	11.78	2.44	5.20	10.90	3.75
22	1.520	0.74	8.98	15.73	3.99	11.28	12.07	2.13	10.13	3.44
23	1.612	0.62	9.19	15.49	11.15	4.08	12.40	2.64	3.99	10.13
24	1.639	0.60	9.20	15.43	11.42	4.07	12.08	2.20	5.99	1.16
25	1.659	0.58	3.50	16.55	4.12	11.60	3.87	11.02	10.36	1.50
26	1.660	0.58	2.98	16.75	11.10	3.65	2.77	5.14	0.44	4.66
27	1.677	0.56	9.26	15.46	11.58	4.27	11.85	2.64	10.17	3.51
28	1.822	0.45	9.44	15.66	4.84	11.07	3.00	11.89	5.41	5.68
29	1.882	0.40	8.95	15.59	4.06	11.74	12.14	1.57	3.77	10.42
30	2.041	0.31	9.30	15.78	3.71	11.30	2.29	11.12	10.14	1.82
31	2.041	0.31	9.27	15.41	11.61	4.12	12.53	3.02	0.52	4.70
32	2.075	0.29	9.34	15.68	3.08	11.61	3.95	9.24	3.32	9.33
33	2.140	0.26	3.41	16.45	11.21	3.82	11.78	1.52	6.06	1.39
34	2.144	0.26	2.78	15.48	4.27	11.82	12.75	2.24	3.74	10.23
35	2.429	0.16	9.38	16.08	9.35	6.70	5.48	11.47	3.76	4.86
36	2.482	0.14	9.54	15.55	9.95	6.88	1.88	10.51	9.68	1.96
37	2.706	0.10	2.72	15.52	4.22	11.54	12.18	2.72	10.12	3.37
38	2.721	0.10	3.24	16.49	10.94	4.06	12.20	1.98	3.86	10.13

39	2.799	0.09	9.29	15.38	11.37	4.36	12.43	2.74	3.74	3.61
40	2.868	0.08	3.57	16.54	4.18	11.58	10.99	3.71	10.42	1.43
41	2.892	0.07	3.16	16.46	11.31	4.17	11.84	2.12	2.28	5.29
42	2.945	0.07	3.22	16.64	3.08	6.74	3.90	11.33	2.98	9.38
43	3.05	0.06	2.95	15.41	5.30	11.43	2.99	12.32	0.33	3.34
44	3.119	0.05	9.32	15.46	6.20	11.06	11.45	5.35	3.09	10.60
45	3.154	0.05	9.23	15.73	10.65	6.40	5.92	11.00	4.82	1.44
46	3.187	0.04	9.12	15.94	10.63	5.62	5.38	11.74	0.41	3.31
47	3.198	0.04	9.35	15.62	3.37	11.31	5.53	11.92	2.48	10.27
48	3.257	0.04	2.17	15.12	5.07	12.11	2.80	4.86	10.58	3.82
49	3.277	0.04	3.84	16.14	3.56	11.64	4.81	11.96	3.17	10.43
50	3.316	0.04	9.14	15.69	3.86	11.34	12.48	2.17	0.44	3.21
51	3.236	0.03	2.68	15.50	4.48	11.52	12.50	2.78	0.53	2.69
52	3.513	0.03	9.13	15.76	4.42	11.42	3.71	11.23	3.13	0.31
<b>Valor teórico<sup>d</sup></b>			7.40	15.6	7.00	8.00	9.10	4.40	5.80	5.60
<b>Valor corregido<sup>e</sup></b>			6.87	15.24	6.50	7.43	8.28	4.00	5.28	5.10
<b>Valor experimental<sup>f</sup></b>			5.70	15.70	6.40	7.40	9.00	3.60	3.60	7.2

<sup>a</sup> En kcal/mol. <sup>b</sup> En porcentaje de valores de  $\Delta G^\circ$  a 298 K y 1 atm. <sup>c</sup> En Hz calculadas a partir de las estructuras optimizadas a nivel B3LYP/DGDZVP. <sup>d</sup>  $\sum_i J^i \times P^i$ , donde  $J^i$  es el valor de la constante de acoplamiento para cada conformero y  $P^i$  es la población para la *i*-ésima conformación. <sup>e</sup> factores de corrección utilizados:  $f_{\text{H(sp3)-H(sp3)}} = 0.910$ ;  $f_{\text{H(sp3)-H(sp2)}} = 0.929$  and  $f_{\text{H(sp3)-H(sp3)}} = 0.977$ . <sup>f</sup> Constante de acoplamiento obtenida por simulación espectral.

**Cuadro A3.** DFT B3LYP/DGDZVP energía libre,<sup>a</sup> población<sup>b</sup> y comparación entre las constantes de acoplamiento  $J^{\text{H-H}}$ <sup>c</sup> calculadas por DFT y las experimentales de **18b**

Confórmero	$\Delta G^a$	$P^b$	$^cJ_{6-1'}$	$J_{1'-2'}$	$J_{2'-3'_{\text{ProS}}}$	$J_{2'-3'_{\text{ProR}}}$	$J_{3'_{\text{ProS}}-4'}$	$J_{3'_{\text{ProR}}-4'}$	$J_{4'-5'}$	$J_{5'-6'}$
1	0.000	40.077	9.06	15.62	11.70	4.28	5.06	2.46	10.79	2.64
2	0.625	14.073	9.04	15.61	4.26	11.41	1.64	11.19	10.25	2.64
	0.914	8.626	2.86	15.66	4.48	11.77	5.61	1.19	10.39	2.49
4	1.204	5.287	3.15	15.45	11.35	4.84	2.69	11.71	10.14	2.25
5	1.387	3.836	2.50	15.23	4.47	11.69	1.90	11.32	10.15	2.54
6	1.392	3.836	2.79	15.58	11.33	4.01	2.46	12.48	2.41	2.44
7	1.450	3.467	9.04	15.85	11.05	3.52	2.11	12.39	2.31	9.67
8	1.490	3.240	9.05	15.47	4.37	11.43	1.75	11.98	2.44	9.60
9	1.530	3.029	8.87	15.70	11.44	3.03	1.08	11.15	10.10	9.49
10	1.536	3.029	9.31	15.49	3.89	11.18	1.49	11.75	3.64	2.40
11	1.551	2.928	2.80	15.13	4.18	11.85	2.05	12.03	2.46	1.68
12	1.982	1.417	2.70	15.19	4.37	11.81	1.48	11.11	7.92	2.51
13	2.235	0.929	3.16	14.92	11.45	4.43	5.06	2.84	10.93	10.46
14	2.332	0.785	8.92	15.69	4.43	10.95	1.74	12.33	0.64	2.77
15	2.390	0.709	2.54	15.43	12.06	4.10	12.03	3.27	1.66	9.19
16	2.498	0.589	8.85	16.01	3.04	11.26	12.28	6.38	0.60	10.21
17	2.595	0.506	8.90	15.57	5.61	11.07	12.18	5.58	0.55	9.16
18	2.697	0.420	0.89	15.99	6.13	10.99	11.08	6.43	0.75	9.51
19	2.711	0.413	3.32	16.65	3.80	11.12	12.63	5.07	5.18	9.20
20	2.825	0.343	2.74	15.18	4.53	11.83	1.29	11.13	1.01	9.21
21	2.859	0.321	9.24	15.44	12.24	3.66	6.01	1.49	10.42	6.19
22	3.001	0.253	9.29	15.67	11.94	3.73	5.90	12.45	3.81	12.16
23	3.028	0.241	2.72	15.53	11.37	4.48	12.49	2.08	3.60	1.93
24	3.056	0.233	2.91	15.47	11.41	4.90	3.24	13.18	4.46	9.13
25	3.150	0.197	2.94	15.60	11.34	4.17	2.10	12.17	12.81	5.81
26	3.206	0.181	9.04	15.81	11.34	3.90	2.94	13.31	4.42	6.40
27	3.263	0.163	9.27	15.34	5.94	11.46	4.63	3.02	3.53	9.29
28	3.267	0.161	9.14	15.87	3.03	11.24	4.89	2.46	10.13	10.25
29	3.281	0.158	9.05	15.62	4.22	11.57	2.28	11.71	9.12	9.12
30	3.401	0.129	9.18	15.87	3.67	11.49	5.00	2.43	11.11	9.41
31	3.557	0.098	9.08	15.57	4.26	11.28	11.97	1.51	3.01	3.73
32	3.599	0.092	9.14	15.58	4.11	11.62	2.15	11.42	10.56	4.31
33	3.614	0.090	2.86	15.28	4.06	11.26	12.89	2.54	5.21	3.22
34	3.723	0.075	9.08	15.51	5.64	11.38	12.14	5.84	3.59	9.93
35	3.795	0.067	2.87	15.49	11.44	4.51	2.26	12.69	2.94	1.61
<b>Valor teórico<sup>d</sup></b>			7.20	15.60	8.60	7.20	3.80	6.70	8.70	3.60
<b>Valor corregido<sup>e</sup></b>			6.69	15.24	7.99	6.70	3.50	6.00	7.93	3.30
<b>Valor experimental<sup>f</sup></b>			5.70	15.70	6.40	7.40	9.00	3.60	3.60	7.20

**Cuadro A4.** DFT B3LYP/DGDZVP energía libre,<sup>a</sup> población<sup>b</sup> y comparación entre las constantes de acoplamiento  $J$   $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$   $^c$  calculadas por DFT y las experimentales **18c**.

Confórmero	$\Delta G^a$	$P^b$	$^cJ_{6-1'}$	$J_{1'-2'}$	$J_{2'-3'_{\text{ProS}}}$	$J_{2'-3'_{\text{ProR}}}$	$J_{3'_{\text{ProS}}-4'}$	$J_{3'_{\text{ProR}}-4'}$	$J_{4'-5'}$	$J_{5'-6'}$
1	0.000	18.406	8.96	15.71	4.26	11.23	11.54	2.26	10.90	2.64
2	0.077	16.354	8.65	15.83	4.85	11.32	3.20	12.77	4.05	10.38
3	0.276	11.669	9.18	15.70	3.74	11.50	2.57	12.07	2.09	10.93
4	0.321	10.724	9.32	15.60	3.89	11.07	12.19	2.10	2.05	10.45
5	0.591	6.798	9.24	15.41	11.09	4.18	12.25	2.11	3.80	1.68
6	0.650	6.144	9.29	15.39	11.35	4.44	11.17	2.64	10.67	2.76
7	0.807	4.770	3.29	16.46	11.22	4.16	11.14	2.03	10.93	2.68
8	0.913	3.961	9.11	15.67	3.89	11.52	12.08	1.32	1.96	10.20
9	1.100	2.874	3.13	16.48	11.36	4.24	11.75	1.99	2.59	11.00
10	1.100	2.874	7.75	14.34	5.23	9.16	3.75	10.87	3.51	2.64
11	1.248	2.269	8.97	15.54	4.59	11.87	3.27	3.92	11.51	2.69
12	1.371	1.822	9.27	15.67	3.77	11.45	2.14	11.87	2.16	10.92
13	1.428	1.675	9.05	15.44	4.46	12.00	3.31	3.99	11.02	0.86
14	1.527	1.415	3.09	16.47	11.05	4.47	11.73	1.55	9.25	10.43
15	1.596	1.257	9.14	15.67	3.84	11.20	12.06	1.34	3.58	1.88
16	1.756	0.959	3.07	16.68	11.38	3.94	2.75	4.45	10.87	0.78
17	1.794	0.897	3.38	16.71	11.35	3.58	4.25	2.79	11.23	9.51
18	1.883	0.770	9.29	15.73	11.56	3.91	1.83	6.90	2.46	10.64
19	1.905	0.745	2.95	16.50	4.35	11.70	2.11	5.06	11.33	2.90
20	2.064	0.569	9.19	15.55	4.06	12.20	1.86	6.31	3.63	11.00
21	2.219	0.434	9.00	15.75	11.34	5.22	6.15	11.21	3.65	1.63
22	2.265	0.406	2.70	16.75	3.59	11.29	5.02	12.71	4.11	10.29
23	2.373	0.334	2.98	16.48	10.58	4.69	11.20	1.08	3.77	1.85
24	2.717	0.190	3.51	16.58	4.17	11.50	3.63	11.90	1.03	10.10
25	2.740	0.180	3.26	16.47	11.47	4.04	11.55	2.31	1.83	3.73
26	2.751	0.177	8.90	15.72	4.53	11.13	12.26	2.83	7.01	10.54
27	2.753	0.177	8.95	15.61	3.97	11.58	11.02	1.47	10.03	0.24
28	2.755	0.177	8.86	15.79	11.64	4.13	6.01	12.07	2.26	10.25
29	2.783	0.168	9.14	16.34	4.27	4.94	8.72	10.22	11.05	2.49
30	2.941	0.129	9.55	15.81	11.27	4.60	8.53	9.44	3.66	1.30
31	2.955	0.127	9.04	15.61	5.21	11.83	3.17	5.49	0.97	0.99
32	3.173	0.087	9.31	15.40	11.32	4.45	12.16	3.18	7.57	10.27
33	3.225	0.080	9.30	15.42	11.92	5.71	2.75	11.82	2.40	10.82
34	3.228	0.080	3.20	16.48	11.10	4.12	11.16	2.00	10.12	0.29
35	3.461	0.053	3.41	16.35	4.47	11.71	2.84	4.35	10.56	2.39
36	3.561	0.045	3.11	16.69	11.33	3.87	2.81	4.26	10.67	2.00
37	3.616	0.041	9.33	15.60	10.99	6.51	6.04	10.06	8.99	1.02
38	3.620	0.040	3.32	16.45	11.15	4.12	12.11	2.52	7.06	10.42
39	3.635	0.040	4.49	14.91	5.29	10.03	2.79	6.28	4.42	9.67

40	3.689	0.037	9.29	15.69	3.35	11.80	1.81	6.40	3.05	3.89
41	3.693	0.036	3.20	16.34	11.64	5.68	3.37	11.99	1.90	11.00
<b>Valor teórico<sup>d</sup></b>			8.2	15.7	6.1	9.4	8.0	5.8	6.0	6.5
<b>Valor corregido<sup>e</sup></b>			7.6	15.3	5.7	8.7	7.3	5.3	5.5	5.9
<b>Valor experimental<sup>f</sup></b>			5.7	15.7	6.4	7.4	9.0	3.6	3.6	7.2

<sup>a</sup> En kcal/mol. <sup>b</sup> En porcentaje de valores de  $\Delta G^\circ$  a 298 K y 1 atm. <sup>c</sup> En Hz calculadas a partir de las estructuras optimizadas a nivel B3LYP/DGDZVP. <sup>d</sup>  $\sum_i J^i \times P^i$ , donde  $J^i$  es el valor de la constante de acoplamiento para cada conformero y  $P^i$  es la población para la *i*-ésima conformación. <sup>e</sup> factores de corrección utilizados:  $f_{\text{H(sp3)-H(sp3)}} = 0.910$ ;  $f_{\text{H(sp3)-H(sp2)}} = 0.929$  and  $f_{\text{H(sp3)-H(sp3)}} = 0.977$ . <sup>f</sup> Constante de acoplamiento obtenida por simulación espectral.



**Cuadro A5.** DFT B3LYP/DGDZVP energía libre,<sup>a</sup> población<sup>b</sup> y comparación entre las constantes de acoplamiento  $J^1\text{H}-^1\text{H}^c$  calculadas por DFT y las experimentales de **18d**

Confórmero	$\Delta G^a$	$P^b$	$^cJ_{6-1'}$	$J_{1'-2'}$	$J_{2'-3'_{\text{ProS}}}$	$J_{2'-3'_{\text{ProR}}}$	$J_{3'_{\text{ProS}}-4'}$	$J_{3'_{\text{ProR}}-4'}$	$J_{4'-5'}$	$J_{5'-6'}$
1	0.000	38.866	9.03	15.57	4.23	11.46	1.55	11.24	2.69	10.29
2	0.529	15.887	2.58	15.42	11.85	4.14	11.69	4.25	2.30	10.16
3	0.701	11.924	3.06	15.42	11.73	4.39	1.95	11.85	2.54	10.38
4	1.353	3.980	8.97	15.63	11.61	3.28	1.01	11.13	2.47	10.35
5	1.392	3.720	8.86	15.66	4.39	11.51	1.43	11.02	2.77	0.74
6	1.552	2.840	8.94	15.57	12.26	3.88	4.41	2.77	10.23	1.98
7	1.570	2.746	2.61	15.22	4.28	11.76	1.60	11.26	2.51	10.37
8	1.593	2.654	9.08	15.61	4.17	11.52	2.32	12.16	9.59	2.50
9	1.912	1.547	3.26	15.37	4.63	11.83	11.78	3.85	1.94	10.01
10	1.912	1.547	2.91	15.51	12.26	3.08	8.30	0.90	2.90	10.14
11	1.919	1.521	2.82	15.48	11.49	4.46	2.27	11.97	2.03	0.94
12	2.061	1.201	2.86	15.51	11.00	4.29	3.00	12.28	9.85	2.78
13	2.126	1.085	3.81	15.77	2.76	10.97	6.31	2.27	1.98	10.14
14	2.128	1.085	8.91	15.86	10.83	3.39	2.25	12.39	9.79	2.44
15	2.194	0.964	8.39	16.03	11.22	2.79	11.32	5.82	3.47	10.04
16	2.226	0.916	9.45	15.58	11.61	4.20	11.87	4.55	2.39	10.48
17	2.233	0.901	2.92	15.49	11.76	4.42	1.69	12.42	5.73	5.35
18	2.393	0.688	9.03	15.53	1.96	11.48	1.43	11.05	1.66	3.65
19	2.421	0.654	9.02	15.78	11.78	3.64	1.56	12.48	4.39	3.21
20	2.429	0.643	8.96	15.61	4.08	11.08	11.91	11.59	5.69	6.28
21	2.483	0.591	9.43	15.30	12.25	4.45	9.79	2.81	2.83	10.29
22	2.502	0.571	2.82	15.48	11.36	5.18	11.34	2.69	0.78	2.33
23	2.669	0.429	9.60	15.71	10.42	6.26	11.73	2.22	0.37	2.52
24	2.684	0.422	8.93	16.84	7.19	2.59	12.13	4.29	2.58	10.18
25	2.761	0.368	2.53	15.26	4.51	11.51	2.43	11.92	9.17	3.28
26	2.866	0.311	2.88	15.22	4.07	11.66	1.59	11.97	4.58	3.15
27	2.967	0.258	8.78	15.73	11.59	2.85	0.47	11.02	5.91	0.87
28	3.002	0.246	2.69	15.19	4.25	11.75	1.64	11.28	2.52	0.91
29	3.061	0.222	2.61	15.36	12.02	4.34	11.58	4.64	1.77	3.92
30	3.077	0.215	9.05	15.67	3.99	11.52	1.69	11.85	4.40	3.17
31	3.077	0.215	2.81	15.29	4.00	11.79	2.72	12.22	9.20	9.21
32	3.163	0.187	8.75	15.98	3.84	11.59	5.26	2.45	7.71	10.30
33	3.200	0.175	2.87	15.51	11.46	4.41	2.46	11.88	1.70	3.70
34	3.344	0.138	2.76	15.54	12.09	4.05	1.88	12.63	4.28	3.22
35	3.347	0.138	2.76	15.54	11.78	4.21	2.06	12.58	3.17	10.66
36	3.693	0.077	9.00	15.83	11.48	3.72	1.69	12.46	3.42	10.54
37	3.76	0.068	9.08	15.79	11.34	3.81	2.75	12.32	3.60	10.63

<b>Valor teórico<sup>d</sup></b>	6.5	15.5	7.7	8.0	9.4	4.1	3.2	8.8
<b>Valor corregido<sup>e</sup></b>	6.0	15.4	7.1	7.4	8.6	3.7	3.0	8.0
<b>Valor experimental<sup>f</sup></b>	5.7	15.7	6.4	7.4	9.0	3.6	3.6	7.2

<sup>a</sup> En kcal/mol. <sup>b</sup> En porcentaje de valores de  $\Delta G^\circ$  a 298 K y 1 atm. <sup>c</sup> En Hz calculadas a partir de las estructuras optimizadas a nivel B3LYP/DGDZVP. <sup>d</sup>  $\sum_i J^i \times P^i$ , donde  $J^i$  es el valor de la constante de acoplamiento para cada conformero y  $P^i$  es la población para la *i*-ésima conformación. <sup>e</sup> factores de corrección utilizados:  $f_{\text{H(sp3)-H(sp3)}} = 0.910$ ;  $f_{\text{H(sp3)-H(sp2)}} = 0.929$  and  $f_{\text{H(sp3)-H(sp3)}} = 0.977$ . <sup>f</sup> Constante de acoplamiento obtenida por simulación espectral.

**Cuadro A6.** DFT B3LYP/DGDZVP energía libre,<sup>a</sup> población<sup>b</sup> y comparación entre las constantes de acoplamiento  $J$   $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  <sup>c</sup> calculadas por DFT y las experimentales del isómero **18e** de la sinargentólida A.

Confórmero	$\Delta G^a$ Kcal/mol	$P^b$	$^cJ_{6-1'}$	$J_{1'-2'}$	$J_{2'-3'_{\text{ProS}}}$	$J_{2'-3'_{\text{ProR}}}$	$J_{3'_{\text{ProS}}-4'}$	$J_{3'_{\text{ProR}}-4'}$	$J_{4'-5'}$	$J_{5'-6'}$
1	0.6735	67.350	3.06	15.52	11.45	5.21	11.80	2.68	1.71	10.26
2	0.0950	9.502	9.27	15.37	4.33	11.34	2.37	11.93	2.40	10.34
3	0.0619	6.194	9.16	15.72	5.54	4.35	11.89	4.05	2.41	10.19
4	0.0466	4.665	9.09	15.59	11.57	3.75	1.45	11.56	2.65	10.31
5	0.0299	2.992	9.12	15.68	4.86	11.44	11.45	4.77	1.98	9.98
6	0.0170	1.703	9.11	15.57	11.33	4.03	1.82	11.67	1.91	12.43
7	0.0118	1.187	9.36	15.41	4.59	11.44	3.23	12.13	9.72	2.36
8	0.0081	0.816	2.55	15.40	11.75	4.36	2.02	11.98	2.32	10.43
9	0.0070	0.701	9.03	15.90	11.10	5.06	11.42	2.96	9.13	2.22
10	0.0067	0.679	3.31	15.26	4.76	11.71	1.30	10.89	2.61	10.32
11	0.0058	0.582	2.87	15.64	3.85	11.73	5.07	2.26	10.25	2.87
12	0.0057	0.578	3.04	15.29	4.89	11.86	11.55	4.22	2.35	9.99
13	0.0055	0.553	8.96	15.72	10.72	4.23	2.71	12.35	9.59	2.49
14	0.0051	0.517	3.01	15.14	12.64	4.90	7.02	1.95	2.13	10.07
15	0.0040	0.404	8.91	15.53	12.16	4.43	3.78	3.44	10.31	2.05
16	0.0036	0.366	9.25	15.38	11.43	4.23	2.52	11.82	2.25	1.12
17	0.0032	0.325	9.07	15.70	10.91	4.00	2.66	12.36	9.21	9.32
18	0.0022	0.226	9.44	15.85	3.10	10.95	8.22	12.18	2.82	10.26
19	0.0019	0.194	9.25	15.51	4.47	11.22	2.89	11.96	9.20	0.40
20	0.0017	0.173	9.09	15.71	11.18	3.93	1.96	11.88	1.51	3.58
21	0.0014	0.148	9.31	15.36	4.51	11.48	2.40	11.61	1.86	3.65
22	0.0013	0.139	9.22	15.79	5.53	10.72	10.90	4.54	1.50	1.36
23	0.0011	0.110	2.83	15.54	11.06	4.30	3.46	12.38	9.68	2.37
<b>Valor teórico<sup>d</sup></b>			4.8	15.5	9.9	6.0	9.7	4.7	2.2	9.9
<b>Valor corregido<sup>e</sup></b>			4.5	15.2	9.2	5.6	8.8	4.3	2.0	9.1
<b>Valor experimental<sup>f</sup></b>			5.7	15.7	6.4	7.4	9.0	3.6	3.6	7.2

<sup>a</sup> En kcal/mol. <sup>b</sup> En porcentaje de valores de  $\Delta G^\circ$  a 298 K y 1 atm. <sup>c</sup> En Hz calculadas a partir de las estructuras optimizadas a nivel B3LYP/DGDZVP. <sup>d</sup> $\sum_i J^i \times P^i$ , donde  $J^i$  es el valor de la constante de acoplamiento para cada confórmero y  $P^i$  es la población para la  $i$ -ésima conformación. <sup>e</sup> factores de corrección utilizados:  $f_{\text{H(sp3)-H(sp3)}} = 0.910$ ;  $f_{\text{H(sp3)-H(sp2)}} = 0.929$  and  $f_{\text{H(sp3)-H(sp3)}} = 0.977$ . <sup>f</sup> Constante de acoplamiento obtenida por simulación espectral.

