



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

CONFIGURACIÓN ABSOLUTA Y ANÁLISIS CONFORMACIONAL DE 6-  
HEPTENIL-5,6-DIHIDRO-2*H*-PIRAN-2-ONAS DE ESPECIES DEL GÉNERO  
*HYPTIS* (LABIADAS)

**TESIS**

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA

M. en C. LUCERO MARICELA MARTÍNEZ FRUCTUOSO

Dr. ROGELIO GREGORIO PEREDA MIRANDA  
FACULTAD DE QUÍMICA

MÉXICO CDMX, MAYO 2019



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: Dra. María Luisa Villareal Ortega

Vocal: Dr. Francisco Hernández Luis

Vocal: Dra. Karina Martínez Mayorga

Vocal: Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar

Secretario: Dr. Jose Alberto Rivera Chávez

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: \_\_\_\_\_

M. en C. Lucero Maricela Martínez Fructuoso.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco el apoyo brindado a las siguientes personas e instituciones:

Al CONACyT (número de becario 288963) por la beca otorgada.

A la Dirección General de Asuntos de Personal Académico (IN215016; IN208019) y al CONACyT (proyecto CB220535) por el financiamiento parcial de esta investigación.

A los miembros del Comité tutor –los Drs. Federico de Ríó y Mario Figueroa– y al jurado asignado por sus observaciones, las cuales me permitieron enriquecer la presente disertación.

A la Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación (USAI), Facultad de Química, UNAM, por el registro de los espectros de resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas.

Al Dr. Carlos Martín Cerda García-Rojas del Departamento de Química del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional por la asesoría en los cálculos teóricos de RMN-DFT y en la determinación de la rotación óptica y registro de algunos espectros de resonancia magnética nuclear.

A la Dra. Mabel Clara Fragosó Serrano por su apoyo y dedicación durante la realización de la presente investigación.

A la Dra. Suzana G. Leitão (Faculdade de Farmacia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil) por compartir el material vegetal de la especie brasileña *Hyptis monticola*.

Al Dr. Rogelio Pereda Miranda por permitirme trabajar en su grupo de investigación y por la dedicación brindada durante la dirección de la presente investigación.



# CONTENIDO

<b>1. Introducción</b>	5
<b>2. Antecedentes</b>	9
2.1 La familia Lamiaceae	9
2.2 Género <i>Hyptis</i>	9
2.3 <i>Hyptis pectinata</i> e <i>Hyptis monticola</i>	11
2.4 Fitoquímica de especies del género <i>Hyptis</i>	14
2.5 Dihidro-2 <i>H</i> -piran-2-onas	17
2.5.1 Dihidro-2 <i>H</i> -piran-2-onas sustituidas en la posición C-4	18
2.5.2 Dihidro-2 <i>H</i> -piran-2-onas sustituidas en la posiciones C-5 y C-6	21
2.5.2.1 5,6-Dihidro-2 <i>H</i> -piran-2-onas aisladas de especies del género <i>Hyptis</i>	24
2.6 Química computacional	25
2.6.1 La resonancia magnética nuclear y el análisis conformacional	28
2.7 Referencias	34
<b>3. Justificación</b>	45
<b>4. Objetivos</b>	47
<b>5. Capítulo I: Structure Elucidation, Conformation, and Configuration of Cytotoxic 6-Heptenyl-5,6-dihydro-2<i>H</i>-pyran-2-ones from <i>Hyptis</i> Species and their Molecular Docking to <math>\alpha</math>-Tubulin</b>	49
5.1 Introduction	51
5.2 Results and discussion	54
5.3 Experimental section	73
5.4 References	83
5.5 Información suplementaria	87
<b>6. Capítulo II: Aislamiento y elucidación estructural de 2(5<i>H</i>)-furanonas y sustancias aromáticas</b>	185
6.1 Introducción	185
6.2 Desarrollo experimental	188
6.2.1 Determinación de constantes espectroscópicas	188
6.2.2 Material vegetal	188
6.2.3 Extracción del material vegetal	188
6.2.4 Técnicas cromatográficas	189
6.2.5.1 Cromatografía en columna abierta	189
6.2.5.2 Cromatografía en capa fina (CCF)	189
6.2.5.3 Cromatografía en contracorriente (HSCCC)	189
6.2.5.4 Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)	190
6.2.6 Fraccionamiento primario	191
6.2.7 Fraccionamiento secundario	192
6.2.8 Análisis y purificación mediante cromatografía de líquidos	194
6.2.9 Hidrólisis de la montecólida A (14) y pectinólida I (15)	202
6.2.10 Reacción de acetilación de 1 y 4	202
6.2.11 Ensayo de citotoxicidad	202
6.3 Resultados y discusión	205
6.3.1 Estudio fitoquímico	205
6.3.2 Elucidación estructural de las lactonas 1-5	206
6.3.3 Elucidación estructural de las sustancias aromáticas	212
6.4 Referencias	220
6.5 Información suplementaria	223
<b>7. Conclusiones</b>	247
<b>8. Publicaciones y presentaciones en congresos</b>	251

## LISTA DE FIGURAS

### Introducción

**Figura 1.** Plantas con compuestos con actividad antitumoral. 6

### Antecedentes

**Figura 2.** Morfología de *Hyptis pectinata*. 12

**Figura 3.** Morfología de *Hyptis monticola*. 14

**Figura 4.** Terpenoides aislados de especies del género *Hyptis*. 15

**Figura 5.** Lignanoides aislados de especies del género *Hyptis*. 16

**Figura 6.** Flavonoides y fenilpropanoides aislados de especies del género *Hyptis*. 17

**Figura 7.** Pironetina aislada de *Streptomyces* sp. 18

**Figura 8.** Dihidro-2*H*-piran-2-onas sustituidas en la posición 4. 20

**Figura 9.** Dihidro-2*H*-piran-2-onas sustituidas en las posiciones 5 y 6. 23

**Figura 10.** 5,6-dihidro-2*H*-piran-2-onas aisladas del género *Hyptis*. 25

**Figura 11.** Estructuras de productos naturales corregidas a través de química computacional. 31

**Figura 12.** Estructuras originales y corregidas por DFT de las 5,6-dihidro-2*H*-piran-2-onas de especies del género *Hyptis*. 33

### Capítulo I

**Figure 1.** Chemical structure of pironetin (above), a representative example of cytotoxic 5,6-dihydro-2*H*-pyran-2-ones, and minimum energy molecular model of  $\alpha$ -tubulin with pironetin covalently bonded at Lys352 (below). Pironetin incorporation alters the H8 and M-loop tertiary structure of  $\alpha$ -tubulin. 52

**Figure 2.** RMSD values between theoretical and experimental  $^3J_{H,H}$  for epimers **3** and **5** in gas phase (blue) and solution (red). 61

**Figure 3.** The four most relevant conformers of pectinolide C (**3**) modeled in CHCl<sub>3</sub> solution, showing the stabilizing intramolecular hydrogen bond formed between the hydroxy hydrogen at C-5 in the lactone ring and the carbonyl group of the acetyloxy substituent at C-3'. 62

**Figure 4.** The four most relevant conformers of pectinolide J (**5**) modeled in CHCl<sub>3</sub> solution. 62

**Figure 5.** Structure of the most frequent and stable pectinolide K (**6**)-tubulin complex. Tubulin  $\alpha$ -subunit (cyan);  $\beta$ -subunit (blue). The distance between the Lys352 amino group (red) and the  $\beta$  carbon atom of the  $\alpha,\beta$ -unsaturated lactone was 5.30 Å, close enough to favor a Michael addition. Docking energy ( $E_f$  kcal/mol) and hydrogen bond distances are indicated. 72

### Capítulo II

**Figura 1.** La bútenólida más simple, 2-furanona. 185

**Figura 2.** Butenólidas de origen natural. 185

**Figura 3.** 2(5*H*)-furanonas aisladas de especies del género *Hyptis*. 186

**Figura 4.** 2(5*H*)-furanonas de origen natural. 187

<b>Figura 5.</b> Purificación de la fracción 85-87 a través de la técnica de reciclaje.	197
<b>Figura 6.</b> CLAR a nivel preparativo de la fracción 39-51.	197
<b>Figura 7.</b> CLAR a nivel preparativo de la fracción 19-25.	197
<b>Figura 8.</b> CLAR a nivel analítico de la fracción 35-38.	198
<b>Figura 9.</b> CLAR a nivel analítico de la fracción A9.	198
<b>Figura 10.</b> CLAR a nivel analítico de la fracción F4.	198
<b>Figura 11.</b> Purificación del pico 2 de la fracción F4 a través de la técnica de reciclaje.	199
<b>Figura 12.</b> Ensayo de citotoxicidad con el método de la SRB en la línea celular MCF-7 (carcinoma de mama). La figura muestra la toxicidad producida por diferentes controles positivos (CI <sub>50</sub> µg/mL): vinblastina, 0.047; adriamicina, 0.644; colchicina, 0.016; camptotecina, >0.00064; elipticina, 0.359.	204
<b>Figura 13.</b> Pirona adicional y furanonas aisladas de <i>H. monticola</i> e <i>H. pectinata</i> .	205
<b>Figura 14.</b> Sustancias aromáticas aisladas de las plantas <i>H. monticola</i> e <i>H. pectinata</i> .	206
<b>Figura 15.</b> Correlaciones químicas entre la pectinólida A y las montecólidas.	207
<b>Figura 16.</b> Mecanismo para la apertura de la δ-lactona y formación de la 2(5 <i>H</i> )-furanona.	208
<b>Figura 17.</b> Correlación química entre la pectinólida I ( <b>15</b> ) y las 2(5 <i>H</i> )-furanonas.	211
<b>Figura 18.</b> Espectro de masas mediante (+)-ESI de la 3-acetoxi-aromadendrina ( <b>8</b> ).	214
<b>Figura 19.</b> Fragmentación en (+)-electrospray de la 3-acetoxi-aromadendrina ( <b>8</b> ).	215
<b>Figura S1.</b> Espectro de <sup>1</sup> H RMN (400 MHz) de la montecólida C ( <b>1</b> ) en CD <sub>3</sub> OD.	223
<b>Figura S2.</b> Espectro de <sup>13</sup> C RMN (100 MHz) de la montecólida C ( <b>1</b> ) en CD <sub>3</sub> OD.	224
<b>Figura S3.</b> Espectro 2D <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H COSY de la montecólida C ( <b>1</b> ) en CD <sub>3</sub> OD.	225
<b>Figura S4.</b> Espectro 2D <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C HSQC de la montecólida C ( <b>1</b> ) en CD <sub>3</sub> OD.	226
<b>Figura S5.</b> Espectro de <sup>1</sup> H RMN (400 MHz) de la montecólida D ( <b>2</b> ) en CDCl <sub>3</sub> .	
<b>Figura S6.</b> Espectro de <sup>13</sup> C RMN (100 MHz) de la montecólida D ( <b>2</b> ) en CDCl <sub>3</sub> .	227
<b>Figura S7.</b> Espectro bidimensional <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H COSY de la montecólida D ( <b>2</b> ) en CDCl <sub>3</sub> .	228
<b>Figura S8.</b> Espectro bidimensional <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C HSQC de la montecólida D ( <b>2</b> ) en CDCl <sub>3</sub> .	229
<b>Figura S9.</b> Espectro de <sup>1</sup> H RMN (400 MHz) de la pectinólida N ( <b>3</b> ) en CDCl <sub>3</sub> .	230
<b>Figura S10.</b> Espectro de <sup>13</sup> C RMN (100 MHz) de la pectinólida N ( <b>3</b> ) en CDCl <sub>3</sub> .	231
<b>Figura S11.</b> Espectro de <sup>1</sup> H RMN (400 MHz) de la pectinólida O ( <b>4</b> ) en CDCl <sub>3</sub> .	232
<b>Figura S12.</b> Espectro de <sup>13</sup> C RMN (100 MHz) de la pectinólida O ( <b>4</b> ) en CDCl <sub>3</sub> .	233
<b>Figura S13.</b> Espectro de <sup>1</sup> H RMN (400 MHz) de la pectinólida P ( <b>5</b> ) en CDCl <sub>3</sub> .	234
<b>Figura S14.</b> Espectro de <sup>13</sup> C RMN (100 MHz) de la pectinólida P ( <b>5</b> ) en CDCl <sub>3</sub> .	235
<b>Figura S15.</b> Espectro de <sup>1</sup> H RMN (400 MHz) del dihidrokaempferol ( <b>6</b> ) en CD <sub>3</sub> OD.	236
<b>Figura S16.</b> Espectro de <sup>13</sup> C RMN (100 MHz) del dihidrokaempferol ( <b>6</b> ) en CD <sub>3</sub> OD.	237
<b>Figura S17.</b> Espectro de <sup>1</sup> H RMN (400 MHz) de cartamidina ( <b>7</b> ) en CD <sub>3</sub> OD.	238
<b>Figura S18.</b> Espectro de <sup>13</sup> C RMN (100 MHz) de la cartamidina ( <b>7</b> ) en CD <sub>3</sub> OD.	239
<b>Figura S17.</b> Espectro de <sup>1</sup> H RMN (400 MHz) de 2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> -acetoxi-aromadendrina ( <b>8</b> ) en CD <sub>3</sub> OD.	240 241
<b>Figura S18.</b> Espectro de <sup>13</sup> C RMN (100 MHz) de la 2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> -acetoxi-aromadendrina ( <b>8</b> ) en CD <sub>3</sub> OD.	242
<b>Figura S17.</b> Espectro de <sup>1</sup> H RMN (400 MHz) de 2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> -acetoxi-dihidrogosipetina ( <b>9</b> ) en CD <sub>3</sub> OD.	243
<b>Figura S18.</b> Espectro de <sup>13</sup> C RMN (100 MHz) de la 2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> -acetoxi-dihidrogosipetina ( <b>9</b> ) en CD <sub>3</sub> OD.	244
<b>Figura S19.</b> Espectro de <sup>1</sup> H RMN (400 MHz) del ácido rosmarínico ( <b>10</b> ) en CD <sub>3</sub> OD.	245



**Figura S20.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz) del ácido rosmarínico (**10**) en  $\text{CD}_3\text{OD}$ . 246

## LISTA DE CUADROS

### Antecedentes

<b>Cuadro 1.</b> Actividad farmacológica de especies del género <i>Hyptis</i> .	10
<b>Cuadro 2.</b> Taxonomía de <i>H. pectinata</i> e <i>H. monticola</i> .	13
<b>Cuadro 3.</b> Ejemplos de enantiómeros mostrando diferentes actividades biológicas.	30

### Capítulo I

<b>Table 1.</b> $^1\text{H}$ NMR Data of Natural Products <b>4-10</b> (400 MHz in $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ in ppm, and $J$ in Hz).	56
<b>Table 2.</b> $^{13}\text{C}$ NMR Data of Natural Products <b>4-10</b> (100 MHz in $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ in ppm).	57
<b>Table 3.</b> $^1\text{H}$ NMR Chemical Shift Data for Signals from ( <i>S</i> )- and ( <i>R</i> )-Ester Derivatives <b>11</b> , <b>13</b> and <b>16</b> (300 MHz in $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ in ppm).	58
<b>Table 4.</b> Summary <sup>a</sup> of Theoretical <sup>b</sup> and Experimental <sup>c</sup> Chemical Shifts (in ppm) for the C-4' Protons of <b>3</b> and <b>5</b> .	60
<b>Table 5.</b> Summary <sup>a</sup> of Theoretical <sup>b</sup> and Experimental <sup>c</sup> $^3J_{\text{H,H}}$ Coupling Constants for Compound <b>2-5</b> , <b>10</b> , and <b>14</b> .	65
<b>Table 6.</b> $^1\text{H}$ NMR Data of Derivatives <b>14</b> and <b>17-19</b> (300 MHz in $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ in ppm, and $J$ in Hz)	69
<b>Table 7.</b> $^{13}\text{C}$ NMR Data of Derivatives <b>14</b> and <b>17-19</b> (75 MHz in $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ in ppm, and $J$ in Hz).	69
<b>Table 8.</b> Cytotoxicity of Natural Compounds <b>1-10</b> for Three Cancer Cell Lines.	72

### Capítulo II

<b>Cuadro 1.</b> Columnas utilizadas en el equipo de CLAR.	190
<b>Cuadro 2.</b> Fraccionamiento primario de <i>H. pectinata</i> .	192
<b>Cuadro 3.</b> Fraccionamiento secundario de las fracciones A9, A12 y B8.	194
<b>Cuadro 4.</b> Condiciones utilizadas en CLAR para <i>H. monticola</i> e <i>H. pectinata</i> .	196
<b>Cuadro 5.</b> Valores de $^1\text{H}$ NMR para los productos naturales <b>1-5</b> (400 MHz en $\text{CDCl}_3$ y $\text{CD}_3\text{OD}$ <sup>a</sup> , $\delta$ en ppm, $J$ en Hz).	211
<b>Cuadro 6.</b> Valores de $^{13}\text{C}$ NMR para los productos naturales <b>1-5</b> (100 MHz en $\text{CDCl}_3$ y $\text{CD}_3\text{OD}$ <sup>a</sup> , $\delta$ en ppm).	212
<b>Cuadro 7.</b> Citotoxicidad de las 2( <i>5H</i> )-furanonas aisladas de <i>H. pectinata</i> e <i>H. Monticola</i> .	212
<b>Cuadro 8.</b> Valores de $^1\text{H}$ NMR para los productos naturales <b>5-7</b> (400 MHz en $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ en ppm, $J$ en Hz).	218
<b>Cuadro 9.</b> Valores de $^1\text{H}$ NMR para los productos naturales <b>5-7</b> (400 MHz en $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ en ppm, $J$ en Hz).	218

## LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
[ $\alpha$ ]	Rotación específica
B3LYP	Funcional de intercambio Becke, funcional de correlación Lee-Yang-Parr con tres parámetros
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo deuterado
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano
CHCl <sub>3</sub>	Cloroformo
Cys316	Residuo de cisteína 316
COSY	Correlation Spectroscopy
<i>m</i> CPBA	Ácido meta cloroperbenzoico
$\Delta G$	Energía libre de Gibbs
$\delta$	Desplazamiento químico
d	Doblete
dd	Doble de doble
ddd	Doble de doble de doble
DFT	Teoría de funcionales de la densidad
DGDZVP	Conjunto de bases doble zeta para electrones de valencia más funciones de polarización
DMSO	Dimetil Sulfóxido
ECD	Dicroísmo circular electrónico
ESIMS	Espectrometría de masas por ionización en electrospray
AcOEt	Acetato de etilo
GIAO	Orbitales atómicos gauge incluidos
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
HCT-15	Carcinoma de colon
HeLa	Carcinoma de cérvix
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
HRESIMS	Espectrometría de masas por ionización en electrospray de alta resolución
HSCCC	Cromatografía en contracorriente
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence
Hz	Hertz
IC <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria media
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
<sup>3</sup> <i>J</i> <sub>H,H</sub>	Constante de acoplamiento vecinal
KOH	Hidróxido de potasio
Lys352	Residuo de lisina 352
MCF-7	Carcinoma de mama
<i>m/z</i>	Relación masa carga
MeOH	Metanol
CD <sub>3</sub> OD	Metanol deuterado

MMFF94  
(*S*)- y (*R*)-MTPA-Cl  
<sup>1</sup>H NMR/RMN  
<sup>13</sup>C NMR/RMN  
NOE  
ORD  
*P*  
PCM  
ppm  
RMSD  
SRB  
*t*  
TMS  
*t<sub>r</sub>*  
UPLC

Merck Molecular Force Field 94  
(*S*)- o (*R*)- $\alpha$ -metoxi- $\alpha$ -(trifluorometil)fenilacetil  
Resonancia magnética nuclear de hidrógeno  
Resonancia magnética nuclear de carbono 13  
Efecto Nuclear Overhauser  
Dispersión óptica rotatoria  
Fracción molar  
Polarizable continuum model  
Partes por millón  
Root-mean-square deviation  
Sulforrodamina B  
Triplete  
Tetrametilsilano  
Tiempo de retención  
Cromatografía de líquidos de ultra resolución

## RESUMEN

La actividad farmacológica de un metabolito depende de su estructura tridimensional, por ello es importante determinarla para comprender las interacciones involucradas con las biomoléculas que sirvan como sus ligandos. La determinación de la configuración absoluta de los centros quirales de una molécula se puede llevar a cabo a través de métodos experimentales como la rotación óptica, la difracción de rayos X, el dicroísmo circular, el dicroísmo circular vibracional y la derivatización con ésteres de Mosher; además de métodos computacionales, como la Teoría de Funcionales de la Densidad (DFT), a través de los cuales se puede realizar un análisis conformacional para obtener las constantes de acoplamiento vecinales H,H ( $^3J_{H,H}$ ) y los desplazamientos químicos teóricos ( $\delta$ ) para los núcleos de protón y carbono en la resonancia magnética nuclear (RMN), considerando condiciones para una fase gaseosa o en solución con el fin de comparar los valores teóricos obtenidos con los experimentales y poder distinguir entre un grupo de epímeros.

El presente trabajo describe el aislamiento, la purificación, la caracterización estructural, el análisis conformacional por DFT, la evaluación del potencial citotóxico y el análisis de acoplamiento molecular de las 5,6-dihidro-2*H*-piran-2-onas aisladas de las especies *Hyptis pectinata* e *Hyptis monticola*, compuestos a los cuales se les ha reportado actividad citotóxica y antimicrobiana. El anillo de  $\delta$ -lactona- $\alpha,\beta$ -insaturada es el responsable de la actividad biológica por medio de su interacción con la subunidad alfa del dímero de tubulina a través de una adición tipo Michael que sucede entre el nitrógeno terminal del residuo de lisina 352 y el doble enlace de la  $\delta$ -lactona- $\alpha,\beta$ -insaturada; los grupos funcionales presentes en la cadena lateral interacciones por puentes de hidrógeno con los grupos funcionales de los aminoácidos cercanos dándole estabilidad al complejo formado. Además, de estas especies de *Hyptis* también se aislaron, purificaron, caracterizaron y evaluó el potencial citotóxico de compuestos del tipo 2(5*H*)-furanonas, relacionadas con las 5,6-dihidro-2*H*-piran-2-onas, junto con seis estructuras flavonoides y un fenilpropanoide previamente aislados de otras especies de la familia Lamiaceae.

Utilizando diversas técnicas cromatográficas como columna abierta y la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) se obtuvieron de *H. pectinata* tres 5,6-dihidro-2*H*-piran-2-onas previamente descritas conocidas como pectinólida A-C y cinco compuestos novedosos, pectinólida I-M junto con tres estructuras tipo 2(5*H*)-furanonas. A partir de la cromatografía en contra corriente, de *H. monticola* se obtuvieron dos compuestos biogénicamente relacionados con las pectinólidas, la montecólida A y B, una nueva 2(5*H*)-furanona y dos flavonoides previamente reportados. La configuración absoluta de los compuestos obtenidos se determinó a través del registro de sus propiedades quirópticas, ésteres de Mosher y el análisis de las constantes de acoplamiento vecinales H,H ( $^3J_{H,H}$ ) en RMN. Se realizó el análisis conformacional de la pectinólida C y J, correspondiente a un par enantiomérico, para confirmar la configuración absoluta de los centros quirales presentes en la cadena alifática que sustituye la posición C-6 del anillo de  $\delta$ -lactona- $\alpha,\beta$ -insaturada de estos compuestos a través de un protocolo basado en la comparación de las constantes de acoplamiento vecinales calculadas por DFT B3LYP/DGDZVP y experimentales (RMN). Este protocolo también se aplicó para las pectinólidas B e I y la montecólida B, junto con el derivado obtenido de la epoxidación y posterior apertura en medio ácido de la pectinólida K.

Se evaluó el potencial citotóxico de las 5,6-dihidro-2*H*-piran-2-onas y las 2(5*H*)-furanonas aisladas frente a tres líneas celulares derivadas de tumores humanos; las 2(5*H*)-furanonas y las pectinólidas L y M no presentaron actividad citotóxica, el resto de los compuestos presentaron una actividad moderada que se encuentra en un rango de IC<sub>50</sub> 0.1-9.9  $\mu$ M. Se seleccionaron las pectinólidas C y K, las montecólidas A y B y el epóxido derivado obtenido de la epoxidación de la pectinólida K para el análisis de acoplamiento molecular (“docking”). Este análisis puso en evidencia la alta afinidad de las 5,6-dihidro-2*H*-piran-2-onas con la subunidad  $\alpha$  del dímero de tubulina, a través de una adición tipo Michael de las 5,6-dihidro-2*H*-piran-2-onas. Esta interacción puede representar un mecanismo para justificar el potencial citotóxico de estas moléculas flexibles.

## ABSTRACT

The pharmacological activity of a metabolite depends on its three-dimensional structure, so it is important to determine its configuration in order to understand the interactions involved with the biomolecules that serve as ligands. The absolute configuration for the chiral centers of a molecule can be determined through experimental methods such as optical rotation, X-ray diffraction, circular dichroism, circular vibrational dichroism, and derivatization with Mosher esters; in addition to computational methods, such as the Density Functional Theory (DFT), through which a conformational analysis can be performed to obtain the theoretical vicinal coupling constants  $H,H$  ( $^3J_{H,H}$ ) and chemical shifts ( $\delta$ ) for proton and carbon in nuclear magnetic resonance (NMR). After considering conditions for a gaseous phase or in solution, it is possible to compare theoretical values with experimental values to be able to distinguish between a group of epimers.