**Cuadro A7.** DFT B3LYP/DGDZVP energía libre,<sup>a</sup> población<sup>b</sup> y comparación entre las constantes de acoplamiento  $J$   $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ <sup>c</sup> calculadas por DFT y las experimentales de la 5'-epi-olguina **1**

Confórmero	$\Delta G^a$	$P^b$	$^c J_{6,1}$	$J_{1,2}$	$J_{2,3}$	$J_{3,4}$	$J_{4,5}$	$J_{5,6}$
1	0.000	0.291	9.72	3.48	1.41	16.92	10.16	1.80
2	0.031	0.277	9.76	3.96	2.20	15.61	3.68	2.43
3	0.238	0.195	9.88	3.80	9.74	16.00	3.78	2.12
4	0.851	0.069	9.66	4.01	2.17	15.91	3.86	10.23
5	1.288	0.033	9.75	3.87	2.39	15.55	3.42	2.33
6	1.464	0.025	9.74	3.87	2.38	15.54	3.45	2.34
7	1.483	0.024	9.85	3.87	2.41	15.72	10.60	2.65
8	1.581	0.020	9.51	3.98	2.39	16.28	9.73	1.31
9	1.605	0.019	9.51	3.98	2.39	16.28	9.73	1.31
10	1.628	0.019	9.50	4.08	8.78	16.56	9.33	10.18
11	1.966	0.011	9.40	3.90	10.15	15.60	3.19	1.74
12	1.984	0.010	9.74	4.01	8.79	16.23	10.16	2.04
13	2.634	0.003	9.60	3.44	1.15	17.13	3.03	10.57
14	2.850	0.002	9.47	3.46	1.22	16.87	2.90	2.86
15	3.114	0.002	9.70	3.47	1.56	16.70	9.97	2.46
<b>Valor teórico<sup>d</sup></b>			<b>9.75</b>	<b>3.78</b>	<b>3.72</b>	<b>16.15</b>	<b>6.16</b>	<b>2.84</b>
<b>Valor corregido<sup>e</sup></b>			<b>8.87</b>	<b>3.44</b>	<b>3.46</b>	<b>15.78</b>	<b>5.61</b>	<b>2.58</b>
<b>Valor experimental<sup>f</sup></b>			<b>8.40</b>	<b>4.20</b>	<b>4.5</b>	<b>15.60</b>	<b>5.70</b>	<b>3.6</b>

<sup>a</sup> En kcal/mol. <sup>b</sup> En porcentaje de valores de  $\Delta G^\circ$  a 298 K y 1 atm. <sup>c</sup> En Hz calculadas a partir de las estructuras optimizadas a nivel B3LYP/DGDZVP. <sup>d</sup>  $\sum_i J^i \times P^i$ , donde  $J^i$  es el valor de la constante de acoplamiento para cada confórmero y  $P^i$  es la población para la *i*-ésima conformación. <sup>e</sup> factores de corrección utilizados:  $f_{\text{H(sp3)-H(sp3)}} = 0.910$ ;  $f_{\text{H(sp3)-H(sp2)}} = 0.929$  and  $f_{\text{H(sp3)-H(sp3)}} = 0.977$ . <sup>f</sup> Constante de acoplamiento obtenida por simulación espectral.

**Cuadro A8.** DFT B3LYP/DGDZVP energía libre,<sup>a</sup> población<sup>b</sup> y comparación entre las constantes de acoplamiento  $J^{\text{H-H}}$ <sup>c</sup> calculadas por DFT y las experimentales del isómero **1a**.

Confórmero	$\Delta G^a$	$P^b$	$^c J_{6,1'}$	$J_{1',2'}$	$J_{2',3'}$	$J_{3',4'}$	$J_{4',5'}$	$J_{5',6'}$
1	0.000	0.325	9.64	3.90	9.79	15.92	10.05	9.78
2	0.087	0.281	9.64	3.90	9.78	15.93	10.05	9.78
3	0.183	0.239	9.64	3.90	9.78	15.93	10.05	9.78
4	1.458	0.028	9.73	3.88	2.21	16.01	2.83	4.63
5	1.503	0.026	9.69	3.95	2.20	15.86	10.05	3.95
6	1.639	0.020	9.66	3.76	10.19	15.75	4.87	9.01
7	1.703	0.018	9.66	3.76	10.19	15.75	4.87	9.01
8	1.794	0.016	9.78	3.80	10.11	15.77	3.52	2.27
9	2.017	0.011	9.78	3.80	10.12	15.76	3.55	2.28
10	2.313	0.007	9.83	3.88	2.20	15.65	3.74	9.21
11	2.347	0.006	10.03	3.69	3.25	15.85	5.07	1.18
12	2.402	0.006	9.83	3.88	2.19	15.65	3.74	9.21
13	2.442	0.005	9.13	3.96	10.19	15.62	10.40	5.62
14	2.628	0.004	9.88	3.93	1.40	15.85	9.83	9.81
15	2.718	0.003	9.60	3.48	4.27	16.56	1.29	9.13
16	2.802	0.003	9.91	3.91	1.43	16.17	8.95	2.54
17	3.060	0.002	9.60	3.43	1.21	16.92	9.82	2.41
18	3.065	0.002	9.63	3.47	1.32	16.89	3.19	5.13
<b>Valor teórico<sup>d</sup></b>			9.65	3.89	9.17	15.92	9.33	9.13
<b>Valor corregido<sup>e</sup></b>			8.78	3.54	8.52	15.55	8.49	8.31
<b>Valor experimental<sup>f</sup></b>			8.00	4.20	8.40	15.80	8.50	8.20

<sup>a</sup> En kcal/mol. <sup>b</sup> En porcentaje de valores de  $\Delta G^\circ$  a 298 K y 1 atm. <sup>c</sup> En Hz calculadas a partir de las estructuras optimizadas a nivel B3LYP/DGDZVP. <sup>d</sup> $\sum_i J^i \times P^i$ , donde  $J^i$  es el valor de la constante de acoplamiento para cada confórmero y  $P^i$  es la población para la *i*-ésima conformación. <sup>e</sup> factores de corrección utilizados:  $f_{\text{H(sp3)-H(sp3)}} = 0.910$ ;  $f_{\text{H(sp3)-H(sp2)}} = 0.929$  and  $f_{\text{H(sp3)-H(sp3)}} = 0.977$ . <sup>f</sup> Constante de acoplamiento obtenida por simulación espectral.

**Cuadro A9.** DFT B3LYP/DGDZVP energía libre,<sup>a</sup> población<sup>b</sup> y comparación entre las constantes de acoplamiento  $J$  <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H <sup>c</sup> calculadas por DFT y las experimentales de la 5-desacetoxi-5'-*epi*-olguina **2**.

Confórmero	$\Delta G^a$	$P^b$	$^c J_{6,1}$	$J_{1,2}$	$J_{2,3}$	$J_{3,4}$	$J_{4,5}$	$J_{5,6}$
1	0.000	0.120	9.62	3.70	8.80	16.34	9.44	10.16
2	0.033	0.114	9.71	3.71	8.46	16.58	9.31	2.23
3	0.052	0.110	9.42	3.82	2.53	16.10	9.90	1.66
4	0.056	0.109	9.66	3.68	9.74	15.81	3.55	2.45
5	0.056	0.109	9.66	3.68	9.74	15.81	3.55	2.45
6	0.341	0.067	9.82	3.77	8.60	16.35	9.05	10.53
7	0.418	0.059	9.73	3.78	2.88	15.74	9.75	9.93
8	0.569	0.046	9.47	3.91	1.93	15.52	3.91	2.27
9	0.570	0.046	9.47	3.91	1.93	15.52	3.91	2.27
10	0.761	0.033	9.63	3.67	8.67	16.09	10.33	2.15
11	0.794	0.031	9.63	3.67	8.66	16.09	10.33	2.15
12	0.858	0.028	9.37	3.93	2.20	15.45	10.76	2.23
13	0.868	0.028	9.50	3.90	1.88	15.98	4.99	10.28
14	0.875	0.027	9.50	3.90	1.88	15.98	4.99	10.28
15	1.071	0.020	9.36	3.86	2.16	15.39	3.52	2.45
16	1.075	0.020	9.36	3.86	2.16	15.39	3.52	2.45
17	1.476	0.010	9.45	3.38	1.25	16.96	10.04	1.83
18	1.536	0.009	9.28	3.87	2.24	15.85	9.71	2.66
19	1.912	0.005	9.37	3.85	10.03	15.60	3.33	1.75
20	2.091	0.004	9.44	3.37	1.28	16.40	3.53	2.81
21	2.244	0.003	1.25	3.39	9.98	16.12	2.66	2.40
22	2.770	0.001	9.44	3.41	1.37	16.80	1.03	1.81
23	3.291	0.000	9.44	3.37	1.28	16.40	3.53	2.81
<b>Valor teórico<sup>d</sup></b>			<b>9.57</b>	<b>3.76</b>	<b>6.28</b>	<b>16.01</b>	<b>7.22</b>	<b>4.64</b>
<b>Valor corregido<sup>e</sup></b>			<b>8.71</b>	<b>3.42</b>	<b>5.83</b>	<b>15.64</b>	<b>6.57</b>	<b>4.22</b>
<b>Valor experimental<sup>f</sup></b>			<b>8.20</b>	<b>4.10</b>	<b>5.20</b>	<b>15.80</b>	<b>6.30</b>	<b>4.10</b>

<sup>a</sup> En kcal/mol. <sup>b</sup> En porcentaje de valores de  $\Delta G^\circ$  a 298 K y 1 atm. <sup>c</sup> En Hz calculadas a partir de las estructuras optimizadas a nivel B3LYP/DGDZVP. <sup>d</sup>  $\sum_i J^i \times P^i$ , donde  $J^i$  es el valor de la constante de acoplamiento para cada confórmero y  $P^i$  es la población para la *i*-ésima conformación. <sup>e</sup> factores de corrección utilizados:  $f_{H(sp^3)-H(sp^3)} = 0.910$ ;  $f_{H(sp^3)-H(sp^2)} = 0.929$  and  $f_{H(sp^3)-H(sp^3)} = 0.977$ . <sup>f</sup> Constante de acoplamiento obtenida por simulación espectral.

**Cuadro A10.** DFT B3LYP/DGDZVP energía libre,<sup>a</sup> población<sup>b</sup> y comparación entre las constantes de acoplamiento  $J^1\text{H}-^1\text{H}$ <sup>c</sup> calculadas por DFT y las experimentales del isómero 2a.

Confórmero	$\Delta G^a$	$P^b$	$J_{6,1'}$	$J_{1',2'}$	$J_{2',3'}$	$J_{3',4'}$	$J_{4',5'}$	$J_{5',6'}$
1	0.000	0.209	9.64	3.70	9.91	15.74	10.10	9.82
2	0.023	0.201	9.64	3.70	9.91	15.74	10.10	9.82
3	0.497	0.090	9.20	3.79	2.25	15.83	10.06	2.36
4	0.581	0.078	9.19	3.79	2.26	15.82	10.06	2.36
5	0.713	0.063	9.10	3.77	2.38	15.51	10.49	9.79
6	0.717	0.062	9.10	3.77	2.38	15.51	10.49	9.79
7	0.803	0.054	9.37	3.83	2.08	15.93	2.83	4.83
8	0.907	0.045	9.37	3.83	2.09	15.93	2.81	4.80
9	1.034	0.037	9.56	3.63	9.96	15.98	3.27	4.89
10	1.246	0.026	9.39	3.89	2.00	15.53	3.52	9.24
11	1.342	0.022	9.76	3.70	2.96	15.66	4.36	1.33
12	1.431	0.019	9.37	3.88	2.03	15.53	3.54	9.24
13	1.465	0.018	9.59	3.64	10.04	15.67	3.61	2.35
14	1.582	0.014	9.02	3.92	9.98	15.92	9.62	4.72
15	1.703	0.012	9.33	3.82	1.69	15.93	8.35	4.03
16	1.762	0.011	9.33	3.82	1.69	15.93	8.35	4.03
17	1.856	0.009	6.99	3.54	9.16	16.47	9.80	9.85
18	1.910	0.008	9.06	3.93	10.00	15.85	9.56	4.94
19	2.053	0.007	9.50	3.39	1.31	16.54	4.28	9.05
20	2.059	0.006	9.50	3.39	1.32	16.54	4.27	9.05
21	2.301	0.004	9.76	3.33	1.35	16.66	9.72	2.40
22	2.848	0.003	9.42	3.41	1.38	16.82	3.08	5.10
23	3.014	0.002	9.39	3.34	1.21	16.47	10.03	4.45
<b>Valor teórico<sup>d</sup></b>			<b>9.41</b>	<b>3.74</b>	<b>6.02</b>	<b>15.77</b>	<b>8.49</b>	<b>7.23</b>
<b>Valor corregido<sup>e</sup></b>			<b>8.56</b>	<b>3.40</b>	<b>5.59</b>	<b>15.41</b>	<b>7.73</b>	<b>6.58</b>
<b>Valor experimental<sup>f</sup></b>			<b>8.40</b>	<b>4.20</b>	<b>5.20</b>	<b>15.80</b>	<b>6.30</b>	<b>4.10</b>

<sup>a</sup> En kcal/mol. <sup>b</sup> En porcentaje de valores de  $\Delta G^\circ$  a 298 K y 1 atm. <sup>c</sup> En Hz calculadas a partir de las estructuras optimizadas a nivel B3LYP/DGDZVP. <sup>d</sup>  $\sum_i J^i \times P^i$ , donde  $J^i$  es el valor de la constante de acoplamiento para cada confórmero y  $P^i$  es la población para la *i*-ésima conformación. <sup>e</sup> factores de corrección utilizados:  $f_{\text{H(sp3)-H(sp3)}} = 0.910$ ;  $f_{\text{H(sp3)-H(sp2)}} = 0.929$  and  $f_{\text{H(sp3)-H(sp3)}} = 0.977$ . <sup>f</sup> Constante de acoplamiento obtenida por simulación espectral.

**Cuadro A11.** Valores obtenidos para la transición electrónica de más baja energía  $n \rightarrow \pi^*$  para el compuesto **4** utilizando DFT- B3LYP/DGDZVP.

Confórmero ( $P$ ) <sup>a</sup>	$\Delta E^b$	$\lambda_{\max}^c$	$f^d$	$R_{\text{velocity}}^e$	$R_{\text{length}}^f$
<b>4a</b> (28.2)	3.929	316	0.662	-1.26	-2.30
<b>4b</b> (23.8)	3.899	318	0.661	-136.87	-134.59
<b>4c</b> (16.8)	3.886	319	0.572	-4.55	-4.03
<b>4d</b> (9.1)	3.827	324	0.565	-88.65	-89.75
<b>4e</b> (5.0)	3.906	317	0.660	-108.73	-107.05
<b>4f</b> (4.7)	3.896	318	0.670	-127.95	-126.58
<b>4g</b> (2.9)	3.878	319	0.627	-115.31	-112.53
<b>4h</b> (2.3)	3.878	320	0.628	-115.34	-112.57
<b>4i</b> (1.7)	3.715	333	0.672	-40.35	-37.80
<b>4j</b> (1.6)	3.968	314	0.482	-51.98	-51.17
<b>4k</b> (0.7)	3.885	319	0.636	-100.01	-98.90
<b>4l</b> (0.5)	3.907	317	0.652	-117.10	-116.54
<b>4m</b> (0.5)	3.873	320	0.638	-134.12	-132.61
<b>4n</b> (0.4)	3.906	317	0.660	-113.77	-114.04
<b>4o</b> (0.3)	3.882	319	0.633	-135.31	-133.57
<b>4p</b> (0.3)	3.883	319	0.633	-135.28	-133.56

<sup>a</sup> Población conformacional dada entre paréntesis. <sup>b</sup> Energía de excitación en eV. <sup>c</sup> Longitud de onda en nm. <sup>d</sup> Oscilador de fuerza. <sup>e</sup> fuerza rotatoria en velocidad ( $\times 10^{-40}$  erg·esu·cm·Gauss<sup>-1</sup>). <sup>f</sup> Fuerza rotatoria longitudinal ( $\times 10^{-40}$  erg·esu·cm·Gauss<sup>-1</sup>)



**Cuadro A12.** Valores obtenidos para la transición electrónica de más baja energía  $n \rightarrow \pi^*$  para el compuesto **5** utilizando DFT- B3LYP/DGDZVP.

Confórmero ( $P$ ) <sup>a</sup>	$\Delta E$ <sup>b</sup>	$\lambda_{\max}$ <sup>c</sup>	$f^d$	$R_{\text{velocity}}$ <sup>e</sup>	$R_{\text{length}}$ <sup>f</sup>
<b>5a</b> (28.2)	30.8	313	0.879	78.109	77.310
<b>5b</b> (23.8)	27.4	313	0.855	42.437	43.420
<b>5c</b> (16.8)	8.6	313	0.856	42.428	43.418
<b>5d</b> (9.1)	7.3	310	0.905	66.734	67.068
<b>5e</b> (5.0)	6.7	315	0.526	61.039	60.848
<b>5f</b> (4.7)	5.6	309	0.833	84.459	84.489
<b>5g</b> (2.9)	3.8	309	0.842	70.230	70.055
<b>5h</b> (2.3)	2.3	310	0.768	0.0971	0.0391
<b>5i</b> (1.7)	2.3	307	0.909	0.0082	0.0081
<b>5j</b> (1.6)	1.8	309	0.812	50.319	50.517
<b>5k</b> (0.7)	0.9	309	0.811	49.997	50.184
<b>5l</b> (0.5)	0.6	316	0.697	58.935	52.860
<b>5m</b> (0.5)	0.6	312	0.752	7.889	13.569
<b>5n</b> (0.4)	0.5	313	0.709	109.483	109.872
<b>5o</b> (0.3)	0.4	306	0.855	62.258	62.762
<b>5p</b> (0.3)	0.4	316	0.788	-25.272	-21.834

<sup>a</sup> Población conformacional dada entre paréntesis. <sup>b</sup> Energía de excitación en eV. <sup>c</sup> Longitud de onda en nm. <sup>d</sup> Oscilador de fuerza. <sup>e</sup> fuerza rotatoria en velocidad ( $\times 10^{-40}$  erg·esu·cm·Gauss<sup>-1</sup>). <sup>f</sup> Fuerza rotatoria longitudinal ( $\times 10^{-40}$  erg·esu·cm·Gauss<sup>-1</sup>)

**Cuadro A13.** Valores obtenidos para la transición electrónica de más baja energía  $n \rightarrow \pi^*$  para el epímero hipotético en C6'(R) de **4** utilizando DFT- B3LYP/DGDZVP.

Confórmero ( $P$ ) <sup>a</sup>	$\Delta E$ <sup>b</sup>	$\lambda_{\max}$ <sup>c</sup>	$f^d$	$R_{\text{velocity}}$ <sup>e</sup>	$R_{\text{length}}$ <sup>f</sup>
<b>C<sub>6</sub>R-4a</b> (38.9)	3.774	316	0.678	82.149	79.606
<b>C<sub>6</sub>R-4b</b> (29.7)	3.774	328	0.565	128.064	127.541
<b>C<sub>6</sub>R-4c</b> (11.5)	3.942	314	0.653	60.003	57.201
<b>C<sub>6</sub>R-4d</b> (8.1)	3.859	321	0.561	123.144	119.619
<b>C<sub>6</sub>R-4e</b> (3.7)	3.919	316	0.689	55.1403	55.8165
<b>C<sub>6</sub>R-4f</b> (2.7)	3.966	312	0.732	42.268	42.7675
<b>C<sub>6</sub>R-4g</b> (1.1)	3.928	315	0.651	59.059	58.336
<b>C<sub>6</sub>R-4h</b> (1.1)	4.001	309	0.449	63.112	53.493
<b>C<sub>6</sub>R-4i</b> (1.0)	3.916	316	0.624	72.382	72.166
<b>C<sub>6</sub>R-4j</b> (0.9)	3.926	315	0.651	62.226	59.673
<b>C<sub>6</sub>R-4k</b> (0.7)	3.948	314	0.640	83.312	82.725
<b>C<sub>6</sub>R-4l</b> (0.3)	3.924	317	0.656	49.408	46.804
<b>C<sub>6</sub>R-4m</b> (0.2)	3.970	312	0.748	29.972	30.872
<b>C<sub>6</sub>R-4n</b> (0.1)	3.947	314	0.652	52.967	50.741

<sup>a</sup> Población conformacional dada entre paréntesis. <sup>b</sup> Energía de excitación en eV. <sup>c</sup> Longitud de onda en nm. <sup>d</sup> Oscilador de fuerza. <sup>e</sup> fuerza rotatoria en velocidad ( $\times 10^{-40}$  erg·esu·cm·Gauss<sup>-1</sup>). <sup>f</sup> Fuerza rotatoria longitudinal ( $\times 10^{-40}$  erg·esu·cm·Gauss<sup>-1</sup>)

**Cuadro A14.** Valores obtenidos para la transición electrónica de más baja energía  $n \rightarrow \pi^*$  para el epímero hipotético en C6'(R) de **5** utilizando DFT- B3LYP/DGDZVP.

Confórmero ( <i>P</i> ) <sup>a</sup>	$\Delta E^b$	$\lambda_{\max}^c$	$f^d$	$R_{\text{velocity}}^e$	$R_{\text{length}}^f$
<b>C<sub>6</sub>R-5a</b> (38.7)	4.096	303	0.875	0.148	0.161
<b>C<sub>6</sub>R-5b</b> (32.7)	4.0152	308	0.861	-47.910	-46.463
<b>C<sub>6</sub>R-5c</b> (18.1)	4.0755	304	0.852	-26.564	-27.026
<b>C<sub>6</sub>R-5d</b> (4.8)	4.008	309	0.833	-84.494	-84.526
<b>C<sub>6</sub>R-5e</b> (1.7)	3.968	312	0.0002	0.004	0.004
<b>C<sub>6</sub>R-5f</b> (1.3)	3.952	313	0.713	42.217	37.547
<b>C<sub>6</sub>R-5g</b> (1.0)	4.029	307	0.853	-60.848	-60.077
<b>C<sub>6</sub>R-5h</b> (0.6)	3.999	309	0.750	-76.783	-75.909
<b>C<sub>6</sub>R-5i</b> (1.0)	4.075	304	0.843	-39.118	-40.678
<b>C<sub>6</sub>R-5j</b> (0.2)	4.017	308	0.843	-38.965	-40.414
<b>C<sub>6</sub>R-5k</b> (0.2)	4.035	307	0.801	-13.798	-16.473
<b>C<sub>6</sub>R-5l</b> (0.17)	4.029	307	0.853	-60.848	-60.077
<b>C<sub>6</sub>R-5m</b> (0.1)	4.054	305	0.878	-30.916	-32.445
<b>C<sub>6</sub>R-5n</b> (0.08)	4.000	309	0.697	-53.549	-58.929
<b>C<sub>6</sub>R-5o</b> (0.01)	3.980	311	0.710	-40.148	-40.179

<sup>a</sup> Población conformacional dada entre paréntesis. <sup>b</sup> Energía de excitación en eV. <sup>c</sup> Longitud de onda en nm. <sup>d</sup> Oscilador de fuerza. <sup>e</sup> fuerza rotatoria en velocidad ( $\times 10^{-40}$  erg·esu·cm·Gauss<sup>-1</sup>). <sup>f</sup> Fuerza rotatoria longitudinal ( $\times 10^{-40}$  erg·esu·cm·Gauss<sup>-1</sup>)

# Absolute Configuration and Conformational Analysis of Brevipolides, Bioactive 5,6-Dihydro- $\alpha$ -pyrones from *Hyptis brevipes*

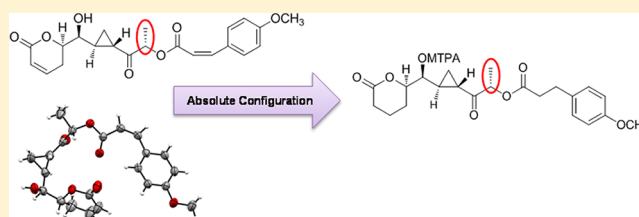
G. Alejandra Suárez-Ortiz,<sup>†</sup> Carlos M. Cerda-García-Rojas,<sup>‡</sup> Adriana Hernández-Rojas,<sup>†</sup> and Rogelio Pereda-Miranda<sup>\*†</sup>

<sup>†</sup>Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior Ciudad Universitaria, México City, D. F. 04510 México

<sup>‡</sup>Departamento de Química y Programa de Posgrado en Farmacología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, A.P. 14-470, México City, D. F. 07000 México

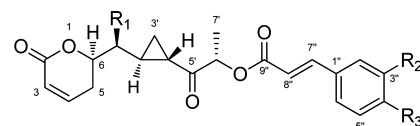
## Supporting Information

**ABSTRACT:** The (6'S)-configuration of brevipolides A–J (1–10), isolated from *Hyptis brevipes*, was established by X-ray diffraction analysis of 9 in conjunction with Mosher's ester analysis of the tetrahydro derivative 11 obtained from both geometric isomers 8 and 9 as well as by chemical correlations. The structure of the new brevipolide J (10) was characterized through NMR and MS data as having the same 6-heptyl-5,6-dihydro-2H-pyran-2-one framework possessing the cyclopropane moiety of all brevipolides but substituted by an isoferuloyl group instead of the *p*-methoxycinnamoyl moiety found in 8 and 9. Conformational analysis of these cytotoxic 6-heptyl-5,6-dihydro- $\alpha$ -pyrones was carried out on compound 9 by application of a protocol based on comparison between experimental and DFT-calculated vicinal <sup>1</sup>H–<sup>1</sup>H NMR coupling constants. Molecular modeling was used to correlate minimum energy conformers and observed electronic circular dichroism transitions for the isomeric series of brevipolides. Compounds 7–10 exhibited moderate activity (ED<sub>50</sub> 0.3–8.0  $\mu$ g/mL) against a variety of tumor cell lines.

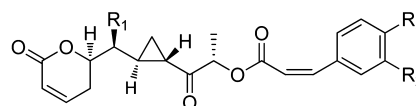


$\alpha,\beta$ -Unsaturated  $\delta$ -lactones, well-known Michael acceptors, constitute the pharmacophoric group of a broad range of natural products.<sup>1</sup> Many of these compounds display pharmacologically relevant properties, e.g., antimicrobial, cytotoxic, and antitumoral activities.<sup>2,3</sup> These bioactive products, occurring in several members of the mint family (Lamiaceae)<sup>4–6</sup> (Figure S1, Supporting Information), comprise polyacylated-6-heptyl-5,6-dihydro-2H-pyran-2-ones particularly abundant in the genus *Hyptis*.<sup>3,7,8</sup> They are structurally related to pironetin (Figure S2, Supporting Information), an anticancer acetogenin of microbial origin that selectively targets Lys-352 of  $\alpha$ -tubulin.<sup>9</sup>

Recently, six cytotoxic compounds, brevipolides A–F (1–6, Figure 1), all of which share a 6-heptyl-5,6-dihydro-2H-pyran-2-one framework bearing a cyclopropane moiety, were isolated from *Hyptis brevipes* collected in Indonesia.<sup>10</sup> These products were structurally related to the skeletal class first characterized in compound 7 and related compounds 8 and 9 from *Lippia alva* (Verbenaceae), which were identified as inhibitors of the chemokine receptor CCR5 (the principal human immunodeficiency virus type 1 co-receptor).<sup>11</sup> Compound 7 was also found to be active in an enzyme-based ELISA NF- $\kappa$ B assay.<sup>10</sup> However, the absolute configuration at C-6' was not established for any of these 6-heptyl-5,6-dihydro-2H-pyran-2-ones. This situation prompted us to undertake a study directed to the assignment of the absolute configuration and conformational analysis of compound 9, as a representative model for all



- |    |                      |                     |                      |
|----|----------------------|---------------------|----------------------|
| 1  | R <sub>1</sub> = OAc | R <sub>2</sub> = H  | R <sub>3</sub> = OH  |
| 2  | R <sub>1</sub> = OH  | R <sub>2</sub> = OH | R <sub>3</sub> = OH  |
| 3  | R <sub>1</sub> = OAc | R <sub>2</sub> = OH | R <sub>3</sub> = OH  |
| 7  | R <sub>1</sub> = OH  | R <sub>2</sub> = H  | R <sub>3</sub> = OH  |
| 8  | R <sub>1</sub> = OH  | R <sub>2</sub> = H  | R <sub>3</sub> = OMe |
| 10 | R <sub>1</sub> = OH  | R <sub>2</sub> = OH | R <sub>3</sub> = OMe |



- |   |                      |                     |                      |
|---|----------------------|---------------------|----------------------|
| 4 | R <sub>1</sub> = OAc | R <sub>2</sub> = H  | R <sub>3</sub> = OH  |
| 5 | R <sub>1</sub> = OH  | R <sub>2</sub> = OH | R <sub>3</sub> = OH  |
| 6 | R <sub>1</sub> = OAc | R <sub>2</sub> = H  | R <sub>3</sub> = OH  |
| 9 | R <sub>1</sub> = OH  | R <sub>2</sub> = H  | R <sub>3</sub> = OMe |

Figure 1. Brevipolides from *Hyptis brevipes*.

related brevipolides, in order to obtain an accurate description of their three-dimensional properties by applying a protocol

Received: October 26, 2012

Published: January 2, 2013

based on the systematic comparison between DFT theoretical and experimental vicinal  $^1\text{H}$  NMR coupling constants.<sup>12,13</sup>

In the present investigation, compounds 7–9 and the new natural product 10 were isolated from a Mexican collection of *H. brevipes* and given the trivial names of brevipolides G–J, respectively. A combination of X-ray diffraction analysis, chiroptical measurements, chemical correlations, and Mosher ester derivatization was used to confirm the absolute configuration of these compounds.

## RESULTS AND DISCUSSION

Aerial parts of *H. brevipes* were powdered and extracted with  $\text{CHCl}_3$ . The extract was fractionated by column chromatography on silica. The fractions containing 5,6-dihydro-2*H*-pyran-2-ones were purified by preparative reversed-phase HPLC through application of the recycling technique.<sup>14</sup> This procedure afforded 7–10, which displayed moderate cytotoxicity against nasopharyngeal cancer cells (KB) with  $\text{IC}_{50}$  values of 0.3–2.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Table S7, Supporting Information).

Compound 7 showed a quasi-molecular ion at  $m/z$  387.1455  $[\text{M} + \text{H}]^+$  by HRFABMS in the positive mode, consistent with the molecular formula  $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_7$ . The molecular formula of compound 8 was established as  $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{O}_7$  by HRFABMS with a quasi-molecular ion peak  $[\text{M} + \text{H}]^+$  at  $m/z$  401.1595. Compound 9 showed the same ion, thus indicating that 8 and 9 are structural isomers. Methylation of the phenolic group of 7 with diazomethane afforded a product that was identical to compound 8.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR chemical shifts for 7–9 are listed in Table S1 (Supporting Information). All values were identical to those reported for the compounds isolated from *Lippia alva*.<sup>11</sup>

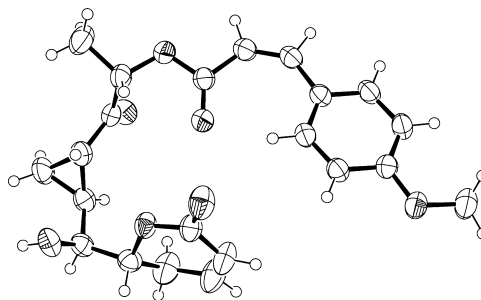
The molecular formula of the new natural product 10 was established as  $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{O}_8$  by HRFABMS, showing a quasi-molecular  $[\text{M} + \text{H}]^+$  ion peak at  $m/z$  416.1467. Compound 10 exhibited the characteristic  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR signals (Table 1; Figures S9 and S10, Supporting Information) for the 6-heptyl-5,6-dihydro-2*H*-pyran-2-one framework. The  $\alpha,\beta$ -unsaturated  $\delta$ -lactone system was identified through the characteristic resonance for the C-2 carbonyl group ( $\delta$  164.0) and the C-3 and C-4 vinylic protons at  $\delta$  6.02 and 6.98, respectively, as part of an  $\text{AMX}_2$  spin-system with the C-5 methylene group ( $\delta$  23.4), which is also coupled to  $\text{H}_6$  resonating at  $\delta$  4.52. The coupling constants between the methylene protons at C-5 and  $\text{H}_6$  ( $J_{\text{sax-6}} = 12.3$ ;  $J_{\text{seq-6}} = 3.8$ ) indicated the pseudoequatorial orientation of the side chain.<sup>4,7</sup> The heptyl side chain was identified through the C-7' terminal methyl group ( $\delta$  1.60) as part of an  $\text{AX}_3$  spin-system with the downshifted methine signal at C-6' ( $\delta$  5.30), corroborating the substitution of this stereogenic center by an ester group. The observed  $^3J_{\text{CH}}$  correlation of the terminal methyl group with the carbonyl carbon at  $\delta$  206.7 permitted placement of the carbonyl group at C-5'. The multiplicities of the signals in the upfield region at  $\delta$  2.28 (H-4'), 1.60 (H-2'), 1.34 (H-3'<sub>proS</sub>), and 1.12 (H-3'<sub>proR</sub>) were attributed to the presence of a cyclopropane ring.  $^{2,3}J_{\text{CH}}$  correlations from H-6 to H-1' ( $\delta$  3.70) and H-2' indicated that the lactone and cyclopropane moieties were connected through a secondary hydroxy group at C-1' ( $\delta$  71.8). The characteristic signals for an isoferuloyl group, as the C-6' substituent, were also observed (Table 1).

X-ray diffraction analysis was undertaken to establish the relative configuration of 9 (Figure 2). The crystal parameters and X-ray coordinates are included in Tables S2–S6 (Supporting Information). Because of the bent U-shaped

**Table 1.**  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR Chemical Shifts and Coupling Constants for 10<sup>a</sup>

position	$\delta_{\text{H}}$ ( $J$ in Hz)	$\delta_{\text{C}}$
2		164.0
3	6.02 ddd (9.7, 2.2, 0.9)	120.8
4	6.98 ddd (9.7, 6.4, 2.2)	146.1
$S_{\text{ax}}$	2.70 dddd (18.5, 12.3, 2.2, 2.2)	23.4
$S_{\text{eq}}$	2.52 dddd (18.5, 6.4, 3.8, 0.9)	
6	4.52 ddd (12.3, 3.8, 3.8)	80.7
1'	3.70 dd (6.3, 3.8)	71.8
2'	1.60 dddd (8.9, 6.3, 6.3, 3.4)	26.6
3' <sub>proR</sub>	1.12 ddd (8.9, 6.3, 4.0)	14.5
3' <sub>proS</sub>	1.34 ddd (8.5, 4.0, 3.9)	
4'	2.28 ddd (8.5, 3.9, 3.4)	21.5
5'		206.7
6'	5.30 q (7.0)	75.2
7'	1.60 d (7.0)	16.1
1''		127.7
2''	7.13 d (1.9)	113.2
3''		145.9
4''		148.9
5''	6.84 d (8.3)	110.6
6''	7.03 dd (8.3, 1.9)	122.1
7''	7.64 d (15.9)	146.1
8''	6.34 d (15.9)	114.9
9''		166.7
OMe	3.92 s	56.0

<sup>a</sup>NMR spectra were acquired in  $\text{CDCl}_3$  at 25 °C. Chemical shifts ( $\delta$ ) are in ppm relative to TMS. The spin coupling ( $J$ ) is given in parentheses (Hz) and was obtained by nonlinear fit of the experimental  $^1\text{H}$  NMR spectrum to the simulated spectrum generated by iteration of spectral parameters ( $^1\text{H}$  chemical shifts,  $J$ -couplings, and line width).



**Figure 2.** X-ray ORTEP drawing of brevipolide I (9).

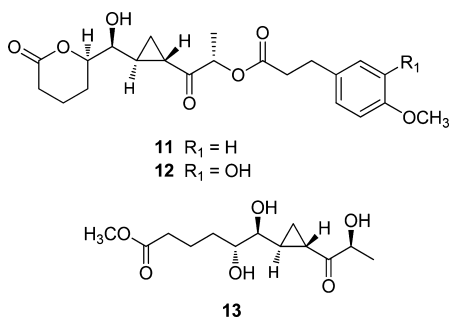
geometry adopted by this brevipolide, intermolecular hydrogen bonds (2.06 Å) between the oxygen of the lactone group and the hydroxy moiety at C-1' were observed in the crystal packing (Figure S24, Supporting Information). To ascertain the absolute configuration of compounds 8 and 9, catalytic hydrogenation using Pd/C was carried out to reduced both double bonds, yielding a convergent tetrahydro derivative (11), followed by application of the Mosher's ester protocol<sup>15</sup> involving its free C-1' hydroxy group. The hydrogenation product derived from either 8 or 9 displayed identical physical data and  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra (Figures S16 and S17, Supporting Information), enabling us to assume that the absolute configurations for all stereogenic centers of both compounds were the same. The tetrahydro derivative 12 was similarly prepared from 10. The chemical shift difference values (Table 2) obtained by comparing the relevant  $^1\text{H}$  NMR data of

**Table 2.**  $^1\text{H}$  NMR Chemical Shift Data for Diagnostic Signals from the (*S*)- and (*R*)-Ester Derivatives of Hydrogenated Derivative 11

MTPA-ester	H-5ax	$\Delta\delta_{\text{H}}$	H-5eq	$\Delta\delta_{\text{H}}$	proton chemical shifts ( $\Delta\delta_{\text{H}} = \delta_{\text{S}} - \delta_{\text{R}}$ ) <sup>a</sup>						C-1' config		
					H-6	$\Delta\delta_{\text{H}}$	H-2'	$\Delta\delta_{\text{H}}$	H-3' <sub>proR</sub>	$\Delta\delta_{\text{H}}$		H-3' <sub>proS</sub>	$\Delta\delta_{\text{H}}$
S	1.60		2.19		4.46		1.57		0.80		1.10		S
R	1.48	+0.12	2.00	+0.19	4.37	+0.09	1.68	-0.11	0.90	-0.10	1.13	-0.03	

<sup>a</sup>Data registered in  $\text{CDCl}_3$  at 300 MHz.

the *R*- and *S*-MTPA esters (Figure S22, Supporting Information) of compound **11** indicated the absolute configuration of C-1' to be *S*. Therefore, the absolute configuration for C-6, C-1', C-2', C-4', and particularly the previously unassigned C-6'<sup>10,11</sup> was confirmed as 6*R*, 1'*S*, 2'*S*, 4'*S*, and 6'*S* according to the relative configuration obtained from X-ray diffraction analysis of **9** (Figure 2). Additionally, in order to validate that all stereogenic centers at the 6-heptyl-5,6-dihydro-2*H*-pyran-2-one core of brevipolides were identical, saponification of compounds **11** and **12** was conducted, providing the same optically active functionalized dodecanoic acid methyl ester **13**.



Chiroptical measurements of **7–10** were undertaken to explore the electronic circular dichroism (ECD) spectra of the brevipolide series. A positive  $n \rightarrow \pi^*$  Cotton effect for the  $\alpha,\beta$ -unsaturated  $\delta$ -lactone was observed for the four compounds centered at  $\lambda_{\text{max}}$  259–264 nm, confirming that the stereogenic center at C-6 is *R* (Figure S23, Supporting Information), as it has been described in all 6-substituted 5,6-dihydro- $\alpha$ -pyrones from the mint family.<sup>4</sup> ECD for the chiral *trans*-cinnamoyl derivatives **7**, **8**, and **10** exhibited a positive Cotton effect centered around 300 nm, in contrast with the *cis*-compound **9**, which showed a negative Cotton effect at 319 nm ( $\Delta\epsilon = -1.3$ ). It is important to note that this effect was not previously reported<sup>10,11</sup> because of the fact that brevipolides were isolated as mixtures in different degrees of both geometric isomers where the positive Cotton effect for the *trans*-isomer overlapped the negative one for the *cis*-compound.

A molecular model for compound **9** was generated to correlate the 3D structure with its spectroscopic and chiroptical properties. The starting geometry was modeled by taking into account the configuration and conformation of the 6-heptyl-5,6-dihydro-2*H*-pyran-2-one framework from the X-ray diffraction data (Figure 2). A systematic search afforded 108 conformers even though several conformational arrangements were discarded because of the presence of hindering steric effects, partial atomic overlapping, or a high MMFF<sup>16</sup> energy. The 64 contributing conformers were geometrically optimized at the B3LYP/DGDZVP level.<sup>17</sup> Table S2 lists the relative free energies as well as the Boltzmann distribution for the most relevant conformers within a  $\Delta G^\circ$  range of between 0 and 3.3

kcal  $\text{mol}^{-1}$ , offering evidence for the flexibility of this molecule.<sup>12,13</sup> The magnetic shielding tensors were calculated with the gauge-including atomic orbital method, followed by theoretical calculation of the NMR spin–spin coupling constants at the B3LYP/DGDZVP level. These values were Boltzmann-averaged to yield DFT-calculated coupling constants according to protocols previously described.<sup>12,13</sup> The theoretical values showed good correlation with the experimentally registered  $J_{\text{H–H}}$  for **9** (Table 3), reflecting the conformational behavior of the brevipolide core in solution. The solid-state conformation (Figure 2) is different from all the minimum energy conformers (Figure 3), perhaps as a result of the replacement of the intermolecular hydrogen bonding (Figure S24, Supporting Information) with a  $\text{C}_1\text{–O}_1\cdots\text{H–O}_1\text{–C}_1$  intramolecular bond. The release of the crystal-packing constraints promotes the presence of multiple conformational arrangements that fulfill the entropic requirements for this flexible system as predicted by DFT modeling (Table 3). Also, the most relevant conformers **9a–9f**, accounting for 88% of the conformational population, were useful to rationalize the observed NOESY correlations as shown in Figure 3. The global minimum **9a** is responsible for the observed correlations between  $\text{H}_6\text{–H}_{1'}$ ,  $\text{H}_{1'}\text{–H}_{3'\text{proR}}$ , and  $\text{H}_4\text{–H}_{6'}$ , while the second minimum **9b** produces the complementary interactions between  $\text{H}_{5\text{seq}}\text{–H}_{2'}$  and  $\text{H}_{1'}\text{–H}_4$ . The subsequent conformers also contribute to enhance the above-mentioned effects. The NMR features are consistent along the brevipolide series, indicating that the conformational behavior in solution for the 6-heptyl-5,6-dihydro-2*H*-pyran-2-one core in compounds **1–10** is essentially the same, e.g.,  $^3J_{\text{HH}}$  (Table S1, Supporting Information) and observed NOEs for the new compound **10** (Figure S15, Supporting Information).

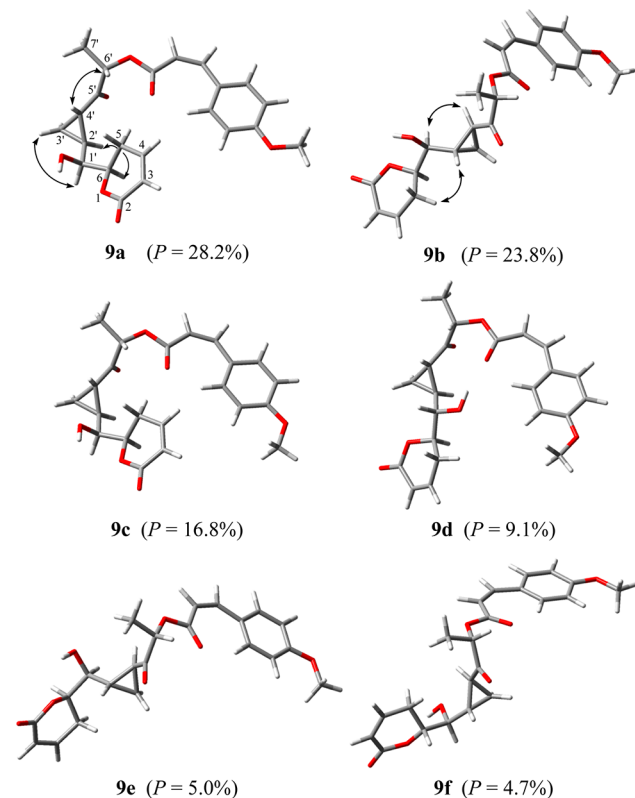
The molecular models for the most stable conformers of **9** (Figure 3) were also useful to provide validation for the observed lowest energy negative Cotton effect in the ECD spectra of *cis*-isomer **9**. TDDFT calculations<sup>18</sup> were carried out to corroborate the sign for the  $n \rightarrow \pi^*$  transition corresponding to the chirally substituted 4-methoxy-*cis*-cinnamoyl moiety.<sup>19</sup> Negative values for the main conformers **9a–9f** were obtained ranging from  $\lambda = 316$  to 324 nm with  $R_{\text{velocity}}$  between  $-1.3$  and  $-136.9 \times 10^{-40}$  erg-esu-cm-Gauss<sup>-1</sup> (Table 4), in agreement with the experimental value (Figure S23, Supporting Information). Additionally, the same theoretical protocol was applied to calculate the  $n \rightarrow \pi^*$  transitions for the hypothetical  $\text{C}_6\text{--}(\text{R})$ -epimer of brevipolide I. The main conformers of this structure ( $\text{C}_6\text{--R-9a}$  to  $\text{C}_6\text{--R-9a}$ ) showed positive values for the lowest energy transition, within the range from  $\lambda = 313$  to 328 nm with  $R_{\text{velocity}}$  between  $42.3$  and  $128.1 \times 10^{-40}$  erg-esu-cm-Gauss<sup>-1</sup> (Table 4).