The present work describes the isolation, purification, structural characterization, conformational analysis by DFT, evaluation of the cytotoxic potential and molecular coupling analysis of 5,6-dihydro-2*H*-pyran-2-ones isolated from the species *Hyptis pectinata* and *Hyptis monticola*, compounds to which cytotoxic and antimicrobial activity have been reported. The  $\delta$ -lactone- $\alpha,\beta$ -unsaturated ring is responsible for the biological activity by means of its interaction with the alpha subunit of the tubulin dimer through a Michael-type addition that occurs between the terminal nitrogen of the lysine residue 352 and the double bond of the  $\delta$ -lactone- $\alpha,\beta$ -unsaturated, the functional groups present in the side chain interact by hydrogen bonds with the functional groups of nearby amino acids giving stability to the complex. In addition, from these *Hyptis* species, 2(5*H*)-furanones, related to 5,6-dihydro-2*H*-pyran-2-ones, were also isolated, purified, characterized and their cytotoxic potential evaluated, together with six flavonoids and one phenylpropanoid, which represented structures previously isolated from other species of the family Lamiaceae.

By the application of various chromatographic techniques, such as open column and high performance liquid chromatography (HPLC), three previously described 5,6-dihydro-2*H*-pyran-2-ones, the known pectinolide A-C, were obtained from *H. pectinata* in addition to

five novel compounds, pectinolide I-M, together with three 2-(5*H*)-furanones. The use of countercurrent chromatography afforded two compounds, biogenetically related to pectinolides from *H. monticola* extracts: montecolide A and B, in addition to a new 2-(5*H*)-furanone. Their absolute configuration was determined through the registration of their chiroptical properties, Mosher esters and the analysis of the vicinal coupling constants H,H ( $^3J_{H,H}$ ) in NMR. The conformational analysis of pectinolide C and J corresponding to an enantiomeric pair was performed to confirm the absolute configuration of the substituent groups present in the aliphatic chain that substitutes the C-6 position of the  $\delta$ -lactone- $\alpha,\beta$ -unsaturated ring of these compounds through a protocol based on the comparison of the vicinal coupling constants calculated by DFT (B3LYP/DGDZVP) and experimental (NMR). This protocol was also applied for the pectinolide B, I, montecolide B and the derivative obtained from the epoxidation and subsequent opening in acid medium of pectinolide K.

The cytotoxic potential of the 5,6-dihydro-2*H*-pyran-2-ones and the 2(5*H*)-furanones isolated against three cell lines derived from human tumors was evaluated; the 2(5*H*)-furanones and the pectinolides L and M did not present cytotoxic activity, the rest of the compounds presented a moderate activity that was found in a range of IC<sub>50</sub> 0.1-9.9  $\mu$ M. Pectinolide C, K, montecolide A, B and the epoxide derivative obtained from the epoxidation of pectinolide K were selected for a molecular docking analysis in which a high affinity of the 5,6-dihydro-2*H*-pyran-2-ones with the  $\alpha$  subunit of the tubulin dimer was demonstrated through a Michael-type addition, which may be a possible mechanism contributing to the cytotoxic potential of these small and flexible molecules.

## 1. INTRODUCCIÓN

La utilidad de las plantas medicinales para el tratamiento de diversos padecimientos es un hecho bien conocido desde siempre por todas las sociedades. La OMS define a las plantas medicinales como cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyos principios puedan servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos. En el caso de México, éste ocupa el quinto lugar respecto al número de especies de plantas y se estiman alrededor de 7000 especies con algún tipo de uso, de las cuales 4000 se han identificado y registrado con atributos medicinales.<sup>1</sup>

Cáncer es un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo; también se habla de tumores malignos o neoplasias malignas y una característica definitoria de estos términos es la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos, un proceso que se denomina metástasis, la cual es la principal causa de muerte por cáncer. El cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo, en el 2015 ocasionó 8.8 millones de muertes.<sup>2</sup> El tratamiento de estas enfermedades se basa principalmente en la cirugía, radiación y quimioterapia, sin embargo, algunos productos de origen vegetal también desempeñan un papel importante.<sup>3,4</sup>

Una variedad de compuesto derivados de plantas han sido utilizados exitosamente en el tratamiento del cáncer, uno de los más significativos ejemplos son los alcaloides de la vinca aislados de *Catharantus roseus*; la vincristina, vinblastina y vindesina fueron los primeros alcaloides de la vinca con actividad antitumoral identificada. El mecanismo de acción de estos compuestos se lleva a cabo a través de la unión específica con la subunidad  $\beta$ -tubulina y bloquea la habilidad de polimerización con la  $\alpha$ -tubulina en microtúbulos lo cual lleva a la muerte celular por la inhibición de la mitosis.<sup>3,4</sup> Metabolitos como la maitansina, un macrólido aislado de plantas del género *Maytenus*, desestabilizan los microtúbulos al unirse a la  $\beta$ -tubulina e inhibir las interacciones longitudinales entre los dímeros de tubulina; la colchicina inhibe la formación del microtúbulo previniendo principalmente previniendo el cambio conformacional de la forma “curva” del dímero de tubulina en su forma libre a una



estructura “recta” en los microtúbulos.<sup>5</sup> Otros ejemplos de compuestos con actividad antitumoral derivado de productos naturales son el etoposido, una epipodofilotoxina inhibidora de la topoisomerasa II aislada de *Podophyllum peltatum* y *Podophyllum emodi*. Los taxanos como el paclitaxel, aislado inicialmente de *Taxus brevifolia*, y el docetaxel, un taxano semisintético obtenido a partir del 10-desacetilbaccatina III aislado de *Taxus baccata*, muestran una actividad citotóxica sobre la tubulina manteniendo el microtúbulo polimerizado y protegiéndolo de su despolimerización,<sup>3</sup> al igual que la pelorusida A y la laulimalida aisladas de esponjas marinas *Cacospongia mycofijensis* y *Mycale hentscheli* respectivamente.<sup>5</sup>



**Figura 1.** Plantas productoras de compuesto con actividad antitumoral.

A diferencia de los compuestos anteriormente mencionados, las 5,6-dihidro-2*H*-piran-2-onas, aisladas de diversos microorganismos y plantas, son los únicos compuestos que actúan sobre la subunidad  $\alpha$  del dímero de tubulina desestabilizando los microtúbulos al unirse y perturbar la hélice H8 y el bucle T7 de la  $\alpha$ -tubulina que inhibe las interacciones tubulina-tubulina longitudinales<sup>5</sup>. De las plantas del género *Hyptis* se han aislado una variedad de 5,6-

dihidro-2*H*-piran-2-onas, por ejemplo, las brevipólidas aisladas de *Hyptis brevipes* que desarrollaron una citotoxicidad moderada en contra de la línea celular de carcinoma nasofaríngeo<sup>6</sup> y las pectinólidas aisladas *H. pectinata* que exhibieron una IC<sub>50</sub> menor a 4 µg/mL frente a diversas líneas celulares.<sup>7</sup>

En el presente estudio, se realizó una investigación química de dos plantas del género *Hyptis* provenientes de México y del suroeste de Brasil; este género tiene una importante relevancia dentro de la medicina tradicional latinoamericana donde se le ha dado usos para el tratamiento de malestares gastrointestinales, pulmonares y cutáneos, así como para el tratamiento de dolores reumáticos, musculares y calambres; también se ha demostrado una variedad de actividades farmacológicas entre las que resaltan las propiedades antiinflamatorias, antifúngicas y antimicrobianas, incluyendo la actividad citotóxica relacionada con las 5,6-dihidro-2*H*-piran-2-onas y los compuestos de tipo lignano. El presente trabajo se enfocó en el aislamiento, purificación y caracterización de nuevos compuestos citotóxicos, a partir de los cuales y utilizando una combinación de correlaciones químicas, mediciones quirópticas y análisis de resonancia magnética nuclear (RMN) de sus ésteres de Mosher se confirmó su configuración absoluta. Mediante el empleo de cálculos DFT-RMN para determinar los desplazamientos químicos y las constantes de acoplamiento  $J_{H-H}$  fue posible la diferenciación epimérica de los compuestos aislados. Se realizó el acoplamiento molecular para determinar la alta afinidad por el sitio de unión en la  $\alpha$ -tubulina para explicar el potencial citotóxico de estas moléculas pequeñas y altamente flexibles.



## 2. ANTEDECENTES

### 2.1 La familia Lamiaceae.

La familia Lamiaceae está constituida por 236 géneros y 7173 especies, son plantas aromáticas y tienen importancia económica en varias partes del mundo ya que muchas se usan como condimento (*Origanum*, *Thymus* y *Mentha*), para la perfumería (*Lavandula*, *Pogostemon* y *Salvia*) y para usos ornamentales (*Coleus*, *Salvia* y *Scutellaria*). Presentan una distribución cosmopolita, en México se encuentran ampliamente distribuidas principalmente a lo largo de las zonas montañosas y de manera primordial en el eje volcánico transversal. Los géneros más representativos en el país son *Salvia*, *Scutellaria*, *Stachys* e *Hyptis* con más de 35 especies cada uno.<sup>8</sup>

El nombre original de la familia es Labiatae (labiadas) debido a que típicamente las flores tienen los pétalos fusionados en un labio superior e inferior. Las hojas emergen de manera opuesta, cada par en ángulo recto con el anterior (llamado decusado) o verticiladas (conjunto de tres o más hojas que crecen al mismo nivel). Los tallos son frecuentemente cuadrados en la sección transversal. Las flores son bilateralmente simétricas con cinco pétalos fusionados y cinco sépalos también fusionados. Son usualmente bisexuales y verticilustradas (flores en racimo).<sup>9</sup> Los constituyentes medicinales de las especies de la familia Lamiaceae incluyen principalmente aceites esenciales con propiedades antibacterianas, antivirales, carminativas y antiespasmolíticas.<sup>10</sup>

### 2.2 Género *Hyptis*.

El género *Hyptis* es rico en especies de gran importancia farmacológica alrededor del mundo y su uso se remonta a las civilizaciones mesoamericanas. El manuscrito del siglo XVI “*Historia Plantarum Novae Hispanae*” del médico español Francisco Hernández menciona a especies del género *Hyptis* con el nombre de “huistsiquia” (purépecha) y “xoxouhcaptli” (náhuatl) para el tratamiento de disentería, tumores, reumatismo, llagas e infecciones oculares.<sup>6</sup> De este género se conocen 280 especies en el mundo, de las cuales 35 se encuentran

en México y 17 son endémicas y se distribuyen principalmente en las partes tropicales del sur y a lo largo de ambas costas.<sup>8</sup>

La mayoría de los usos tradicionales que se le han dado a las plantas de este género están relacionados con el tratamiento de padecimientos gastrointestinales, cutáneos, respiratorios, así como para el tratamiento de la fiebre y el dolor.<sup>11</sup> Otros usos descritos para estas especies están relacionados con el tratamiento de la gota utilizando preparados de la planta *H. fasciculata*<sup>12</sup>; especies como *H. mutabilis* e *H. suaveolens* han sido utilizadas para el tratamiento contra el paludismo<sup>13</sup> y la segunda para el tratamiento de la tuberculosis.<sup>14</sup> Las especies *H. oblongifolia* e *H. albida* han sido utilizadas como repelentes de insectos<sup>15,16</sup> e *H. spicigera* se ha usado tradicionalmente como insecticida.<sup>17</sup> Algunos de estos usos, y muchos otros, se han corroborado a través de estudios científicos. En el cuadro 1 se resume la actividad farmacológica para las especies del género *Hyptis*.

#### Cuadro 1. Actividad farmacológica de especies del género *Hyptis*.

<i>H. romboides</i>	Actividad antixantina oxidasa <sup>18</sup> y antimicrobiana <sup>19</sup>
<i>H. Suaveolens</i>	Actividad contra <i>Plasmodium falciparum</i> <sup>20</sup> , antidiabética <sup>21</sup> , antiviral contra el virus causante de la fiebre chikunguña <sup>22</sup> , antimicótico contra el género <i>Aspergillus</i> <sup>23</sup> , antinociceptiva <sup>24</sup> , gastroprotectiva contra agentes ulcerantes <sup>24</sup> , efecto hepatoprotectivo <sup>25</sup>
<i>H. brevipes</i>	Actividad antimicrobiana <sup>19</sup> , antifúngica <sup>26</sup>
<i>H. crenata</i>	Actividad antiulcerogénica <sup>27</sup> , citotóxica y antioxidante <sup>28</sup>
<i>H. spicigera</i>	Repelente de insectos <sup>29</sup> , actividad antinociceptiva <sup>30</sup> , gastroprotectora y efecto curativo de úlceras <sup>31</sup>
<i>H. lantanifolia</i>	Inhibidor de la VIH transcriptasa reversa <sup>32</sup>
<i>H. fruticosa</i>	Actividad antioxidante, efecto antinociceptivo <sup>33</sup> , efecto hipotensivo <sup>34</sup>
<i>H. martiussi</i>	Actividad antiulcerogénica <sup>35</sup> , antimicrobiana mediada por luz <sup>36</sup> , antifúngica, antiprotozoaria contra <i>Trypanozoma cruzi</i> <sup>37</sup> , antiedematogénica <sup>38</sup>
<i>H. albida</i>	Actividad antiinflamatoria <sup>39</sup>
<i>H. urticoides</i>	Actividad antimicrobiana contra <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i> <sup>40</sup>
<i>H. mutabilis</i>	Actividad antitumoral en sarcomas de roedores <sup>41</sup> , antifúngica contra <i>Mucor sp.</i> <sup>42</sup>
<i>H. fasciculata</i>	Actividad antimicrobiana frente <i>H. pylori</i> , <i>E. coli</i> y <i>S. enteritidis</i> <sup>43</sup>
<i>H. ovalifolia</i>	Actividad antifúngica contra dermatofitos <sup>44</sup>
<i>H. atrorubens</i>	Actividad antibacteriana y antifúngica <sup>45</sup>
<i>H. verticillata</i>	Actividad citotóxica, antimicrobiana, antifúngica, insecticida, antiviral <sup>46</sup>

### 2.3 *Hyptis pectinata* e *Hyptis monticola*.

*Hyptis pectinata* es conocida comúnmente como “hierba del burro” en Veracruz, con el nombre maya de xoolte’xnuuk en Yucatán y en San Luis Potosí con el nombre huasteco de Terek de task maape’.<sup>47</sup> En Brasil, se le conoce como “mercúrio do campo” o “Canudiho” en los estados de Sergipe y Alagoa. En el resto de Hispanoamérica, se le conoce como “poleo”.<sup>48</sup> Se encuentra diseminada abundantemente en los trópicos de ambos hemisferios. En África, se distribuye desde Sierra Leona hacia el este hasta Abisinia y hacia el sur hasta Angola, Rodesia, Tanzania, Malawi y Madagascar. En Asia, ha sido hallada en Java, Guam y en India, en las regiones de Tamil Nadu, Bengala Occidental y Assam. En México, se distribuye en el eje volcánico transversal, en el pacífico desde Nayarit hasta Chiapas, en los estados del Golfo de México y de la península de Yucatán.<sup>49</sup>

Es una hierba enmalezada perenne de hasta tres metros de alto, más o menos pubescente en las partes superiores, los ángulos a menudo escabrosos; láminas foliares variables en tamaño y forma, casi siempre de 4-7 cm de largo, las superiores reducidas, generalmente ovada, agudas o acuminadas, redondeadas en la base o hasta semicodiformes, irregularmente crenado-aserradas, la superficie superior densa y delicadamente hirsuta o a veces hirsuta, la inferior más clara, ya puberulenta, ya enblanquecida y tomentosa; pecíolos casi siempre de 2-3 cm de largo; cúlulas laxas, antes que densas, semiescorpiodes, a menudo bifurcadas, subtendidas por brácteas lineares o subfoliares, las bractéolas setáceas, pectinadas, de 1-4 mm de largo; pendúculos de 1-2 mm de largo; glomérulos generalmente apretados y en espiga; las espigas apanojadas, a menudo densamente; tubo del cáliz en la flor apenas de 1 mm de largo, los dientes de 1-1.5 mm de largo, erectos, estrictos, el orificio blanco-hirsuto, el tubo maduro de 1.5-2.5 mm de largo, levemente hispido, leve pero notablemente estrechado en el orificio; tubo de la corola de 1.5 mm de largo; núculas de más o menos 1 mm de largo, negras<sup>49</sup> (Figura 12).

En la medicina tradicional mexicana, *H. pectinata*, se ha usado para el tratamiento de fiebres, problemas cutáneos, gastrointestinales, rinofaringitis y congestión pulmonar,<sup>50</sup> además en Brasil se ha utilizado tradicionalmente en desórdenes del hígado, asma, tos, bronquitis y dismenorrea.<sup>51</sup>

Los extractos acuosos de las hojas demostraron efectos sobre la estimulación de la regeneración hepática,<sup>52</sup> previenen la pérdida ósea en la enfermedad periodontal<sup>53</sup> y muestran efectos antidematogénicos y antinociceptivos en modelos animales.<sup>48</sup> Los efectos antinociceptivos mediados por los receptores opioides y colinérgicos se han demostrado para el aceite esencial de *H. pectinata*,<sup>54</sup> junto con la actividad antiinflamatoria a través de la inhibición de la producción de óxido nítrico y la prostaglandina E2.<sup>55</sup> Los extractos orgánicos presentaron actividad contra el promastigote de *Leishmania braziliensis*,<sup>56</sup> y también muestran propiedades antioxidantes<sup>57</sup> y actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivo como *Streptococcus mutans*<sup>58</sup> y levaduras.<sup>59</sup>

Los aceites esenciales de *H. pectinata* son responsables de un gran número de aplicaciones terapéuticas; sin embargo, esta planta contiene un grupo de marcadores químicos conformado por el sistema farmacofórico alquilante de 6-heptenil-5,6-dihidro-2H-piran-2-ona, que contribuye con sus propiedades antimicrobianas y citotóxicas. La actividad de estos compuestos está relacionada con el sistema  $\delta$ -lactona  $\alpha,\beta$ -insaturado que actúa como un aceptor tipo Michael.<sup>60</sup>



**Figura 2.** Morfología de *Hyptis pectinata*.

*Hyptis monticola* es una especie endémica del sureste de los estados de Minas Gerais y Río de Janeiro.<sup>49</sup> No se han descrito estudios previos para la actividad farmacológica de esta especie; sin embargo, se han estudiado los aceites esenciales de esta planta y se determinó que sus principales componente eran el *trans*-cariofileno, el (*E*)-metil-cinamato, el germacreno D, el limoneno, el  $\alpha$ -muroleno y el  $\beta$ -pineno.<sup>61</sup>

Es un arbusto pequeño con ramas más o menos rígidas, delicada y levemente hispida con pelos ascendentes, los internodios casi tan largos como las hojas; láminas foliares coriáceas, casi siempre obovadas, a veces ovadas u ovals, de 2.0-4.5 cm de largo, de 1.0-2.5 cm de ancho, redondeadas en el ápice u obtusas, estrechadas debajo de la mitad o aún acuminadas hasta pecíolos de 2-6 mm de largo, sus márgenes crenados, principalmente arriba de la mitad, la superficie superior escabrosa, también glabra, la inferior levemente hispida a lo largo de las venas y menudamente puberulenta en las areolas, o casi glabra; capítulos maduros de 12-15 mm de diámetro, hemisféricos, en las axilas de las hojas superiores notablmente reducidas con pendúculos levemente hispídos de 8-12 mm de largo, semicorimbosos y agregados en panojas bastante hojosas; brácteas subuladas, de 4-6 mm de largo; cáliz en la flor más o menos 5 mm de largo, los dientes lanceolados, acuminados, de 2 mm de largo, de más o menos 1 mm de ancho en la base, de 5 mm de largo; núculas de 2 mm de largo<sup>49</sup> (Figura 3). La clasificación taxonómica de *H. pectinata* e *H. monticola* se encuentra en el cuadro 2.

**Cuadro 2. Taxonomía de *H. pectinata* e *H. monticola*.**

<b>Reino</b>	Plantae	
<b>Division</b>	Magnoliophyta	
<b>Clase</b>	Magnoliopsida	
<b>Orden</b>	Lamiales	
<b>Familia</b>	Lamiaceae	
<b>Género</b>	<i>Hyptis</i>	
<b>Especie</b>	<i>Hyptis pectinata</i> (L.) Poit.	<i>Hyptis monticola</i> Mart. Ex Benth.



## 2.4 Fitoquímica de especies del género *Hyptis*.

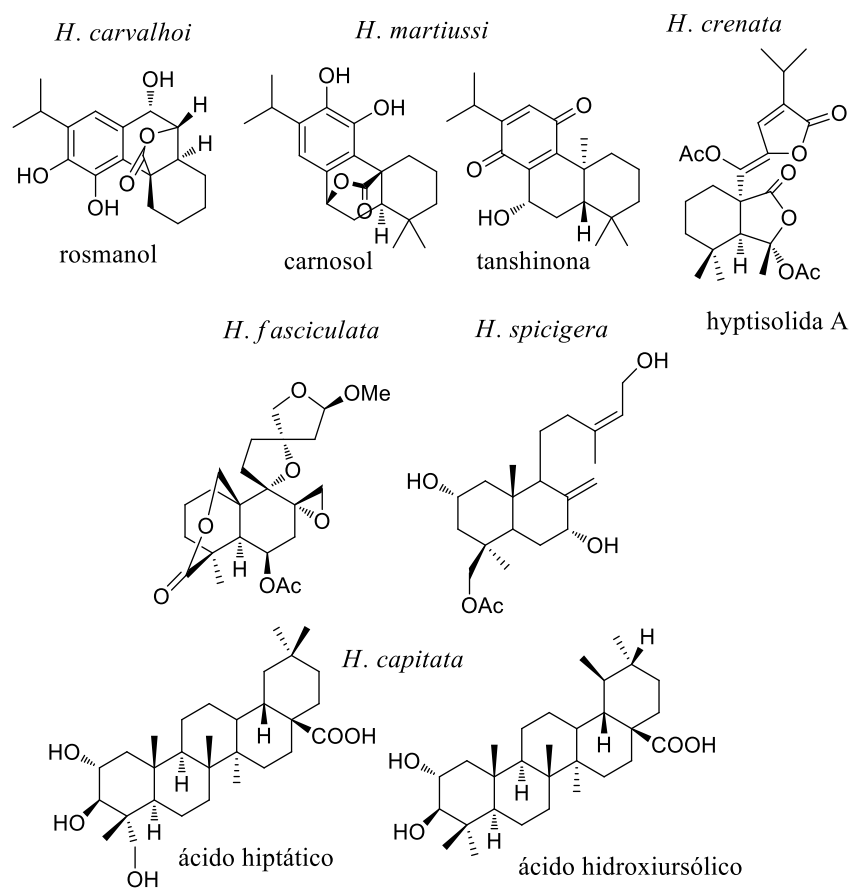
De las especies del género *Hyptis*, se han aislado una gran variedad de metabolitos secundarios, entre los que destacan aquellos de tipo terpenoide, flavonoide, lignano y las 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas. Los aceites esenciales de las plantas pertenecientes a la familia Lamiaceae son de gran importancia económica, además de que son los responsables de muchas de las actividades farmacológicas. Los principales compuestos presentes en los aceites esenciales son los monoterpenos y sesquiterpenos, aunque otras sustancias han sido identificadas como ácidos grasos C<sub>16</sub> y C<sub>18</sub> esterificados en *H. spicigera*, fenol en *H. pectinata* y acetato de decilo en *H. emory*, entre otros.<sup>11</sup>



**Figura 3.** Morfología de *Hyptis monticola*.

Los diterpenos son metabolitos ampliamente distribuidos en la familia Lamiaceae (Figura 4), de *Hyptis carvalhoi*<sup>62</sup> y del extracto metanólico de las raíces de *H. crassifolia*<sup>63</sup> se han aislado una variedad de diterpenos con esqueleto abietano, del extracto hexánico de las raíces de *H. martiussi* se identificaron dos diterpenos abietanos, carnosol y 11,14-dihidroxi-8,11,12-

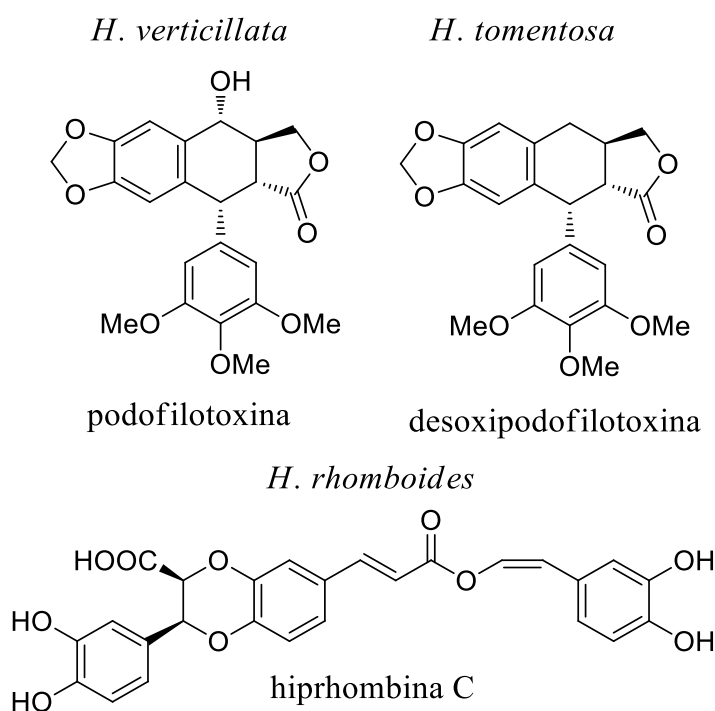
abietatrien-7-ona, con actividad antiproliferativa en diversas líneas celulares<sup>64</sup> y dos tanshiononas que presentaron actividad genotóxica frente a células de pulmón de hámster V79.<sup>65</sup> El carnosol también fue identificado en *H. dilatata* junto con el 7-etoxirosmanol y presentaron actividad citotóxica frente a tres líneas celulares diferentes (HeLa, MCF7 y HT29) y actividad antibacteriana contra *B. subtilis*, *S. aureus* y *Salmonella* sp.<sup>66</sup>. De *H. crenata*, se aisló un diterpeno bis-*seco*-abietano el cual demostró inducir la transcripción dependiente de elementos que responden a cAMP en células Neuro2A<sup>67</sup>. También se han aislado diterpenos del tipo labdánico del extracto metanólico de *H. fasciculata*<sup>12</sup> y de las partes aéreas de *Hyptis spicigera*, los cuales presentaron propiedades insecticidas<sup>17</sup>. En los extractos orgánicos, se ha presentado un alto contenido de triterpenos pentacíclicos; un ejemplo son los ácidos hiptático A y 2 $\alpha$ -hidroxiursólico aislados de *H. capitata* que resultaron tóxicos contra células de tumor de colon (HCT-8)<sup>68</sup>.



**Figura 4.** Terpenoides aislados de especies del género *Hyptis*.

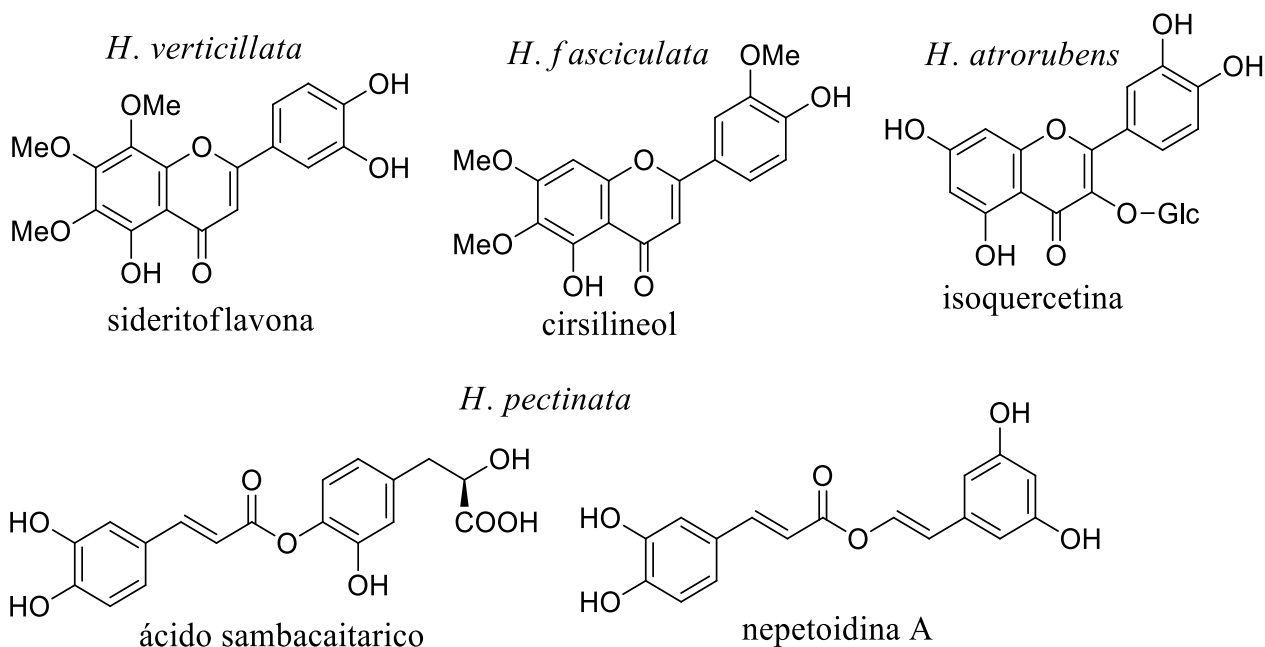
Se han identificado compuestos de origen esteroideal; en *H. suaveolens*:  $\beta$ -sitosterol, su D-glucósido y campesterol, en *H. capitata*; estigmasterol; y en *H. rhomboides*: estigmasterol,  $\beta$ -sitosterol y sus glucósidos).<sup>11</sup> De tipo alcaloide, se aisló el (*R*)-5-hidroxi-pirrolidin-2-ona de la especie *H. verticillata*.<sup>69</sup>

Los lignanos (Figura 5) con esqueleto de ariltetralinas son los principales responsables de las actividades citotóxicas descritas para los extractos orgánicos de estas especies. Las propiedades antisépticas de las infusiones preparadas con las partes aéreas de *H. verticillata* y su empleo para eliminar verrugas es un resultado la actividad antimitótica establecida para su alto contenido de lignanos citotóxicos ( $ED_{50} < 10^{-2} \mu\text{g/mL}$ ).<sup>70</sup> De esta especie, se han aislado los lignanos citotóxicos: 5-metoxidihidropodofilotoxina, dihidropodofilotoxina, deoxidihidropodofilotoxina, (-)-yateína, deoxipropodofilina, entre otros.<sup>70,71</sup> Los neolignanos aislados del extracto etanólico de *Hyptis rhomboides*, hiprhombina C y epihiprhombina B exhibieron una mejor actividad antixantina oxidasa que el alopurinol.<sup>18</sup> La desoxipodofilotoxina aislada de la *H. tomentosa* presentó actividad citotóxica.<sup>72</sup>



**Figura 5.** Lignanos aislados de especies del género *Hyptis*.

Una gran variedad de compuestos con estructura de flavonoide y fenilpropanoide (Figura 6) también se han aislado de este género; algunos ejemplos provienen de las partes áreas de *H. verticillata* donde se aisló la sideritoflavona (KB: ED<sub>50</sub> 1.6 µg/mL)<sup>69</sup> y los flavonoides 5-hidroxi-4',6,7,8-tetrametoxiflavona y 5-hidroxi-4',3,6,7,8-pentametoxiflavona aislados de *H. tomentosa*<sup>71</sup>; las metoxiflavonas cirsilineol y cirsimaritina aisladas de *H. fasciculata* presentaron actividad anti-*Helicobacter pylori*.<sup>43</sup> Del extracto hidrometanólico de *H. atrorubens* se aislaron la isoquercetina y el hiperósido, junto con los derivados del ácido cafeico como el ácido rosmanérico y el metilrosmarinato, estos compuestos presentaron actividad antibacteriana.<sup>45</sup> Otros derivados del ácido cafeico como el ácido sambacaitarico y el 3-*O*-metil-sambacaitarico se aislaron de *Hyptis pectinata* y presentaron actividad contra el promastigote de *L. braziliensis*.<sup>56</sup>



**Figura 6.** Flavonoides y fenilpropanoides aislados de especies del género *Hyptis*.

## 2.5 Dihidro-2H-piran-2-onas.

Las 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas tienen un anillo de  $\delta$ -lactona- $\alpha,\beta$ -insaturada y pueden presentar con una variedad de grupos sustituyentes alrededor del anillo. La actividad antimicrobiana<sup>7</sup>

y citotóxica<sup>73</sup> de estos compuestos está relacionada con el sistema de  $\delta$ -lactona- $\alpha,\beta$ -insaturada.<sup>74</sup> La pironetina (Figura 7), aislada de cultivos de *Streptomyces* sp., es un ejemplo representativo de este tipo de compuestos y su mecanismo de acción se lleva a cabo a través de una adición tipo Michael en la subunidad  $\alpha$  del dímero de tubulina, la cual se complementa con el carácter lipofílico de este metabolito provisto por los sustituyentes alquilo en la posición C-6 que facilitan la interacción con las membranas celulares;<sup>75</sup> la reacción de adición sucede entre el nitrógeno terminal de la  $\alpha$ -lisina-352 con el carbono cuatro del doble enlace del anillo de  $\delta$ -lactona- $\alpha,\beta$ -insaturada. Los oxígenos de los grupos funcionales presentes en la cadena lateral interacciona por medio de enlaces de hidrógeno con los grupos funcionales de los aminoácidos cercanos al sitio de acción<sup>76</sup>. Sin embargo, se ha postulado, basándose en datos cristalográficos y de espectrometría de masas, que la pironetina también podría formar un enlace covalente a la cisteína-316 en la subunidad  $\alpha$  del dímero de tubulina.<sup>77</sup> El resto de metabolitos disruptores del microtúbulo aislados de plantas se unen a la subunidad  $\beta$  de la tubulina.<sup>5</sup>

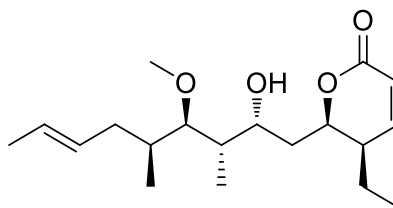


Figura 7. Pironetina aislada de *Streptomyces* sp.

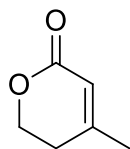
### 2.5.1. Dihidro-2H-piran-2-onas sustituidas en la posición C-4.

Las  $\alpha$ -pironas sustituidas en la posición C-4 se han aislado de diversos microorganismos y plantas. De los constituyentes volátiles de *Nicotiana tabacum*, se aisló una 4-isopropil-5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona;<sup>78</sup> del género *Penicillium sizovae* se han descrito compuestos con estructura 4-metil-5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona como la anhidromevalonolactona, este metabolito es precursor en la síntesis de agentes controladores de plagas de insectos, presenta actividad inhibitoria frente a *Lactobacillus acidophilus* y *L. heterohiochii* en presencia de ácido mevalónico e inhibe completamente el crecimiento de *S. cerevisiae* y *S. carlsbergensis*; dado a su

importancia como precursor de diversos compuestos con actividad biológica se ha desarrollado su producción utilizando cepas recombinantes de *Aspergillus oryzae*.<sup>79</sup> De un cultivo líquido del ascomiceto *Pestalotiopsis* sp., un patógeno de plantas, se obtuvo una 4-metoxi-5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona con una cadena alifática en la posición C-6. La configuración absoluta de los sustituyentes se determinó por cristalografía,<sup>80</sup> del hongo endófito aislado de *Corylus avellana*, se obtuvieron dos compuestos con una cadena alifática de cinco miembros unida a la posición C-6 que presentaron moderada actividad citotóxica frente a cuatro líneas celulares humanas;<sup>81</sup> de cultivos sólidos del hongo endófito *Sarcosomataceae*<sup>82</sup> y del hongo *Nectria* sp.,<sup>83</sup> se aislaron otras  $\alpha$ -pironas similares sin descripciones de alguna actividad biológica y del hongo *Nodulisporium* sp. se aisló la nodulisporipirona D que presentó actividad antifúngica moderada contra *A. niger*.<sup>84</sup>

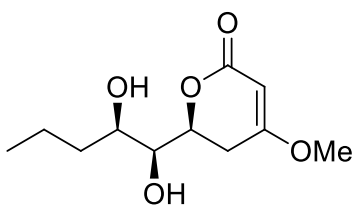
La monacolina K, que no presenta un doble enlace en el anillo de lactona y aislada de *Monascus ruber*, posee una actividad hipocolesterolémica al ser un inhibidor competitivo de la HMG-CoA reductasa.<sup>85</sup> Otras  $\alpha$ -pironas sustituidas en las posiciones C-3, C-4 y C-6 con azúcares y grupos terpenoides han sido aisladas de *Tricholepsis eburnea*<sup>86</sup> y de cepas de *Serratia plymuthica*,<sup>75</sup> cuyos dos compuestos aislados, plimuthipiranonas, presentaron una actividad antimicrobiana potente frente a bacterias Gram positivo. En la Figura 8, se muestran algunas estructuras de dihidro-2H-piran-2-onas sustituidas en la posición C-4.

*Penicillium sizovae*

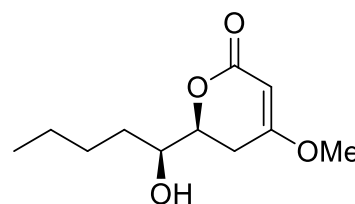


anhidromevalonolactona

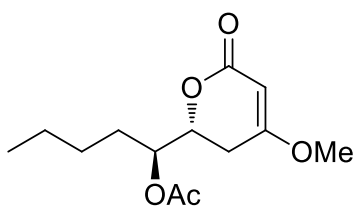
*Pestalotiopsis* sp.



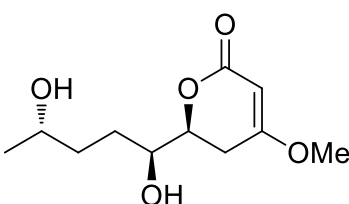
*Corylus avellana*



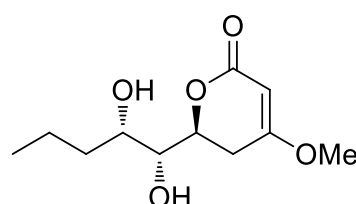
*Sarcosomataceae*



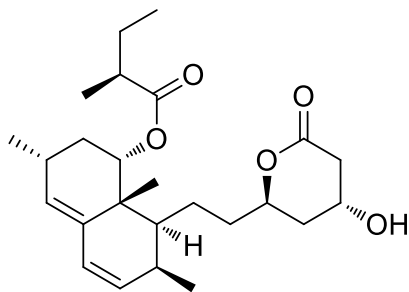
*Nectria* sp.



*Nectria* sp.

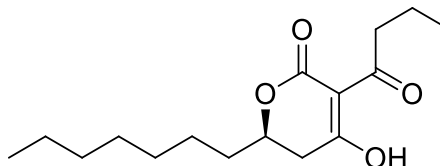


*T. barbarae*

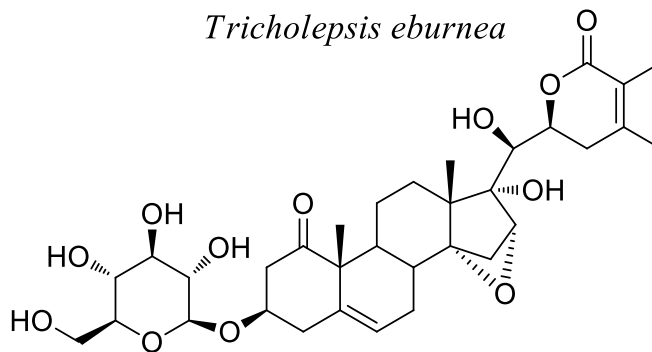


monacolina K

*Nodulisporium* sp.



*Tricholepsis eburnea*



trichosida A

**Figura 8.** Dihidro-2H-piran-2-onas sustituidas en la posición 4.

### 2.5.2. Dihidro-2H-piran-2-onas sustituidas en las posiciones C-5 y C-6.

Se han obtenido  $\alpha$ -pironas sustituidas únicamente en la posición C-5, como la bisélica E aislada del ascidiáceo *Didemnidae* sp.,<sup>87</sup> y sustituidas solamente en C-6 como la callystatina A obtenida de *Callyspongia truncata*, la cual presentó actividad citotóxica frente a la línea celular KB.<sup>88</sup> Dos  $\alpha$ -pironas con cadenas alifáticas de 7 y 10 carbonos fueron aisladas de *Cheilolejeuna imbricata*.<sup>89</sup> De los áfidos de la especie *Cryptomyzus* sp. se obtuvieron las cryptolactonas con actividad citotóxica contra células humanas promielocíticas de leucemia HL-60.<sup>90</sup>  $\alpha$ -Pironas glucosiladas en la cadena sustituyente de C-6 se han obtenido *Euscaphis japonica*.<sup>91</sup> Las gamahonólidas obtenidas del ascomiceto *Epichloe typhina* presente en el estroma de *Phleum pratense* mostraron actividad antifúngica.<sup>92</sup>

La fostriecina de *Streptomyces pulveraceus*, que presenta un grupo fosfato en su cadena lateral, ha demostrado actividad antitumoral a través de la inhibición de la proteína fosfatasa (PP)2A al unirse al residuo cis-269 de la subunidad PP2Ac, interrumpiendo la mitosis celular.<sup>93,94</sup>

De plantas del género *Cryptocarya* se han aislado metabolitos con como la *R*-goniothalamina con actividad citotóxica;<sup>95</sup> los criptocarioles A-H, polioles de cadena larga que protegen a la proteína Pdc4 de la degradación inducida por en tetradecanoilforbol (TPA, un potente promotor tumoral usado en la investigación biomédica); la proteína Pdc4 se encarga de inhibir la transformación, migración e invasión de las células cancerosas *in vitro*.<sup>96</sup> La *Z*-criptofoliona y criptomoscato D2 mostraron una alta actividad inhibitoria del punto G2 del ciclo celular y que pueden forzar a la célula a detenerse en la fase G2 debido al daño en el ADN antes de entrar a la mitosis y pueden mejorar la eliminación de células cancerosas por radiación ionizante y agentes quimioterapéuticos; la rugulactona induce el inhibidor kappa  $\beta$  ( $I\kappa\beta$ ), un regulador crítico del factor nuclear  $\kappa\beta$  (NF- $\kappa\beta$ ) que se encuentra activo en muchos tipos de neoplasias malignas.<sup>97</sup> La 7',8'-dihidroobolactona aislada de *C. obovata* presentó actividad inhibitoria contra *Trypanosoma brucei*.<sup>98</sup> Los criptorigidifolios mostraron actividad antimalaria moderada contra *Plasmodium falciparum*.<sup>99</sup> Finalmente se han aislado otras  $\alpha$ -pironas sin actividad biológica demostrada de las especies *C. strictifolia* y *C. latifolia*.<sup>100,101</sup>

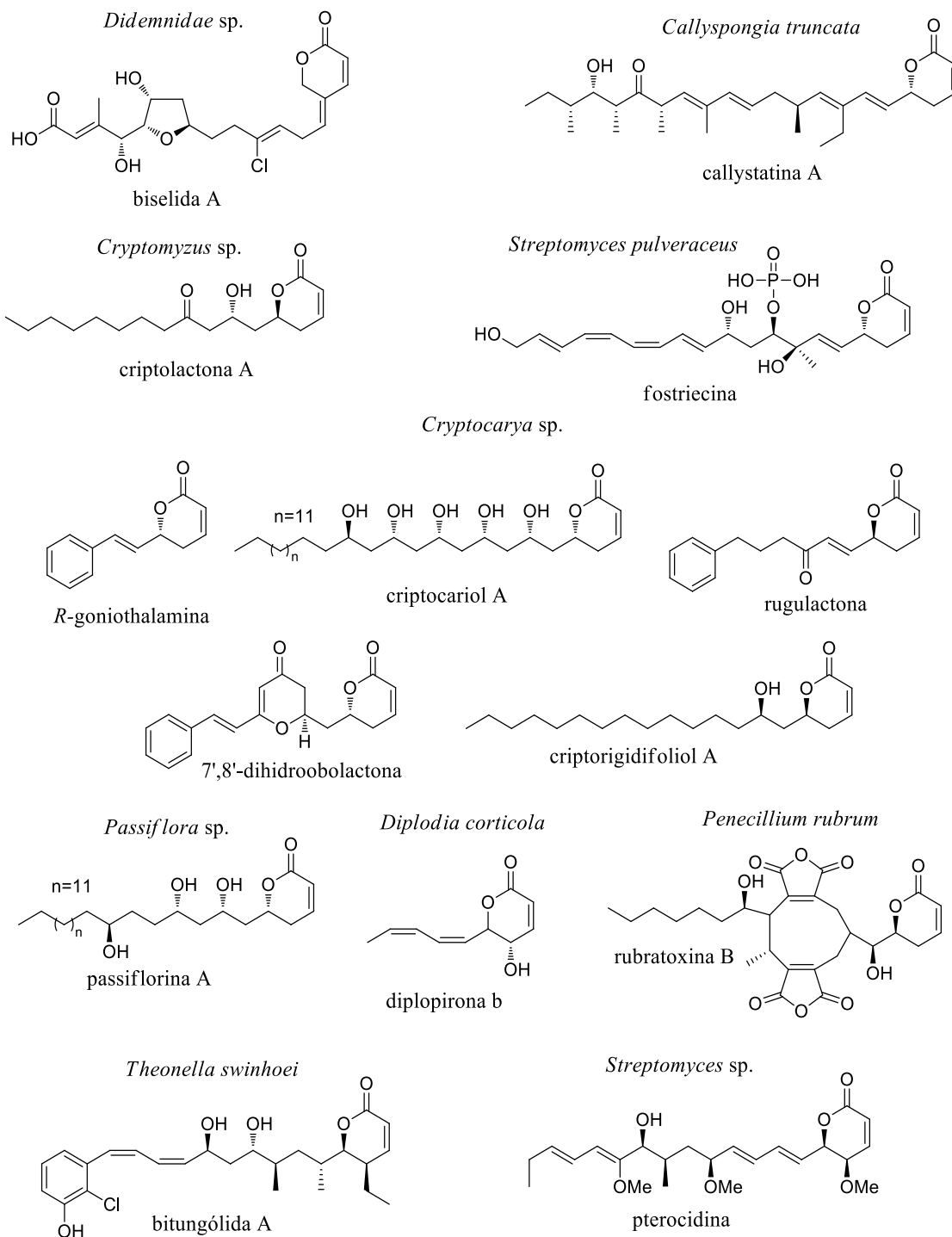


También aislada de *Bryonopsis lacinosa*, la *R*-goniothalamina presentó actividad citotóxica en un ensayo con *Artemia salina*<sup>102</sup> y en la línea celular de cáncer de pulmón no microcítica (NSCLC) H1299<sup>103</sup>, además de actividad antimicrobiana significativa contra un amplio rango de bacterias Gram positivo y negativo, así como en hongos patógenos junto con actividad larvicida contra el mosquito *Culex quinquefasciatus*<sup>104</sup>; la *S*-goniothalamina es un análogo sintético de la *R*-goniothalamina con actividad citotóxica frente a una variedad de líneas celulares.<sup>105</sup>

Las pasiflorinas, aisladas del género *Passiflora*, son  $\alpha$ -pironas sustituidas en la posición C-6 por cadenas alifáticas largas que pueden presentar grupos sustituyentes a lo largo de éstas. Por ejemplo, la pasiflorina A obtenida de *P. foetida* presentó actividad contra el amastigote de *L. Panamensis*,<sup>106</sup> al igual que la  $\alpha$ -pironas aisladas de *Raimondia monoica* que también presentaron actividad contra *Plasmodium falciparum*.<sup>107</sup> Del género *Ravensara*, se han obtenido  $\alpha$ -pironas con actividad antifúngica contra *C. albicans* y *Cladosporium cucumerinum* un fitopatógeno.<sup>108,109</sup>

La micotoxina rubratoxina B aislada de *Penicillium rubrum* es un macrociclo de nueve miembros unido a la posición C-6, al cual se le atribuyen diversas actividades biológicas como actividad hepatotóxica,<sup>110</sup> citotóxica en fibrosarcoma humano (HT1U80), inhibitoria de la metaloproteinasa MMP2 y MMP9 relacionadas con el inicio del tumor, su crecimiento y metástasis,<sup>111</sup> además de inducir la apoptosis p53 independiente en células HL60.<sup>112</sup> La tarchonanthuslactona obtenida de *Tarchonanthus trilobus* también presentó actividad citotóxica frente a diversas líneas celulares.<sup>113</sup>

Se han obtenido diversas 5,6-dihidro-2*H*-piran-2-onas como las bitungólidas aisladas de la esponja *Theonella swinhoei* que presentaron actividad citotóxica en células de fibroblastos normales de rata 3Y1 y actividad débil contra la fosfatasa de doble especificidad (VHR);<sup>114</sup> otra  $\alpha$ -pirona citotóxica denominada pterocidina sustituida en C-5 y C-6 se obtuvo de cepas de *Streptomyces* originarias de sedimentos marinos.<sup>115</sup> De *Diplodia corticola*, se obtuvo la diplopirona B con actividad antifúngica para el control de *Phytophthora spp.* que ocasionan enfermedades en las plantas.<sup>116</sup> En la Figura 9 se muestran algunas estructuras de dihidro-2*H*-piran-2-onas sustituidas en la posición C-5 y C-6.