In conclusion, the present investigation exemplified a protocol for stereochemical analysis by application of a combined theoretical and experimental methodology.<sup>13</sup> The absolute configuration and conformation of the brevipolide

**Table 3.** DFT B3LYP/DGDZVP Relative Free Energies,<sup>a</sup> Population,<sup>b</sup> and Comparison between DFT and Experimental <sup>1</sup>H–<sup>1</sup>H Coupling Constants<sup>c</sup> for the 20 Lowest Energy Conformers of Brevipolide I (9)

conformer	$\Delta G^a$	$P^b$	$J_{3-4}$	$J_{4-5eq}$	$J_{4-5ax}$	$J_{5eq-6}$	$J_{5ax-6}$	$J_{6-1'}$	$J_{1'-2'}$	$J_{2'-3'proS}$	$J_{2'-3'proR}$	$J_{2'-4'}$	$J_{3'proS-4'}$	$J_{3'proR-4'}$
9a	0.000	28.2	9.75	7.16	2.41	3.94	12.82	2.54	1.20	9.70	6.26	3.19	3.92	8.23
9b	0.100	23.8	9.81	6.95	2.34	3.98	12.62	2.74	10.38	9.02	6.61	2.91	3.99	8.81
9c	0.307	16.8	9.74	7.14	2.42	4.00	12.81	2.47	10.27	9.71	6.07	3.19	3.93	8.20
9d	0.671	9.1	9.80	6.85	2.27	3.67	12.35	8.65	9.36	9.68	6.08	2.68	4.71	7.67
9e	1.029	5.0	9.81	6.73	2.31	3.56	13.65	8.04	1.12	8.88	6.28	3.23	3.55	8.73
9f	1.060	4.7	9.79	6.97	2.36	4.01	12.72	2.63	9.24	9.59	6.02	3.81	3.43	9.77
9g	1.349	2.9	9.79	6.97	2.36	4.01	12.72	2.66	8.99	9.59	6.04	3.86	3.43	9.87
9h	1.474	2.3	9.79	6.83	2.26	3.69	12.36	8.60	9.55	9.54	5.74	3.10	3.66	9.41
9i	1.669	1.7	9.73	6.71	2.29	3.55	14.05	2.45	9.81	8.99	5.54	3.17	5.21	7.34
9j	1.682	1.6	9.81	6.96	2.35	3.97	12.61	2.63	10.53	8.98	5.52	2.70	3.87	8.12
9k	2.184	0.7	9.82	6.82	2.30	3.39	13.75	2.94	1.63	9.51	5.90	3.94	3.58	9.57
9l	2.334	0.5	9.80	6.81	2.26	3.82	12.38	8.78	2.19	9.53	6.21	3.75	3.96	8.90
9m	2.391	0.5	9.78	6.88	2.36	3.90	12.73	1.44	10.81	9.10	5.84	3.06	3.46	9.15
9n	2.397	0.5	9.80	6.81	2.26	3.83	12.38	8.76	2.20	9.54	6.22	3.74	3.98	8.87
9o	2.566	0.4	9.80	6.82	2.26	3.78	12.40	8.74	2.35	9.52	6.18	3.66	4.13	8.70
9p	2.610	0.3	9.81	6.82	2.27	3.82	12.39	8.75	2.40	9.50	6.17	3.68	4.10	8.73
9q	2.679	0.3	9.82	6.79	2.30	3.46	13.78	2.89	1.52	9.51	5.90	3.86	3.60	9.49
9r	2.698	0.3	9.81	6.81	2.26	3.88	12.39	8.77	2.02	9.56	6.23	3.70	3.97	8.86
9s	2.905	0.2	9.82	7.00	2.45	3.16	13.87	3.89	2.90	9.55	5.60	3.25	4.46	7.76
9t	3.545	0.1	9.73	6.92	2.30	3.59	12.96	1.21	11.18	9.12	5.18	3.34	3.80	9.44
	weighted values <sup>c,d</sup>		9.78	7.01	2.36	3.90	12.77	3.68	6.83	9.45	6.23	3.13	3.97	8.50
	experimental values <sup>e</sup>		9.70	6.50	2.20	3.80	12.30	3.80	6.30	8.90	6.00	3.40	3.90	8.10

<sup>a</sup>In kcal/mol. <sup>b</sup>In percent from  $\Delta G^\circ$  values at 298 K and 1 atm,  $G_{\text{global}} = -1379.11433$  kcal/mol. <sup>c</sup>In Hz calculated from the B3LYP/DGDZVP structures. <sup>d</sup> $\sum_i J_i \times P_i$ , where  $J_i$  is the coupling constant value for each conformer and  $P_i$  is the population for the  $i$ th conformation. <sup>e</sup>Couplings obtained by spectral simulation.



**Figure 3.** The most relevant conformers of brevipolide I (9) accounting for 88% of the conformational population. NOESY correlations are indicated with arrows in the global minimum (9a) and the second lowest energy minimum (9b).

**Table 4.** Calculated Energy, Wavelength, and Oscillator and Rotatory Strengths for the Lowest Energy  $n \rightarrow \pi^*$  Transition of Brevipolide I (9) and Its Hypothetical  $C_6'$ -(R)-Epimer at the B3LYP/DGDZVP Level of Theory

conformer ( $P$ ) <sup>a</sup>	$\Delta E^b$	$\lambda_{\text{max}}^c$	$f^d$	$R_{\text{velocity}}^e$	$R_{\text{length}}^f$
9a (28.2)	3.929	316	0.662	-1.26	-2.30
9b (23.8)	3.899	318	0.661	-136.87	-134.59
9c (16.8)	3.886	319	0.572	-4.55	-4.03
9d (9.1)	3.827	324	0.565	-88.65	-89.75
9e (5.0)	3.906	317	0.660	-108.73	-107.05
9f (4.7)	3.896	318	0.670	-127.95	-126.58
$C_6'$ -R-9a (39.2)	3.915	317	0.692	82.15	79.61
$C_6'$ -R-9b (29.5)	3.774	328	0.577	128.06	127.54
$C_6'$ -R-9c (11.5)	3.942	315	0.667	60.00	57.20
$C_6'$ -R-9d (8.0)	3.859	321	0.573	123.14	119.62
$C_6'$ -R-9e (3.6)	3.920	316	0.696	55.14	55.82
$C_6'$ -R-9f (2.7)	3.966	313	0.748	42.27	42.77

<sup>a</sup>Conformational population in percentage is given in parentheses. <sup>b</sup>Excitation energy in eV. <sup>c</sup>Wavelength in nm. <sup>d</sup>Oscillator strength. <sup>e</sup>Rotatory strength in velocity form ( $\times 10^{-40}$  erg-esu-cm-Gauss<sup>-1</sup>). <sup>f</sup>Rotatory strength in length form ( $\times 10^{-40}$  erg-esu-cm-Gauss<sup>-1</sup>).

series were established by the systematic comparison between theoretical and experimental vicinal <sup>1</sup>H NMR coupling constants and DFT ECD calculations. These results provided support for the (6'S)-configuration in this class of bioactive compounds from the mint family.

## EXPERIMENTAL SECTION

**General Experimental Procedures.** Melting points were determined on a Fisher-Johns apparatus and are uncorrected. Optical

rotations were measured with a Perkin-Elmer model 341 polarimeter.  $^1\text{H}$  (400 and 300 MHz) and  $^{13}\text{C}$  (100 and 75 MHz) NMR experiments were registered on a Varian Inova instrument. Positive-ion HRFABMS were recorded using a matrix of 3-nitrobenzyl alcohol on a Thermo DFS spectrometer. Analytical and semipreparative HPLC analysis were carried out on Waters equipment (Millipore Corp., Waters Chromatography Division, Milford, MA, USA), which was composed of a 600E multisolvent delivery system equipped with a 996 photodiode array detector. Empower 2 software was used to control equipment and for data acquisition, processing, and management of the chromatographic information.

**Plant Material.** Aerial parts of *Hyptis brevipes* were collected in Dos Ríos, Municipio de Emiliano Zapata, Veracruz, Mexico, in November 2009. The plant material was identified by A.H.-R., and a voucher specimen has been deposited in the herbarium of the Instituto de Ecología, Xalapa, Veracruz, Mexico (accession number XAL000247). Also, a voucher specimen was archived at the Botanical Collection of Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México (voucher 127321).

**Extraction and Isolation.** Aerial parts (2 kg) were powdered and extracted exhaustively by maceration at room temperature with  $\text{CHCl}_3$  to afford, after removal of the solvent, a dark brown syrup (50 g). The extract (50 g) was fractionated by open column chromatography over silica gel (1 kg), using a gradient of hexanes– $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , followed by  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ –acetone and acetone–MeOH in several proportions. Altogether, 100 eluates (300 mL each one) were collected and combined in 20 fractions. Fraction 12 (2.3 g, eluted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ –acetone, 4:1) was fractionated by passage on silica gel (230–400 mesh) and using a gradient of increasing polarity of hexanes–EtOAc, EtOAc–acetone, and acetone–MeOH. A total of 10 pooled subfractions were collected. Subfraction VII (200 mg, eluted with EtOAc–acetone, 9:1) was resolved by HPLC on a Symmetry  $\text{C}_{18}$  column (Waters; 7  $\mu\text{m}$ , 19  $\times$  300 mm) with an isocratic elution of MeCN– $\text{H}_2\text{O}$  (2:3) and a flow rate of 7.5 mL/min (sample injection, 500  $\mu\text{L}$ ; concentration, 0.1 mg/ $\mu\text{L}$ ). Eluates across the peaks with  $t_{\text{R}}$  values of 37.60 min (peak I) and 40.37 min (peak II) were collected by the technique of heart cutting and independently reinjected in the apparatus operating in the recycle mode to achieve total homogeneity after 5–10 consecutive cycles and employing the same reversed-phase column and the instrumental conditions as described above. These techniques afforded pure compounds **8** (30 mg) from peak I and **9** (15 mg) from peak II. Compound **9** was recrystallized from hexanes– $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (4:1).

Fraction 15 (9.0 g, eluted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ –acetone, 7:3) was submitted to column chromatography on silica gel (230–400 mesh) using a gradient of increasing polarity of hexanes–EtOAc, EtOAc–acetone, and acetone–MeOH. In total, eight pooled subfractions were collected. Subfraction VI (100 mg, eluted with EtOAc–acetone) was resolved by HPLC on a Symmetry  $\text{C}_{18}$  column (Waters; 7  $\mu\text{m}$ , 19  $\times$  300 mm) with an isocratic elution of MeCN– $\text{H}_2\text{O}$  (7:3) and a flow rate of 9.0 mL/min (sample injection, 500  $\mu\text{L}$ ; concentration, 0.1 mg/ $\mu\text{L}$ ). Eluates across the peaks with  $t_{\text{R}}$  values of 31.04 min (peak III) and 34.79 min (peak IV) were collected by the technique of heart cutting and independently reinjected (sample injection, 500  $\mu\text{L}$ ; concentration, 0.1 mg/ $\mu\text{L}$ ) in the apparatus operating in the recycle mode to achieve total homogeneity after 10 cycles. These techniques afforded pure compound **7** (15 mg) from peak III and compound **10** (12 mg) from peak IV.

**Brevipolide G (7):** colorless oil; ORD ( $c$  0.08,  $\text{CHCl}_3$ )  $[\alpha]_{589} +138.7$ ,  $[\alpha]_{578} +142.5$ ,  $[\alpha]_{546} +167.5$ ,  $[\alpha]_{436} +361.2$ ; ECD ( $c$   $5.5 \times 10^{-5}$  M, MeCN)  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\Delta\epsilon$ ) 230 (–2.99), 260 (+4.22), 301 (+4.02);  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) and  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) data (Figures S3 and S4, Supporting Information), see Table S1 (Supporting Information); HRFABMS  $m/z$  387.1455  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (calcd for  $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{O}_7$ , 387.1438).

**Brevipolide H (8):** colorless solid; mp 114–116  $^\circ\text{C}$ ; ORD ( $c$  0.24,  $\text{CHCl}_3$ )  $[\alpha]_{589} +157.5$ ,  $[\alpha]_{578} +165$ ,  $[\alpha]_{546} +195$ ,  $[\alpha]_{436} +421$ ,  $[\alpha]_{365} +1067.9$ ; ECD ( $c$   $2.8 \times 10^{-5}$  M, MeCN)  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\Delta\epsilon$ ) 230 (–3.71), 259 (+3.83), 305 (+8.54);  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) and  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) data (Figures S5 and S6, Supporting Information),

see Table S1 (Supporting Information); HRFABMS  $m/z$  401.1595  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (calcd for  $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{O}_7$ , 401.1522).

**Brevipolide I (9):** colorless prisms; mp 124–125  $^\circ\text{C}$ ; ORD ( $c$  0.15,  $\text{CHCl}_3$ )  $[\alpha]_{589} +36$ ,  $[\alpha]_{578} +37.3$ ,  $[\alpha]_{546} +42$ ,  $[\alpha]_{436} +59$ ; ECD ( $c$   $2.2 \times 10^{-5}$  M, MeCN)  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\Delta\epsilon$ ) 229 (–0.91), 264 (+2.20), 319 (–1.26);  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) and  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) data (Figures S7 and S8, Supporting Information), see Table S1 (Supporting Information); HRFABMS  $m/z$  401.1595  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (calcd for  $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{O}_7$ , 401.1522).

**Brevipolide J (10):** colorless oil; ORD ( $c$  0.17,  $\text{CHCl}_3$ )  $[\alpha]_{589} +147.0$ ,  $[\alpha]_{578} +156.5$ ,  $[\alpha]_{546} +183.5$ ,  $[\alpha]_{436} +392.9$ ; ECD ( $c$   $8.6 \times 10^{-5}$  M, MeCN)  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\Delta\epsilon$ ) 229 (–4.11), 262 (+6.11), 294 (+5.83);  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) and  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) data, see Table 1 (Figures S9 and S10, Supporting Information); HRFABMS  $m/z$  416.1467  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (calcd for  $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{O}_7$ , 416.1471).

**Methylation of Compound 7.** A MeOH solution of **7** (3 mg/100  $\mu\text{L}$ ) was treated with  $\text{CH}_2\text{N}_2$  in  $\text{Et}_2\text{O}$  (1 mL) at 0  $^\circ\text{C}$ . The solution was monitored over 1 h by TLC until reaction completion and dissipation of the yellow color. The solvent was evaporated under reduced pressure inside a fume-hood to afford a product that was identical to compound **8** (3 mg).

**Hydrogenation of Compounds 8–10.** A solution of compounds **8** and **9** (15 mg each) in THF was treated with Pd/C (5% mol, 0.045g) under a  $\text{N}_2$  atmosphere during 15 min. The solution was transferred to a 45 mL stainless steel Parr reactor and pressurized with  $\text{H}_2$  (200 psi) at room temperature during 24 h.<sup>20</sup> Then, the excess of gas was released. The residue was filtered, concentrated under vacuum, and purified by HPLC on a Symmetry  $\text{C}_{18}$  column (Waters; 7  $\mu\text{m}$ , 19  $\times$  300 mm) with an isocratic elution of MeCN– $\text{H}_2\text{O}$  and a flow rate of 9.0 mL/min (sample injection, 500  $\mu\text{L}$ ; concentration, 0.06 mg/ $\mu\text{L}$ ). These procedures afforded pure compound **11** (25 mg) as the only reaction product. The same process was individually applied to each pure natural product **8** and **9** (3 mg) to afford a convergent derivative (2.5 mg) that was chromatographically (HPLC coelution experiments,  $t_{\text{R}}$  30.68 min) and spectroscopically (NMR) identical with compound **11**. Compound **10** (5 mg) was also subjected to the same hydrogenation protocol to generate the tetrahydro derivative **12**.

**Tetrahydro derivative 11:** colorless oil; ORD ( $c$  0.36,  $\text{CHCl}_3$ )  $[\alpha]_{589} +46.4$ ,  $[\alpha]_{578} +48.3$ ,  $[\alpha]_{546} +56.7$ ,  $[\alpha]_{436} +115.8$ ,  $[\alpha]_{365} +242.8$ ;  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.11 (d,  $J$  = 8.7 Hz, H-2" and H-6"), 6.82 (d,  $J$  = 8.7 Hz, H-3" and H-5"), 5.16 (q,  $J$  = 7.1 Hz, H-6'), 4.39 (ddd,  $J$  = 10.8, 3.2, 3.2 Hz, H-6), 3.78 (s, OCH<sub>3</sub>), 3.54 (dd,  $J$  = 6.1, 3.2 Hz, H-1'), 2.90 (t,  $J$  = 7.4 Hz, H-8"), 2.68 (t,  $J$  = 7.4 Hz, H-7"), 2.67 (m, H-3ax), 2.47 (m, H-3eq), 2.10 (ddd,  $J$  = 8.5, 3.9, 3.4 Hz, H-4'), 1.98–1.75 (4m, H-4ax, H-4eq, H-5ax, and H-5eq), 1.54 (dddd,  $J$  = 8.9, 6.3, 6.3, 3.4 Hz, H-2'), 1.43 (d,  $J$  = 7.1 Hz, Me-7'), 1.27 (ddd,  $J$  = 8.5, 4.0, 3.9 Hz, H-3' <sub>proS</sub>), 1.02 (ddd,  $J$  = 8.9, 6.3, 4.0 Hz, H-3' <sub>proR</sub>) (Figure S16, Supporting Information);  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  206.5 (C-5'), 173.1 (C-9"), 171.7 (C-2), 158.1 (C-4"), 132.3 (C-1"), 129.3 (C-2" and C-6"), 113.9 (C-3" and C-5"), 83.3 (C-6), 75.2 (C-6'), 72.5 (C-1'), 55.3 (OCH<sub>3</sub>), 35.8 (C-8"), 29.9 (C-7"), 29.8 (C-3), 26.4 (C-2'), 21.6 (C-5), 21.3 (C-4'), 18.4 (C-4), 15.6 (C-7'), 14.3 (C-3') (Figure S17, Supporting Information); HRFABMS  $m/z$  405.1875  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (calcd for  $\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{O}_7$ , 405.1908).

**Tetrahydro Derivative 12:** colorless oil; ORD ( $c$  0.12,  $\text{CHCl}_3$ )  $[\alpha]_{589} +39.2$ ,  $[\alpha]_{578} +40.0$ ,  $[\alpha]_{546} +46.7$ ,  $[\alpha]_{436} +95.0$ ,  $[\alpha]_{365} +190.8$ ;  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.06 (d,  $J$  = 1.9 Hz, H-2"), 6.80 (d,  $J$  = 8.2 Hz, H-5"), 6.71 (dd,  $J$  = 8.2, 1.9 Hz, H-6"), 5.20 (q,  $J$  = 7.1 Hz, H-6'), 4.42 (ddd,  $J$  = 10.7, 3.1, 3.1 Hz, H-6), 3.89 (s, OCH<sub>3</sub>), 3.54 (dd,  $J$  = 6.3, 3.3 Hz, H-1'), 2.90 (t,  $J$  = 7.1 Hz, H-8"), 2.71 (t,  $J$  = 7.1 Hz, H-7"), 2.70–2.45 (2m, H-3ax and H-3eq), 2.13 (ddd,  $J$  = 8.5, 3.9, 3.4 Hz, H-4'), 2.10–1.80 (4m, H-4ax, H-4eq, H-5ax, and H-5eq), 1.57 (dddd,  $J$  = 8.9, 6.3, 6.3, 3.4 Hz, H-2'), 1.47 (d,  $J$  = 7.1 Hz, H-7'), 1.32 (ddd,  $J$  = 8.5, 4.0, 3.9 Hz, H-3' <sub>proS</sub>), 1.04 (ddd,  $J$  = 8.9, 6.3, 4.0 Hz, H-3' <sub>proR</sub>) (Figure S18, Supporting Information);  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  206.6 (C-5'), 172.5 (C-9"), 171.5 (C-2), 145.5 (C-3") 145.1 (C-4"), 133.6 (C-1"), 119.7 (C-6"), 114.6 (C-2"), 110.8 (C-5"), 83.2 (C-6), 75.3 (C-6'), 72.6 (C-1'), 56.0 (OCH<sub>3</sub>), 35.6 (C-8"), 30.1 (C-7"), 29.8 (C-3), 26.5 (C-2'), 21.6 (C-5), 21.3 (C-4'), 18.4 (C-4), 15.9 (C-7'),

14.3 (C-3') (Figure S19, Supporting Information); HRFABMS  $m/z$  420.1779 [M]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>22</sub>H<sub>28</sub>O<sub>8</sub>, 420.1784).

**Preparation of R- and S-MTPA Ester Derivatives of 11.** A solution of compound **11** (3.0 mg) in CDCl<sub>3</sub> (0.75 mL) was transferred into a clean NMR tube containing DMPA (0.5 mg) in pyridine-*d*<sub>5</sub> (0.10 mL). (S)- or (R)- $\alpha$ -Methoxy- $\alpha$ -(trifluoromethyl)-phenylacetyl chloride (S- or R-MTPA-Cl) (10  $\mu$ L) was immediately added into the NMR tube under a N<sub>2</sub> stream.<sup>21</sup> The <sup>1</sup>H NMR spectrum of the reaction mixture for each derivative (S- or R-MTPA-ester) was obtained directly from the reaction tube, which was permitted to stand at room temperature and monitored every 1 h. The reaction was found to be completed after 4 h.

**R-MTPA ester of 11:** <sup>1</sup>H NMR  $\delta$  7.03 (d,  $J$  = 8.6 Hz, H-2" and H-6"), 6.73 (d,  $J$  = 8.6 Hz, H-3" and H-5"), 5.00 (q,  $J$  = 7.1, H-6'), 4.70 (dd,  $J$  = 9.5, 2.9 Hz, H-1'), 4.37 (ddd,  $J$  = 11.0, 3.2, 3.2 Hz, H-6), 2.80 (t,  $J$  = 7.4 Hz, H-8"), 2.58 (m, H-3ax), 2.55 (t,  $J$  = 7.4 Hz, H-7"), 2.37 (ddd,  $J$  = 14.0, 4.0, 4.0 Hz, H-3eq), 2.18 (ddd,  $J$  = 8.5, 3.9, 3.4 Hz, H-4'), 2.00 (ddd,  $J$  = 14.0, 10.0, 6.0 Hz, H-5eq), 1.83–1.60 (2m, H-4ax and H-4eq), 1.68 (m, H-2'), 1.48 (dddd,  $J$  = 14.0, 12.0, 12.0, 3.0 Hz, H-5ax), 1.25 (d,  $J$  = 7.1 Hz, Me-7'), 1.13 (ddd,  $J$  = 8.5, 4.0, 3.9 Hz, H-3'<sub>proS</sub>), 0.90 (ddd,  $J$  = 8.9, 6.3, 4.0 Hz, H-3'<sub>proR</sub>) (Figure S22, Supporting Information).

**S-MTPA ester of 11:** <sup>1</sup>H NMR  $\delta$  7.03 (d,  $J$  = 8.6 Hz, H-2" and H-6"), 6.72 (d,  $J$  = 8.6 Hz, H-3" and H-5"), 5.00 (q,  $J$  = 7.1 Hz, H-6'), 4.77 (dd,  $J$  = 8.8, 2.6 Hz, H-1'), 4.46 (ddd,  $J$  = 11.0, 3.1, 3.1 Hz, H-6), 2.82 (t,  $J$  = 7.4 Hz, H-8"), 2.62 (m, H-3ax), 2.62 (t,  $J$  = 7.4 Hz, H-7"), 2.48 (ddd,  $J$  = 14.0, 4.0, 4.0 Hz, H-3eq), 2.19 (ddd,  $J$  = 14.0, 10.0, 6.0 Hz, H-5eq), 2.17 (ddd,  $J$  = 8.5, 3.9, 3.4 Hz, H-4'), 1.90–1.60 (2m, H-4ax and H-4eq), 1.60 (dddd,  $J$  = 14.0, 12.0, 12.0, 3.0 Hz, H-5ax), 1.57 (m, H-2'), 1.26 (d,  $J$  = 7.1 Hz, Me-7'), 1.10 (ddd,  $J$  = 8.5, 4.0, 3.9 Hz, H-3'<sub>proS</sub>), 0.80 (ddd,  $J$  = 8.9, 6.3, 4.0 Hz, H-3'<sub>proR</sub>) (Figure S22, Supporting Information).

**Hydrolysis of Compounds 11 and 12.** Compound **11** (21.7 mg) was dissolved in MeOH (400  $\mu$ L), and NaOMe (3.6 mg) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h. Saturated aqueous NH<sub>4</sub>Cl solution was added, and the mixture was diluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.<sup>22</sup> The organic layer was dried, filtered, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by HPLC on a Symmetry C<sub>18</sub> column (Waters; 5  $\mu$ m, 4.6  $\times$  250 mm) with an isocratic elution of MeOH–MeCN (7:3) and a flow rate of 0.3 mL/min (sample injection, 20  $\mu$ L; concentration, 0.05 mg/ $\mu$ L) to afford pure compound **13** (6 mg). Derivative **12** was also hydrolyzed, and the reaction residue was purified using the same procedures as described above to yield compound **13**.

**Compound 13:** colorless oil; ORD ( $c$  0.07, CHCl<sub>3</sub>) [ $\alpha$ ]<sub>589</sub> +88.6, [ $\alpha$ ]<sub>578</sub> +92.9, [ $\alpha$ ]<sub>546</sub> +107.1, [ $\alpha$ ]<sub>436</sub> +207.1, [ $\alpha$ ]<sub>365</sub> +412.9; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  4.49 (q,  $J$  = 7.0 Hz, H-11), 3.74 (m, H-5), 3.71 (s, OCH<sub>3</sub>), 3.24 (dd,  $J$  = 7.4, 3.5 Hz, H-6), 2.42 (t,  $J$  = 7.1 Hz, H-2a and H-2b), 2.13 (ddd,  $J$  = 8.5, 3.9, 3.4 Hz, H-9), 1.87 (m, H-3a), 1.74 (2m, H-3b and H-7), 1.59 (2m, H-4a and H-4b), 1.47 (d,  $J$  = 7.0 Hz, Me-12), 1.37 (ddd,  $J$  = 8.5, 4.0, 3.9 Hz, H-8<sub>proS</sub>), 1.10 (ddd,  $J$  = 8.9, 6.3, 4.0 Hz, H-8<sub>proR</sub>) (Figure S20, Supporting Information); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  211.9.5 (C-10), 174.4 (C-1), 75.6 (C-6), 73.9 (C-5), 73.1 (C-11), 51.7 (OCH<sub>3</sub>), 33.6 (C-2), 31.1 (C-4), 26.9 (C-7), 21.4 (C-9), 21.0 (C-3), 19.8 (C-12), 15.5 (C-8) (Figure S21, Supporting Information); EIMS  $m/z$  256 [M – H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> (1), 230 (4), 197 (11), 179 (19), 151 (21), 132 (28), 131 (44), 100 (55), 99 (100), 97 (32), 95 (16), 87 (29), 83 (27), 71 (46), 55 (48); FABMS  $m/z$  297 [M + Na]<sup>+</sup>.