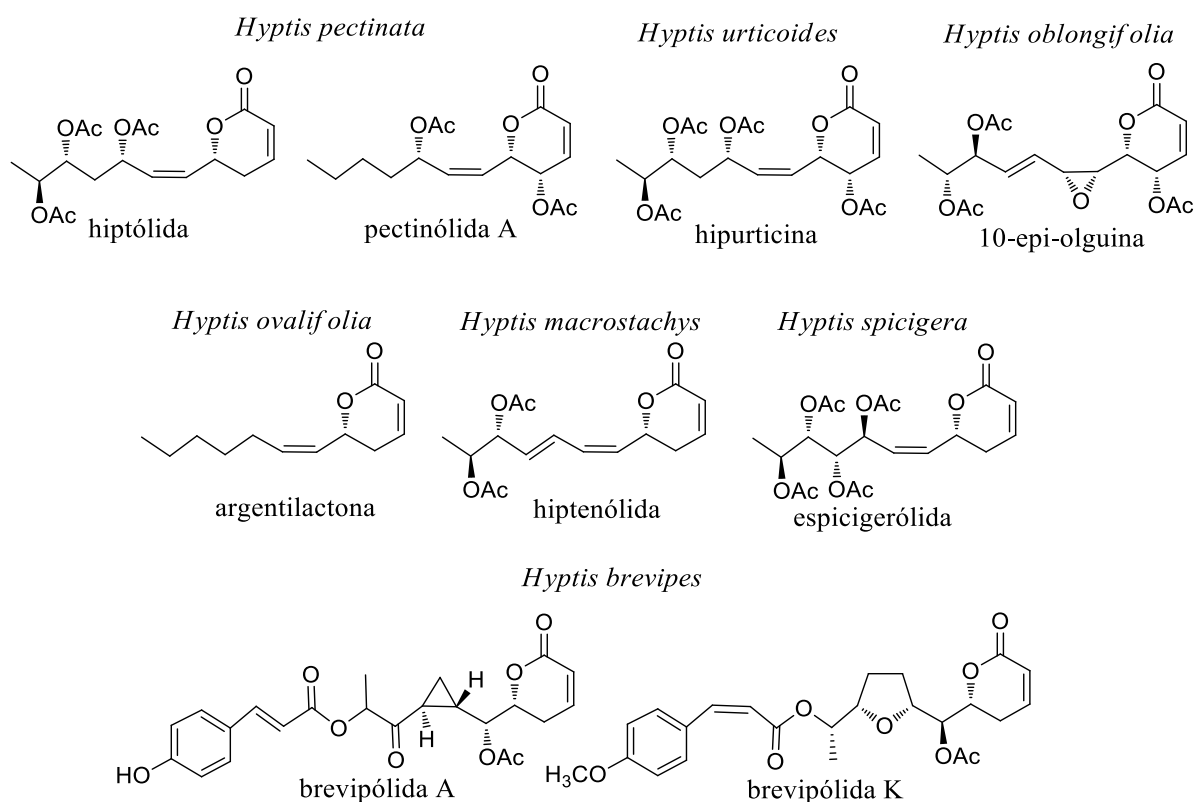


**Figura 9.** Dihidro-2*H*-piran-2-onas sustituidas en las posiciones C-5 y C-6.

### 2.5.2.1. 5,6-Dihidro-2H-piran-2-onas aisladas de especies del género *Hyptis*.

La primer  $\alpha$ -pirona aislada de este género (Figura 10) fue aislada de *H. pectinata* y se conoce como hiptólida.<sup>117</sup> De esta especie, también se han aislado las pectinólidas A-C, las cuales poseen actividad citotóxica para una variedad de líneas celulares ( $IC_{50} < 4 \mu\text{g/mL}$ ) y antimicrobiana frente *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*;<sup>7</sup> también se han aislado otros compuestos denominados pectinólidas D-G de una colecta de la isla Barbados.<sup>118</sup> De *H. urticoides* se aisló la hipurticina, cuya reasignación estructural y configuracional se estableció recientemente mediante el empleo de cálculos teóricos DFT-RMN y simulación espectral (RMN).<sup>119</sup> De *H. oblongifolia* se han descrito la 5'-*epi*-olguina, 5-desacetoxi-5'-*epi*-olguina<sup>15</sup> y la 10-*epi*-olguina, la cual también se aisló de *H. capitata*.<sup>120</sup> La argentilactona aislada de *Hyptis ovalifolia* presenta actividad antifúngica contra *Paracoccidioides lutzii*,<sup>121</sup> los hongos dermatofitos *Microsporum canis*, *Gypseum tricophyton mentaagrophytes* y *T. rubrum*.<sup>122</sup> De las partes aéreas de *H. macrostachys*, se aisló la denominada hiptenólida, la cual presentó actividad antiespasmolítica en íleon de cobayo inducida por histamina y carbacol junto con actividad antibacteriana contra una cepa resistente a meticilina de *S. aureus*;<sup>123</sup> este compuesto también ha sido aislado de *Neohyptis paniculata*.<sup>124</sup>

En *H. spicigera* se aisló la denominada con el nombre trivial espicigérolida, la cual presentó una actividad citotóxica contra la línea celular de carcinoma nasofaríngeo.<sup>125</sup> De *H. brevipes* se obtuvieron diez compuesto llamados brevipólidas A-J, los cuales contiene 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. Las brevipólidas G-J presentaron actividad citotóxica en contra de líneas celulares del carcinoma nasofaríngeo (KB), mientras que las brevipólidas B y F presentaron actividad frente a las líneas celulares de carcinoma de mama (MCF7) y adenocarcinoma de colon grado II (HT-29).<sup>6</sup> Estos compuestos presentan actividad como inhibidores en un ensayo ELISA del complejo nuclear NF- $\kappa$ B, receptor de citoquinas CCR5, el principal receptor del VIH tipo 1.<sup>126</sup>



**Figura 10.** 5,6-dihidro-2*H*-piran-2-onas aisladas de especies del género *Hyptis*.

## 2.6. Química computacional.

La química computacional es un resultado de la evolución de la química teórica y su objetivo principal es predecir todo tipo de propiedades moleculares de sistemas químicos utilizando la fisicoquímica, la física molecular y la física cuántica. Esta disciplina permite investigar múltiples propiedades y comportamientos moleculares como la geometría, la energía, la reactividad química, las propiedades espectroscópica, eléctricas y magnéticas, entre otras.<sup>127</sup>

Los métodos matemáticos para llevar a cabo sus objetivos pueden dividirse en dos grandes categorías:

- A) Mecánica molecular: aplica las leyes de la física clásica al núcleo molecular sin considerar explícitamente los electrones. Se basa en los siguientes principios:
- El núcleo y los electrones de un átomo están juntos, es decir, se tratan como una partícula única y las partículas como si fueran esferas.
  - Los enlaces entre partículas se comportan como osciladores armónicos.
  - Las interacciones no enlazantes entre partículas se tratan utilizando la mecánica clásica.
  - Se utilizan funciones de potencial individuales para describir las diferentes interacciones.
  - Las funciones de energía potencial se relacionan con parámetros derivados empíricamente que describen las interacciones entre los átomos.
  - La suma de todas las interacciones determina la distribución espacial de un conjunto de átomos.
  - Las energías obtenidas en la mecánica molecular no son cantidades absolutas sino que sólo se pueden utilizar para comparar energías estéricas relativas entre dos o más conformaciones de la misma molécula.<sup>127,128</sup>
- B) Mecánica cuántica: se basa en la ecuación de Schrödinger para describir una molécula con un tratamiento directo de la estructura electrónica. En ésta los núcleos y electrones se distinguen unos de los otros y las interacciones electrón-electrón y electrón-núcleo son explícitas y están dirigidas por el movimiento y las cargas de los electrones.<sup>127,128</sup>

Dentro de los métodos de cálculo de mecánica cuántica los principales son los métodos semiempíricos, los *ab initio* (desde el principio) y la teoría de funcionales de la densidad (DFT). Los métodos *ab initio* no emplean otra información empírica que no sea la de las constantes físicas fundamentales. Partiendo del método variacional Hartree-Fock (HF) de cálculo de orbitales moleculares (OM), es posible formular familias de métodos *ab initio*, como las Moller-Plesset (MP) y Coupled-Cluster (CC), que están organizadas jerárquicamente en términos de su capacidad para describir la correlación electrónica de modo que es posible predecir cualquier propiedad molecular con una exactitud controlable. En la práctica la aplicación de los métodos *ab initio* más exactos puede ser muy complicada,

así como requerir del empleo de súpercomputadoras de altas prestaciones y una gran cantidad de tiempo de cálculo.<sup>128,129</sup>

A causa de las dificultades en la aplicación de los método *ab initio* a moléculas medianas y grandes, se han desarrollado los métodos semiempíricos para el tratamiento de estas moléculas; estos métodos obtienen la energía y orbitales moleculares, pero lo hacen simplificando los cálculos HF o DFT, al remplazar valores esperados de la función de onda o de funcionales de la densidad electrónica por formas paramétricas ajustadas estadísticamente, empleando grandes conjuntos de datos experimentales (geometrías moleculares y calores de formación) o datos teóricos generados por métodos *ab initio* o DFT. El costo computacional se reduce al considerar sólo los electrones de valencia y no los de capas internas o *core*, se utilizan sólo conjuntos de base mínima, así como el número mínimo de funciones necesarias para representar los electrones realizando aproximaciones para simplificar el número de integrales de traslape y de repulsión interelectrónica por resolver. De esta manera, estos cálculos son casi tan rápidos como los cálculos de mecánica molecular hasta el punto que es posible realizar cálculos semiempíricos en sistemas de miles de átomos.<sup>128,129</sup>

En 1964, Hohenberg y Kohn probaron un teorema que establecía que para las moléculas con estados basales no degenerados, la energía del estado basal, la función de onda y las demás propiedades electrónicas se determinan únicamente por la densidad electrónica de ese estado, por lo que se puede decir que la energía del estado basal es funcional (función de una función) de la densidad electrónica. La implementación de los métodos DFT conduce a las ecuaciones de Kohn-Sham (KS), muy semejantes a las ecuaciones HF porque la densidad electrónica se expresa a partir de orbitales moleculares. Los cálculos se inician con una densidad de partida, que usualmente se encuentra superponiendo las densidades calculadas de los átomos individuales en la geometría molecular. De esta densidad se estima el potencial de intercambio y correlación, la cual se usa en las ecuaciones KS y permite obtener los orbitales Kohn-Sham; estos son orbitales para el sistema de referencia ficticio de electrones no interactuantes y, de manera estricta, no tienen un significado físico. Su utilidad es la de permitir que la densidad molecular exacta del estado basal pueda calcularse; al obtener los orbitales, estos se usan para conseguir una densidad electrónica y con ello se inicia el ciclo

de nuevo hasta que no exista una diferencia entre la densidad y los orbitales, cuando el cálculo converge se puede calcular la energía.<sup>128,129</sup>

El potencial de intercambio y correlación es la derivada del funcional de la energía de intercambio y correlación. El problema es que este funcional no se conoce, así que para determinarlo se han desarrollado varios métodos para encontrar aproximaciones, como la aproximación local de la densidad (LDA) y la aproximación local de la densidad de espín (LSDA), ambas basadas en un modelo de gas uniforme de electrones que es apropiado para sistemas donde la densidad varía lentamente con la posición; también hay aproximaciones donde se corrigen los funcionales variando la densidad electrónica con respecto a la posición y algunas de estas aproximaciones son los funcionales por gradiente de Perdew y Wang de 1986 (PW86), el de Becke de 1988 (B88) y el Lee-Yang-Parr (LYP). Los funcionales híbridos se utilizan con frecuencia, por ejemplo el funcional B3LYP donde se mezclan funcionales que depende de la densidad con una expresión Hartree-Fock. Los funcionales corregidos por el gradiente y los híbridos proporcionan excelentes resultados en las geometrías de equilibrio, frecuencias vibracionales, momentos dipolares y energía de atomización.<sup>128,129</sup>

El uso de la química computacional no es independiente de la química experimental, ya que la forma de comprobar que los modelos son adecuados o que las propiedades calculadas son cercanas o correctas a las propiedades reales es el trabajo experimental. Esto quiere decir que sin el trabajo de laboratorio la química computacional no existiría.

### **2.6.1. La resonancia magnética nuclear y el análisis conformacional**

La resonancia magnética nuclear (RMN) es una poderosa herramienta para el análisis de la configuración relativa de los metabolitos secundarios pero no es raro que en algunos casos la asignación estructural este incompleta o incorrecta. Debido a que la configuración espacial de los átomos en una molécula está íntimamente relacionada con la actividad biológica, es importante dilucidar las estructuras de manera correcta, ya que pares de compuestos enantioméricos pueden presentar diferente actividad cuando actúan sobre el mismo sitio de unión, o presentar actividad para dos sitios de unión diferentes, resultando en inactividad, ser

metabolizados o absorbidos por la célula de manera diferenciada, interactuar de forma diferente con el mismo metabolito o incluso resultar tóxicos (Cuadro 3).

La determinación de la configuración absoluta se puede llevar a cabo a través de diversos métodos experimentales como la rotación óptica, donde es necesario conocer los datos físicos de ambos enantiómeros, la difracción de rayos X, el dicroísmo circular y el dicroísmo circular vibracional.<sup>130</sup> A partir de la resonancia magnética nuclear es posible determinar la configuración absoluta empleando agentes derivatizantes quirales que emplean ácidos arilalcoxiacéticos, o sus sales quirales para la formación de ésteres, que dependiendo del enantiómero del ácido o la sal utilizada se obtendrá cambios en los espectros de resonancia del compuesto problema; algunos ejemplos de reactivos utilizados con este fin son el ácido fenilmetoxiacético (MPA) y el reactivo de Mosher (ácido  $\alpha$ -metoxi- $\alpha$ -trifluorometilfenilacético).<sup>131</sup> La química computacional puede resultar una valiosa herramienta para determinar la configuración absoluta, ya que se puede establecer las propiedades magnéticas de los enantiómeros de un compuesto y compararlas con los valores experimentales, como los desplazamientos químicos o las constantes de acoplamiento.<sup>130</sup>

La elucidación estructural de los productos naturales presenta diversos retos pues se trata de estructuras complejas y muchas veces sin precedentes, algunas pueden ser moléculas flexibles con numerosas conformaciones y su asignación espectroscópica se basa en la  $^{13}\text{C}$  y  $^1\text{H}$  RMN en la cual los espectros obtenidos pueden presentar regiones pobladas con muchas señales que complique su asignación, además, el valor de los desplazamientos químicos puede variar dependiendo del disolvente en el que se encuentre el compuesto. A través del cálculo de los desplazamientos químicos de  $^{13}\text{C}$  y  $^1\text{H}$  mediante DFT, en conjunto con la síntesis total y la resonancia magnética, se han corregido la estructura total o algunos centros quirales de diversos productos naturales como el hexaciclínol, la aquatólida, la elatenina, la nobilisitina A, el vannusal B, entre otros<sup>132</sup> (Figura 11). Actualmente la mayoría de los cálculos con DFT se enfocan a moléculas rígidas con pocas conformaciones y a la obtención de los desplazamientos químicos. Es fácil determinar la configuración de compuestos cíclicos (tres a seis miembros) a través de los parámetros de RMN, como los valores de las constantes de acoplamiento y las intensidades del efecto Nuclear Overhauser (NOE), sin embargo, asignar la configuración de sistemas flexibles no es una tarea fácil; las constantes de



acoplamiento ofrecen una valiosa información en estudios conformacionales y estereoquímicos pues proporcionan información geométrica relevante.<sup>133</sup>

**Cuadro 3. Ejemplos de enantiómeros mostrando diferentes actividades biológicas.**<sup>134</sup>

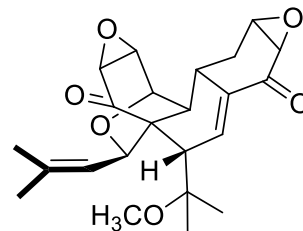
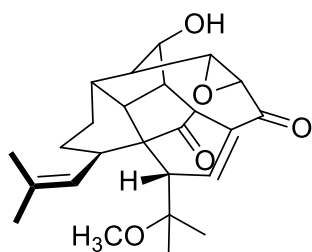
Metabolito	Enantiómero	Actividad
Spirocromano	<i>S</i>	Cardioprotector
	<i>R</i>	Inactivo
Zilpaterol	<i>S,S</i>	Afinidad por el receptor adrenérgico $\beta_2$
	<i>R,R</i>	Afinidad por el receptor opiode $\mu$
Talidomida	<i>S</i>	Mutagénico
	<i>R</i>	Sedante, hipnótico
Metadona	<i>S</i>	Produce riesgo cardiovascular
	<i>R</i>	Inhibe el canal de potasio cardiaco
Etambutol	<i>S</i>	Tuberculostático
	<i>R</i>	Produce ceguera
Penicilamina	<i>S</i>	Antiartrítico
	<i>R</i>	Mutagénico
Asparagina	<i>S</i>	Sabor amargo
	<i>R</i>	Sabor dulce
Amlodipino	<i>S</i>	Antihipertensivo y antianginal
	<i>R</i>	Inactivo

Las constantes de acoplamiento  $^3J_{H-H}$  se relacionan directamente con sus ángulos dihedros a través de la ecuación de Karplus y dependen de los parámetros moleculares como la sustitución, los ángulos y longitudes de enlace, la electronegatividad y la posición relativa de los sustituyentes unidos al fragmento H-C-C-H; también, las constantes de acoplamiento heteronucleares ( $^3J_{C-H}$ ) siguen una relación similar a la de Karplus y, por lo tanto, pueden usarse para derivar restricciones angulares adicionales. En el caso  $^2J_{C-H}$ , sus valores pueden ser útiles cuando el  $C\alpha$  tiene un sustituyente electronegativo, la magnitud relativa de la  $^2J_{C-H}$  de dos enlaces puede relacionarse con el ángulo diedro entre el protón y el átomo electronegativo unido al carbono acoplado.<sup>133,135</sup>

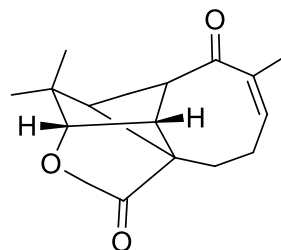
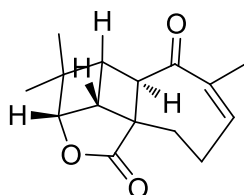
**Estructura original**

**Estructura revisada**

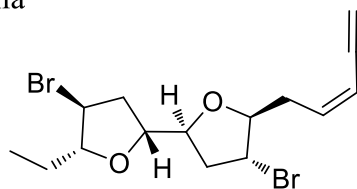
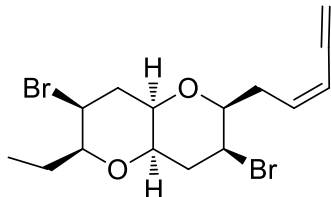
Hexaciclínol



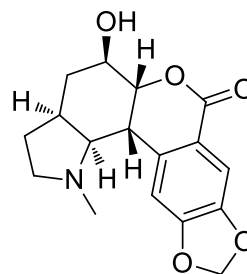
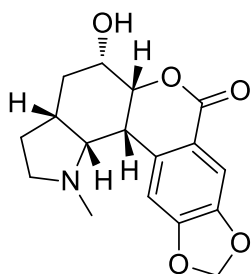
Aquatólida



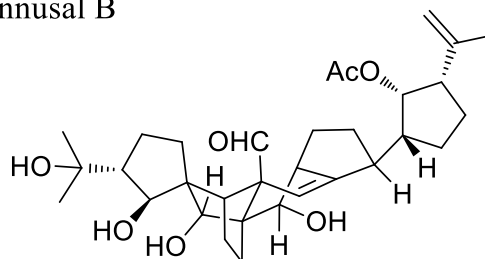
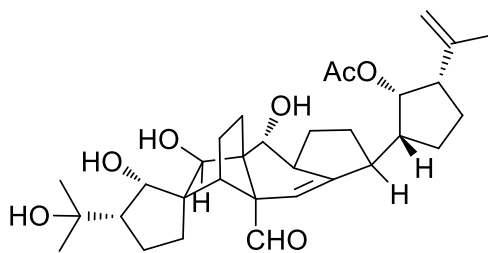
Elatanina



Nobilisitina A



Vannusal B



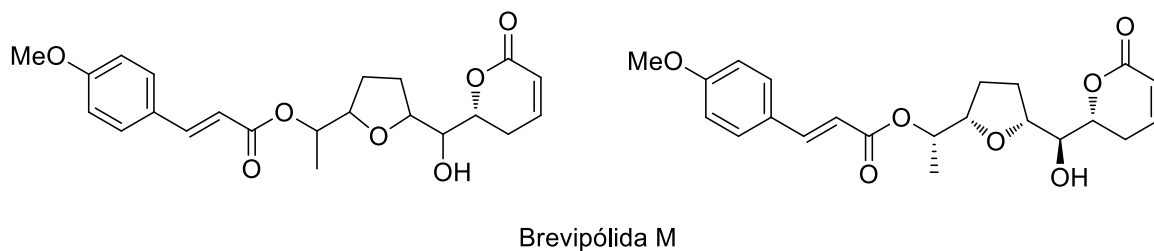
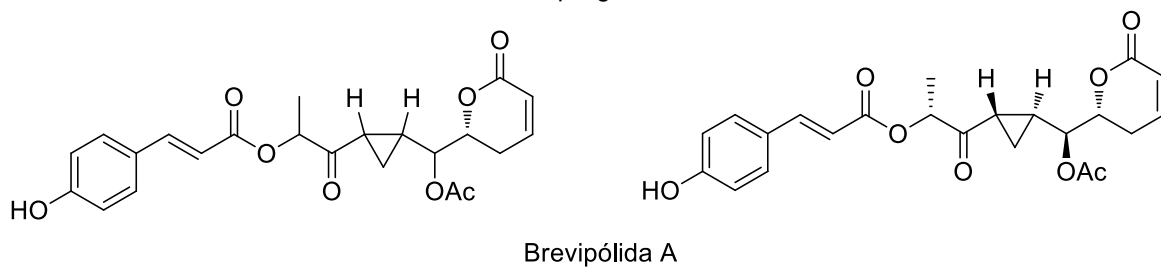
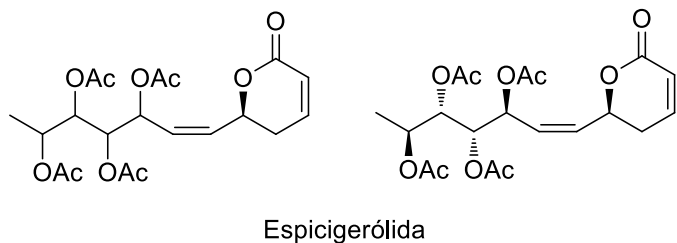
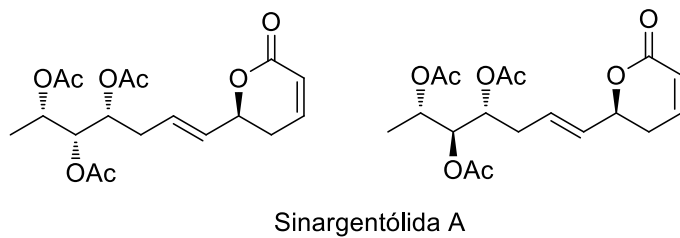
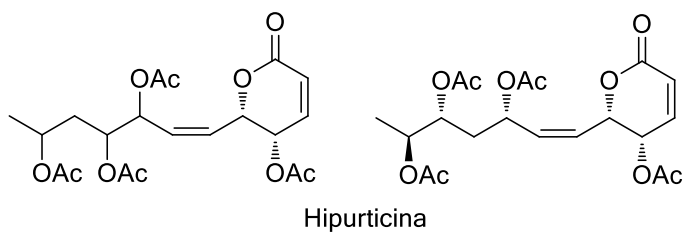
**Figura 11.** Estructuras de productos naturales corregidas a través de química computacional.

Ejemplos del uso del cálculo de las constantes de acoplamiento vecinales ( $J_{H-H}$ ) para moléculas flexibles son los realizados para las 5,6-dihidro-2*H*-piran-2-onas (Figura 12) de origen vegetal ya que esta clase de metabolitos secundarios representa un modelo de estudio muy interesante debido a su funcionalización y alto grado de dispersión conformacional (Figura 12).<sup>60,135</sup> La metodología llamada de “DFT-RMN”<sup>135</sup> incluye la comparación de las constantes de acoplamiento  $J_{H,H}$  vecinales experimentales a través del error cuadrático medio (RMSD) con los valores teóricos obtenidos a partir de una búsqueda conformacional utilizando mecánica molecular (MMFF94). Mediante el empleo de una optimización geométrica, utilizando DFT B3LYP y la base DGZVP, para obtener las frecuencias vibracionales y los parámetros termodinámicos a 298 K y 1 atm y el método GIAO (Gauge Independent Atomic Orbital), se establecieron las constantes de acoplamiento vecinales para la hipurticina,<sup>119</sup> logrando su asignación estructural correcta y la determinación de la configuración absoluta. Esta metodología también se describió para otras 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas pertenecientes a especies de la familia de las labiadas como la espicigerólida,<sup>60</sup> la 5'-epiolguina,<sup>60</sup> la olguina,<sup>60</sup> la sinargentólida A,<sup>136</sup> y las brevipólidas A-J<sup>6</sup> y K-O.<sup>137</sup> Para estas últimas, se complementó el análisis estructural con los cálculos de DFT para la obtención de los espectros teóricos de dicroísmo circular (Figura 12).

Una cuestión crucial que debe abordarse es la forma en como se evalúa la precisión de los desplazamientos químicos calculados y las constantes de acoplamiento. Con frecuencia, se presenta una gráfica de datos calculados *versus* experimentales y la precisión se juzga de acuerdo a: 1) la correlación lineal entre los dos; 2) un parámetro estadístico como el coeficiente de correlación que debe ser suficientemente alto; c) el error absoluto medio que debe ser mínimo y d) la pendiente que debe ser cerca de la unidad y la intersección cercana de cero.<sup>138</sup> Existen otras metodologías para la determinación de la estereoquímica de una molécula orgánica como la probabilidad DP4 que usa los cálculos de desplazamientos químicos a través de GIAO RMN cuando sólo se dispone de datos experimentales para un único diastereoisómero dentro de todas las posibilidades estereoquímicas posibles.<sup>139,140</sup>

**Estructura original**

**Estructura revisada**



**Figura 12.** Estructuras originales y corregidas por DFT de las 5,6-dihidro-2*H*-piran-2-onas de especies del género *Hyptis*.

## 2.7. Referencias

1. Loraine S, Mendoza-Espinoza JA. Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer , relevancia para México Medicinal plants as potential agents against cancer , relevance for Mexico. *Rev Mex Ciencias Farm.* 2010;41(4):18-27. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57916060003>.
2. OMS | Cáncer. *WHO.* 2017. <https://www.who.int/cancer/es/>. Accessed November 23, 2018.
3. Prakash O, Kumar A, Kumar P, Ajeet A. Anticancer Potential of Plants and Natural Products: A Review. *Am J Pharmacol Sci.* 2013;1(6):104-115. doi:10.12691/ajps-1-6-1
4. Da Rocha AB, Lopes RM, Schwartzmann G. Natural products in anticancer therapy. *Curr Opin Pharmacol.* 2001;1(4):364-369. doi:10.1016/S1471-4892(01)00063-7
5. Steinmetz MO, Prota AE. Microtubule-Targeting Agents: Strategies To Hijack the Cytoskeleton. *Trends Cell Biol.* 2018;28(10):776-792. doi:10.1016/j.tcb.2018.05.001
6. Suárez-Ortiz GA, Cerda-García-Rojas CM, Hernández-Rojas A, Pereda-Miranda R. Absolute configuration and conformational analysis of brevipolides, bioactive 5,6-dihydro- $\alpha$ -pyrones from *Hyptis brevipes* . *J Nat Prod.* 2013;76(1):72-78. doi:10.1021/np300740h
7. Fragoso-Serrano M, Gibbons S, Pereda-Miranda R. Anti-staphylococcal and cytotoxic compounds from *Hyptis pectinata*. *Planta Med.* 2005;71(3):278-280. doi:10.1055/s-2005-837831
8. Martínez-Gordillo M, Fragoso-Martínez I, García-Peña MDR, Montiel O. Géneros de Lamiaceae de México, diversidad y endemismo. *Rev Mex Biodivers.* 2013;84(1):30-86. doi:10.7550/rmb.30158
9. Raja RR. Medicinally potential plants of Labiatae (Lamiaceae) family: an overview. 2012:203-2013. doi:20026216
10. Pereda-Miranda R. Bioactive natural products from traditionally used Mexican plants. *Recent Adv Phytochem.* 1995;29:83-112.  
<http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=3UK8q5N40KIC&oi=fnd&pg=PA83&dq=plant+anti+herbivore+chemicals+AND+human+culture&ots=1kAuJsifVE&sig=OMv4R88D7uOymnmBcRK7vi+jqvww>.
11. Falcão DQ, Menezes FS. Revisão etnofarmacológica, farmacológica e química do gênero *Hyptis*. The *Hyptis* genus: an ethnopharmacological and chemical review. *Rev Bras Farmacogn.* 2003;84(3):69-74.
12. Ohsaki A, Kishimoto Y, Isobe T, Fukuyama Y. New labdane diterpenoids from *Hyptis fasciculata*. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 2005;53(12):1577-1579. doi:10.1248/cpb.53.1577
13. Olorunnisola OS, Adetutu A, Balogun EA, Afolayan AJ. Ethnobotanical survey of medicinal plants used in the treatment of malarial in Ogbomoso, Southwest Nigeria. *J Ethnopharmacol.* 2013;150(0):71-78. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2013.07.038>
14. Bunalema L, Obakiro S, Tabuti JRS, Waako P. Knowledge on plants used traditionally in the treatment of tuberculosis in Uganda. *J Ethnopharmacol.* 2014;151(2):999-1004. doi:10.1016/j.jep.2013.12.020

15. Pereda-Miranda R, García M, Delgado G. Structure and stereochemistry of four  $\alpha$ -pyrones from *Hyptis oblongifolia*. *Phytochemistry*. 1990;29(9):2971-2974. doi:10.1016/0031-9422(90)87117-D
16. Pereda-Miranda R, Delgado G. Triterpenoids and flavonoids from *Hyptis albida*. *J Nat Prod*. 1990;53(1):182-185. doi:10.1021/np50067a028
17. Fragoso-Serrano M, González-Chimeo E, Pereda-Miranda R. Novel labdane diterpenes from the insecticidal plant *Hyptis spicigera*. *J Nat Prod*. 1999;62(1):45-50. doi:10.1021/np980222z
18. Tsai SF, Lee SS. Neolignans as xanthine oxidase inhibitors from *Hyptis rhomboides*. *Phytochemistry*. 2014;101:121-127. doi:10.1016/j.phytochem.2014.01.016
19. Xu DH, Huang YS, Jiang DQ, Yuan K. The essential oils chemical compositions and antimicrobial, antioxidant activities and toxicity of three *Hyptis* species. *Pharm Biol*. 2013;51(9):1125-1130. doi:10.3109/13880209.2013.781195
20. Chukwujekwu JC, Smith P, Coombes PH, Mulholland DA, Van Staden J. Antiplasmodial diterpenoid from the leaves of *Hyptis suaveolens*. *J Ethnopharmacol*. 2005;102(2):295-297. doi:10.1016/j.jep.2005.08.018
21. Danmalam UH, Abdullahi LM, Agunu A, Musa KY. Acute Toxicity Studies and Hypoglycemic Activity of the Methanol Extract of the Leaves of *Hyptis Suaveolens* Poit.( Lamiaceae ). *J Pharm Sci*. 2009;8(2):87-92.
22. Kothandan S, Swaminathan R. Evaluation of in vitro antiviral activity of *Vitex Negundo* L., *Hyptis suaveolens* (L) poit., *Decalepis hamiltonii* Wight & Arn., to Chikungunya virus. *Asian Pacific J Trop Dis*. 2014;4(S1):S111-S115. doi:10.1016/S2222-1808(14)60424-2
23. Moreira ACP, Lima E de O, Wanderley PA, Carmo ES, de Souza EL. Chemical composition and antifungal activity of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit leaves essential oil against *Aspergillus* species. *Brazilian J Microbiol*. 2010;41(1):28-33. doi:10.1590/S1517-83822010000100006
24. Begum A, Sama V, Dodle JP. Study of antinociceptive effects on acute pain treated by bioactive fractions of *Hyptis suaveolens*. *J Acute Dis*. 2016;5(5):397-401. doi:10.1016/j.joad.2016.08.006
25. Ghaffari H, Ghassam BJ, Prakash HS. Hepatoprotective and cytoprotective properties of *Hyptis suaveolens* against oxidative stress-induced damage by CCl<sub>4</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Asian Pac J Trop Med*. 2012;5(11):868-874. doi:10.1016/S1995-7645(12)60162-X
26. Goun E, Cunningham G, Chu D, Nguyen C, Miles D. Antibacterial and antifungal activity of Indonesian ethnomedical plants. *Fitoterapia*. 2003;74(6):592-596. doi:10.1016/S0367-326X(03)00117-5
27. Diniz LRL, Vieira CFX, Santos EC Dos, et al. Gastroprotective effects of the essential oil of *Hyptis crenata* Pohl ex Benth. on gastric ulcer models. *J Ethnopharmacol*. 2013;149(3):694-700. doi:10.1016/j.jep.2013.07.026
28. Rebelo MM, Da Silva JKR, Andrade EHA, Maia JGS. Antioxidant capacity and biological activity of essential oil and methanol extract of *Hyptis crenata* Pohl ex Benth. *Brazilian J Pharmacogn*. 2009;19(1 B):230-235. doi:10.4067/S0718-07642015000400007
29. Wekesa I, Onok LA, Deng AL, Hasanali A, Othira JO. Toxicity and repellent potency of *Hyptis*

- spicigera extracts on *Sitophilus zeamais* motschulsky ( Coleoptera : Curculionidae ). *J Stored Prod Post-harvest Res.* 2011;2(June):113-119.
30. Simões RR, Coelho I dos S, Junqueira SC, et al. Oral treatment with essential oil of *Hyptis spicigera* Lam. (Lamiaceae) reduces acute pain and inflammation in mice: Potential interactions with transient receptor potential (TRP) ion channels. *J Ethnopharmacol.* 2017;200(February):8-15.  
doi:10.1016/j.jep.2017.02.025
  31. Takayama C, De-Faria FM, De Almeida ACA, et al. Gastroprotective and ulcer healing effects of essential oil from *Hyptis spicigera* Lam. (Lamiaceae). *J Ethnopharmacol.* 2011;135(1):147-155.  
doi:10.1016/j.jep.2011.03.002
  32. Matsuse IT, Lim YA, Hattori M, Correa M, Gupta MP. A search for anti-viral properties in Panamanian medicinal plants. The effects on HIV and its essential enzymes. *J Ethnopharmacol.* 1998;64(1):15-22. doi:10.1016/S0378-8741(98)00099-3
  33. Lima ACBD, Paixão MS, Melo M, et al. Orofacial antinociceptive effect and antioxidant properties of the hydroethanol extract of *Hyptis fruticosa* salmz ex Benth. *J Ethnopharmacol.* 2013;146(1):192-197. doi:10.1016/j.jep.2012.12.031
  34. Santos MRV, Carvalho AA, Medeiros IA, Alves PB, Marchioro M, Antonioli AR. Cardiovascular effects of *Hyptis fruticosa* essential oil in rats. *Fitoterapia.* 2007;78(3):186-191.  
doi:10.1016/j.fitote.2006.11.009
  35. Caldas GFR, Do Amaral Costa IMÊ, Da Silva JBR, et al. Antiulcerogenic activity of the essential oil of *Hyptis martiusii* Benth. (Lamiaceae). *J Ethnopharmacol.* 2011;137(1):886-892.  
doi:10.1016/j.jep.2011.07.005
  36. Coutinho HDM, Costa JGM, Lima EO, Siqueira-Júnior JP. In vitro phototoxic activity of *Eugenia jambolana* L. and *Hyptis martiusii* Benth. *J Photochem Photobiol B Biol.* 2009;96(1):63-65.  
doi:10.1016/j.jphotobiol.2009.04.002
  37. Santos KKA, Matias EFF, Sobral-Souza CE, et al. Trypanocide, cytotoxic, and anti-Candida activities of natural products: *Hyptis martiusii* Benth. *Eur J Integr Med.* 2013;5(5):427-431.  
doi:10.1016/j.eujim.2013.06.001
  38. Barbosa AGR, Oliveira CDM, Lacerda-Neto LJ, et al. Evaluation of chemical composition and antiedematogenic activity of the essential oil of *Hyptis martiusii* Benth. *Saudi J Biol Sci.* 2017;24(2):355-361. doi:10.1016/j.sjbs.2015.10.004
  39. Sánchez Miranda E, Pérez Ramos J, Fresán Orozco C, Zavala Sánchez MA, Pérez Gutiérrez S. Anti-Inflammatory effects of *Hyptis albida* chloroform extract on lipopolysaccharide-stimulated peritoneal macrophages. *ISRN Pharmacol.* 2013;2013(Splm 20419):Article ID 713060.  
<http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&AuthType=cookie,ip,shib&db=awn&AN=23970974&site=ehost-live>.
  40. Meckes M, Villarreal ML, Tortoriello J, Berlin B, Berlin EA. A microbiological evaluation of medicinal plants used by the Maya people of Southern Mexico. *Phyther Res.* 1995;9(4):244-250.  
doi:10.1002/ptr.2650090403

41. Ximenes RM, Melo AM, Magalhães LPM, de Souza IA, de Albuquerque JFC. Antitumor Activity of Leaves from *Hyptis mutabilis* (A. Rich.) Briq. (Lamiaceae) in Mice Bearing Tumor. *Dataset Pap Pharmacol.* 2013;2013(Daufpe 6256):1-3. doi:10.7167/2013/169357
42. Maria M. Oliva , Mirta S. Demo , Abel G. Lopez MLL& JAZ. Antimicrobial Activity and Composition of *Hyptis mutabilis* Essential Oil. *J Herbs, Spices Med Plants.* 2005;11(4):57-63. doi:10.1300/J044v11n04\_07
43. Isobe T, Doe M, Morimoto Y, Nagata K, Ohsaki A. The Anti-Helicobacter pylori Flavones in a Brazilian Plant, *Hyptis fasciculata*, and the Activity of Methoxyflavones. *Biol Pharm Bull.* 2006;29(5):1039-1041. doi:10.1248/bpb.29.1039
44. Souza LKH, De Oliveira CMA, Ferri PH, et al. Antimicrobial Activity of *Hyptis ovalifolia* Towards Dermatophytes. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003;98(7):963-965. doi:10.1590/S0074-02762003000700018
45. Abedini A, Roumy V, Mahieux S, et al. Rosmarinic acid and its methyl ester as antimicrobial components of the hydromethanolic extract of *Hyptis atrorubens* Poit. (Lamiaceae). *Evidence-based Complement Altern Med.* 2013;2013. doi:10.1155/2013/604536
46. Picking D, Delgoda R, Boulogne I, Mitchell S. *Hyptis verticillata* Jacq: A review of its traditional uses, phytochemistry, pharmacology and toxicology. *J Ethnopharmacol.* 2013;147(1):16-41. doi:10.1016/j.jep.2013.01.039
47. Biblioteca Digital Medicina Tradicional Mexicana. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/>. Accessed November 23, 2018.
48. Bispo MD, Mourão RHV, Franzotti EM, et al. Antinociceptive and antiedematogenic effects of the aqueous extract of *Hyptis pectinata* leaves in experimental animals. *J Ethnopharmacol.* 2001;76(1):81-86. doi:10.1016/S0378-8741(01)00172-6
49. Revisión del género *Hyptis* (Labiatae). In: *Revista Del Museo de La Plata, Sección Botánica.* ; 1949:153-497.
50. Pereda-Miranda R, Hernández L, Villavicencio MJ, et al. Structure and stereochemistry of pectinolides a-C, novel antimicrobial and cytotoxic 5, 6-dihydro- $\alpha$ -pyrones from *Hyptis pectinata*. *J Nat Prod.* 1993;56(4):583-593. doi:10.1021/np50094a019
51. Agra MDF, Freitas PF De, Barbosa-filho JM. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. 2007;17(1):114-140.
52. Melo GB, Lemos Silva R, Melo VA, et al. Proliferative effect of the aqueous extract of *Hyptis pectinata* on liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Acta Cirúrgica Bras -Vol Planta Melo GB alActa Cirúrgica Bras.* 2006;21(21):33-36. doi:10.1039/c5ta00976f
53. Paixão MS, Melo MS, Damascena NP, et al. *Hyptis pectinata* gel prevents alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. *Brazilian J Pharmacogn.* 2015;25(1):35-41. doi:10.1016/j.bjp.2014.12.002
54. Falcão REA, de Souza SA, Camara CA, et al. Evaluation of the orofacial antinociceptive profile of the ethyl acetate fraction and its major constituent, rosmarinic acid, from the leaves of *Hyptis*



- pectinata* on rodents. *Brazilian J Pharmacogn.* 2016;26(2):203-208. doi:10.1016/j.bjp.2015.07.029
55. Guilhon CC, Raymundo LJP, Alviano DS, et al. Characterisation of the anti-inflammatory and antinociceptive activities and the mechanism of the action of *Lippia gracilis* essential oil. *J Ethnopharmacol.* 2011;135(2):406-413. doi:10.1016/j.jep.2011.03.032
  56. Falcao RA, Do Nascimento PLA, De Souza SA, et al. Antileishmanial phenylpropanoids from the leaves of *Hyptis pectinata* (L.) poit. *Evidence-based Complement Altern Med.* 2013;2013. doi:10.1155/2013/460613
  57. Serafini MR, Campos M, Rabelo K, et al. Determination of chemical and physical properties of *Hyptis pectinata* essential oil and their redox active profile. 2012;3(March):1-9.
  58. Nascimento PFC, Alviano WS, Nascimento ALC, Santos PO, Arrigoni-blank MF, Jesus RA De. *Hyptis pectinata* essential oil : chemical composition and anti- *Streptococcus mutans* activity. 2008;(May 2007):485-489. doi:10.1111/j.1601-0825.2007.01405.x
  59. Santos PO, Costa MDJC, Alves JAB, et al. Chemical Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Hyptis pectinata* (L.) poit. 2008;31(7):1648-1652.
  60. López-Vallejo F, Fragoso-Serrano M, Suárez-Ortiz GA, Hernández-Rojas AC, Cerda-García-Rojas CM, Pereda-Miranda R. Vicinal 1H-1H NMR coupling constants from density functional theory as reliable tools for stereochemical analysis of highly flexible multichiral center molecules. *J Org Chem.* 2011;76(15):6057-6066. doi:10.1021/jo200637g
  61. Perera WH, Bizzo HR, Gama PE, et al. Essential oil constituents from high altitude Brazilian species with antimicrobial activity: *Baccharis parvidentata* Malag., *Hyptis monticola* Mart. ex Benth. and *Lippia organoides* Kunth. *J Essent Oil Res.* 2017;29(2):109-116. doi:10.1080/10412905.2016.1210039
  62. Lima KSB de, Ávila Pimenta AT, Silva Guedes ML, Sousa Lima MA, Silveira ER. Abietane diterpenes from *Hyptis carvalhoi* Harley. *Biochem Syst Ecol.* 2012;44:240-242. doi:10.1016/j.bse.2011.12.001
  63. Lima KSB, Guedes MLS, Silveira ER. Abietane diterpenes from *Hyptis crassifolia* Mart. ex Benth. (Lamiaceae). *J Braz Chem Soc.* 2015;26(1):32-39. doi:10.5935/0103-5053.20140210
  64. Costa-Lotufo L V., Araújo ECC, Lima MAS, et al. Antiproliferative effects of abietane diterpenoids isolated from *Hyptis martiusii* Benth (Labiatae). *Pharmazie.* 2004;59(1):78-79.
  65. Cavalcanti BC, Moura DJ, Rosa RM, et al. Genotoxic effects of tanshinones from *Hyptis martiusii* in V79 cell line. *Food Chem Toxicol.* 2008;46(1):388-392. doi:10.1016/j.fct.2007.08.009
  66. Álvarez F, Tello E, Bauer K, Díaz LE, Jimenez C. Cytotoxic and Antimicrobial Diterpenes from *Hyptis dilatata*. *Curr Bioact Compd.* 2015;(July 2016):189-197. doi:10.2174/1573407211666150914213356
  67. Yun YS, Fukaya H, Nakane T, et al. A New Bis- seco -abietane Diterpenoid from *Hyptis crenata* Pohl ex Benth. *Org Lett.* 2014;16(23):6188-6191. doi:10.1021/ol503086n
  68. Yamagishi T, Zhang DC, Chang JJ, McPhail DR, McPhail AT, Lee KH. The cytotoxic principles of *Hyptis capitata* and the structures of the new triterpenes hyptatic acid-A and -B. *Phytochemistry.*

- 1988;27(10):3213-3216. doi:10.1016/0031-9422(88)80028-1
69. Dalglish T, Williams JMG., Golden A-MJ, et al. Biological and Pharmacological Activities and Further Constituents of *Hyptis verticillata*. *J Exp Psychol Gen*. 2007;136(1):23-42.
70. Kuhnt M, Rimpler H, Heinrich M. Lignans and other compounds from the mixe indian medicinal plant *Hyptis verticillata*. *Phytochemistry*. 1994;36(2):485-489. doi:10.1016/S0031-9422(00)97101-2
71. Novelo M, Cruz JG, Hernández L, et al. Cytotoxic constituents from *Hyptis Verticillata*. *J Nat Prod*. 1993;56(10):1728-1736. doi:10.1021/np50100a011
72. Kingston DGI, Rao MM, Zucker W V. Plant Anticancer Agents. IX. Constituents of *Hyptis tomentosa*. *J Nat Prod*. 1979;42(5):496-499. doi:10.1021/np50005a010
73. Falomir E, Murga J, Ruiz P, et al. Stereoselective synthesis and determination of the cytotoxic properties of spicigerolide and three of its stereoisomers. *J Org Chem*. 2003;68(14):5672-5676. doi:10.1021/jo034470y
74. Davies-Coleman, M. T.; Rivett DEA. Naturally occurring 6-substituted 5, 6-dihydro- $\alpha$ -pyrones. In: Herz, W.; Grisebach, H.; Kirby, G. W.; Tamm C, ed. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. New York; 1989:1-35.
75. Bjerketorp J, Levenfors JJ, Sahlberg C, et al. Antibacterial 3,6-Disubstituted 4-Hydroxy-5,6-dihydro-2H-pyran-2-ones from *Serratia plymuthica* MF371-2. *J Nat Prod*. 2017;80(11):2997-3002. doi:10.1021/acs.jnatprod.7b00565
76. Bañuelos-Hernández AE, Mendoza-Espinoza JA, Pereda-Miranda R, Cerda-García-Rojas CM. Studies of (-)-pironetin binding to  $\alpha$ -tubulin: Conformation, docking, and molecular dynamics. *J Org Chem*. 2014;79(9):3752-3764. doi:10.1021/jo500420j
77. Yang J, Wang Y, Wang T, et al. Pironetin reacts covalently with cysteine-316 of  $\alpha$ -tubulin to destabilize microtubule. *Nat Commun*. 2016;7(May):1-9. doi:10.1038/ncomms12103
78. Demole E, Berthet D. A Chemical Study of Burley Tobacco Flavour (*Nicotiana tabacum* L.). I. Volatile to medium-volatile constituents (b.p.  $\leq$  84°/0.001 Torr. *Helv Chim Acta*. 1972;55(6):1866-1882. doi:10.1002/hlca.19720550603
79. Wattanachaisaereekul S, Tachaleat A, Punya J, Haritakun R, Boonlarpradab C, Cheevadhanarak S. Assessing medium constituents for optimal heterologous production of anhydromevalonolactone in recombinant *Aspergillus oryzae*. *AMB Express*. 2014;4(1):1-16. doi:10.1186/s13568-014-0052-9
80. Valenti DJ, Arif AM, Strobel GA, Harper JK. (6S\*)-6-[(1S\*,2R\*)-1,2-Dihydroxypentyl]-4-methoxy-5, 6-dihydro-2H-pyran-2-one. *Acta Crystallogr Sect E Struct Reports Online*. 2013;69(11):721-727. doi:10.1107/S1600536813027025
81. Akay, Ş., Ekiz, G., Kocabaş, F., Hameş-Kocabaş, E. E., Korkmaz, K. S., Bedir E. A new 5,6-dihydro-2-pyrone derivative from *Phomopsis amygdali*, an endophytic fungus isolated from hazelnut (*Corylus avellana*). *Phytochem Lett*. 2014;7(1):93-96. doi:10.1016/j.phytol.2013.09.012
82. Tian JF, Yu RJ, Li XX, et al. 1H and 13C NMR spectral assignments of 2-pyrone derivatives from an endophytic fungus of Sarcosomataceae. *Magn Reson Chem*. 2015;53(10):866-871. doi:10.1002/mrc.4282

83. Li W, Li X Bin, Li L, Li RJ, Lou HX.  $\alpha$ -Pyrone derivatives from the endolichenic fungus *Nectria* sp. *Phytochem Lett.* 2015;12:22-26. doi:10.1016/j.phytol.2015.02.008
84. Zhao Q, Wang CX, Yu Y, et al. Nodulisporipyrone A-D, new bioactive  $\alpha$ -pyrone derivatives from *Nodulisporium* sp. *J Asian Nat Prod Res.* 2015;17(5):567-575. doi:10.1080/10286020.2015.1040776
85. Endo A, Hasumi K, Masuda M. Dihydromonacolin L and Monacolin Those Inhibit Cholesterol X, New Metabolites Biosynthesis. *J Antibiot (Tokyo).* 1985;XXXVIII(3):321-327. doi:10.7164/antibiotics.38.321
86. Maher S, Rasool S, Mehmood R, Perveen S, Tareen RB. Trichosides A and B, new withanolide glucosides from *Tricholepis eburnea*. *Nat Prod Res.* 2018;32(1):1-6. doi:10.1080/14786419.2015.1030340
87. Teruya T, Suenaga K, Maruyama S, Kurotaki M, Kigoshi H. Biselides A-E: Novel polyketides from the Okinawan ascidian Didemnidae sp. *Tetrahedron.* 2005;61(27):6561-6567. doi:10.1016/j.tet.2005.04.052
88. Murakami N, Sugimoto M, Nakajima T, Kawanishi M, Tsutsui Y, Kobayashi M. Participation of the Conjugated Diene Part for Potent Cytotoxicity of Callystatin A , a Spongean Polyketide. 2000;8:2651-2661.
89. Of VCOMPONENTS, Liverworts THE, Olivacea ARCHILEJEUNEA, Elliptica ANDLEPTOLEJEUNEA. Volatile components of the liverworts *Archilejeunea olivacea*, *Cheilolejeunea imbricata* and *Leptolejeunea elliptica*. 1997;44(7):1261-1264.
90. Horikawa M, Inai M, Oguri Y, et al. Isolation and Total Syntheses of Cytotoxic Cryptolactones A1,A2,B1, and B2:  $\alpha,\beta$ -Unsaturated  $\delta$ -Lactones from a *Cryptomyzus* sp. Aphid. *J Nat Prod.* 2014;77(11):2459-2464. doi:10.1021/np500542x
91. Takeda Y, Okada Y, Masuda T, Hirata E, Takushi A, Otsuka H. Euscapholide and its glucoside from leaves of *Euscaphis japonica*. *Phytochemistry.* 1998;49(8):2565-2568. doi:10.1016/S0031-9422(98)00193-9
92. Koshino H, Yoshihara T, Okuno M, Sakamura S, Tajimi A, Shimanuki T. Gamahonolides A, B, and Gamahorin, Novel Antifungal Compounds from Stromata of *Epichloe typhina* on *Phleum pratense*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1992;56(7):1096-1099. doi:10.1271/bbb.56.1096
93. Swingle MR, Amable L, Lawhorn BG, et al. Structure-activity relationship studies of fostriecin, cytostatin, and key analogs, with PP1, PP2A, PP5, and( beta12-beta13)-chimeras (PP1/PP2A and PP5/PP2A), provide further insight into the inhibitory actions of fostriecin family inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009;331(1):45-53. doi:10.1124/jpet.109.155630
94. Takeuchi T, Takahashi N, Ishi K, Kusayanagi T, Kuramochi K, Sugawara F. Antitumor antibiotic fostriecin covalently binds to cysteine-269 residue of protein phosphatase 2A catalytic subunit in mammalian cells. *Bioorganic Med Chem.* 2009;17(23):8113-8122. doi:10.1016/j.bmc.2009.09.050
95. Kasaplar P, Yilmazer Ö, Çağır A. 6-Bicycloaryl substituted (S)- and (R)-5,6-dihydro-2H-pyran-2-ones: Asymmetric synthesis, and anti-proliferative properties. *Bioorganic Med Chem.* 2009;17(1):311-318. doi:10.1016/j.bmc.2008.10.069