**Single-Crystal X-ray Diffraction Analysis of 9.** Single-crystal X-ray diffraction analysis was collected on a Bruker SMART APEX CCD diffractometer with graphite-monochromated Mo K $\alpha$  radiation ( $\lambda$  = 0.71073 Å). Crystal data for **9** were C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>O<sub>7</sub>,  $M$  = 400.41, monoclinic, space group P2<sub>1</sub>,  $a$  = 8.9649(12) Å,  $b$  = 7.7800(11) Å,  $c$  = 14.731(2) Å,  $\beta$  = 98.250(2)°,  $V$  = 1016.9(1) Å<sup>3</sup>,  $Z$  = 2,  $\rho$  = 1.31 mg/mm<sup>3</sup>,  $\lambda$ (Mo K $\alpha$ ) = 0.71073 Å, total reflections = 7442, independent reflections 2617 ( $R_{int}$  0.04%), final  $R$  indices [ $I > 2\sigma(I)$ ],  $R_1$  = 4.20%,  $wR_2$  = 5.25%. For the structural refinement, the non-hydrogen atoms were treated anisotropically, and the hydrogen atoms included in the structure factor calculations were refined isotropically. Crystallographic data reported in this paper have been deposited with the Cambridge

Crystallographic Data Centre (CCDC 914932). Copies of the data can be obtained free of charge on application to the Director, CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK (fax: +44-(0)1223-336033 or e-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk).

**Molecular Modeling Calculations.** Molecular building and conformational search for isomers **8** and **9** and the corresponding C<sub>6</sub>-(R)-epimer were carried out in the Spartan'04 program<sup>23</sup> using the MMFF94 force-field calculation on a Windows operating system machine. A systematic search protocol was performed in which the torsion angles C(5)–C(6)–C(1')–C(2'), C(1')–C(2')–C(4')–C(5'), and C(2')–C(4')–C(5')–C(6') in the side chain were varied by 120°, starting at 60° for each central bond, and the torsion angles of the C(4')–C(5')–C(6')–C(7') dihedral angles were rotated in steps of 180°. The fragment of cinnamic acid was restricted to its most stable conformation, generating a total of 108 initial conformers for each stereoisomer. The cinnamoyl moiety began at H–C<sub>sp3</sub>–O–C<sub>sp2</sub> and C<sub>sp3</sub>–O–C=O dihedral angles ca. 0°, and conformational explorations for this group were achieved within dihedral angle ranges of +60° and –60°. All structures were minimized to a rmsd gradient of 1  $\times$  10<sup>–6</sup> kcal/mol on the potential energy surface. An energy cutoff of 10 kcal/mol was selected in order to have a wide frame of conformers in the Boltzmann distribution. All structures inside the cutoff window were geometrically optimized using the hybrid DFT method B3LYP and basis set DGDZVP (B3LYP/DGDZVP). The optimized structures were used to calculate the thermochemical parameters estimated at 298 K and 1 atm. Magnetic shielding tensors were calculated with the gauge-invariant atomic orbital (GIAO) method. Total NMR spin–spin coupling constants (SSCC,  $J$  (Hz)) were calculated as the summation of the Fermi contact, diamagnetic spin–orbit, spin–dipolar, and paramagnetic spin–orbit, which were calculated from B3LYP/DGDZVP-optimized structures by using the spin–spin option during the NMR jobs. All quantum mechanical NMR calculations were carried out using the Gaussian 03 program on a Linux operating system in the KanBalam cluster, which includes 1368 AMD Opteron processors at 2.6 GHz and a RAM memory of 3 terabytes. For each job, a maximum of four processors was used and each conformer required four different DFT jobs: geometric optimizations, frequency calculations, SSCC estimations, and TD ECD calculations. The total cpu time consumed in this work was 1.33  $\times$  10<sup>3</sup> h. The free energy equation ( $\Delta G = -RT \ln K$ ) was used to obtain the conformational population, taking into account a cyclic equilibrium at 298 K between the selected conformers of **9** within a 0.0–3.3 kcal/mol window with respect to the global minimum. The free energy values  $\Delta G^\circ$  were obtained from the vibrational frequency calculations as the sum of electronic and thermal free energies.

**Cytotoxicity Assay.** Nasopharyngeal (KB), laryngeal (Hep-2), colon (HCT-15), cervix (HeLa), breast (MCF-7),<sup>24</sup> and prostate carcinoma (PC-3) cell lines were maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum and were cultured at 37 °C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air (100% humidity). The cytotoxicity was determined using the SRB assay.<sup>25</sup> The cells were harvested at log phase of their growth cycle, treated in triplicate with various concentrations of the test samples (0.16–20  $\mu$ g/mL), and incubated for 72 h at 37 °C as described above. Results are expressed as the concentration that inhibits 50% control growth after the incubation period (IC<sub>50</sub>). The values were estimated from a semilog plot of the drug concentration ( $\mu$ g/mL) against the percentage of growth inhibition. Vinblastine was included as a positive control drug.

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### 📄 Supporting Information

<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra of compounds **7–13** and DEPTQ-135 and 2D NMR spectra including <sup>1</sup>H–<sup>1</sup>H COSY, HSQC, HMBC, and NOESY of compound **10**. Crystal parameters and X-ray coordinates of **9**. CD spectra for **7–10**. Table of cytotoxicity for **7–10**. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.



## ■ AUTHOR INFORMATION

## Corresponding Author

\*Tel: +52 55 5622-5288. Fax: +52 55 5622 5329. E-mail: pereda@unam.mx.

## Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ■ ACKNOWLEDGMENTS

Financial support was provided by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, grant 104887). G.A.S.O. is also grateful to CONACyT for a graduate student scholarship (226766). Geometry optimizations and coupling constant calculations were performed in the HP Cluster Platform 4000 (KanBalam) at Departamento de Supercomputo, Dirección General de Servicios de Cómputo Académico, UNAM. Thanks are due to G. Duarte and M. Guzmán (USAI, Facultad de Química, UNAM) for recording of the mass spectra. The authors also acknowledge Dr. A. Toscano for the X-ray crystallographic analysis. We also wish to thank Dr. M. Fragoso-Serrano (Facultad de Química, UNAM) for HPLC assistance and cytotoxicity evaluations.

## ■ REFERENCES

- (1) Hoffmann, H. M. R.; Rabe, J. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1985**, *24*, 94–110.
- (2) (a) Pereda-Miranda, R. In *Phytochemistry of Medicinal Plants*; Arnason, J. T.; Mata, R.; Romeo, J. T., Eds.; Plenum: New York, 1995; pp 83–112. (b) Falomir, E.; Murga, J.; Ruiz, P.; Carda, M.; Marco, J. A.; Pereda-Miranda, R.; Fragoso-Serrano, M.; Cerda-García-Rojas, C. M. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 5672–5676.
- (3) (a) Pereda-Miranda, R.; Hernández, L.; Villavicencio, M. J.; Novelo, M.; Ibarra, P.; Chai, H.; Pezzuto, J. M. *J. Nat. Prod.* **1993**, *56*, 583–593. (b) Fragoso-Serrano, M.; Gibbons, S.; Pereda-Miranda, R. *Planta Med.* **2005**, *71*, 278–280.
- (4) (a) Davies-Coleman, M. T.; Rivett, D. E. A. In *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*; Herz, W.; Grisebach, H.; Kirby, G. W.; Tamm, Ch., Eds.; Springer: New York, 1989; Vol. 55, pp 1–35. (b) Collet, L. A.; Davies-Coleman, M. T.; Rivett, D. E. A. In *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*; Herz, W.; Falk, H.; Kirby, G. W.; Moore, R. E.; Tamm, Ch., Eds.; Springer: New York, 1998; Vol. 75, pp 182–209.
- (5) (a) Davies-Coleman, M. T.; Rivett, D. E. A. *Phytochemistry* **1996**, *41*, 1085–1092. (b) Collet, L. A.; Davies-Coleman, M. T.; Rivett, D. E. A.; Drewes, S. E.; Horn, M. M. *Phytochemistry* **1997**, *44*, 935–938.
- (6) (a) Collet, L. A.; Davies-Coleman, M. T.; Rivett, D. E. A. *Phytochemistry* **1998**, *48*, 651–656. (b) Collet, L. A.; Davies-Coleman, M. T.; Rivett, D. E. A. *Phytochemistry* **1995**, *38*, 791–792.
- (7) Pereda-Miranda, R.; Fragoso-Serrano, M.; Cerda-García-Rojas, C. M. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 47–53.
- (8) Boalino, D. M.; Connolly, J. D.; McLean, S.; Reynolds, W. F. *Phytochemistry* **2003**, *64*, 1303–1307.
- (9) (a) Usui, T.; Watanabe, H.; Nakayama, H.; Tada, Y.; Kanoh, N.; Kondoh, M.; Asao, T.; Takio, K.; Watanabe, H.; Nishikawa, K.; Kitahara, T.; Osada, H. *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 799–806. (b) Yoshida, M.; Matsui, Y.; Ikarashi, Y.; Usui, T.; Osada, H.; Wakasugi, H. *Anticancer Res.* **2007**, *27*, 729–736. (c) Vogt, A.; McPherson, P. A.; Shen, X.; Balachandran, R.; Zhu, G.; Raccor, B. S.; Nelson, S. G.; Tsang, M.; Day, B. W. *Chem. Biol. Drug Des.* **2009**, *74*, 358–368.
- (10) Deng, Y.; Balunas, M. J.; Kim, J.-A.; Lantvit, D. D.; Chin, Y.-W.; Chai, H.; Sugiarsso, S.; Kardono, L. B. S.; Fong, H. H. S.; Pezzuto, J. M.; Swanson, S. M.; Carcache-Blanco, E. J.; Kinghorn, A. D. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 1165–1169.
- (11) Hegde, V. R.; Pu, H.; Patel, M.; Das, P. R.; Strizki, J.; Gullo, V. P.; Chou, C.-C.; Buevich, A. V.; Chan, T.-M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 5339–5342.
- (12) Mendoza-Espinoza, J. A.; López-Vallejo, F.; Fragoso-Serrano, M.; Pereda-Miranda, R.; Cerda-García-Rojas, C. M. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 700–708.
- (13) López-Vallejo, F.; Fragoso-Serrano, M.; Suárez-Ortiz, G. A.; Hernández-Rojas, A. C.; Cerda-García-Rojas, C. M.; Pereda-Miranda, R. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 6057–6066.
- (14) Pereda-Miranda, R.; Hernández-Carlos, B. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 3145–3154.
- (15) (a) Kusumi, T.; Hamada, T.; Ishitsuka, M. O.; Othani, T.; Kakisawa, H. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 1033–1035. (b) Seco, J. M.; Quiñoá, E.; Riguera, R. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 17–117.
- (16) (a) Halgren, T. *J. Comput. Chem.* **1996**, *17*, 490–519. (b) Halgren, T. *J. Comput. Chem.* **1996**, *17*, 520–552. (c) Halgren, T. *J. Comput. Chem.* **1996**, *17*, 553–586. (d) Halgren, T.; Nachbar, R. B. *J. Comput. Chem.* **1996**, *17*, 587–615. (e) Halgren, T. *J. Comput. Chem.* **1996**, *17*, 616–641.
- (17) (a) Godbout, N.; Salahub, D. R.; Andzelm, J.; Wimmer, E. *Can. J. Chem.* **1992**, *70*, 560–571. (b) Andzelm, J.; Wimmer, E. *J. Chem. Phys.* **1992**, *96*, 1280–1303.
- (18) (a) Cerda-García-Rojas, C. M.; García-Gutiérrez, H. A.; Hernández-Hernández, J. D.; Román-Marín, L. U.; Joseph-Nathan, P. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 1167–1172. (b) Ding, Y.; Li, X.-C.; Ferreira, D. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 327–335.
- (19) Choudhary, M. I.; Naheed, N.; Abbaskhan, A.; Ali, S.; Atta-ur-Rahman. *Phytochemistry* **2009**, *70*, 1467–1473.
- (20) Tolmacheva, N. A.; Gerus, I. I.; Dolovanyuk, V. G.; Kondratov, I. S.; Haufe, G. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, *29*, S012–S019.
- (21) (a) Rieser, M. J.; Hui, Y. H.; Rupprecht, J. K.; Kozlowski, J. F.; Wood, K. V.; McLaughlin, J. L.; Hanson, P. R.; Zhuang, Z.; Hoye, T. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *114*, 10203–10213. (b) Fragoso-Serrano, M.; González-Chimeo, E.; Pereda-Miranda, R. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 45–50.
- (22) O'Malley, S. J.; Tan, K. L.; Watzke, A.; Bergman, R. G.; Ellman, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13496–13497.
- (23) Kong, J.; White, C. A.; Krylov, A. I.; Sherrill, C. D.; Adamson, R. D.; Furlani, T. R.; Lee, M. S.; Lee, A. M.; Gwaltney, S. R.; Adams, T. R.; Ochsenfeld, C.; Gilbert, A. T. B.; Kedziora, G. S.; Rassolov, V. A.; Maurice, D. R.; Nair, N.; Shao, Y.; Besley, N. A.; Maslen, P. E.; Dombroski, J. P.; Daschel, H.; Zhang, W.; Korambath, P. P.; Baker, J.; Byrd, E. F. C.; Van Voorhis, T.; Oumi, M.; Hirata, S.; Hsu, C.-P.; Ishikawa, N.; Florian, J.; Warshel, A.; Johnson, B. G.; Gill, P. M. W.; Head-Gordon, M.; Pople, J. A. *J. Comput. Chem.* **2000**, *21*, 1532–1548.
- (24) Figueroa-González, G.; Jacobo-Herrera, N.; Zentella-Dehesa, A.; Pereda-Miranda, R. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 93–97.
- (25) (a) Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J. T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M. R. *J. Natl. Cancer Inst.* **1990**, *82*, 1107–1112. (b) Vichai, V.; Kirtikara, K. *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 1112–1116.

# Vicinal $^1\text{H}$ – $^1\text{H}$ NMR Coupling Constants from Density Functional Theory as Reliable Tools for Stereochemical Analysis of Highly Flexible Multichiral Center Molecules

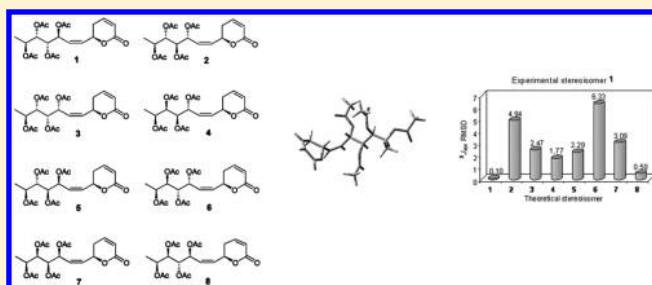
Fabian López-Vallejo,<sup>†,‡</sup> Mabel Fragoso-Serrano,<sup>‡</sup> Gloria Alejandra Suárez-Ortiz,<sup>‡</sup> Adriana C. Hernández-Rojas,<sup>‡</sup> Carlos M. Cerda-García-Rojas,<sup>\*,†</sup> and Rogelio Pereda-Miranda<sup>\*,‡</sup>

<sup>†</sup>Departamento de Química y Programa de Posgrado en Farmacología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, A.P. 14-470, México, D. F. 07000 Mexico

<sup>‡</sup>Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, México, D. F. 04510 Mexico

**S** Supporting Information

**ABSTRACT:** A protocol for stereochemical analysis, based on the systematic comparison between theoretical and experimental vicinal  $^1\text{H}$ – $^1\text{H}$  NMR coupling constants, was developed and applied to a series of flexible compounds (1–8) derived from the 6-heptenyl-5,6-dihydro-2H-pyran-2-one framework. The method included a broad conformational search, followed by geometry optimization at the DFT B3LYP/DGDZVP level, calculation of the vibrational frequencies, thermochemical parameters, magnetic shielding tensors, and the total NMR spin–spin coupling constants. Three scaling factors, depending on the carbon atom hybridizations, were found for the  $^1\text{H}$ –C–C– $^1\text{H}$  vicinal coupling constants:  $f_{(\text{sp}^3)-(\text{sp}^3)} = 0.910$ ,  $f_{(\text{sp}^3)-(\text{sp}^2)} = 0.929$ , and  $f_{(\text{sp}^2)-(\text{sp}^2)} = 0.977$ . A remarkable correlation between the theoretical ( $J^{\text{the}}$ ) and experimental ( $J^{\text{exp}}$ ) coupling constants for spicigerolide (1), a cytotoxic natural product, and some of its synthetic stereoisomers (2–4) demonstrated the predictive value of this approach for the stereochemical assignment of highly flexible compounds containing multiple chiral centers. The stereochemistry of two natural 6-heptenyl-5,6-dihydro-2H-pyran-2-ones (14 and 15) containing diverse functional groups in the heptenyl side chain was also analyzed by application of this combined theoretical and experimental approach, confirming its reliability. Additionally, a geometrical analysis for the conformations of 1–8 revealed that weak hydrogen bonds substantially guide the conformational behavior of the tetraacyloxy-6-heptenyl-2H-pyran-2-ones.



## INTRODUCTION

One of the most challenging tasks in the field of structure elucidation is stereochemical analysis performed on flexible organic compounds.<sup>1</sup> An accurate description of the three-dimensional arrangement is crucial for either synthesizing new bioactive substances or evaluating them in drug-receptor interaction models.<sup>2</sup> Theoretical NMR parameters have reached such a high level of accuracy that it is now possible for researchers to solve stereochemical problems in organic compounds.<sup>3</sup> For instance, the calculated  $^1\text{H}$ – $^1\text{H}$  vicinal coupling constants values ( $^3J_{\text{HH}}$ ) are a powerful tool for the stereochemical analysis of complex molecules with multichiral centers, even in such cases of highly flexible compounds displaying a large number of conformers.<sup>4</sup>

Theoretical studies have focused mainly on proteins<sup>5</sup> and oligosaccharides,<sup>6</sup> as well as on polycyclic natural products with a restricted number of conformers.<sup>7</sup> In this study, a protocol for stereochemical analysis based on a systematic comparison between theoretical and experimental  $^1\text{H}$ – $^1\text{H}$  NMR vicinal coupling constants was developed and applied to a series of flexible

compounds (1–8) (Figure 1) possessing a polyacylated chain with four contiguous stereocenters. This approach increases the number of theoretical protocols aimed at solving stereochemical aspects of flexible organic compounds as recently demonstrated by the use of ab initio NMR chemical shift calculations.<sup>3</sup>

Polyacylated 6-heptenyl-5,6-dihydro-2H-pyran-2-ones occur in several members of the mint family (Lamiaceae),<sup>8</sup> particularly in the genus *Hyptis*.<sup>9,10</sup> The pharmacological properties displayed by these natural molecules, e.g., antimicrobial, cytotoxic, and antitumoral activities,<sup>8–10</sup> make them an interesting subject for stereochemical exploration because all of them possess an  $\alpha,\beta$ -unsaturated  $\delta$ -lactone system, which is a well-known Michael acceptor. This moiety is the pharmacophoric group responsible for the cytotoxic properties of this type of compounds,<sup>11</sup> but conformational requirements for their interaction with target biomolecules have not yet been studied. These bioactive

Received: March 29, 2011

Published: June 21, 2011

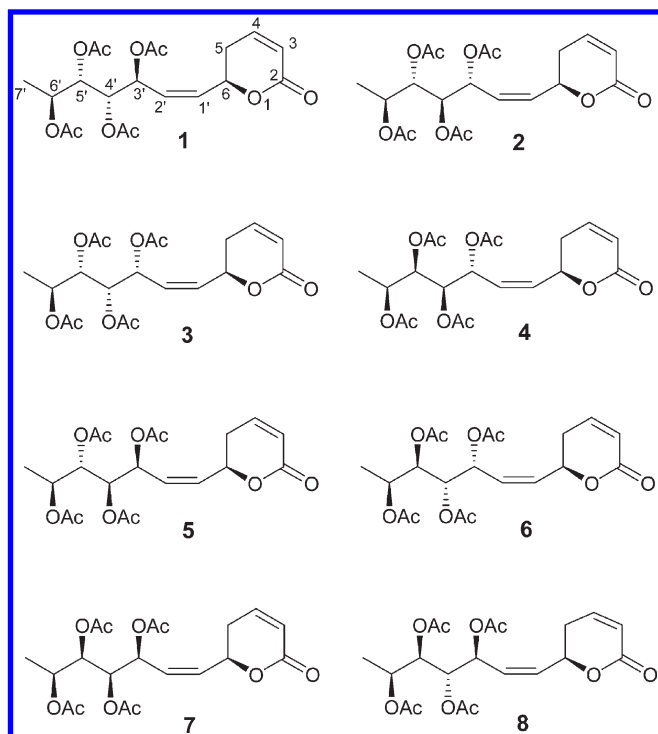


Figure 1. The eight possible stereoisomers for spicigerolide (1).

compounds are structurally related to pironetin, a pharmacologically relevant natural product that selectively binds to  $\alpha$ -tubulin.<sup>12</sup> Preceding this report, the stereochemical elucidation of spicigerolide (1), a cytotoxic (KB,  $ED_{50} = 1.5 \mu\text{g/mL}$ ) 6-tetraacetyloxyheptenyl-5,6-dihydro-2*H*-pyran-2-one, was determined by applying molecular mechanics and  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NMR coupling constant analysis ( $MM^3/J_{\text{HH}}$ ) predicting the relative configuration for all its stereogenic centers.<sup>10</sup>

Current interest in this type of bioactive molecules has resulted in some synthetic approaches for 1 and several of its stereoisomers<sup>13</sup> since their cytotoxic potential strongly depends on the stereochemistry of the chiral centers located in both the pyrone moiety and the heptenyl side chain,<sup>13a</sup> which in any given compound governs its conformational arrangements leading to specific molecular geometries that selectively interact with bioreceptors. After comparing density functional theory calculations with experimental  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NMR coupling constants for the structural reassignment as well as stereochemical and conformation analysis of hypurticin,<sup>4</sup> another polyacetylated 6-heptenyl-5,6-dihydro-2*H*-pyran-2-one, this approach was improved and resulted in the successful exploration of the full conformational space for eight diastereoisomers of spicigerolide (1–8) as described in this article. DFT scaling factors were found for the  $^1\text{H}$ -C-C- $^1\text{H}$  vicinal couplings ( $^3J_{\text{HH}}$ ) augmenting the correlation between theoretical and experimental  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NMR coupling constants, emphasizing the efficacy of this method for stereochemical assignment of highly flexible compounds containing multiple chiral centers. Reliability of this approach was further confirmed when applied in the stereochemical analysis of two additional 6-heptenyl-5,6-dihydro-2*H*-pyran-2-ones containing diverse functional groups in the heptenyl side chain. The relevance of weak hydrogen bonds for the conformational behavior of tetraacetyloxy-6-heptenyl-2*H*-pyran-2-ones was also elucidated.