96. Grkovic T, Bleses JS, Colburn NH, et al. Cryptocaryols A-H,  $\alpha$ -pyrone-containing 1,3-polyols from *Cryptocarya* sp. implicated in stabilizing the tumor suppressor Pcdcd4. *J Nat Prod.* 2011;74(5):1015-1020. doi:10.1021/np100918z
97. Sturgeon CM, Cinel B, Díaz-Marrero AR, et al. Abrogation of ionizing radiation-induced G2 checkpoint and inhibition of nuclear export by *Cryptocarya* pyrones. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2008;61(3):407-413. doi:10.1007/s00280-007-0483-y
98. Davis RA, Demirkiran O, Sykes ML, et al. 7',8'-Dihydroobolactone, a typanocidal  $\alpha$ -pyrone from the rainforest tree *Cryptocarya obovata*. *Bioorganic Med Chem Lett.* 2010;20(14):4057-4059. doi:10.1016/j.bmcl.2010.05.091
99. Liu Y, Rakotondraibe LH, Brodie PJ, et al. Antimalarial 5,6-Dihydro- $\alpha$ -pyrones from *Cryptocarya rigidifolia*: Related Bicyclic Tetrahydro- $\alpha$ -Pyrone Are Artifacts. *J Nat Prod.* 2015;78(6):1330-1338. doi:10.1021/acs.jnatprod.5b00187
100. Juliawaty LD, Kitajima M, Takayama H, Achmad SA, Aimi N. A 6-substituted-5,6-dihydro-2-pyrone from *Cryptocarya strictifolia*. *Phytochemistry.* 2000;54(8):989-993. doi:10.1016/S0031-9422(00)00077-7
101. Collett, L. A., Davies-Coleman, M. T., Rivett, D. E., Drewes, S. E., & Horn MM. Absolute configuration of  $\alpha$ -pyrones from *Cryptocarya latifolia* and *Syncolostemon densiflorus*. *Phytochemistry.* 1997;44(5):935-938.
102. Mosaddik MA, Haque ME. Cytotoxicity and Antimicrobial Activity of Goniiothalamine Isolated from *Bryonopsis laciniata*. *Phyther Res.* 2003;17(10):1155-1157. doi:10.1002/ptr.1303
103. Chiu CC, Liu PL, Huang KJ, et al. Goniiothalamine inhibits growth of human lung cancer cells through DNA damage, apoptosis, and reduced migration ability. *J Agric Food Chem.* 2011;59(8):4288-4293. doi:10.1021/jf200566a
104. Kabir KE, Khan AR, Mosaddik MA. Goniiothalamine - A potent mosquito larvicide from *Bryonopsis laciniata* L. *J Appl Entomol.* 2003;127(2):112-115. doi:10.1046/j.1439-0418.2003.00716.x
105. De Fátima Â, Kohn LK, De Carvalho JE, Pilli RA. Cytotoxic activity of (S)-goniiothalamine and analogues against human cancer cells. *Bioorganic Med Chem.* 2006;14(3):622-631. doi:10.1016/j.bmc.2005.08.036
106. Cardona G. W., Quiñones F. W., Echeverri L. F. Leishmanicidal activity of passifloricin A and derivatives. *Molecules.* 2004;9(8):666-672.
107. Carmona D, Sáez J, Granados H, et al. Antiprotozoal 6-substituted-5,6-dihydro- $\alpha$ -pyrones from *Raimondia cf. Monoica*. *Nat Prod Res.* 2003;17(4):275-280. doi:10.1080/1057563031000065062
108. Andrianaivoravelona JO, Sahpaz S, Terreaux C, Hostettmann K, Stoeckli-evans H, Rasolondramanitra J. Two 6-substituted 5,6-dihydro- $\alpha$ -pyrones from *Ravensara anisata*. 2000;52(1999):265-269.
109. Raelison GE, Terreaux C, Queiroz EF, et al. Absolute configuration of two new 6-alkylated  $\alpha$ -pyrones (= 2H-pyran-2-ones) from *Ravensara crassifolia*. *Helv Chim Acta.* 2001;84(11):3470-3476. doi:10.1002/1522-2675(20011114)84:11<3470::AID-HLCA3470>3.0.CO;2-K

110. Nagashima H, Nakamura K, Goto T. Hepatotoxin rubratoxin B induced the secretion of TNF- $\alpha$ , IL-8, and MCP-1 in HL60 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;287(4):829-832. doi:10.1006/bbrc.2001.5657
111. Wang T, Zhang Y, Wang Y, Pei Y hu. Anti-tumor effects of Rubratoxin B on cell toxicity, inhibition of cell proliferation, cytotoxic activity and matrix metalloproteinase-2,9. *Toxicol Vitr.* 2007;21(4):646-650. doi:10.1016/j.tiv.2007.01.001
112. Nagashima H, Goto T. Calcium channel blockers verapamil and diltiazem impaired rubratoxin B-caused toxicity in HL60 cells. *Toxicol Lett.* 2000;118(1-2):47-51. doi:10.1016/S0378-4274(00)00266-6
113. Toneto Novaes LF, Martins Avila C, Pelizzaro-Rocha KJ, et al. (-)-Tarchonanthuslactone: Design of New Analogues, Evaluation of their Antiproliferative Activity on Cancer Cell Lines, and Preliminary Mechanistic Studies. *ChemMedChem.* 2015;10(10):1687-1699. doi:10.1002/cmde.201500246
114. Sirirath S, Tanaka J, Ohtani II, et al. Bitungolides A - F, new polyketides from the Indonesian sponge *Theonella cf. swinhoei*. *J Nat Prod.* 2002;65(12):1820-1823. doi:10.1021/np0200865
115. Igarashi Y, Asano D, Furihata K, et al. Absolute configuration of pterocidin, a potent inhibitor of tumor cell invasion from a marine-derived *Streptomyces*. *Tetrahedron Lett.* 2012;53(6):654-656. doi:10.1016/j.tetlet.2011.11.115
116. Masi M, Maddau L, Linaldeddu BT, et al. Bioactive Secondary Metabolites Produced by the Oak Pathogen *Diplodia corticola*. *J Agric Food Chem.* 2016;64(1):217-225. doi:10.1021/acs.jafc.5b05170
117. Achmad S, Høyer T, Kjær A, Makmur L, Norrestam R. Molecular and Crystal Structure of Hyptolide, a Naturally Occurring alpha,beta-Unsaturated delta-Lactone. *Acta Chem Scand.* 1987;41b(Table 1):599-609. doi:10.3891/acta.chem.scand.41b-0599
118. Boalino DM, Connolly JD, McLean S, Reynolds WF, Tinto WF.  $\alpha$ -Pyrones and a 2(5H)-furanone from *Hyptis pectinata*. *Phytochemistry.* 2003;64(7):1303-1307. doi:10.1016/j.phytochem.2003.08.017
119. Mendoza-Espinoza JA, López-Vallejo F, Fragoso-Serrano M, Pereda-Miranda R, Cerda-García-Rojas CM. Structural reassignment, absolute configuration, and conformation of hypurticin, a highly flexible polyacyloxy-6-heptenyl-5,6-dihydro-2H-pyran-2-one. *J Nat Prod.* 2009;72(4):700-708. doi:10.1021/np800447k
120. Almtorp GT, Hazell AC, Torssell KBG. A lignan and pyrone and other constituents from *Hyptis capitata*. *Phytochemistry.* 1991;30(8):2753-2756. doi:10.1016/0031-9422(91)85137-O
121. Araújo FS, Coelho LM, Silva L do C, et al. Effects of Argentilactone on the Transcriptional Profile, Cell Wall and Oxidative Stress of *Paracoccidioides* spp. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(1):1-18. doi:10.1371/journal.pntd.0004309
122. De Oliveira CMA, Silva MDRR, Kato L, Da Silva CC, Ferreira HD, Souza LKH. Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Hyptis ovalifolia* Benth. (Lamiaceae). *J Braz Chem Soc.* 2004;15(5):756-759. doi:10.1055/s-2004-827162
123. Costa VCDO, Tavares JF, Silva AB, et al. Hyptenolide, a new  $\alpha$ -pyrone with spasmolytic activity from *Hyptis macrostachys*. *Phytochem Lett.* 2014;8(1):32-37. doi:10.1016/j.phytol.2014.01.009

124. Rahman MM, Gibbons S. Antibacterial constituents of *Neohyptis paniculata*. *Fitoterapia*. 2015;105:269-272. doi:10.1016/j.fitote.2015.07.012
125. Pereda-Miranda R, Fragoso-Serrano M, Cerda-García-Rojas CM. Application of molecular mechanics in the total stereochemical elucidation of spicigerolide, a cytotoxic 6-tetraacetyl-oxyheptenyl-5,6-dihydro- $\alpha$ -pyrone from *Hyptis spicigera*. *Tetrahedron*. 2001;57(1):47-53. doi:10.1016/S0040-4020(00)00987-X
126. Deng Y, Balunas MJ, Kim J, et al. Bioactive 5,6-Dihydro-r-pyrone Derivatives from *Hyptis brevipes*. 2009;72:1165-1169.
127. Valles-sánchez A, Rosales-marines L, Eugenia L, Lorena S. Métodos y Usos de la Química Computacional Computational Chemistry Methods and its Applications. *Rev Científica la Univ Autónoma Coahuila Métodos*. 2014;6(11):16-21.
128. D. Suárez. Objetivos y características de la química computacional y su aplicación al estudio de materiales de carbono. *Bol Grup Español Carbón*. 2012;25:23-28. doi:10.1021/nl102916n
129. Cuevas G, Cortes F. *Introducción a La Química Computacional*. primera ed. Mexico: Fondo de Cultura Económica; 2003.
130. Cedrón JC, Tenerife LL. Métodos para Determinar la Configuración Absoluta de una Molécula. *Inst Univ Bioorgánica "Antonio González."* 2011:19-31.
131. José M. Seco, Emilio Quiñoá and RR. *The Assignment of the Absolute Configuration by NMR Using Chiral Derivatizing Agents: A Practical Guide*. New York: Oxford University Press; 2015.
132. Tantillo DJ. Walking in the woods with quantum chemistry-applications of quantum chemical calculations in natural products research. *Nat Prod Rep*. 2013;30(8):1079-1086. doi:10.1039/c3np70028c
133. Riccio R, Bifulco G, Cimino P, Bassarello C, Gomez-Paloma L. Stereochemical analysis of natural products. Approaches relying on the combination of NMR spectroscopy and computational methods. *Pure Appl Chem*. 2003;75(2-3):295-308. doi:10.1351/pac200375020295
134. Mohan SJ, Mohan EC, Yamsani MR. Chirality and its Importance in Pharmaceutical Field- An Overview. *Int J Pharm Sci Nanotechnol*. 1998;1(4):309-316. <http://www.pharmabooksyndicate.com/issues/309.pdf>.
135. Tormena CF. Conformational analysis of small molecules: NMR and quantum mechanics calculations. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc*. 2016;96:73-88. doi:10.1016/j.pnmrs.2016.04.001
136. Juárez-González F, Suárez-Ortiz GA, Fragoso-Serrano M, Cerda-García-Rojas CM, Pereda-Miranda R. DFT  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  coupling constants in the conformational analysis and stereoisomeric differentiation of 6-heptenyl-2H-pyran-2-ones: Configurational reassignment of synargentolide A. *Magn Reson Chem*. 2015;53(3):203-212. doi:10.1002/mrc.4178
137. Suárez-Ortiz GA, Cerda-García-Rojas CM, Fragoso-Serrano M, Pereda-Miranda R. Complementarity of DFT Calculations, NMR Anisotropy, and ECD for the Configurational Analysis of Brevipolides K-O from *Hyptis brevipes*. *J Nat Prod*. 2017;80(1):181-189. doi:10.1021/acs.jnatprod.6b00953
138. Bagno A, Rastrelli F, Saielli G. Toward the complete prediction of the  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of

- complex organic molecules by DFT methods: Application to natural substances. *Chem - A Eur J.* 2006;12(21):5514-5525. doi:10.1002/chem.200501583
139. Smith SG, Goodman JM. Assigning stereochemistry to single diastereoisomers by GIAO NMR calculation: The DP4 probability. *J Am Chem Soc.* 2010;132(37):12946-12959. doi:10.1021/ja105035r
140. Grimblat N, Zanardi MM, Sarotti AM. Beyond DP4: An Improved Probability for the Stereochemical Assignment of Isomeric Compounds using Quantum Chemical Calculations of NMR Shifts. *J Org Chem.* 2015;80(24):12526-12534. doi:10.1021/acs.joc.5b02396

### 3. JUSTIFICACIÓN

Las 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas han demostrado ser responsables de la actividad citotóxica y antimicrobiana de algunas especies de plantas del género *Hyptis*. A su vez estos compuestos flexibles de bajo peso molecular y con múltiples centros quirales representan un valioso y muy poco explorado modelo para el análisis conformacional y configuracional a través de la teoría de funcionales de la densidad (DFT). Debido a esto, se seleccionaron dos especies del género *Hyptis* con el fin de aislar, purificar y caracterizar la estructura molecular de nuevos 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas citotóxicas. También se realizó el análisis termodinámico teórico de esta clase de metabolitos secundarios con una alta dispersión conformacional, en combinación con correlaciones químicas, mediciones quirópticas y constantes experimentales obtenidas a través de DFT-RMN para determinar la configuración absoluta y lograr la diferenciación epimérica de ejemplos selectos de 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas con una alta afinidad por la subunidad alfa del dímero de tubulina.





## 4. OBJETIVOS

El objetivo principal del presente estudio consistió en llevar a cabo el aislamiento, la purificación y la caracterización estructural de nuevas 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas citotóxicas a partir de los extractos de *Hyptis pectiata* e *Hyptis monticola*, con el fin de realizar el análisis conformacional y el establecimiento de la configuración absoluta aplicando el cálculo teórico DFT de las constantes de acoplamiento ( $^3J_{H,H}$ ) y desplazamientos químicos ( $\delta$ ) en la resonancia magnética nuclear y su correlación con los valores experimentales; además, se determinó el potencial citotóxico de las 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas aisladas en diferentes líneas celulares y su análisis mediante acoplamiento molecular con la tubulina.

### Objetivos específicos

- Realizar el aislamiento y la purificación de las 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas a través de diversas técnicas cromatográficas.
- Caracterizar la estructura química de los compuestos obtenidos utilizando RMN y espectrometría de masas (MS), en conjunto con derivatizaciones con ésteres de Mosher y correlaciones químicas para establecer la configuración absoluta.
- Analizar, a través de un protocolo de modelado molecular con DFT y RMN, la conformación teórica en fase gaseosa y en disolución de las 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas obtenidas para determinar la configuración absoluta y establecer su diferenciación epimérica.
- Evaluar el potencial citotóxico de los compuestos puros utilizando tres líneas celulares derivadas de tumores humanos: HTC-15 (carcinoma de colon), HeLa (carcinoma de cérvix) y MCF-7 (carcinoma de mama).
- Realizar el análisis de acoplamiento molecular (docking) utilizando como ligandos las 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas aisladas con mayor potencial citotóxico para la proteína  $\alpha,\beta$ -tubulina.



## 5. CAPÍTULO I

### **Structure Elucidation, Conformation, and Configuration of Cytotoxic 6-Heptyl-5,6-dihydro-2*H*-pyran-2-ones from *Hyptis* Species and their Molecular Docking to $\alpha$ -Tubulin**

Lucero Martínez-Fructuoso,<sup>†</sup> Rogelio Pereda-Miranda,<sup>\*,†</sup> Daniel Rosas-Ramírez,<sup>†</sup>  
Mabel Fragoso-Serrano,<sup>†</sup> Carlos M. Cerda-García-Rojas,<sup>‡</sup> Aline Soares da Silva,<sup>§</sup>  
Gilda Guimarães Leitão,<sup>±</sup> and Suzana Guimarães Leitão<sup>§</sup>

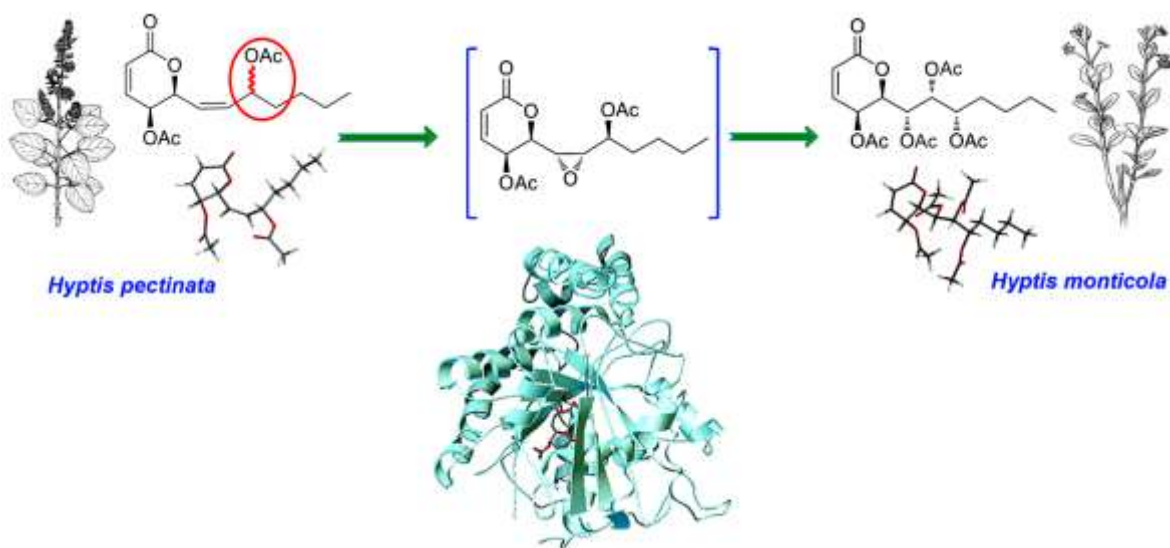
<sup>†</sup>Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Mexico City 04510, Mexico

<sup>‡</sup>Departamento de Química, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, A. P. 14-740, Mexico City 07000, Mexico

<sup>§</sup>Faculdade de Farmacia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, CCS, Bloco A, Ilha do Fundão, 21941-902, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>±</sup>Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, CCS, Bloco H, Ilha do Fundão, 21941-590, Rio de Janeiro, Brazil

**ABSTRACT:** Cytotoxic 6-heptyl-5,6-dihydro-2*H*-pyran-2-ones are chemical markers of *Hyptis* (Lamiaceae) and responsible for some of the therapeutic properties of species with relevance to traditional medicine. The present investigation describes the isolation of known pectinolides A-C (**1-3**), in addition to the new pectinolides I-M (**4-8**), from two Mexican collections of *H. pectinata* by HPLC. The novel biosynthetically related monticolides A (**9**) and B (**10**) were also isolated by high-speed countercurrent chromatography from *H. monticola*, an endemic species of the Brazilian southeastern high-altitude regions. A combination of chemical correlations, chiroptical measurements, and Mosher esters NMR analysis was used to confirm their absolute configuration. The utility of DFT-NMR chemical shifts and  $J_{H-H}$  calculations was assessed for epimer differentiation. Molecular docking studies indicated that 6-heptyl-5,6-dihydro-2*H*-pyran-2-ones have a high affinity for the pironetin-binding site of  $\alpha$ -tubulin, which may be a possible mechanism contributing to the cytotoxic potential of these small and flexible molecules.

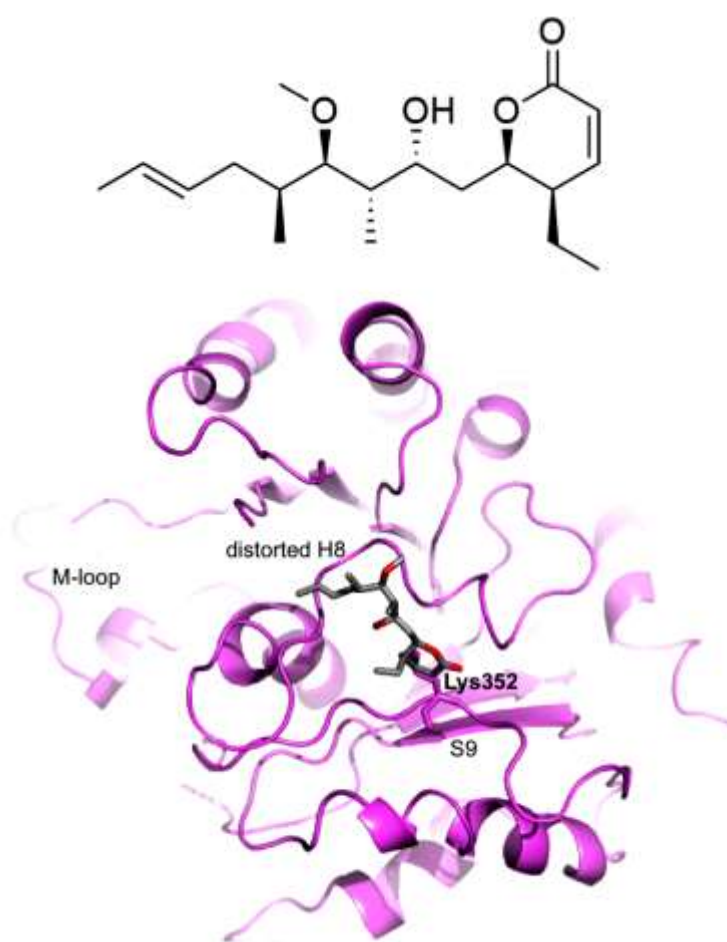


## 5.1 INTRODUCTION

The plants belonging to the genus *Hyptis* from the mint family (Lamiaceae), commonly known as bushmints, are widespread in the tropical Americas with the Guianan and Brazilian shields as their diversification center.<sup>1</sup> This genus has a great relevance for the traditional medicine of Latin America in the treatment of gastrointestinal and respiratory problems and fever.<sup>2-4</sup> *H. pectinata* (L.) Poit., with a pantropical distribution, has spread as a weed and became naturalized throughout the South American tropics to the Caribbean, Central America, and Mexico. It is considered a noxious weed of cultivated land, pastures, and trailsides. In Mexico and Brazil, it is utilized extensively in ethnomedicine as a decoction, mainly as a natural anti-inflammatory agent for rheumatic pains. Aqueous and organic extracts from leaves have shown antiedematogenic and antinociceptive effects in animal models,<sup>5,6</sup> validating the popular use of this herbal drug. In addition, the antimicrobial activities of its essential oils, with thymol as the major component, are also responsible for a large number of the therapeutic applications of this medicinal plant.<sup>7</sup> Additionally, *H. monticola* Mart. ex Benth. is an endemic species of high-altitude areas (1000-2000 m a.s.l.) at the Brazilian Southeastern region. Its essential oil was characterized predominantly by *trans*-caryophyllene, (*E*)-methyl cinnamate, germacrene D, limonene,  $\alpha$ -muurolene, and  $\beta$ -pinene.<sup>7c</sup> The pharmacological properties of this species have not been studied.

*Hyptis* contains a group of chemical markers possessing the 6-heptyl-5,6-dihydro-2*H*-pyran-2-one system, which contributes with its antimicrobial<sup>3</sup> and cytotoxic<sup>8</sup> properties. The activity of these compounds is related to the  $\alpha,\beta$ -unsaturated  $\delta$ -lactone system, a well-known Michael acceptor, which is complemented with the lipophilicity provided by the 6-alkyl substituent to facilitate interaction with cell membranes.<sup>8b</sup> Pironetin, isolated from cultures

of *Streptomyces* sp., is a representative example of this type of cytotoxic compounds, which is the only natural compound currently known to bind to  $\alpha$ -tubulin, and is a potent inhibitor of microtubule polymerization. Its mechanism of action is carried out through a Michael-type addition of Lys352 of the tubulin  $\alpha$ -subunit to the  $\beta$ -carbon atom of the  $\alpha,\beta$ -unsaturated  $\delta$ -lactone (Figure 1).<sup>9</sup> However, it has been postulated that pironetin could also form a covalent bond to Cys316.<sup>9c</sup> All other microtubule-disruptive drugs of plant origin bind to  $\beta$ -tubulin.<sup>10</sup>



**Figure 1.** Chemical structure of pironetin (above), a representative example of cytotoxic 5,6-dihydro-2*H*-pyran-2-ones, and minimum energy molecular model of  $\alpha$ -tubulin with pironetin covalently bonded at Lys352 (below). Pironetin incorporation alters the H8 and M-loop tertiary structure of  $\alpha$ -tubulin.

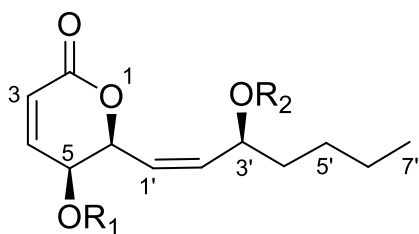
The first compound isolated from *H. pectinata* and belonging to this class of 5,6-dihydro-2*H*-pyran-2-ones was named hyptolide.<sup>11a</sup> Pectinolides A-C (**1-3**) were isolated from this species collected in Mexico, which demonstrated cytotoxic activity for a variety of cell lines and antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*.<sup>3a</sup> Other  $\alpha$ -pyrones, pectinolides D-F, and a 2(5*H*)-furanone (pectinolide G), were also isolated from a collection from Barbados.<sup>11b</sup> Pectinolide H, corresponding to a butenolide structurally related to pectinolide B, displayed antimicrobial activity against multidrug resistant strains of *S. aureus*.<sup>3b</sup>

The 6-heptenyl-5,6-dihydro-2*H*-pyran-2-ones have been used as models to study the conformational and configurational properties of flexible natural products with multiple chiral centers. Thus, DFT-NMR calculations, in combination with ECD data, have been used to solve the absolute configuration of this type of compounds.<sup>12</sup> The present investigation describes the isolation and structural elucidation of seven biosynthetically related new lactones isolated from a Mexican collection of *H. pectinata* and the Brazilian endemic species *H. monticola*. A combination of chemical correlations, chiroptical measurements, and Mosher ester methodology was used to confirm the absolute configuration of these compounds. Additionally, DFT NMR  $J_{\text{H,H}}$  values were used to predict the configuration of these flexible compounds and their utility was further assessed through the comparison of DFT calculated and experimental values for epimer differentiation at the C-3' chiral center of the side chain. The binding interactions of these cytotoxic 5,6-dihydro-2*H*-pyran-2-ones to  $\alpha$ -tubulin were also studied through molecular docking analysis.

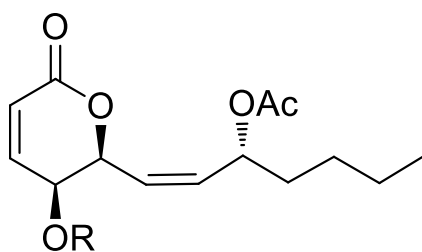


## 5.2 RESULTS AND DISCUSSION

Pectinolides A-C (**1-3**), in addition to the new pectinolides I-M (**4-8**), were isolated from two Mexican collections of *H. pectinata* by reversed-phase preparative HPLC. The biosynthetically related 6-heptyl-5,6-dihydro-2*H*-pyran-2-ones, monticolides A (**9**) and B (**10**), were also isolated from the Brazilian endemic species *H. monticola* by high-speed countercurrent chromatography. The known compounds **1-3** were identified by HPLC coelution with authentic samples and comparison of their <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra with published data.<sup>3</sup> The positive Cotton effect in the circular dichroism curve ( $\Delta\epsilon$  260-290 nm) was correlated with the C-6(*S*) configuration for the three compounds as described for all 6-substituted 5,6-dihydro- $\alpha$ -pyrones from the mint family.<sup>12,13</sup> The pseudo-equatorial side chain at C-6 and the axially oriented substituent at C-5 were established by the  $J_{5,6}$  value.<sup>3a</sup> The C-3' absolute configuration was previously corroborated as *S* by Mosher ester derivatives of pectinolide B (**2**)<sup>3b</sup> and ozonolysis of pectinolides A (**1**) and C (**3**), which yielded (+)-2(*S*)-acetyloxyhexanoic acid.<sup>3a</sup>

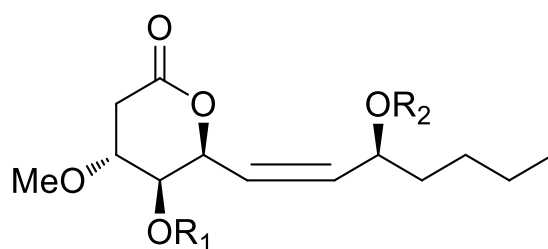


- |           |                       |                       |
|-----------|-----------------------|-----------------------|
| <b>1</b>  | R <sub>1</sub> = Ac   | R <sub>2</sub> = Ac   |
| <b>2</b>  | R <sub>1</sub> = Ac   | R <sub>2</sub> = H    |
| <b>3</b>  | R <sub>1</sub> = H    | R <sub>2</sub> = Ac   |
| <b>4</b>  | R <sub>1</sub> = H    | R <sub>2</sub> = H    |
| <b>11</b> | R <sub>1</sub> = MTPA | R <sub>2</sub> = MTPA |



**5** R = H

**6** R = Ac



**7** R<sub>1</sub> = Ac R<sub>2</sub> = Ac

**8** R<sub>1</sub> = H R<sub>2</sub> = Ac

The molecular formula of pectinolide I (**4**) was deduced as C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>O<sub>4</sub> by HRESIMS ( $m/z$  249.10969 [M + Na]<sup>+</sup>). The 6-heptenyl-5,6-dihydro-2*H*-pyran-2-one framework was recognized through its characteristic <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR signals (Tables 1 and 2, respectively; Figures S19-S21, Supporting Information) by comparison with published data for the pectinolide series.<sup>3</sup> The positive Cotton effect in the circular dichroism curve ( $\Delta\epsilon_{289} +1.32$ ) was correlated with the C-6(*S*) configuration. The pseudo-equatorial side chain at C-6 and the axially oriented hydroxy group at C-5 were established by the  $J_{5,6}$  value of 3.5 Hz. The simple peracetylation of **4** did not enable a direct chemical comparison of **4** with pectinolide A (**1**), since its diacetylated derivate was identical in its NMR data and chromatographic behavior to those prepared from pectinolides C (**3**) and J (**5**).

**Table 1.** <sup>1</sup>H NMR Data of Natural Products **4-10** (400 MHz in CDCl<sub>3</sub>, δ in ppm, and *J* in Hz)

position	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>
3	6.13 d (9.8)	6.10 d (9.8)	6.24 d (9.7)	2.70 dd (17.5, 1.6) 2.64 dd (17.5, 3.4)	2.78 dd (17.4, 3.6) 2.65 dd (17.4, 6.2)	6.24 d (9.7)	6.23 d (9.6)
4	6.98 dd (9.8, 4.9)	6.98 dd (9.8, 5.5)	6.95 dd (9.7, 5.7)	4.06 ddd (4.8, 3.4, 1.6)	4.13 ddd (6.2, 5.3, 3.6)	6.95 dd (9.7, 6.1)	7.08 dd (9.6, 6.1)
5	4.24 dd (4.9, 3.3)	4.12 dd (5.5, 3.0)	5.17 dd (5.7, 2.9)	4.89 dd (7.5, 4.8)	4.44 t (5.3)	5.27 dd (6.1, 2.5)	5.40 dd (6.1, 2.3)
6	5.36 dd (7.6, 3.3)	5.31 ddd (7.5, 3.0, 0.9)	5.59 ddd (8.1, 2.9, 1.8)	5.80 t (7.5)	4.99 dd (8.6, 5.3)	4.54 dd (9.7, 2.5)	4.55 dd (9.5, 2.3)
1'	5.78 dd (11.7, 7.6)	5.76 dd (11.5, 7.5)	5.74 dd (10.9, 8.1)	5.65 (11.2, 7.5)	5.71 dd (10.1, 8.6)	5.43 dd (9.7, 1.9)	3.89 dd (9.5, 0.9)
2'	5.84 dd (11.7, 7.6)	5.66 ddd (11.5, 9.1, 0.9)	5.64 dd (10.9, 9.0)	5.58 m	5.49 m	5.45 dd (7.4, 1.9)	4.02 dd (5.6, 0.9)
3'	4.47 ddd (7.6, 6.4, 6.7)	5.46 ddd (9.1, 7.4, 5.9)	5.35 ddd (9.0, 7.2, 5.9)	5.58 m	5.45 m	5.01 ddd (8.7, 7.4, 4.0)	5.06 ddd (7.2, 5.6, 5.0)
4' <sub>proS</sub>	1.62 m	1.70 m	1.68 m	1.58 m	1.69 m	1.69 m	1.66 m
4' <sub>proR</sub>	1.51 m	1.59 m	1.55 m	1.58 m	1.53 m	1.63 m	1.66 m
5'	1.29 m	1.33 m	1.32 m	1.30 m	1.34 m	1.31 m	1.30 m
6'	1.29 m	1.30 m	1.32 m	1.30 m	1.34 m	1.31 m	1.30 m
7'	0.90 t (6.9)	0.90 t (6.9)	0.90 t (7.0)	0.90 t (7.3)	0.91 t (7.0)	0.89 t (6.8)	0.91 t (6.3)
CH <sub>3</sub> O	-	-	-	3.28 s	3.31 s	-	-
CH <sub>3</sub> CO	-	2.03 s	2.08 s	2.08 s	2.04 s	2.11 s	2.12 s
CH <sub>3</sub> CO	-	-	2.04 s	2.05 s	-	2.10 s	2.11 s
CH <sub>3</sub> CO	-	-	-	-	-	2.06 s	-
CH <sub>3</sub> CO	-	-	-	-	-	2.05 s	-

**Table 2.**  $^{13}\text{C}$  NMR Data of Natural Products **4-10** (100 MHz in  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  in ppm)

position	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>
2	163.8	162.9	162.2	174.3	171.5	160.9	162.1
3	122.4	122.6	125.1	34.8	33.8	125.4	125.2
4	144.8	144.4	139.9	76.4	84.3	139.5	140.5
5	62.9	63.2	64.3	82.7	76.8	59.6	61.4
6	77.2	77.8	75.1	69.0	71.1	75.6	76.9
1'	123.6	125.8	133.1	125.0	131.6	66.9	68.4
2'	138.9	133.8	126.2	135.1	130.1	70.8	70.0
3'	68.6	70.7	69.4	71.6	65.9	71.8	75.9
4'	36.9	34.2	34.0	34.3	34.7	30.3	30.7
5'	27.4	27.1	27.2	27.4	27.1	27.1	27.3
6'	22.6	22.4	22.5	22.6	22.5	22.3	22.4
7'	13.9	13.9	13.9	13.9	13.9	13.9	13.9
CH <sub>3</sub> CO	-	171.0	170.3	170.6	171.5	170.4	171.9
CH <sub>3</sub> CO	-	-	169.8	169.2	-	170.1	170.6
CH <sub>3</sub> CO	-	-	-	-	-	169.8	-
CH <sub>3</sub> CO	-	-	-	-	-	169.4	-
CH <sub>3</sub> CO	-	21.2	21.1	21.2	21.3	20.9	21.2
CH <sub>3</sub> CO	-	-	20.5	21.0	-	20.6	20.6
CH <sub>3</sub> CO	-	-	-	-	-	20.5	-
CH <sub>3</sub> CO	-	-	-	-	-	20.5	-
CH <sub>3</sub> O	-	-	-	56.8	57.2	-	-

Thus, in order to avoid further inexactitudes in the assignment of the chiral center C-3' at the side chain, Mosher ester derivatization was used. Bis-MTPA derivatives (**11**) corroborated the C-5(*S*) and C-3'(*S*) absolute configuration for compound **4** in accordance with the negative value for the  $\delta_{\text{H}}^{\text{SR}}$  sign distribution pattern for the *anti-sec/sec-1,n*-diols<sup>14</sup> (Table 3 and Figure S35, Supporting Information).

Pectinolide J (**5**) was found to have the molecular formula  $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{O}_5$ , as determined by ESIMS ( $m/z$  291.12061  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ ). The  $^1\text{H}$  NMR spectrum slightly differed in the chemical shifts and multiplicities for H-1', H-2', and H-3' signals to those reported for pectinolide C (**3**) (Table 1; Figure S5, Supporting Information); however, their  $^{13}\text{C}$  NMR data were almost identical (Table 2; Figure S4, Supporting Information). Also, an evident difference in their HPLC retention time values was registered (**3**:  $t_{\text{R}}$  9.2 min; **5**:  $t_{\text{R}}$  8.6 min). The positive sign for the circular dichroism ( $\Delta\epsilon_{278} +0.57$ ) was in agreement with the C-6(*S*) absolute configuration, in addition, the pseudo-

equatorial side chain at C-6 and the axially oriented hydroxy group at C-5 were established by the  $J_{5,6}$  value of 2.9 Hz. Thus, the structure for compound **5** ( $[\alpha]_D +63.8$ ) should correspond to the C-3'(*R*) epimer of pectinolide C (**3**,  $\Delta\epsilon_{270} +0.38$ ,  $[\alpha]_D +80.9$ ).<sup>3</sup> On acetylation, compound **5** afforded derivative **6**, which was chromatographically undistinguishable from pectinolide K (**6**). Natural compound **6** was found to have the molecular formula  $C_{16}H_{22}O_6$ , as determined by ESIMS ( $m/z$  333.13078  $[M + Na]^+$ ). Although the  $^1H$  and  $^{13}C$  NMR data of **6** were quite comparable with those of **1**, their optical rotations (**1**,  $[\alpha]_D +202$  vs. **6**,  $[\alpha]_D +98$ ) differed and indicated the presence of a second natural diastereoisomeric pair at the C-3' chiral center of the side chain between both compounds.

**Table 3.**  $^1H$  NMR Chemical Shift Data for Signals from (*S*)- and (*R*)-Ester Derivatives **11**, **13** and **16** (300 MHz in  $CDCl_3$ ,  $\delta$  in ppm)

compound	MTPA-ester	proton chemical shifts ( $\Delta\delta_H = \delta_S - \delta_R$ )						
		H-3	H-4	H-5	H-6	H-1'	H-2'	H-3'
<b>11</b>	<i>S</i>	6.91	5.94	4.13	5.24	5.81	5.75	4.37
	$\Delta\delta_H$	-0.02	-0.03	-0.04	-0.03	-0.02	-0.01	-0.02
	<i>R</i>	6.93	5.97	4.17	5.27	5.83	5.76	4.39
<b>13</b>	<i>S</i>	5.99	6.83	5.09	3.66	4.14	5.54	5.40
	$\Delta\delta_H$	-0.1	-0.2	-0.25	-0.91	0.16	1.58	0.31
	<i>R</i>	6.09	7.03	5.34	4.57	3.98	3.96	5.09
<b>16</b>	<i>S</i>	6.94	6.13	5.20	3.79	4.26	5.82	5.41
	$\Delta\delta_H$	-0.14	-0.04	-0.21	-1.05	0.09	1.56	0.27
	<i>R</i>	7.08	6.17	5.41	4.84	4.17	4.26	5.14

Complementary structural information was available via the utility of the DFT chemical shifts and  $^3J_{H,H}$  calculations<sup>12</sup> in the gas phase and  $CHCl_3$  solution for the conformational analysis and epimer differentiation of compounds **3** and **5** by taking advantage of the fact that the absolute configuration for pectinolide C (**3**) has also been confirmed by stereoselective total

synthesis.<sup>15</sup> The <sup>1</sup>H chemical shifts and coupling constants were sufficiently different between this natural product and its epimeric counterpart at C-3', pectinolide J (**5**), to permit the appropriate spectroscopic interpretation of each stereoisomer after comparison with the DFT <sup>1</sup>H NMR chemical shifts and <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> values. In contrast, experimental <sup>13</sup>C NMR data was not useful to distinguish between these stereoisomers (Figure S4, Supporting Information). This situation was previously reported for pairs of stereoisomers when two chiral moieties are separated by a flexible connective chain,<sup>12b</sup> thus producing identical <sup>13</sup>C NMR spectra but distinguishable <sup>1</sup>H NMR spectra, as observed for **3** and **5**. The conformational distributions of **3** and **5** were obtained by using the Monte Carlo protocol complemented with a systematic search with molecular mechanics minimization in which the C(5)-C(6)-C(1')=C(2') and C(1')=C(2')-C(3')-C(4') dihedral angles were rotated in steps of 180° and the remaining dihedral angles of the heptenyl moiety were rotated in steps of 120°, starting at 60° for each bond. The acetyloxy H-C<sub>sp3</sub>-O-C<sub>sp</sub> and C<sub>sp3</sub>-O-C=O dihedral angles were explored within the range from +60° to -60° to find the more favored alignment. DFT single-point calculations were achieved at the B3LYP/6-31G(d) level theory for each minimum-energy structure falling between  $E_{\text{MMFF}} = 0\text{-}5$  kcal/mol and geometry optimization at the B3LYP/DGDZVP level were carried out for all the structures within an  $E_{\text{DFT-SP}}$  range of 0-3 kcal/mol. This procedure yielded 14 conformers for **3** and 20 for **5**; their Gibbs free energy values ( $\Delta G$ ) and conformational populations ( $P$ ), together with NMR chemical shifts (<sup>1</sup>H, Tables S1 and S3; <sup>13</sup>C Tables S17 and S19, Supporting Information) and coupling constants (Tables S7 and S11, Supporting Information), were calculated from the minimum-energy structures with the gauge-invariant atomic orbital (GIAO) method. Subsequently, the minimum energy structures, chemical shifts (DFT-<sup>1</sup>H NMR, Tables S2 and S4; and DFT-<sup>13</sup>C NMR, Tables S18 and S20, Supporting Information), and coupling constants (Tables S8 and S12, Supporting Information) were refined and recalculated with the polarizable continuum model (PCM) using CHCl<sub>3</sub> as the solvent.

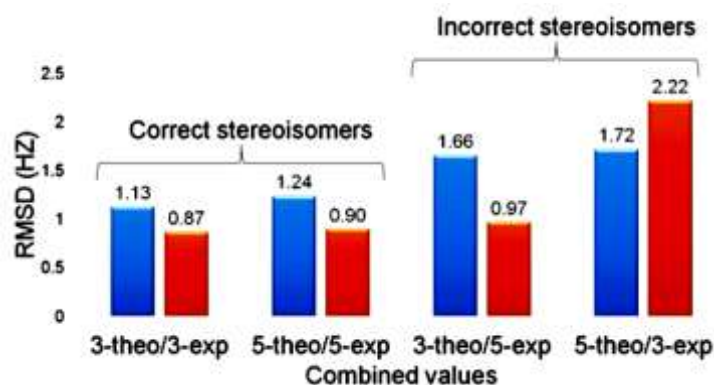
Calculated  $^1\text{H}$  NMR chemical shifts in solution for compounds **3** and **5** are summarized in Tables S2 and S4 (Supporting Information), where experimental values are also included for comparison, showing values with RMSD < 0.20 ppm. The main differences in the chemical shifts between this pair of diastereoisomers were observed in the C-1'=C-2'-C-3'-C-4' fragment (Figure S5, Supporting Information), in particular, the C-4' pro*R* and pro*S* protons ( $\Delta\delta_{\text{H-4'proR} - \text{H-4'proS}} = 0.1$  ppm) were unquestionably distinguished based on the DFT chemical shift predictions (Table 4).

**Table 4.** Summary<sup>a</sup> of Theoretical<sup>b</sup> and Experimental<sup>c</sup> Chemical Shifts (in ppm) for the C-4' Protons of **3** and **5**.

compound		H-4'pro <i>S</i>	H-4'pro <i>R</i>
<b>3</b>	theor gas phase	1.5638	1.6133
	theor solvent	1.5945	1.6846
	exp	1.6591	1.7559
<b>5</b>	theor gas phase	1.6678	1.5280
	theor solvent	1.6465	1.5374
	exp	1.6990	1.5909

<sup>a</sup>For full details on theoretical chemical shifts calculations for each contributing conformer, refer to Supporting Information (Tables S1-S4).<sup>b</sup>Obtained from the DFT-optimized structures using DFT B3LYP/DGDZVP in gas phase and DFT B3LYP/DGDZVP PCM in solution. Values were Boltzmann averaged with equation  $\sum_i J_i \times P_i$ , where  $J_i$  is the spin-spin coupling constant (in Hz) for each conformer and  $P_i$  is the population for the  $i$ th conformer calculated from  $\Delta G$  values at 298 K and 1 atm.<sup>c</sup>The  $^1\text{H}$  NMR chemical shifts were obtained at 700 MHz from  $\text{CDCl}_3$  solutions using TMS as the internal standard.

Calculated  $^3J_{\text{H,H}}$  values were scaled using the previously described factors.<sup>12a</sup> Thus, an excellent correlation (a low RMSD) was obtained when the correct combination of theoretical and experimental  $^3J_{\text{H,H}}$  values were chosen, i.e., **3**-theor/**3**-exp and **5**-theor/**5**exp in contrast to **3**-theor/**5**-exp and **5**-theor/**3**exp (Figure 2), which also confirmed the biosynthetic enantiodivergence at C-3'. The observed reduction in the RMSD values (from 1.13 to 0.87 Hz) for the  $^3J_{\text{H,H}}$  in gas phase and solution reflects that the inclusion of solvation provides a more precise calculation model for hydroxylated compounds, as previously described.<sup>12b</sup>

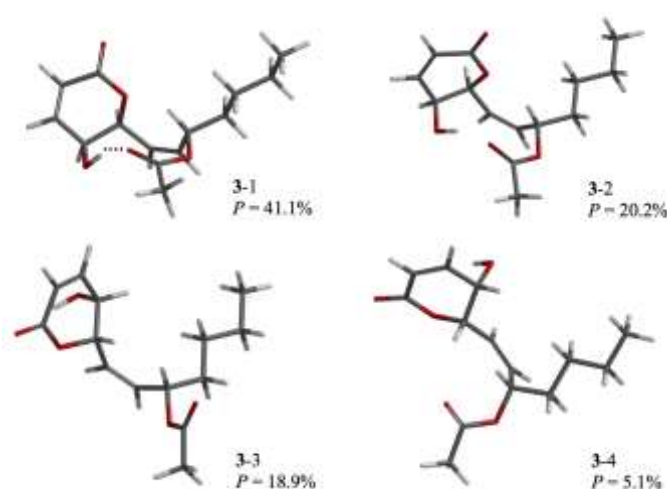


**Figure 2.** RMSD values between theoretical and experimental  $^3J_{\text{H,H}}$  for epimers **3** and **5** in gas phase (blue) and solution (red).

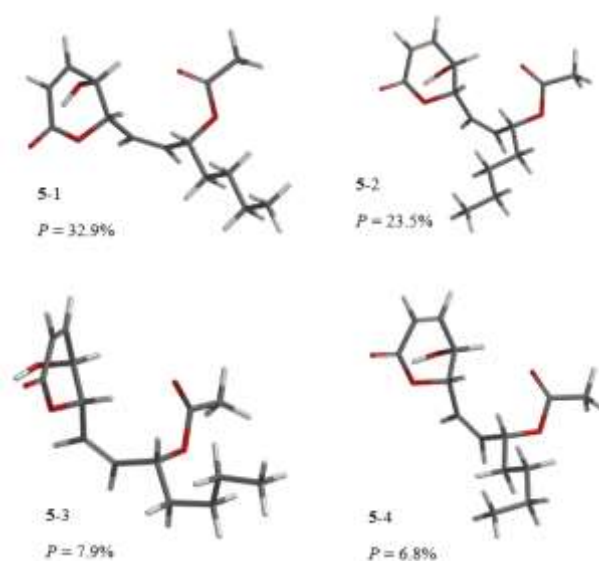
Figures 3 and 4 show the four minimum-energy structures in  $\text{CHCl}_3$  solution of conformers of **3** and **5**, respectively. For example, in the most relevant conformer **5-1** with a 32.9% contribution to the Boltzmann population (Figure 4), it was observed the anti-orientation between H-3' and H-4'proS that resulted in a large DFT  $^3J_{\text{HH}}$  value (11.3 Hz, Table S12, Supporting Information), while the H-3'/H-4'proR pair exists in a gauche orientation giving a small DFT  $^3J_{\text{HH}}$  (1.9 Hz). Conversely, conformer **5-2**, which contributed with a 23.5% of the Boltzmann population, showed a DFT  $^3J_{\text{HH}} = 3.7$  Hz for the H-3'/H-4'proS derived from the gauche orientation, while the calculated  $^3J_{\text{HH}}$  for H-3'/H-4'proR was 11.5 Hz. The calculated averaged  $^3J_{\text{HH}}$  values for these protons in the new pectinolide **J (5)** in  $\text{CHCl}_3$  solution were  $J_{3',4'proR} = 5.12$  and  $J_{3',4'proS} = 7.26$  Hz at the equilibrium considering 20 conformers (Table S12, Supporting Information), in agreement with the experimental values ( $J_{3',4'proR} = 5.90$  and  $J_{3',4'proS} = 7.38$  Hz). The solvent used in our computational calculations is aprotic and accounted for the stabilizing interaction derived from the intramolecular hydrogen bond formed between the hydroxy hydrogen at C-5 in the lactone ring and the carbonyl group of the acetyloxy substituent at C-3' present in pectinolide **C (3)** with a distance of 1.76 Å (Figure 3). In contrast, a higher



conformational dispersion was found at the side chain of pectinolide J (**5**) due to the lack of such an interaction (Figure 4). Theoretical  $^3J_{H,H}$  values were estimated in solution by evenly decreasing and increasing the percentages of the hydrogen-bonded and non-bonded conformations resulting in higher values for the RMSD, thus confirming that the hydrogen bonded conformations were accurately estimated for **3** (Figure S3; Table S24, Supporting Information).



**Figure 3.** The four most relevant conformers of pectinolide C (**3**) modeled in  $\text{CHCl}_3$  solution, showing the stabilizing intramolecular hydrogen bond formed between the hydroxy hydrogen at C-5 in the lactone ring and the carbonyl group of the acetyloxy substituent at C-3'.



**Figure 4.** The four most relevant conformers of pectinolide J (**5**) modeled in  $\text{CHCl}_3$  solution.

Additionally, NOE differential spectroscopy<sup>16</sup> of **3** and **5** carried out in CDCl<sub>3</sub> at 700 MHz (Figures S6 and S7, Supporting Information) was in agreement with the high flexibility reflected by the calculated models. Thus, irradiation of H-2' in compound **3** induced almost identical enhancements in H-4'proR (1.15%) and H-4'proS (1.21%) in accordance with the presence of conformer **3-1**, having a contribution to the Boltzmann population of 41.1% (Figure S8, Supporting Information), in which the measured distance between the vinylic H-2' and the synperiplanar H-4'proR was 2.6 Å, in co-existence with conformers **3-2**, **3-3**, and **3-4**, with a synperiplanar orientation between H-2' and H-4'proS, having a combined contribution of 44.2% to the Boltzmann population.