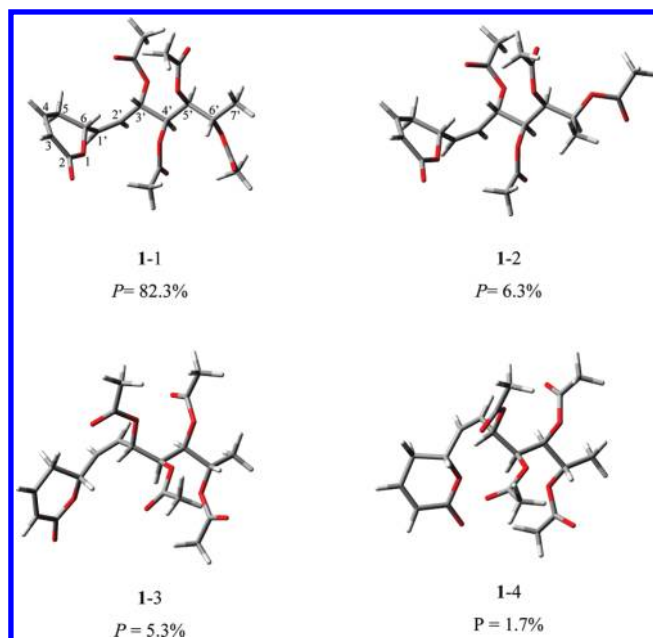


Figure 2. The four most relevant conformers of spicigerolide (1).

## RESULTS AND DISCUSSION

A unique biogenetic feature of natural 6-heptenyl-5,6-dihydro-2*H*-pyran-2-ones is the (*S*)-configuration of the stereogenic center at C-6'.<sup>9,12</sup> This fact and the determination by circular dichroism of the (*R*)-configuration for the lactone C-6 chiral center<sup>9,10</sup> allow the possibility of eight diastereoisomers (1–8) for spicigerolide (Figure 1). Molecular mechanics was used for structure building and the initial conformational search for stereoisomers 1–8. This systematic search used a protocol in which the torsion angles C(2')–C(3')–C(4')–C(5'), C(3')–C(4')–C(5')–C(6'), and C(4')–C(5')–C(6')–C(7') in the heptenyl moiety were rotated in steps of 120°, starting at 60° for each central bond. The torsion dihedral angles for C(1')=C(2')–C(3')–C(4') and C(5)–C(6)–C(1')=C(2') were rotated in steps of 180°. The acetyloxy H–C<sub>sp3</sub>–O–C<sub>sp2</sub> and C<sub>sp3</sub>–O–C=O dihedral angles were initially set to 0° and explored within a range from +60° to –60°. A total of 108 initial conformers were generated for each of the eight stereoisomers. Due to severe intramolecular hindering steric interactions, a considerable number of conformers were discarded (see details in Experimental Section). The stable conformers were geometrically optimized, and their thermochemical parameters and IR frequencies were estimated. As an example, the four most relevant theoretical conformers of spicigerolide (1) are represented in Figure 2. For those conformers within the Gibbs free energy range of  $\Delta G = 0$ –3 kcal/mol, the magnetic shielding tensors were calculated with the gauge-including atomic orbital (GIAO) method, followed by theoretical calculation of the total NMR spin–spin coupling constants (SSCC) at the B3LYP/DGDZVP level. The  $\Delta G = -RT \ln K$  equation was used to obtain the population for each conformer taking into consideration a cyclic equilibrium among the selected conformers. Each coupling value was Boltzmann-weighted taking into account the DFT population to integrate the population-averaged coupling constants. Tables S1–S8 (Supporting Information) list the calculated values for the conformers of 1–8 ranging between 0 and 3 kcal/mol. As an example, IR frequencies and magnetic

**Table 1. Summary<sup>a</sup> of Corrected<sup>b</sup> Weighted<sup>c</sup> Theoretical<sup>d</sup> <sup>1</sup>H–<sup>1</sup>H Coupling Constants of Stereoisomers 1–8 and Experimental<sup>e</sup> *J*-values for 1–4**

stereoisomer	<i>J</i> <sub>3–4</sub>	<i>J</i> <sub>4–5S</sub>	<i>J</i> <sub>4–5R</sub>	<i>J</i> <sub>5S–6</sub>	<i>J</i> <sub>5R–6</sub>	<i>J</i> <sub>6–1'</sub>	<i>J</i> <sub>1'–2'</sub>	<i>J</i> <sub>2'–3'</sub>	<i>J</i> <sub>3'–4'</sub>	<i>J</i> <sub>4'–5'</sub>	<i>J</i> <sub>5'–6'</sub>
theor 1 (6R,3'S,4'S,5'S,6'S)	9.65	2.09	6.21	11.27	3.64	9.32	11.21	9.24	8.96	2.41	8.84
exp 1 (6R,3'S,4'S,5'S,6'S)	9.90	2.50	5.77	11.00	4.00	9.50	11.00	9.60	9.00	2.50	8.70
theor 2 (6R,3'R,4'R,5'S,6'S)	9.62	2.10	6.36	11.25	3.59	8.50	11.74	9.97	3.96	7.63	4.06
exp 2 (6R,3'R,4'R,5'S,6'S)	9.80	3.00	5.50	12.00	3.50	8.70	11.50	9.90	4.30	7.20	4.30
theor 3 (6R,3'R,4'S,5'S,6'S)	9.60	2.16	6.37	11.69	3.42	7.43	11.94	8.80	7.07	3.96	5.17
exp 3 (6R,3'R,4'S,5'S,6'S)	9.50	2.20	6.20	11.50	4.00	8.00	11.80	8.50	6.70	4.30	5.40
theor 4 (6R,3'R,4'R,5'R,6'S)	9.64	2.08	6.24	11.76	3.76	7.35	11.46	9.62	6.94	3.97	6.99
exp 4 (6R,3'R,4'R,5'R,6'S)	10.00	3.00	5.50	11.40	4.20	8.10	11.50	10.00	6.80	4.00	7.20
theor 5 (6R,3'S,4'R,5'S,6'S)	9.65	2.09	6.29	11.23	3.70	9.04	11.52	9.84	7.26	3.46	5.26
theor 6 (6R,3'R,4'S,5'R,6'S)	9.63	2.12	6.26	11.91	3.59	6.81	11.81	9.55	2.85	9.23	2.60
theor 7 (6R,3'S,4'R,5'R,6'S)	9.64	2.09	6.27	11.24	3.73	9.10	11.45	9.49	5.56	4.49	5.11
theor 8 (6R,3'S,4'S,5'R,6'S)	9.63	2.09	6.24	11.39	3.68	8.72	11.30	9.16	8.62	2.04	8.07

<sup>a</sup> For full details on theoretical coupling constant calculations for each contributing conformer, see Supporting Information (Tables S1–S8). <sup>b</sup> The scaling factors were as follows:  $f_{\text{H}(\text{sp}3)-\text{H}(\text{sp}3)} = 0.910$ ;  $f_{\text{H}(\text{sp}3)-\text{H}(\text{sp}2)} = 0.929$  and  $f_{\text{H}(\text{sp}2)-\text{H}(\text{sp}2)} = 0.977$ . <sup>c</sup> Boltzmann averaged with equation  $\sum_i f_i \times P_i$ , where  $f_i$  is the spin–spin coupling constant value (in Hz) for each conformer and  $P_i$  is the population for the  $i$ th conformation calculated from  $\Delta G^\circ$  values at 298 K and 1 atm. <sup>d</sup> Obtained from the DFT optimized structures at the B3LYP/DGDZVP level. <sup>e</sup> In Hz, obtained by nonlinear fit of the experimental <sup>1</sup>H NMR spectrum to the simulated spectrum generated by iteration of spectral parameters (<sup>1</sup>H chemical shifts, *J*-couplings, and line width).

shield tensors for spicigerolide (**1**) selected conformers are included in Tables S13–S30 in Supporting Information, and the corresponding H–C–C–H dihedral angles are listed in Table S31.

Theoretical <sup>1</sup>H–<sup>1</sup>H coupling constants values for compounds **1–8** are summarized in Table 1, where experimental <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> values for compounds **1–4** were also included for comparison to determine the accuracy of the calculations. Through the nonlinear fit of the <sup>1</sup>H NMR spectrum to the spectral parameters obtained by iterative processing, the accurate experimental <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> values were obtained for an authentic sample of spicigerolide (**1**)<sup>10</sup> and for derivatives **2–4** (Table 2). Compounds **1–4** displayed distinctive <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> coupling constant values that correlated with their configurational arrangement (Figures S1–S4, Supporting Information).

Figure 3 shows the synthetic sequence for the microscale preparation of diastereoisomers **2–4**. Acetylation of synrotolide (**9**), isolated from a member of the mint family found only in Pondoland, South Africa<sup>14</sup> afforded the peracetylated derivative **2** and the triacetylated compounds **10** and **11**, both of which were used for the epimerization of chiral centers C-4' and C-5', respectively. Jones' oxidation of alcohols **10** and **11** afforded ketones **12** and **13**, which were then subjected to hydride reduction and acetylation to yield diastereoisomers **3** and **4**, respectively. Regeneration of compound **2** was also observed.

The differences between the experimental and calculated coupling constants of **1–4** (Table 1) were estimated by root-mean-square deviation values (rmsd). All calculations were carried out with neither solvation effects nor intermolecular interactions but including the inherent approximations of the quantum methods. Three scaling factors ( $f$ )<sup>15</sup> were calculated to compensate for the slightly overestimated <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> values:  $J^{\text{pre}} = f_{\text{X}} J^{\text{calc}}$ , arising from the limitations of the employed theoretical methods and which may compensate for the approximations inherent in the quantum mechanics equations for a given structure, as has been reported in work related to coupling constants.<sup>15</sup> Each factor was determined by an iterative process structured to minimize the global rmsd. The procedure took into account the whole set of calculated

versus experimental <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> values, which were grouped according to the carbon atom hybridization of the H–C–C–H fragments as follow:  $f_{\text{H}(\text{sp}3)-\text{H}(\text{sp}3)} = 0.910$ ;  $f_{\text{H}(\text{sp}3)-\text{H}(\text{sp}2)} = 0.929$ , and  $f_{\text{H}(\text{sp}2)-\text{H}(\text{sp}2)} = 0.977$ . For compounds **1–4**, the rmsd values before applying the scaling factors were 0.70, 0.72, 0.69, and 0.73 Hz, respectively, taking into account the whole set of vicinal coupling constants. When using the scaling factors, these numbers substantially decreased to 0.26, 0.50, 0.34, and 0.48 Hz. If the comparison focuses on the coupling constants arising from the C(3')–C(4')–C(5')–C(6') fragment (*J*<sub>3'-4'</sub>, *J*<sub>4'-5'</sub>, and *J*<sub>5'-6'</sub>), where the stereochemical differences take place along the series of 6-heptenyl-5,6-dihydro-2H-pyran-2-ones, the rmsd values decrease even more considerably. For compounds **1–4**, these values were only 0.10, 0.35, 0.32, and 0.15, respectively. The complete set of rmsd comparative values, including the theoretical coupling constants of **5–8**, is shown in Figure 4.

Convergence between DFT calculated and experimental <sup>1</sup>H–<sup>1</sup>H NMR coupling constant values in the four diastereoisomers **1–4** (Table 1) arises from the following results: (1) the exact calculation for each conformer's geometry; (2) the precise estimation of the free energies and Boltzmann population for each analyzed stereoisomer; and (3) the appropriate selection of the coupling constant calculation method, as in this case B3LYP/DGDZVP. This approach provides a single and specific solution for each set of <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> values for diastereoisomers **1–4**, resulting in the stereochemical assignment for each chiral center present in the flexible moiety of each analyzed structure, as well as in the conformational behavior of the entire molecule. In the present study, the use of solvent models was excluded since the contribution to *J* is generally low in molecules lacking polar protic functional groups as OH, NH, and/or COOH, when dissolved in CDCl<sub>3</sub>, an aprotic solvent with a relatively low dipolar moment.

Two natural products (**14** and **15**, Figure 5) containing the 6-heptenyl-5,6-dihydro-2H-pyran-2-one framework, but with diverse functional groups in the heptenyl side chain, were also subjected to the same combined theoretical and experimental methodology as a test for its reliability. The conformational search, minimization procedures, and coupling constant calculations were

Table 2. Experimental  $^1\text{H}$  NMR Chemical Shifts, Multiplicities, and  $^3J_{\text{HH}}$  Coupling Constants of Compounds 1–4<sup>a</sup>

H	1	2	3	4
3	6.06 ddd ( $J_{3,4} = 9.90$ , $J_{3,\text{Sax}} = -2.75$ , $J_{3,\text{Seq}} = -1.10$ )	6.06 ddd ( $J_{3,4} = 9.80$ , $J_{3,\text{Sax}} = -2.20$ , $J_{3,\text{Seq}} = -1.40$ )	6.06 ddd ( $J_{3,4} = 9.50$ , $J_{3,\text{Sax}} = -2.50$ , $J_{3,\text{Seq}} = -1.50$ )	6.07 ddd ( $J_{3,4} = 10.00$ , $J_{3,\text{Sax}} = -2.20$ , $J_{3,\text{Seq}} = -1.40$ )
4	6.90 ddd ( $J_{4,3} = 9.90$ , $J_{4,\text{Sax}} = 2.50$ , $J_{4,\text{Seq}} = 5.77$ )	6.90 ddd ( $J_{4,3} = 9.80$ , $J_{4,\text{Sax}} = 3.00$ , $J_{4,\text{Seq}} = 5.50$ )	6.88 ddd ( $J_{4,3} = 9.50$ , $J_{4,\text{Sax}} = 2.20$ , $J_{4,\text{Seq}} = 6.20$ )	6.90 ddd ( $J_{4,3} = 10.00$ , $J_{4,\text{Sax}} = 3.00$ , $J_{4,\text{Seq}} = 5.50$ )
Sax	2.35 dddd ( $J_{\text{Sax},\text{Seq}} = -18.50$ , $J_{\text{Sax},6} = 11.00$ , $J_{\text{Sax},3} = -2.75$ , $J_{\text{Sax},4} = 2.50$ )	2.43 dddd ( $J_{\text{Sax},\text{Seq}} = -17.40$ , $J_{\text{Sax},6} = 12.00$ , $J_{\text{Sax},3} = -2.2$ , $J_{\text{Sax},4} = 3.00$ )	2.49 dddd ( $J_{\text{Sax},\text{Seq}} = -18.50$ , $J_{\text{Sax},6} = 11.50$ , $J_{\text{Sax},3} = -2.50$ , $J_{\text{Sax},4} = 2.20$ )	2.35 dddd ( $J_{\text{Sax},\text{Seq}} = -17.10$ , $J_{\text{Sax},6} = 11.40$ , $J_{\text{Sax},3} = -2.20$ , $J_{\text{Sax},4} = 3.00$ )
Seq	2.52 dddd ( $J_{\text{Seq},\text{Sax}} = -18.50$ , $J_{\text{Seq},4} = 5.77$ , $J_{\text{Seq},6} = 4.00$ , $J_{\text{Seq},3} = -1.10$ )	2.43 dddd ( $J_{\text{Seq},\text{Sax}} = -17.40$ , $J_{\text{Seq},4} = 5.50$ , $J_{\text{Seq},6} = 3.50$ , $J_{\text{Seq},3} = -1.40$ )	2.56 dddd ( $J_{\text{Seq},\text{Sax}} = -18.50$ , $J_{\text{Seq},4} = 6.20$ , $J_{\text{Seq},6} = 4.00$ , $J_{\text{Seq},3} = -1.50$ )	2.52 dddd ( $J_{\text{Seq},\text{Sax}} = -17.10$ , $J_{\text{Seq},4} = 5.50$ , $J_{\text{Seq},6} = 4.20$ , $J_{\text{Seq},3} = -1.40$ )
6	5.35 dddd ( $J_{6,1'} = 9.50$ , $J_{6,\text{Sax}} = 11.00$ , $J_{6,\text{Seq}} = 4.00$ , $J_{6,2'} = -0.90$ )	5.30 dddd ( $J_{6,1'} = 8.70$ , $J_{6,\text{Sax}} = 12.00$ , $J_{6,\text{Seq}} = 3.50$ , $J_{6,2'} = -1.00$ )	5.30 dddd ( $J_{6,1'} = 8.00$ , $J_{6,\text{Sax}} = 11.50$ , $J_{6,\text{Seq}} = 4.00$ , $J_{6,2'} = -1.10$ )	5.38 dddd ( $J_{6,1'} = 8.10$ , $J_{6,\text{Sax}} = 11.40$ , $J_{6,\text{Seq}} = 4.20$ , $J_{6,2'} = -1.50$ )
1'	5.79 dd ( $J_{1',2'} = 11.00$ , $J_{1',6'} = 9.50$ )	5.87 ddd ( $J_{1',2'} = 11.50$ , $J_{1',6'} = 8.70$ , $J_{1',3'} = -0.85$ )	5.80 ddd ( $J_{1',2'} = 11.80$ , $J_{1',6'} = 8.00$ , $J_{1',3'} = -0.50$ )	5.90 ddd ( $J_{1',2'} = 11.50$ , $J_{1',6'} = 8.10$ , $J_{1',3'} = -1.00$ )
2'	5.49 ddd ( $J_{2',1'} = 11.00$ , $J_{2',3'} = 9.60$ , $J_{2',6'} = -0.90$ )	5.64 ddd ( $J_{2',1'} = 11.50$ , $J_{2',3'} = 9.90$ , $J_{2',6'} = -1.00$ )	5.56 ddd ( $J_{2',1'} = 11.80$ , $J_{2',3'} = 8.50$ , $J_{2',6'} = -1.10$ )	5.63 ddd ( $J_{2',1'} = 11.50$ , $J_{2,3'} = 10.00$ , $J_{2,6'} = -1.50$ )
3'	5.40 dd ( $J_{3',2'} = 9.60$ , $J_{3',4'} = 9.00$ )	5.69 ddd ( $J_{3',2'} = 9.80$ , $J_{3',4'} = 4.30$ , $J_{3',1'} = -0.85$ )	5.70 ddd ( $J_{3',2'} = 8.5$ , $J_{3',4'} = 6.70$ , $J_{3',1'} = -0.50$ )	5.50 ddd ( $J_{3',2'} = 10.00$ , $J_{3',4'} = 6.80$ , $J_{3',1'} = -1.00$ )
4'	5.37 dd ( $J_{4',3'} = 9.00$ , $J_{4',5'} = 2.50$ )	5.25 dd ( $J_{4',5'} = 7.20$ , $J_{4',3'} = 4.30$ )	5.33 dd ( $J_{4',3'} = 6.70$ , $J_{4',5'} = 4.30$ )	5.32 dd ( $J_{4',3'} = 6.80$ , $J_{4',5'} = 4.00$ )
5'	5.30 dd ( $J_{5',6'} = 8.70$ , $J_{5',4'} = 2.50$ )	5.17 dd ( $J_{5',4'} = 7.20$ , $J_{5',6'} = 4.30$ )	5.23 dd ( $J_{5',6'} = 5.40$ , $J_{5',4'} = 4.30$ )	5.21 dd ( $J_{5',6'} = 7.20$ , $J_{5',4'} = 4.00$ )
6'	4.96 dq ( $J_{6',5'} = 8.70$ , $J_{6',7'} = 6.30$ )	5.10 dq ( $J_{6',7'} = 6.50$ , $J_{6',5'} = 4.30$ )	4.98 dq ( $J_{6',5'} = 5.40$ , $J_{6',7'} = 6.50$ )	4.98 dq ( $J_{6',5'} = 7.20$ , $J_{6',7'} = 6.50$ )
Me-7'	1.19 d ( $J_{7',6'} = 6.30$ )	1.22 d ( $J_{7',6'} = 6.50$ )	1.24 d ( $J_{7',6'} = 6.50$ )	1.21 d ( $J_{7',6'} = 6.50$ )
OAc	2.12 s, 2.12 s, 2.04 s, 2.03 s	2.11 s, 2.11 s, 2.06 s, 2.03 s	2.12 s, 2.09 s, 2.09 s, 2.02 s	2.10 s, 2.08 s, 2.05 s, 2.03 s

<sup>a</sup> Obtained by nonlinear fit of the experimental  $^1\text{H}$  NMR spectrum to the simulated spectrum generated by iteration of spectral parameters ( $^1\text{H}$  chemical shifts,  $J$ -couplings, and line width).

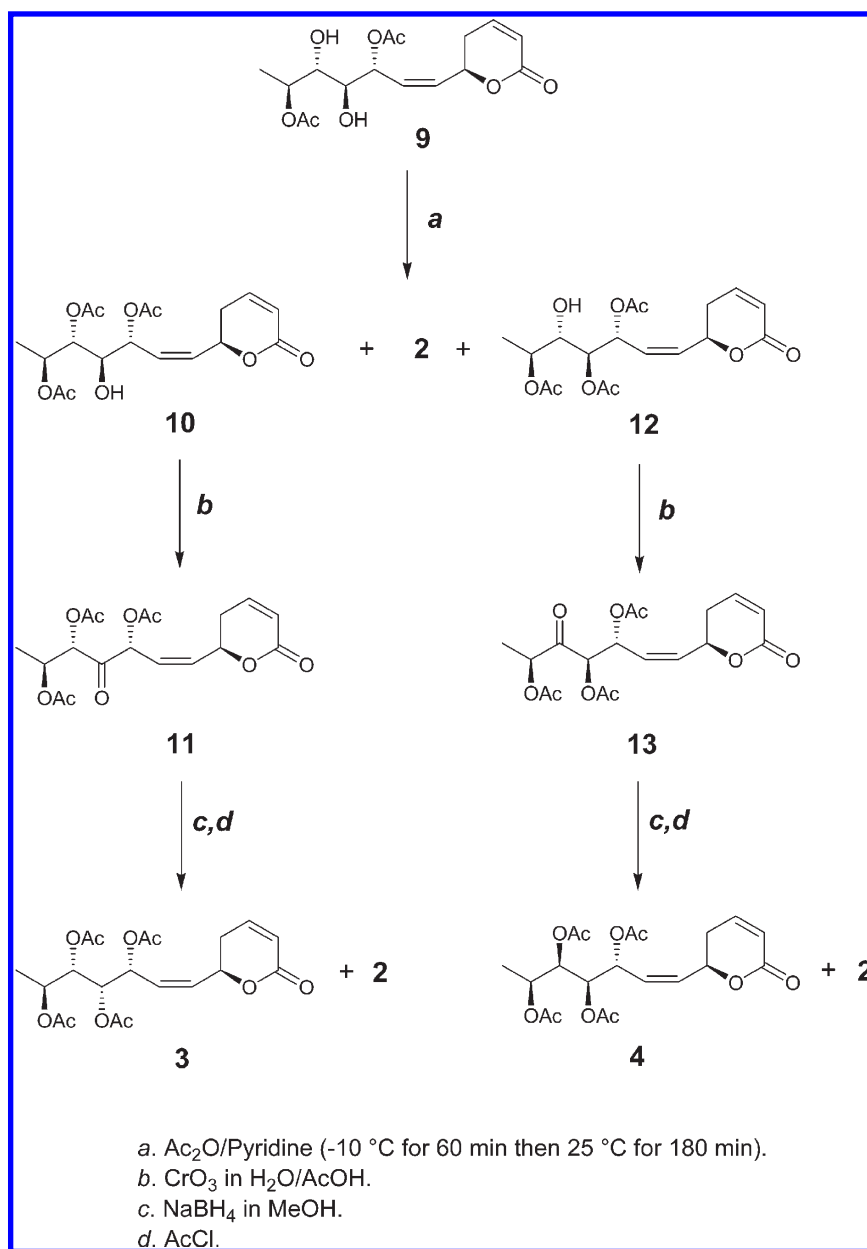
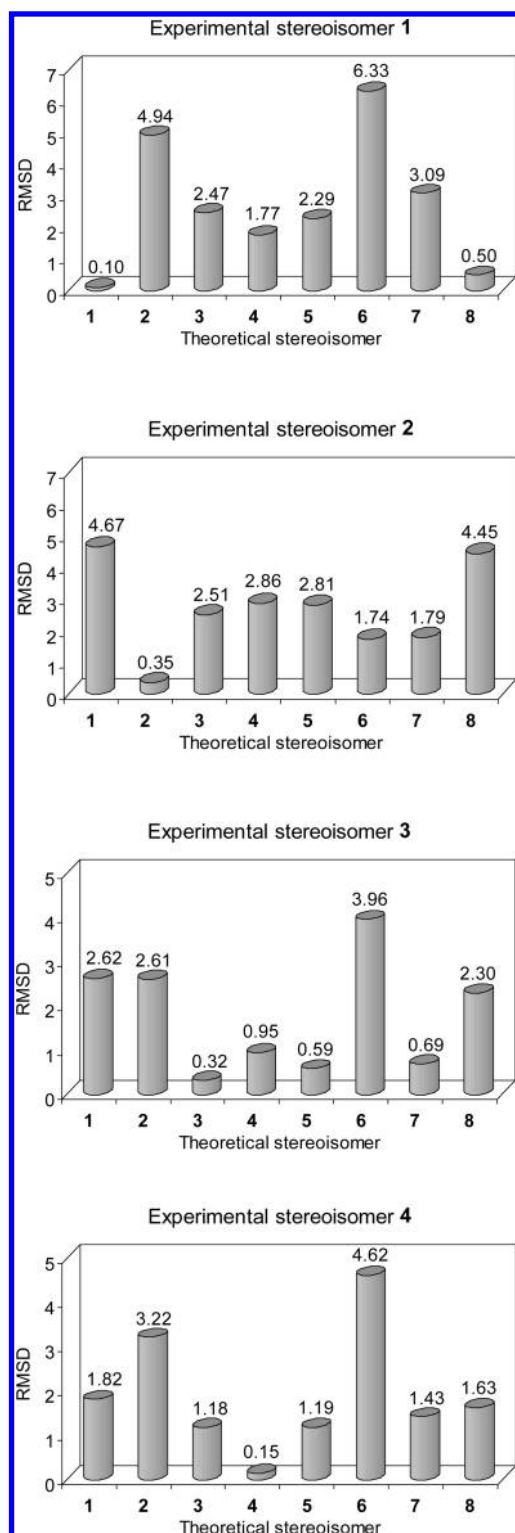


Figure 3. Epimerization reactions of synrotolide (9).

obtained for the molecular models of *5'*-*epi*-olguine (14)<sup>21</sup> and its 5-deacetoxy derivative (15)<sup>22</sup> (Figures S5 and S6, Supporting Information) as described above for spicigerolide (1) and stereoisomers (2–8) while the experimental values (Table 3) were also obtained by nonlinear fit of the <sup>1</sup>H NMR spectrum to the spectral parameters (Figures S7 and S8, Supporting Information). The calculated Boltzmann-averaged vicinal coupling constants found in the whole alkenyl chain were contrasted with the experimental ones summarized in Table 4 (see also Tables S9–S12, Supporting Information) giving rmsd of 0.25 Hz for 14 and 0.45 Hz for 15. After the chiral center at C-5' in both structures (14 and 15) was inverted for the formulation of their epimeric compounds, molecular models for olguine (16)<sup>23</sup> and its hypothetic deacetoxy derivative 17 were generated, respectively. Once the calculation procedures were applied, taking into account the incorrect alternative structures, the rmsd values for

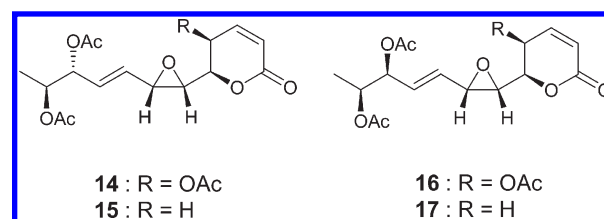
the complete set of couplings substantially increased up to 2.82 for 16 and 1.23 Hz for 17 for the whole chain (Table 4). Additionally, if the comparison is focused on the coupling constants at the C(4')–C(5')–C(6') fragment, where the differences between 14 and 16 or between 15 and 17 are found due to the change in chirality at C-5', the rmsd for the correct structures decreases to 0.03 Hz for 14 and 0.21 Hz for 15. In contrast, inversion of the chirality at C-5' to generate the incorrect stereoisomers causes this value to increase to 3.87 for 16 and 2.02 Hz for 17 (Table 4). The agreement between theoretical and experimental values for the stereochemically correct structures, indicated by small rmsd values, in conjunction with large rmsd values for the incorrect stereoisomers, demonstrated the efficacy of this computational protocol based on DFT <sup>1</sup>H–<sup>1</sup>H NMR coupling constant calculations as a stereochemical analytical tool to aid in structure elucidation of flexible organic



**Figure 4.** Comparison between experimental (1–4) and theoretical (1–8) coupling constants values using rmsd statistics. In the four cases, the minimum rmsd value is found when the correct theoretical stereoisomer matches the experimental one.

synthetic molecules and natural products with multiple chiral centers.

A fundamental task in molecular modeling of highly flexible compounds is the accurate estimation of their conformational



**Figure 5.** Structures of 5'-*epi*-olguine (14), olguine (16), and their 5-deacetoxy derivatives (15 and 17).

distribution. In the case of peracetylated acyclic derivatives of sugars, coplanar and fully extended *zigzag* conformations, but with exclusion of 1,3-parallel nonbonded oxygen–oxygen interactions, constitute the major contribution to their conformational equilibrium.<sup>16</sup> Analysis of the tridimensional structures of 1–4 revealed the presence of a few 1,3-oxygen–oxygen interactions and many weak hydrogen bonds, both factors playing an important role in their conformational behavior. The study of weak hydrogen bonds has been an area of intense discussion over recent years in organic structural chemistry, structural biology, and medicinal chemistry.<sup>17</sup> Experimental and theoretical evidence have confirmed that these bonds play important roles in the conformational behavior of organic molecules, in molecular recognition, and in the supramolecular architectures. Two of the above-mentioned interactions are presented in conformers 1-1 and 1-2 (Figure 2). Notably, the first weak hydrogen bond was established between the oxygen of the lactone group and the hydrogen atoms of the acetyloxy moiety at C-4' in both cases. The second was formed between the hydrogen atoms of the acetyloxy moiety at C-3' and the oxygen atom of carbonyl group at C-5'. Conformer 1-3 also displayed two interactions of this type but established between different pairs of atoms. The first interaction was found between the acidic *pseudo*-equatorial hydrogen at C-5 on the lactone ring and the carbonyl group of the acetyloxy moiety at C-3'. The second, between the vinylic hydrogen at C-2' and the carbonyl group of the acetyloxy moiety at C-5'. These weak hydrogen bonds were observed in the majority of the analyzed conformers of 1–4. From 141 intramolecular C–H···O interactions (Figure 6) observed in 71 conformers (Tables S1–S4 in Supporting Information), a total of 17 were established between acetyl methyl hydrogen atoms and the lactone carbonyl oxygen. The more populated weak hydrogen interactions corresponded to those between the *pseudo*-equatorial allylic hydrogen H-5 and the acetyl carbonyl oxygens, totaling 47. In eight cases, vinylic hydrogens H-1' or H-2' were found to interact with the acetyl carbonyl oxygen atoms located in the heptenyl side chain; in six cases, acetyl methyl hydrogen atoms presented weak hydrogen bonds with the lactone ether oxygen. Interactions between acetyl methyl hydrogen atoms and acetyl carbonyl oxygen took place 24 times with the second most frequent interaction occurring between allylic hydrogen H-6 and acetyl carbonyl or ether oxygen atoms, totaling 26. Finally, allylic hydrogen H-3' interacted with acetyl carbonyl oxygen atoms or the lactone ether oxygen in 13 occasions.

As observed in several polyoxygenated compounds,<sup>18</sup> two main factors that characterize weak hydrogen bonds are the distance between the two interacting atoms H···O, which must be shorter than the sum of their van der Waals radii (2.72 Å), and the C–H···O bond angles, which trend toward 180°. Figure 6 shows the scatter plot of C–H···O angles versus O···H

**Table 3.** Experimental  $^1\text{H}$  NMR Chemical Shifts, Multiplicities, and  $^3J_{\text{HH}}$  Coupling Constants for the Alkenyl Chain of  $5'$ -*epi*-Olguine (14) and  $5$ -Deacetoxy- $5'$ -*epi*-olguine (15)<sup>a</sup>

H	14	15
6	4.19 dd ( $J_{5,6} = 2.94$ , $J_{6,1'} = 8.40$ )	4.18 ddd ( $J_{\text{SproR},6} = 7.80$ , $J_{\text{SproS},6} = 6.0$ , $J_{6,1'} = 8.20$ )
1'	3.49 dd ( $J_{6,1'} = 8.40$ , $J_{1',2'} = 4.03$ )	3.32 dd ( $J_{6,1'} = 8.20$ , $J_{1',2'} = 4.10$ )
2'	3.68 dd ( $J_{1',2'} = 4.03$ , $J_{2',3'} = 4.36$ )	3.60 dd ( $J_{1',2'} = 4.10$ , $J_{2',3'} = 5.20$ )
3'	5.78 dd ( $J_{2',3'} = 4.36$ , $J_{3',4'} = 15.6$ )	5.78 dd ( $J_{2',3'} = 5.20$ , $J_{3',4'} = 15.80$ )
4'	5.86 dd ( $J_{3',4'} = 15.6$ , $J_{4',5'} = 5.70$ )	5.87 dd ( $J_{3',4'} = 15.80$ , $J_{4',5'} = 6.30$ )
5'	5.33 dd ( $J_{4',5'} = 5.70$ , $J_{5',6'} = 3.60$ )	5.35 dd ( $J_{4',5'} = 6.30$ , $J_{5',6'} = 4.10$ )
6'	5.06 dq ( $J_{5',6'} = 3.60$ , $J_{6',7'} = 6.30$ )	5.07 dq ( $J_{5',6'} = 4.10$ , $J_{6',7'} = 6.40$ )
Me-7'	1.16 d ( $J_{6',7'} = 6.30$ )	1.18 d ( $J_{6',7'} = 6.40$ )
OAc	2.03 s, 2.07 s, 2.14 s	2.04 s, 2.09 s

<sup>a</sup> Obtained by nonlinear fit of the experimental  $^1\text{H}$  NMR spectrum to the simulated spectrum generated by iteration of spectral parameters ( $^1\text{H}$  chemical shifts,  $J$ -couplings, and line width).

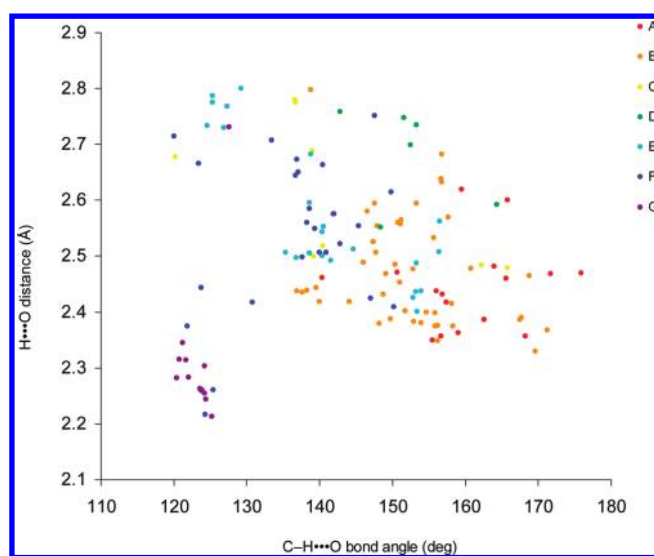
**Table 4.** Comparison between Theoretical and Experimental  $^1\text{H}$ – $^1\text{H}$  Coupling Constants for Compounds 14 and 15 in Contrast with Their C-5' Epimers 16 and 17

compound	$J_{6,1'}$	$J_{1',2'}$	$J_{2',3'}$	$J_{3',4'}$	$J_{4',5'}$	$J_{5',6'}$	rmsd <sup>a</sup>	rmsd <sup>b</sup>
theor 14 <sup>e</sup>	8.73	3.51	4.34	15.63	5.68	3.64	0.25 <sup>d</sup>	0.03 <sup>d</sup>
exp 14 <sup>e</sup>	8.40	4.03	4.36	15.60	5.70	3.60		
theor 16 <sup>e</sup>	8.78	3.54	8.52	15.55	8.49	8.31	2.82 <sup>f</sup>	3.87 <sup>f</sup>
theor 15 <sup>e</sup>	8.71	3.42	5.83	15.64	6.57	4.22	0.45 <sup>d</sup>	0.21 <sup>d</sup>
exp 15 <sup>e</sup>	8.20	4.10	5.20	15.80	6.30	4.10		
theor 17 <sup>e</sup>	8.56	3.40	5.59	15.41	7.73	6.58	1.23 <sup>f</sup>	2.02 <sup>f</sup>

<sup>a</sup> RMDS for the whole set of coupling constants. <sup>b</sup> RMDS for the coupling constants around the inverted chiral center at C-5' ( $J_{4',5'}$  and  $J_{5',6'}$ ). <sup>c</sup> Theoretical coupling constants in Hz calculated from the B3LYP/DGDZVP structures and Boltzmann averaged using the equation  $\sum_i J_i^j \times P^j$ , where  $J_i^j$  is the coupling constant value for each conformer and  $P^j$  is the population for the  $i$ th conformation (for full details see Supporting Information). The coupling constants were scaled with factors:  $f_{\text{H}(\text{sp}^3)\text{--H}(\text{sp}^3)} = 0.910$ ;  $f_{\text{H}(\text{sp}^3)\text{--H}(\text{sp}^2)} = 0.929$ , and  $f_{\text{H}(\text{sp}^3)\text{--H}(\text{sp}^3)} = 0.977$ . <sup>d</sup> Small rmsd value denotes correct stereoisomer. <sup>e</sup> In Hz, obtained by nonlinear fit of the experimental  $^1\text{H}$  NMR spectrum to the simulated spectrum generated by iteration of spectral parameters ( $^1\text{H}$  chemical shifts,  $J$ -couplings, and line width). <sup>f</sup> Large rmsd value denotes incorrect stereoisomer.

distances, each dot representing a weak hydrogen bond measured in the DFT structures of 1–4. The minimum observed  $\text{O}\cdots\text{H}$  distance was 2.33 Å in the present study, and a cutoff of 2.80 Å from previously described analysis was selected.<sup>19</sup> For C–H $\cdots$ O bond angles, which ranged between 110° and 180°, an evident C–H directionality was observed toward a maximum frequency between 150° and 160° weighted with  $1/\sin \theta$  as reported by Kroon.<sup>20</sup> A shorter interaction had a higher angle value as shown by the plotted values in Figure 6.

These preliminary results indicate that a detailed qualitative study of weak hydrogen bonds in polyketide structures, such as 1–8, merits further investigation because such interactions may play a relevant role in the conformational equilibrium of many bioactive substances. Conformers 1-3 and 1-4 (Figure 2) are representative examples of significant local minima where stabilizing weak hydrogen bonds coexist with the destabilizing 1,3 oxygen–oxygen interactions present in the O(3)–C(3)–C(4)–C(5)–O(5) fragment.



**Figure 6.** Scatter plot of C–H $\cdots$ O bond angles versus H $\cdots$ O distances for weak hydrogen bonds between (A) acetyl methyl hydrogens and lactone carbonyl oxygen; (B) the allylic hydrogen H- $S_{\text{eq}}$  and acetyl carbonyl oxygens; (C) vinylic hydrogens H-1' or H-2' and acetyl carbonyl oxygens; (D) acetyl methyl hydrogens and lactone ether oxygen; (E) acetyl methyl hydrogens and acetyl carbonyl oxygens; (F) allylic hydrogen H-6 and acetyl carbonyl or ether oxygens; and (G) allylic hydrogen H-3' and acetyl carbonyl oxygens or lactone ether oxygen.

## CONCLUSIONS

Stereochemical issues are subtle points in the structural assignment of active principles where a single inversion on the absolute stereochemistry of a chiral center could be responsible for the lack of biological activity, as previously demonstrated for spicigerolide (1) and some of its diastereoisomers. Therefore, the presented protocol for stereochemical analysis, based on the convergence between DFT calculated and experimental vicinal  $^1\text{H}$ – $^1\text{H}$  NMR coupling constants, can be of great utility as a predictive tool in the stereochemical assignment of chiral centers of biodynamic flexible polyketides. It also can be concluded that in 6-heptenyl-5,6-dihydro-2H-pyran-2-ones, weak hydrogen bonds may counterbalance the destabilizing effect of 1,3-oxygen–oxygen interactions present in some minimum energy conformers.



## EXPERIMENTAL SECTION

**General.** All melting points are uncorrected. Optical rotations were measured using a microcell of  $l = 1$  cm. HPLC separations were accomplished using a silica gel column (particle size, 10  $\mu\text{m}$ ; column size, 21.2 mm  $\times$  250 mm) on a multisolvent delivery system equipped with a refractive index detector connected to a computer that controlled the equipment, data acquisition, processing, and management of the chromatographic information. The  $^1\text{H}$  (500 MHz),  $^{13}\text{C}$  (125.7 MHz), COSY, HMQC, and HMBC experiments were measured in  $\text{CDCl}_3$  solution using tetramethylsilane as the internal standard. Positive-ion HRFABMS were recorded using a matrix of triethanolamine.

**Spicigerolide (1).** A natural product isolated from *Hyptis spicigera*. Physical constants and spectroscopic data were identical to those previously reported.<sup>10</sup> The  $^1\text{H}$  NMR spectral parameters obtained by spectral simulation are listed in Table 2.

**Partial Acetylation of Synrotolide.** Synrotolide (9)<sup>14</sup> (50 mg) was dissolved in a mixture of  $\text{Ac}_2\text{O}$ /pyridine (7.5  $\mu\text{L}$ /250  $\mu\text{L}$ ), and the mixture was stirred at  $-10$   $^\circ\text{C}$  for 60 min. Then a second addition of  $\text{Ac}_2\text{O}$ /pyridine was done with further stirring at room temperature for 180 min. The reaction mixture was evaporated to dryness under an Ar flow, and the residue was subjected to HPLC (hexane/EtOAc 1:4; flow rate = 5 mL/min) yielding 7.5 mg (11.5%) of peracetyl synrotolide (2,  $t_{\text{R}}$  20.7 min), 4.8 mg (8.1%) of  $5'$ -acetylsynrotolide (10,  $t_{\text{R}}$  25.1 min), 18.5 mg (31.3%) of  $4'$ -acetylsynrotolide (12,  $t_{\text{R}}$  26.8 min), and 4.9 mg of starting material (9,  $t_{\text{R}}$  35.9 min).

**Peracetylsynrotolide (2).** Physical constants and spectroscopic data were identical to those previously reported.<sup>14</sup> The  $^1\text{H}$  NMR spectral parameters obtained by spectral simulation are listed in Table 2.

**$5'$ -Acetylsynrotolide (10).** Oil, ORD  $[\alpha]_{589} +1$ ,  $[\alpha]_{578} +1$ ,  $[\alpha]_{546} +2$ ,  $[\alpha]_{436} +15$ ,  $[\alpha]_{365} +64$  ( $c$  0.59,  $\text{CHCl}_3$ );  $^1\text{H}$  NMR 6.89 (ddd,  $J = 9.8, 5.2, 3.2$  Hz, H-4), 6.04 (ddd,  $J = 9.7, 2.2, 1.4$  Hz, H-3), 5.88 (ddd,  $J = 11.3, 8.1, 1.0$  Hz, H-1'), 5.72 (ddd,  $J = 11.3, 9.4, 1.0$  Hz, H-2'), 5.53 (ddd,  $J = 9.4, 4.5, 1.0$  Hz, H-3'), 5.27 (dddd,  $J = 9.0, 8.1, 7.5, 1.0$  Hz, H-6), 5.23 (dq,  $J = 6.5, 3.9$  Hz, H-6'), 5.06 (dd,  $J = 7.2, 3.9$  Hz, H-5'), 3.92 (ddd,  $J = 7.2, 5.5, 4.5$  Hz, H-4'), 2.62 (d, 5.5, OH), 2.48–2.42 (m, 2 H, H-5), 2.12 (s, 3 H, OCOMe), 2.09 (s, 3 H, OCOMe), 2.01 (s, 3 H, OCOMe), 1.28 (d,  $J = 6.5$  Hz,  $\text{CH}_3$ -7');  $^{13}\text{C}$  NMR  $\delta$  170.2 ( $\times 2$ ) (OCOMe), 169.9 (OCOMe), 163.3 (C-2), 144.6 (C-4), 132.9 (C-1'), 126.9 (C-2'), 121.5 (C-3), 74.1 (C-6), 72.9 (C-5'), 72.0 (C-4'), 70.2 (C-3'), 69.0 (C-6'), 29.5 (C-5), 21.1 (OCOMe), 21.0 (OCOMe), 20.9 (OCOMe), 14.6 (C-7'); EIMS (20 eV)  $m/z$  384  $[\text{M}]^+$  (0.3), 204  $[384 - 3\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2]^+$  (21), 195  $[384 - \text{C}_8\text{H}_{13}\text{O}_5]^+$  (18), 177  $[195 - \text{H}_2\text{O}]^+$  (27), 165 (20), 154 (38), 153 (39), 148 (20), 136 (67), 135  $[195 - \text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2]^+$  (62), 129 (41), 118 (20), 108 (28), 107 (47). HRFABMS  $m/z$  407.1315  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  (calcd for  $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}_9\text{Na}$  requires 407.1313).

**$4'$ -Acetylsynrotolide (12).** White crystals, mp 152–154  $^\circ\text{C}$ , ORD  $[\alpha]_{589} +1$ ,  $[\alpha]_{578} +1$ ,  $[\alpha]_{546} +5$ ,  $[\alpha]_{436} +18$ ,  $[\alpha]_{365} +77$  ( $c$  1.26,  $\text{CHCl}_3$ );  $^1\text{H}$  NMR 6.90 (ddd,  $J = 9.7, 4.8, 3.5$  Hz, H-4), 6.04 (ddd,  $J = 9.7, 1.8, 1.8$  Hz, H-3), 5.90 (ddd,  $J = 11.3, 8.1, 0.7$  Hz, H-1'), 5.80 (ddd,  $J = 10.0, 2.8, 0.7$  Hz, H-3'), 5.73 (ddd,  $J = 11.3, 10.0, 1.1$  Hz, H-2'), 5.38 (dddd,  $J = 9.5, 8.1, 7.1, 1.1$  Hz, H-6), 5.08 (dd,  $J = 9.3, 2.8$  Hz, H-4'), 4.90 (dq,  $J = 6.6, 2.6$  Hz, H-6'), 3.80 (ddd,  $J = 9.3, 5.5, 2.6$  Hz, H-5'), 2.82 (d, 5.5, OH), 2.49–2.40 (m, 2 H, H-5), 2.12 (s, 3 H, OCOMe), 2.08 (s, 3 H, OCOMe), 2.03 (s, 3 H, OCOMe), 1.24 (d,  $J = 6.6$  Hz, H-7');  $^{13}\text{C}$  NMR  $\delta$  170.9 (OCOMe), 169.7 ( $\times 2$ ) (OCOMe), 163.6 (C-2), 144.9 (C-4), 132.8 (C-1'), 125.8 (C-2'), 121.3 (C-3), 74.2 (C-6), 72.3 (C-4'), 72.0 (C-6'), 71.2 (C-5'), 68.5 (C-3'), 29.5 (C-5), 21.2 (OCOMe), 20.9 ( $\times 2$ ) (OCOMe), 14.2 ( $\text{CH}_3$ -7'); EIMS (20 eV)  $m/z$  384  $[\text{M}]^+$  (0.7), 204  $[384 - 3\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2]^+$  (28), 178 (39), 177 (24), 154 (23), 153 (38), 149 (22), 148 (23), 136 (76), 135 (57), 129 (28), 118 (21), 108 (25), 107 (51). HRFABMS  $m/z$  407.1321  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  (calcd for  $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}_9\text{Na}$  requires 407.1313).

**Oxidation of Monoacetyl Derivatives.**  $4'$ -Acetylsynrotolide (12, 18 mg) was dissolved in AcOH (800  $\mu\text{L}$ ) and treated with  $\text{CrO}_3/\text{H}_2\text{O}$  (18 mg/1600  $\mu\text{L}$ ) for 2 h. The solution was diluted with  $\text{H}_2\text{O}$  and extracted with  $\text{Et}_2\text{O}$ . The organic phase was worked up as usual. Removal of the solvent left a residue that was analyzed by HPLC (hexane/EtOAc 1:4; flow rate = 5 mL/min) to afford 6 mg (33.5%) of  $4'$ -acetyl- $5'$ -oxosynrotolide (13,  $t_{\text{R}}$  19.4 min). The same conditions were employed with  $5'$ -acetylsynrotolide (10, 5 mg) to yield 3 mg (61%) of  $5'$ -acetyl- $4'$ -oxosynrotolide (11).

**$5'$ -Acetyl- $4'$ -oxosynrotolide (11).** Oil; ORD  $[\alpha]_{589} +10$ ,  $[\alpha]_{578} +12$ ,  $[\alpha]_{546} +29$ ,  $[\alpha]_{436} +51$ ,  $[\alpha]_{365} +60$  ( $c$  0.60,  $\text{CHCl}_3$ );  $^1\text{H}$  NMR 6.92 (ddd,  $J = 9.8, 5.2, 2.7$  Hz, H-4), 6.07 (ddd,  $J = 9.8, 2.6, 1.1$  Hz, H-3), 5.96 (ddd,  $J = 11.1, 8.4, 1.1$  Hz, H-1'), 5.91 (dd,  $J = 8.8, 1.1$  Hz, H-3'), 5.67 (ddd,  $J = 11.1, 8.8, 1.2$  Hz, H-2'), 5.61 (d,  $J = 3.9$  Hz, H-5'), 5.32 (dddd,  $J = 11.1, 8.4, 5.2, 1.2$  Hz, H-6), 5.26 (dq,  $J = 6.6, 3.9$  Hz, H-6'), 2.53 (dddd,  $J = 18.5, 5.2, 5.2, 1.1$  Hz, H-5eq), 2.45 (dddd,  $J = 18.5, 11.1, 2.7, 2.6$  Hz, H-5ax), 2.20 (s, 3 H, OCOMe), 2.19 (s, 3 H, OCOMe), 2.04 (s, 3 H, OCOMe), 1.25 (d,  $J = 6.6$  Hz,  $\text{CH}_3$ -7'). EIMS (20 eV)  $m/z$  382  $[\text{M}]^+$  (1), 165 (34), 153 (18), 149 (32), 148 (48), 135 (32), 115 (21). HRFABMS  $m/z$  405.1164  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  (calcd for  $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_9\text{Na}$  requires 405.1156).

**$4'$ -Acetyl- $5'$ -oxosynrotolide (13).** Oil;  $[\alpha]_{589} +10$ ,  $[\alpha]_{578} +13$ ,  $[\alpha]_{546} +16$ ,  $[\alpha]_{436} +30$  ( $c$  0.30,  $\text{CHCl}_3$ );  $^1\text{H}$  NMR 6.87 (ddd,  $J = 9.5, 5.5, 2.5$  Hz, H-4), 6.03 (ddd,  $J = 9.5, 2.5, 1.0$  Hz, H-3), 5.87 (ddd,  $J = 10.0, 3.5, 0.5$  Hz, H-3'), 5.85 (dddd,  $J = 11.0, 8.5, 0.5$  Hz, H-1'), 5.70 (d,  $J = 3.5$  Hz, H-4'), 5.68 (ddd,  $J = 11.0, 10.0, 1.0$  Hz, H-2'), 5.32 (dddd,  $J = 11.0, 8.5, 5.0, 1.0$  Hz, H-6), 5.27 (q,  $J = 7.0$  Hz, H-6'), 2.41 (dddd,  $J = 18.5, 5.5, 5.0, 1.0$  Hz, H-5eq), 2.34 (dddd,  $J = 18.5, 11.0, 2.5, 2.5$  Hz, H-5ax), 2.18 (s, 3 H, OCOMe), 2.13 (s, 3 H, OCOMe), 2.01 (s, 3 H, OCOMe), 1.36 (d,  $J = 7.0$  Hz,  $\text{CH}_3$ -7');  $^{13}\text{C}$  NMR  $\delta$  205.3 (C-5'), 170.5 (OCOMe), 170.0 (OCOMe), 169.8 (OCOMe), 163.6 (C-2), 144.6 (C-4), 133.4 (C-1'), 125.0 (C-2'), 121.5 (C-3), 75.0 (C-4'), 73.8 (C-6), 73.0 (C-6'), 67.3 (C-3'), 29.2 (C-5), 20.8 (OCOMe), 20.7 (OCOMe), 20.5 (OCOMe), 16.1 (C-7'); EIMS (20 eV)  $m/z$  382  $[\text{M}]^+$  (0.2), 165 (40), 153 (24), 149 (40), 148 (53), 147 (31), 136 (20), 135 (36), 115 (23). HRFABMS  $m/z$  405.1159  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  (calcd for  $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_9\text{Na}$  requires 405.1156).

**Preparation of Peracetyl- $4'$ -epi-synrotolide (3).** A solution of  $5'$ -acetyl- $4'$ -oxosynrotolide (11, 1.5 mg) in MeOH (500  $\mu\text{L}$ ) was treated with a solution of  $\text{NaBH}_4/\text{MeOH}$  (500  $\mu\text{g}$  in 500  $\mu\text{L}$ ) for 1 h. The reaction mixture was dissolved in water and extracted with EtOAc. The organic phase was worked up as usual. The residue (0.9 mg) was treated with acetyl chloride (100  $\mu\text{L}$ ) at room temperature for 90 min. The reaction mixture was evaporated under a  $\text{N}_2$  flow and subjected to HPLC ( $n$ -hexane/EtOAc, 1:1; flow rate = 0.5 mL/min) affording peracetyl synrotolide 2 (0.5 mg, 30.1%) and peracetyl derivative 3 (0.4 mg, 24.1%,  $t_{\text{R}} = 23.2$  min) as a colorless oil, ORD  $[\alpha]_{589} +18$ ,  $[\alpha]_{578} +20$ ,  $[\alpha]_{546} +31$ ,  $[\alpha]_{436} +42$ ,  $[\alpha]_{365} +53$  ( $c$  0.50,  $\text{CHCl}_3$ );  $^1\text{H}$  NMR (See Table 2); EIMS (20 eV)  $m/z$  366  $[\text{M} - \text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2]^+$  (0.5), 230 (40.0), 205 (29), 204 (30), 178 (62), 153 (42), 149 (34), 137 (30), 136 (100), 135  $[366 - \text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{O}_6]^+$  (63.3), 129 (91.1), 109 (22.0). HRFABMS  $m/z$  449.1415  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  (calcd for  $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_{10}\text{Na}$  requires 449.1418).

**Preparation of Peracetyl- $5'$ -epi-synrotolide (4).** A solution of  $4'$ -acetyl- $5'$ -oxosynrotolide (13, 2 mg) in MeOH (500  $\mu\text{L}$ ) was treated with a solution of  $\text{NaBH}_4$  (500  $\mu\text{g}$ ) in MeOH (500  $\mu\text{L}$ ) for 1 h. The reaction mixture was dissolved in water and extracted with EtOAc. The organic phase was worked up as usual. The residue (1.9 mg) was treated with acetyl chloride (100  $\mu\text{L}$ ) at room temperature for 90 min. The reaction mixture was evaporated under a  $\text{N}_2$  flow and subjected to HPLC as above to afford peracetyl synrotolide (2, 1.2 mg, 52%) and peracetyl derivative 4 (0.8 mg, 37%,  $t_{\text{R}} = 23.2$  min) obtained as a colorless oil; ORD  $[\alpha]_{589} +32$ ,  $[\alpha]_{578} +33$ ,  $[\alpha]_{546} +48$ ,  $[\alpha]_{436} +97$ ,  $[\alpha]_{365} +210$  ( $c$  0.60,  $\text{CHCl}_3$ );  $^1\text{H}$  NMR (See Table 2);  $^{13}\text{C}$  NMR  $\delta$  170.5 (OCOMe), 170.3 ( $\times 2$ ) (OCOMe), 169.4 (OCOMe), 163.6

(C-2), 144.0 (C-4), 134.4 (C-1'), 126.3 (C-2'), 121.8 (C-3), 73.7 (C-6), 71.7 (C-5'), 70.7 (C-4'), 68.6 (C-6'), 66.1 (C-3'), 29.9 (C-5), 21.0 (OCOMe), 20.8 ( $\times 2$ ) (OCOMe), 20.6 (OCOMe), 16.3 (C-7'); EIMS (20 eV)  $m/z$  366 [426 - C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup> (0.7), 230 (40), 205 (20), 204 (65), 178 (69), 165 (30), 159 (23), 153 (55), 149 (24), 137 (27), 136 (100), 135 [426 - C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>O<sub>6</sub> - C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup> (75), 130 (23), 129 (66), 118 (39), 117 (23), 108 (31), 107 (43). HRFABMS  $m/z$  449.1395 [M + Na]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>20</sub>H<sub>26</sub>O<sub>10</sub>Na requires 449.1418).

**Extraction and Isolation of *epi*-Olguine and Deacetyl-*epi*-olguine.** The entire plant of *Hyptis spicigera* with inflorescences and fruits were collected in Municipio Emiliano Zapata, Dos Ríos (at 940 m. a.s.l.), Veracruz, Mexico in November 2009. The plant was identified by one of us (A.C.H.-R.) and a voucher specimen (Hernández-Rojas 118) was deposited in the herbarium of the Instituto de Ecología, Xalapa, Veracruz, Mexico (accession number XAL0000246). Also, voucher specimens were archived at the Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (sample code: HR-118-XAL) and in the botanical Collection of Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México (voucher 127318). The air-dried whole plant of *H. spicigera* (1400 g) was ground and extracted with CHCl<sub>3</sub> overnight (4  $\times$  6 L). The macerate was concentrated in vacuo (54 g) and fractionated using silica gel vacuum-liquid chromatography eluting with hexane/CHCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub>/Me<sub>2</sub>CO, and Me<sub>2</sub>CO/MeOH. The column was then washed with 100% MeOH. Altogether, 10 pooled fractions were collected (80 fractions, 500 mL each). Fraction F5 (500 mg, eluted with CHCl<sub>3</sub>/Me<sub>2</sub>CO) was resolved by HPLC on silica column with an isocratic elution of hexane/AcOEt (1:1) and a flow rate of 9 mL/min. Eluates across the peaks with  $t_R$  values of 13.9 min (peak I), and 17.1 min (peak II) were collected by the technique of heart cutting and independently reinjected (sample injection 500  $\mu$ L, concentration 0.1 mg/mL) in the apparatus operating in the recycle mode to achieve total homogeneity after six consecutive cycles employing the same instrumental conditions described above. These techniques afforded compound **14** (236 mg) from peak I and compound **15** (100 mg) from peak II.

**5'-*epi*-Olguine (**14**).** Natural product isolated from *Hyptis spicigera* (see Supporting Information); mp 75–76 °C; ORD [ $\alpha$ ]<sub>589</sub> +127, [ $\alpha$ ]<sub>578</sub> +133, [ $\alpha$ ]<sub>546</sub> +153, [ $\alpha$ ]<sub>436</sub> +286, [ $\alpha$ ]<sub>365</sub> +521 ( $c$  0.29, CHCl<sub>3</sub>). NMR data were identical to those previously reported.<sup>21</sup>

**5-Deacetoxy-5'-*epi*-olguine (**15**).** Natural product isolated from *Hyptis spicigera* (see Supporting Information); mp 147–149 °C; ORD [ $\alpha$ ]<sub>589</sub> -64, [ $\alpha$ ]<sub>578</sub> -67, [ $\alpha$ ]<sub>546</sub> -76, [ $\alpha$ ]<sub>436</sub> -122 ( $c$  0.1, CHCl<sub>3</sub>). NMR data were identical to those previously reported.<sup>22</sup>

**Molecular Modeling Calculations.** Molecular building and the initial conformational search were carried out in the Spartan '04 program<sup>24</sup> using the MMFF94 force-field calculation. The conformational search was performed through a systematic search protocol in which the torsion angles C(2')-C(3')-C(4')-C(5'), C(3')-C(4')-C(5')-C(6'), and C(4')-C(5')-C(6')-C(7') in the heptenyl moiety were rotated in steps of 120°, starting at 60° for each central bond, and the torsion angles of the C(1')=C(2')-C(3')-C(4') and C(5)-C(6)-C(1')=C(2') dihedral angles were rotated in steps of 180°, generating a total of 108 initial conformers for each stereoisomer (**1–8**) with an overall total number of conformers of 864. The acetyloxy H-C<sub>sp3</sub>-O-C<sub>sp</sub> and C<sub>sp3</sub>-O-C=O dihedral angles were initially set to 0° and explored within a range from +60° to -60°. Molecular potential energy of all structures was minimized to an rmsd gradient of  $1 \times 10^{-6}$  kcal/mol on the potential energy surface. Some out of the 108 conformers achieved for each stereoisomer were ruled out due of severe intramolecular hindering steric interactions. The remaining conformers of **1–8** (83, 99, 100, 97, 89, 94, 59, and 66, respectively) were geometrically optimized without restrictions using the hybrid density functional theory (B3LYP) method in conjunction with the DGDZVP basis set. The stationary points (optimized structures) were used to

calculate the thermochemical parameters, and the IR frequencies were estimated at 298 K and 1 atm. Magnetic shielding tensors were calculated with the gauge-including atomic orbital (GIAO) method, and total NMR spin-spin coupling constants (SSCC)  $J$  (Hz) were calculated as the summation of the Fermi contact (FC), diamagnetic spin-orbit (DSO), spin-dipolar (SD), and paramagnetic spin-orbit (PSO) which were calculated from B3LYP/DGDZVP optimized structures by using the *spinspin* option during the NMR jobs. All DFT calculations, including NMR, were carried out with the Gaussian 03 program on a Linux operating system loaded in a cluster, which includes 1368 processors at 2.6 GHz and a RAM memory of 3 terabytes. For each job, a maximum of four processors was used and each conformer required three different DFT jobs: geometric optimizations, frequency calculations, and SSCC estimations. The total CPU time consumed in this work was approximately  $5 \times 10^4$  h. The Gibbs free energy equation ( $\Delta G = -RT \ln K$ ) was used to obtain the conformational population, taking into account a cyclic equilibrium at 298 K between the selected conformers of **1–8** (9, 21, 29, 12, 10, 10, 25, and 13, respectively) within a 0.0–3.0 kcal/mol range with respect to each global minimum. The Gibbs free energy values  $\Delta G^\circ$  were obtained from the vibrational frequency calculations as the sum of electronic and thermal free energies. Calculations using the triple-zeta basis set DGTZVP were also carried out with the nine minimum energy conformers of spicigerolide (**1**) affording similar total energy values as those obtained with DGDZVP basis set, but emphasizing the free energy differences. The calculated coupling constant values were essentially similar, leading to practically the same results. The calculation time using DGTZVP was considerably higher (almost twice the total CPU time) than that consumed with DGDZVP (see Table S32 in Supporting Information).

**Spectral Simulation.** All experimental  $^3J_{HH}$  were obtained by nonlinear fit of the  $^1H$  NMR spectrum to the spectral parameters using the MestRe-C 3.0 program (Mestrelab Research, Santiago de Compostela, Spain).

## ■ ASSOCIATED CONTENT

**Supporting Information.** NMR spectra of compounds **1–4** and **10–13**. Relevant conformers and simulated vs experimental spectra of **14** and **15**. DFT B3LYP/DGDZVP total free energies, population, and DFT  $^1H$ - $^1H$  coupling constants of stereoisomers **1–8** and **14–17**. Calculated IR frequencies and NMR shielding tensors of stereoisomers **1–8**, calculated H-C-C-H dihedral angles, DFT B3LYP/DGTZVP energies, and DFT B3LYP/DGTZVP  $^1H$ - $^1H$  coupling constants of **1**. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*E-mail: [ccerda@cinvestav.mx](mailto:ccerda@cinvestav.mx); [pereda@servidor.unam.mx](mailto:pereda@servidor.unam.mx).

## ■ ACKNOWLEDGMENT

This research was partially supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (grant 104887). F.L.-V. and G.A.S.-O. are grateful to CONACyT for postgraduate and graduate student scholarships, respectively. Authors are deeply indebted to Professor Michael T. Davies Coleman, Rhodes University, Grahamstown, South Africa for his generous donation of synrotolide. Thanks are due to Georgina Duarte and Margarita Guzmán (Facultad de Química, UNAM) for recording mass spectra. Geometry optimizations and coupling constant calculations were

performed in the KanBalam computer cluster at Departamento de Supercómputo, Dirección General de Servicios de Cómputo Académico, UNAM.

## REFERENCES

- (1) Bifulco, G.; Dambruoso, P.; Gomez-Paloma, L.; Riccio, R. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 3744–3779.
- (2) Folkers, G.; Yarim, M.; Pospisil, P. In *Chirality in Drug Research*; Francotte, E., Lindner, W., Eds.; Wiley-VCH Verlag: Weinheim, 2006; Vol. 33, pp 323–340.
- (3) (a) Sarotti, A. M.; Pellegrinet, S. C. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 7254–7260. (b) Smith, S. G.; Goodman, J. M. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 4597–4607.
- (4) Mendoza-Espinoza, J. A.; López-Vallejo, F.; Fragoso-Serrano, M.; Pereda-Miranda, R.; Cerda-García-Rojas, C. M. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 700–708.
- (5) Tuttle, T.; Kraka, E.; Wu, A.; Cremer, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 5093–5107.
- (6) Klepach, T. E.; Carmichael, I.; Serianni, A. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 9781–9793.
- (7) (a) Bagno, A.; Rastrelli, F.; Saielli, G. *Chem.—Eur. J.* **2006**, *12*, 5514–5525. (b) Manzo, E.; Gavagnin, M.; Bifulco, G.; Cimino, P.; Di Micco, S.; Ciavatta, M. L.; Guo, Y. W.; Cimino, G. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 9970–9978. (c) Galasso, V.; Kovac, B.; Modelli, A. *Chem. Phys.* **2007**, *335*, 141–154. (d) Plaza, A.; Piacente, S.; Perrone, A.; Hamed, A.; Pizza, C.; Bifulco, G. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 12201–12209.
- (8) (a) Davies-Coleman, M. T.; Rivett, D. E. A. Naturally occurring 6-substituted 5,6-dihydro- $\alpha$ -pyrones. In *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*; Herz, W., Grisebach, H., Kirby, G. W., Tamm, Ch., Eds.; Springer: New York, 1989; Vol. 55, pp 1–35. (b) Collet, L. A.; Davies-Coleman, M. T.; Rivett, D. E. A. Naturally occurring 6-substituted 5,6-dihydro- $\alpha$ -pyrones. In *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*; Herz, W., Falk, H., Kirby, G. W., Moore, R. E., Tamm, Ch., Eds.; Springer: New York, 1998; Vol. 75, pp 182–209.
- (9) (a) Pereda-Miranda, R.; Hernández, L.; Villavicencio, M. J.; Novelo, M.; Ibarra, P.; Chai, H.; Pezzuto, J. M. *J. Nat. Prod.* **1993**, *56*, 583–593. (b) Pereda-Miranda, R. In *Bioactive Natural Products from Traditionally Used Mexican Plants*; Arnason, J. T., Mata, R., Romeo, J. T., Eds.; *Phytochemistry of Medicinal Plants*; Plenum: New York, 1995; pp 83–112. (c) Fragoso-Serrano, M.; Gibbons, S.; Pereda-Miranda, R. *Planta Medica* **2005**, *71*, 278–280.
- (10) Pereda-Miranda, R.; Fragoso-Serrano, M.; Cerda-García-Rojas, C. M. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 47–53.
- (11) Hoffmann, H. M. R.; Rabe, J. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1985**, *24*, 94–110.
- (12) (a) Usui, T.; Watanabe, H.; Nakayama, H.; Tada, Y.; Kanoh, N.; Kondoh, M.; Asao, T.; Takio, K.; Watanabe, H.; Nishikawa, K.; Kitahara, T.; Osada, H. *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 799–806. (b) Yoshida, M.; Matsui, Y.; Ikarashi, Y.; Usui, T.; Osada, H.; Wakasugi, H. *Anticancer Res.* **2007**, *27*, 729–736.
- (13) (a) Falomir, E.; Murga, J.; Ruiz, P.; Carda, M.; Marco, A.; Pereda-Miranda, R.; Fragoso-Serrano, M.; Cerda-García-Rojas, C. M. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 5672–5676. (b) Falomir, E.; Murga, J.; Carda, M.; Marco, A. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 539–541. (c) Georges, Y.; Ariza, X.; Garcia, J. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 2008–2012. (d) Chakraborty, T. K.; Purkait, S. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 5502–5504. (e) Srihari, P.; Kumar, P.; Subbarayudu, K.; Yadav, J. S. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 6977–6981. (f) Krishna, R. P.; Reddy, S. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 3995–3999. (g) García-Fortanet, J.; Murga, J.; Carda, M.; Marco, J. A. *Arkivoc* **2005**, 175–188.
- (14) Davies-Coleman, M. T.; English, R. B.; Rivett, D. E. A. *Phytochemistry* **1987**, *26*, 1497–1499.
- (15) Diez, E.; Casanueva, J.; San Fabián, J.; Esteban, A. L.; Galache, M. P.; Barone, V.; Peralta, J. E.; Contreras, R. H. *Mol. Phys.* **2005**, *103*, 1307–1326.
- (16) (a) Masamune, S.; Ma, P.; Moore, R. E.; Fujiyoshi, T.; Jaime, C.; Osawa, E. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1986**, 261–263. (b) Osawa, E.; Imai, K.; Fujiyoshi-Yoneda, T.; Jaime, C.; Ma, P.; Masamune, S. *Tetrahedron* **1991**, *47*, 4579–4590. (c) Horton, D.; Wander, J. D. *Carbohydr. Res.* **1970**, *15*, 271–284. (d) Velasco, D.; Castells, J.; López-Calahorra, F.; Jaime, C. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 3526–3530. (e) Mills, J. A. *Aust. J. Chem.* **1974**, *27*, 1433–1446. (f) López-Calahorra, F.; Velasco, D.; Castells, J.; Jaime, C. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 3530–3536.
- (17) (a) Desiraju, G. R. *Chem. Commun.* **2005**, 2995–3001. (b) Steiner, T. *Chem. Commun.* **1997**, 727–734. (c) Steiner, T. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 48–76.
- (18) Kroon, J.; Kanters, J. A.; Van Duijneveldt-Van de Rijdt, J. G. C. M.; Van Duijneveldt, F. B.; Vliegthart, J. A. *J. Mol. Struct.* **1975**, *24*, 109–129. (b) Ceccarelli, C.; Jeffrey, G. A.; Taylor, R. *J. Mol. Struct.* **1981**, *70*, 255–271.
- (19) Taylor, R.; Kennard, O. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 5063–5070.
- (20) Kroon, J.; Kanters, J. A. *Nature* **1974**, *248*, 667–669.
- (21) Lu, G.-H.; Wang, F.-P.; Pezzuto, J. M.; Tam, T. C. M.; Williams, I. D.; Che, C.-T. *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 425–427.
- (22) (a) Delgado, G.; Pereda-Miranda, R.; Romo de Vivar, A. *Heterocycles* **1985**, *23*, 1869–1872. (b) Pereda-Miranda, R.; García, M.; Delgado, G. *Phytochemistry* **1990**, *29*, 2971–2974.
- (23) Alemany, A.; Márquez, C.; Pascual, C.; Valverde, S.; Perales, A.; Fayos, J.; Martínez-Ripoll, M. *Tetrahedron Lett.* **1979**, 3579–3582.
- (24) Kong, J.; White, C. A.; Krylov, A. I.; Sherrill, C. D.; Adamson, R. D.; Furlani, T. R.; Lee, M. S.; Lee, A. M.; Gwaltney, S. R.; Adams, T. R.; Ochsenfeld, C.; Gilbert, A. T. B.; Kedziora, G. S.; Rassolov, V. A.; Maurice, D. R.; Nair, N.; Shao, Y.; Besley, N. A.; Maslen, P. E.; Dombroski, J. P.; Daschel, H.; Zhang, W.; Korambath, P. P.; Baker, J.; Byrd, E. F. C.; Van Voorhis, T.; Oumi, M.; Hirata, S.; Hsu, C.-P.; Ishikawa, N.; Florian, J.; Warshel, A.; Johnson, B. G.; Gill, P. M. W.; Head-Gordon, M.; Pople, J. A. *J. Comput. Chem.* **2000**, *21*, 1532–1548.