A preferential use of a protocol involving simulations of the surrounding medium (PCM solvation algorithm) was recognized for the deacetylated compounds (Table 5), as previously described for related compounds.<sup>12b</sup> These findings are in line with our recent reports on the application of the DFT-NMR integrated approach<sup>12</sup> for the <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> calculations of some other related flexible systems that indicate the necessity for a careful consideration of the overall DFT population to integrate the population-averaged coupling constants as well as the theoretical energies ( $\Delta G$ ) and spectroscopic properties (e.g., ECD)<sup>12c</sup> of the molecules capable of existing in more than two conformers. Some drawbacks in the NMR calculations in structural terms and conformer populations of highly flexible natural products could emerge if the population-averaged coupling constants for the vicinal interacting protons to chiral centers in flexible chains are not considered, since variations between the epimers are quite subtle.<sup>12</sup> In order to avoid ambiguities<sup>17</sup> for the absolute configurations of the stereogenic centers at the side chains of 6-alkyl-5,6-dihydro-2*H*-pyran-2-ones, comparison between the Boltzmann-averaged  $\delta_H$  and <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> values for signals that participate in the couplings with the chiral center protons is required, but also a well-reproduced experimental <sup>1</sup>H NMR spectrum (RMSD < 0.5 Hz), employing spectral simulation. This task was achieved for compounds **3** and **5** by non-linear

fitting to their simulated parameters through an iteration processing of chemical shifts,  $J_{H,H}$ , and line widths based on the original  $^1\text{H}$  NMR plots<sup>13</sup> using MestReNova software (Figures S1 and S2, Supporting Information). Accordingly, the convergence between the DFT calculated and experimental  $^1\text{H}$  NMR chemical shifts and coupling constant values ( $^3J_{H,H}$ ) conformed a single solution that correctly supported the conformational model for epimer differentiation at the chiral center C-3' for compounds **3** and **5**, which arose from the following results: (1) the exact calculation for each conformer's geometry; (2) the complete approximation of the free energies and Boltzmann population for each analyzed stereoisomer; and (3) the appropriate selection of the calculation method, as in this case B3LYP/DGDZVP.<sup>12a</sup> This approach also allowed the understanding of the conformational behavior of these flexible bioactive natural products in order to gain insight into the role of their interactions with molecular receptors, as demonstrated by the high affinity for the pironetin-binding site of  $\alpha$ -tubulin of these 6-heptyl-5,6-dihydro-2*H*-pyran-2-ones.

Two saturated  $\delta$ -lactones, pectinolides L (**7**) and M (**8**), were also isolated from *H. pectinata*. Compound **7** gave a sodium adduct ion  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  at  $m/z$  365.15729, corresponding to a molecular formula of  $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{O}_7$ . A methoxy group was evident from a single signal at  $\delta$ 3.28, which, in addition to the absence of the characteristic olefinic protons for the 5,6-dihydro- $\alpha$ -pyrone skeleton, suggested the presence of a saturated  $\delta$ -lactone substituted at C-4 by a methoxy group ( $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR: Figures S25 and S26, Supporting Information). This substituent was established as axially oriented from the coupling constants  $J_{3\beta,4} = 1.6$  Hz,  $J_{3\alpha,4} = 3.4$  Hz, and  $J_{4,5} = 4.8$  Hz.

**Table 5.** Summary<sup>a</sup> of Theoretical<sup>b</sup> and Experimental<sup>c</sup> <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> Coupling Constants for Compound **2-5**, **10**, and **14**

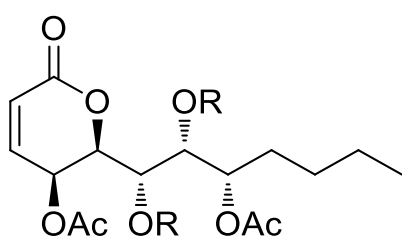
compound	data	<i>J</i> <sub>5,6</sub>	<i>J</i> <sub>6,1'</sub>	<i>J</i> <sub>1',2'</sub>	<i>J</i> <sub>2',3'</sub>	<i>J</i> <sub>3',4'proR</sub>	<i>J</i> <sub>3',4'proS</sub>	RMSD
<b>2</b> (5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,3' <i>S</i> )	theor gas phase	3.52	7.54	12.15	6.63	5.37	5.64	0.99
	theor solvent	3.31	8.36	12.16	6.92	4.40	6.56	0.97
	exp	2.99	8.20	11.45	7.65	6.40	7.25	
<b>3</b> (5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,3' <i>S</i> )	theor gas phase	4.29	4.56	12.54	9.36	7.14	5.50	1.13
	theor solvent	3.86	5.92	12.30	9.54	6.31	6.20	0.87
	exp	2.98	6.62	11.65	8.50	7.54	5.68	
<b>4</b> (5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,3' <i>S</i> )	theor gas phase	3.07	8.47	12.37	5.77	6.63	4.88	1.06
	theor solvent	2.99	8.52	11.68	8.28	5.08	6.65	0.82
	exp	3.30	7.65	11.70	7.60	6.70	6.40	
<b>5</b> (5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,3' <i>R</i> )	theor gas phase	3.02	9.60	11.50	9.67	3.90	8.12	1.24
	Theor solvent	2.73	9.51	11.48	9.51	5.12	7.26	0.90
	exp	3.04	7.52	11.46	9.10	5.90	7.38	
<b>10</b> (5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,1' <i>S</i> ,2' <i>R</i> ,3' <i>S</i> )	theor gas phase	2.79	8.62	1.08	4.01	10.46	2.81	1.79
	theor solvent	2.79	8.78	0.92	5.05	10.55	2.64	1.74
	exp	2.30	9.50	0.95	5.60	7.20	5.05	
<b>14</b> (5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,1' <i>S</i> ,2' <i>R</i> ,3' <i>R</i> )	theor gas phase	2.84	8.45	2.25	4.69	2.48	10.28	1.90
	theor solvent	2.85	8.68	2.01	6.71	2.33	10.27	1.74
	exp	2.50	10.0	1.30	6.50	5.50	7.86	

<sup>a</sup>For full details on theoretical <sup>1</sup>H–<sup>1</sup>H coupling constant calculations for each contributing conformer, refer to Supporting Information. (Tables S5-S16).<sup>b</sup>Obtained from the DFT-optimized structures using DFT B3LYP/DGDZVP in gas phase and DFT B3LYP/DGDZVP PCM in solution. Values were Boltzmann averaged with equation  $\sum_i J_i \times P_i$ , where *J*<sub>*i*</sub> is the spin–spin coupling constant (in Hz) for each conformer and *P*<sub>*i*</sub> is the population for the *i*th conformer calculated from  $\Delta G$  values at 298 K and 1 atm.<sup>c</sup>*J*<sub>H,H</sub> values and line widths were generated by iteration of these spectral parameters. <sup>1</sup>H NMR spectrum obtained at 400 MHz from CDCl<sub>3</sub> solutions using TMS as the internal standard.

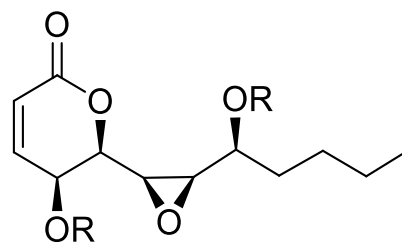
The molecular formula of pectinolide M (**8**) was established as C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>O<sub>6</sub> from the [M + Na]<sup>+</sup> at *m/z* 323.14680. The NMR data revealed that only one acetoxy group was present and the multiplicities for the proton geminal to this group indicated that C-3' is the acylated position (Figures S27 and S28, Supporting Information). Therefore, this natural product should have the same substitution pattern as pectinolide C (**3**). The methoxy group was also confirmed as axially oriented (*J*<sub>3β,4</sub> = 6.2 Hz, *J*<sub>3α,4</sub> = 3.6 Hz, and *J*<sub>4,5</sub> = 5.3 Hz). Compound **7** was identical to a

derivative previously synthesized by base-catalyzed methanolysis of pectinolide A (**1**).<sup>3</sup> In order to confirm the absolute configuration of **8**, the above-mentioned reaction was also used for the chemical correlation of compounds **4** and **8**. TLC detected the presence of compounds **7** and **8** in the crude CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-soluble total extract. Also, these compounds were identified by selective molecular ion search by UPLC-ESIMS analysis. These findings proved that compounds **7** and **8** were produced as natural saturated  $\delta$ -lactones.

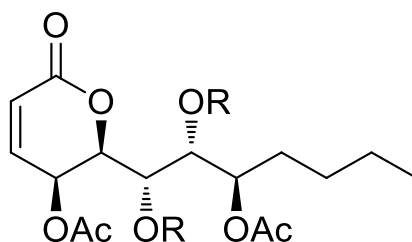
From the dichloromethane extract from leaves of *H. monticola*, two 6-heptyl-5,6-dihydro-2*H*-pyran-2-ones named monticolides A (**9**) and B (**10**), were obtained by high-speed countercurrent chromatography (HSCCC). Attempts to purify compound **10** from the natural source were unsuccessful, since the fraction mainly containing this product was combined with a complex mixture of structurally related 6-heptyl-5,6-dihydro-2*H*-pyran-2-ones. Acetylation of the whole fraction afforded a tetracetylated derivative chromatographically and spectroscopically identical with natural product **10**. A chemical correlation of pectinolide A (**1**) with monticolides A (**9**) and B (**10**) was accomplished by treatment with *m*CPBA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, followed by acetylation.<sup>3</sup> The natural compound **10** was identical to the derivative obtained from the acid-catalyzed hydrolysis of the epoxide intermediate, which would be formed by the epoxidation of the less hindered *re-si* face of the side chain double bond to form the C-1'(S), C-2'(S) epoxide, compound **12**, followed by ring opening due to a nucleophilic attack of water at the C-2' position, which generated diol **10**. Comparison of the <sup>1</sup>H NMR spectra registered for derivative **10** and the one obtained for the CCC-fraction containing this natural product allowed the conclusive identification of this product in the natural mixture (Figures S37, Supporting Information). The absolute configuration for the *threo*-diol was validated as C-1'(S) and C-2'(R) from the diagnostic  $\Delta\delta_{\text{H}}^{\text{SR}}$  signs<sup>14</sup> for the *syn*-1,2 bis-MTPA-diester (**14**; Table 3). Acetylation of derivative **10** also afforded the peracetylated derivative **9**, which was identical to the natural product isolated from *H. monticola*.



**9** R = Ac  
**10** R = H  
**13** R = MTPA



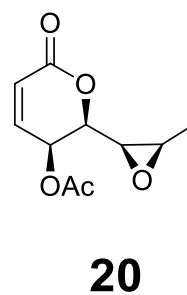
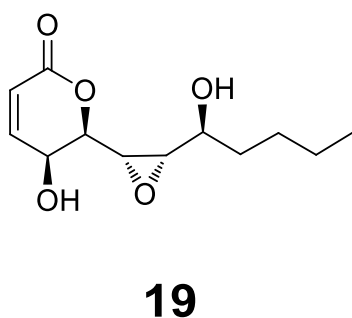
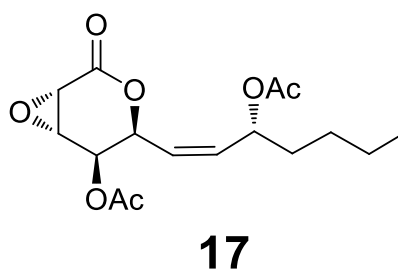
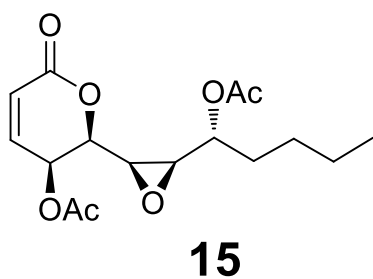
**12** R = Ac  
**18** R = H



**14** R = H  
**16** R = MTPA

On epoxidation followed by ring opening (*m*CPBA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), pectinolide K (**6**) also afforded a related 1,2-diol (**14**), derived from epoxide intermediate (**15**). Compound **14** was epimeric to compound **10** at position C-3' as confirmed by the C-1'(*S*) and C-2'(*R*) absolute configurations also deduced from the analysis of the bis-MTPA derivatives<sup>14</sup> (**16**) (Table 3; <sup>1</sup>H NMR: Figure S36, Supporting Information). The configurational assignments for the chiral center C-3' in this epimeric pair was also deduced by DFT-NMR calculations, which confirmed the (*S*)-configuration for derivative **10** as opposed to the (*R*)-configuration for compound **14** (Table 3). A higher steric hindrance for the *re-si* face of the side chain double bond is observed for the most stable conformer of compound **6** in comparison with the one calculated for its C-3' epimer, pectinolide A (**1**), which resulted from the inversion of configuration for the stereogenic center C-3' (Figure S38, Supporting Information). Thus, the prevention of the interaction with the

epoxidation reagent (*m*-CPBA) as a result of the spatial orientation of the C-3' substituents at the side chain could explain the selectivity for the epoxidation of the less hindered  $\alpha$ -face of the lactone ring double bond in compound **6** at room temperature to afford epoxide **17**. In contrast, the epoxidation of pectinolide I (**4**) afforded epoxides **18** and **19**, which resulted from the lack of  $\pi$  selectivity and reflected the absence of steric hindrance around the side chain double bond as imposed by the acetyl substituents in compounds **1** and **6**. Acetylation of derivative **18** afforded the biosynthetic precursor of monticolides A (**9**) and B (**10**), corresponding to a higher molecular weight homologue of asperlin (**20**), a 6-propyl-5,6-dihydro-2*H*-pyran-2-one antibiotic with cytotoxic properties, isolated from marine-derived *Aspergillus* species.<sup>18</sup> This intermediate under an acid-catalyzed ring opening of the epoxide yielded monticolide B (**10**).



**Table 6.** <sup>1</sup>H NMR Data of Derivatives **14** and **17-19** (300 MHz in CDCl<sub>3</sub>, δ in ppm, and *J* in Hz)

position	<b>14</b>	<b>17</b>	<b>18</b>	<b>19</b>
3	6.23 d (9.6)	3.68 d (3.8)	6.18 dd (9.7)	6.16 d (9.8)
4	7.13 dd (9.6, 6.1)	3.77 dd (3.8, 3.5)	7.05 dd (9.7, 5.7)	6.96 dd (9.8, 5.5)
5	5.44 dd (6.1, 2.5)	5.40 dd (3.5, 3.5)	4.40 dd (5.7, 2.9)	4.32 dd (3.3, 5.5)
6	4.80 dd (10.0, 2.5)	5.70 dd (7.9, 2.2)	4.52 dd (7.5, 2.9)	4.70 dd (7.0, 3.3)
1'	4.20 dd (10.0, 1.3)	5.49 (11.4, 7.9)	3.11 dd (7.5, 4.1)	3.54 dd (7.0, 4.3)
2'	4.25 dd (6.5, 1.3)	5.58 (11.4, 9.0)	3.53 dd (4.1, 7.3)	3.15 dd (8.8, 4.3)
3'	5.12 ddd (7.9, 6.5, 5.5)	5.33 ddd (9.0, 7.7, 6.2)	3.67 td (7.3, 5.6, 3.1)	3.84 td (8.8, 6.1, 3.7)
4' <sub>proS</sub>	1.65 m	1.69 m	1.67 m	1.67 m
4' <sub>proR</sub>	1.65 m	1.55 m	1.67 m	1.67 m
5'	1.34 m	1.34 m	1.30 m	1.30 m
6'	1.34 m	1.34 m	1.30 m	1.30 m
7'	0.92 t (7.1)	0.92 t (6.4)	0.93 t (7.1)	0.93 t (7.1)
CH <sub>3</sub> CO	2.12 s	2.14 s	-	-
CH <sub>3</sub> CO	2.12 s	2.04 s	-	-

**Table 7.** <sup>13</sup>C NMR Data of Derivatives **14** and **17-19** (75 MHz in CDCl<sub>3</sub>, δ in ppm, and *J* in Hz)

position	<b>14</b>	<b>17</b>	<b>18</b>	<b>19</b>
2	161.2	165.5	161.8	161.9
3	124.8	51.7	123.1	123.2
4	140.4	48.5	144.0	144.2
5	61.3	68.2	61.7	61.8
6	77.2	71.7	77.7	79.4
1'	58.8	133.3	58.8	56.1
2'	69.9	125.4	52.8	58.9
3'	75.2	69.7	69.1	68.1
4'	30.4	38.6	34.6	35.4
5'	27.0	25.1	27.3	27.3
6'	22.3	22.4	22.6	22.6
7'	13.9	14.1	14.0	14.2
CH <sub>3</sub> CO	171.8	169.7	-	-
CH <sub>3</sub> CO	169.5	170.1	-	-
CH <sub>3</sub> CO	21.2	21.0	-	-
CH <sub>3</sub> CO	20.5	21.1	-	-

The 5,6-dihydro-2*H*-pyran-2-one framework of the isolated compounds **1-6**, **9** and **10**, constitutes the pharmacophoric moiety responsible for the cytotoxicity against a variety of tumor cell lines (Table 8). The most significant values were for **6** with IC<sub>50</sub> values of 0.5-0.8



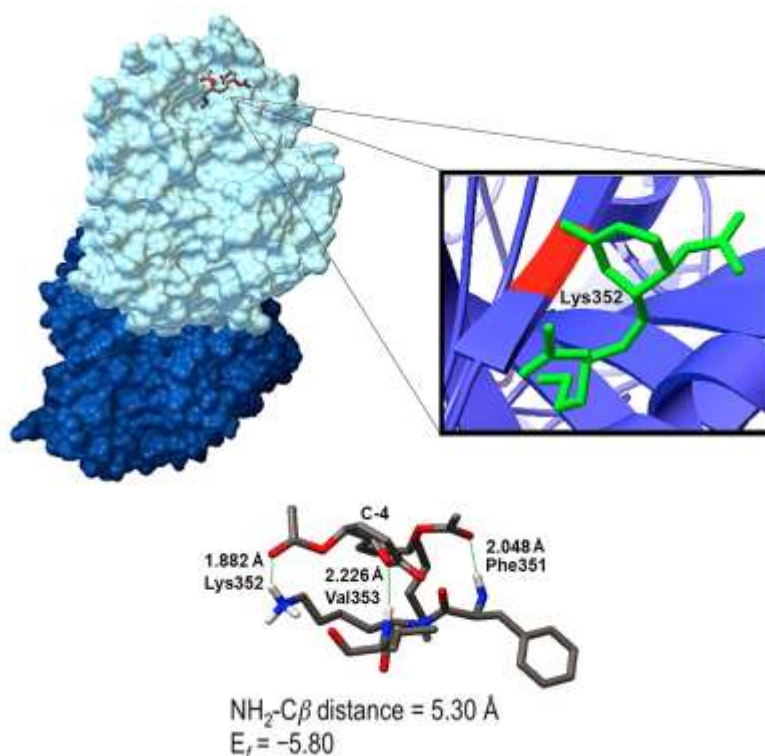
$\mu\text{M}$ . As expected, the saturated  $\delta$ -lactone, pectinolides L (**7**) and M (**8**), were non-cytotoxic (Table 8). A molecular docking study<sup>19</sup> was performed to identify possible binding modes between these dihydropyrones and  $\alpha$ -tubulin in order to recognize their cytotoxicity as a result of their potential as alkylating agents. Previously, the model for the pironetin-tubulin complex indicated that hydrogen-bonding interactions with pironetin occurs through Asn249, Asn258, and Lys352, the latter with a distance of 3.69 Å between the amino acid residue and the  $\beta$  carbon atom of the  $\alpha,\beta$ -unsaturated lactone (Figure 1), supporting the formation of a covalent adduct for the most frequently found pironetin–tubulin complex with a docking energy of  $E_f = -6.97$  kcal/mol.<sup>9b</sup> Compounds **3**, **6**, **9**, **10** and **12** were docked into the pironetin-binding site of  $\alpha$ -tubulin and this analysis showed that these 5,6-dihydro-2*H*-pyran-2-ones interact primarily through stable hydrogen bonds with some amino acid residues (Phe351, Lys352, and Val353) at the same  $\alpha$ -tubulin unit proposed for the pironetin interaction<sup>9b</sup> and with similar binding energies (Figure 5). Therefore, molecular docking analysis established that this class of bioactive natural products could form a covalent bond to Lys352 via a 1,4-addition to the  $\alpha,\beta$ -unsaturated lactone. For the cytotoxic pectinolide K (**6**), the most frequently found and most stable 5,6-dihydro-2*H*-pyran-2-one-tubulin complex was disclosed at  $E_f = -5.80$  kcal/mol and displayed three hydrogen-bond interactions between the oxygen of the lactone ring with the amide hydrogen of Val353, the carbonyl group of the acetyloxy residue at C-3' at the side chain, and the amide hydrogen of Phe351, as well as the carbonyl group of the acetyloxy residue at C-5 with the amide hydrogen of Lys352. Thus, the distance between the latter amino group and the  $\beta$  carbon atom of the  $\alpha,\beta$ -unsaturated lactone was 5.30 Å, close enough to favor a Michael addition (Figure S39, Supporting Information). The complex formed with pectinolide C (**3**;  $E_f = -5.82$  kcal/mol) displayed the same interaction observed for compound **6** with Phe351 and Val353 with a distance of 5.10 Å for the 1,4-addition of Lys352 to the  $\alpha,\beta$ -unsaturated lactone. The most stable complex ( $E_f = -4.34$  kcal/mol) found for the interaction of monticolide A (**9**)

with  $\alpha$ -tubulin showed a distance of 4.70 Å for the 1,4-addition of Lys352 to the  $\alpha,\beta$ -unsaturated lactone and represents a hydrogen-bond interaction between the carbonyl group of the acetyloxy residue at C-1' and the amide hydrogen of Phe351. For monticolide B (**10**), the most frequently found complex ( $E_f = -5.16$  kcal/mol) displayed a distance between the Lys352 amino group and the  $\alpha,\beta$ -unsaturated lactone of 3.70 Å, with three hydrogen-bond interactions as observed for compound **6**. The molecular docking for the intermediate epoxide **12** (MCF-7:  $IC_{50}$  3.2  $\mu$ M) showed a distance of 4.20 Å for the 1,4-addition of Lys352 to the  $\alpha,\beta$ -unsaturated lactone ( $E_f = -4.82$  kcal/mol) and displayed two hydrogen-bond interactions between the carbonyl group of the acetyloxy residue at C-5 and the amide hydrogen of Val353 and the epoxide oxygen with the amide hydrogen of Phe351. Although asperlin (**20**) disclosed a binding mode higher in energy than that of pironetin ( $E_f = -4.21$  kcal/mol), two hydrogen-bond interactions were formed with Phe351 and Val353 with a distance of 5.20 Å for the 1,4-addition of Lys352 to support the formation of the covalent adduct. Probably, the high energy observed for the complex asperlin-tubulin could be the result of the lack of additional oxygenated substituents at the C-6 propyl side chain that could provide further points for hydrogen-bond interactions with the amino acid residues of the protein to deliver additional complex stabilization. Interestingly, in all surface scanning simulations carried out with **3**, **6**, **9** and **10**, there were no indication of a binding mode close to Cys316, in contrast with recent data obtained in the solid state for pironetin.<sup>9c</sup> Thus, the 5,6-dihydro-2*H*-pyran-2-one framework is a pharmacophore model for tubulin inhibitors to provide a better understanding of the cytotoxic potential of these small-molecule tubulin-binding ligands.

**Table 8.** Cytotoxicity of Natural Compounds **1-10** for Three Cancer Cell Lines

compound	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) <sup>a</sup> , 72 h		
	MCF-7	HeLa	HCT15
<b>1</b>	3.2	3.2	5.7
<b>2</b>	9.3	4.1	5.2
<b>3</b>	1.0	0.3	2.3
<b>4</b>	5.9	6.2	7.4
<b>5</b>	1.3	1.4	9.5
<b>6</b>	0.5	0.7	0.8
<b>7</b>	>10	>10	>10
<b>8</b>	>10	>10	>10
<b>9</b>	7.7	2.7	>10
<b>10</b>	9.8	6.9	9.9
vinblastine	0.012	0.011	0.011
pironetin	0.015	0.092	< 0.015

<sup>a</sup>MCF-7 = breast carcinoma; HeLa = cervix carcinoma; HCT-15 = colon carcinoma.



**Figure 5.** Structure of the most frequent and stable pectinolide K (**6**)-tubulin complex. Tubulin  $\alpha$ -subunit (cyan);  $\beta$ -subunit (blue). The distance between the Lys352 amino group (red) and the  $\beta$  carbon atom of the  $\alpha,\beta$ -unsaturated lactone was 5.30 Å, close enough to favor a Michael addition. Docking energy ( $E_f$  kcal/mol) and hydrogen bond distances are indicated.

### 5.3 EXPERIMENTAL SECTION

**General Experimental Procedures.** Optical rotations were measured with a Perkin-Elmer model 341 polarimeter using methanol as solvent. ECD curves were recorded on a JASCO J-715 spectropolarimeter. NMR techniques and HPLC instrumentation were described in preceding papers.<sup>13</sup> In brief, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR experiments were measured on a Varian VNMRS-400 instrument, using tetramethylsilane as an internal standard. All NMR assignments were confirmed by 2D experiments, including COSY, HSQC, and HMBC. NOE experiments were registered on a Bruker Avance III HD spectrometer at 700 MHz. HPLC analyses were carried out on a Waters instrument (Millipore Corp., Waters Chromatography Division, Milford MA) with a 600E multisolvent delivery system and a 996 photodiode array detector. For the MS analysis, a Thermo LTQ Orbitrap XL hybrid FT mass spectrometer (ThermoFisher, San Jose, CA, USA) equipped with an electrospray ionization source was used. Each sample (1 mg) was dissolved in 1 ml of MeOH and 250  $\mu$ L were diluted with 100  $\mu$ L of MeOH-H<sub>2</sub>O (9:1, v/v) containing 0.1% formic acid supplemented with 1  $\mu$ mol/L sodium formate and directly infused into the ESI source. The detection parameters in the positive-ionization mode were set as follows: capillary temperature at 275 °C; spray voltage 4.5 kV; capillary voltage 20 V, and 95 V for the tube lens; sheath gas flow 60 arbitrary units of nitrogen.

**Plant Material.** The aerial parts of *Hyptis pectinata* were collected in Dos Ríos (19.29472° N, 96.47375° W; Elev. 940 m) and camino al campo de tiro El Corso (19.29433° N, 96.48118 W; Elev. 943 m), Municipio de Emiliano Zapata, Veracruz, Mexico in October and December, 2009. An individual plant specimen of each collection was identified by Adriana Hernández-Rojas and deposited with the voucher accession numbers XAL0001406 and XAL0000286, respectively, in the herbarium of the Instituto de Ecología, Xalapa, Veracruz, Mexico. Leaves of *H. monticola* were collected in the locality of Vale das Videiras, Petrópolis, Rio de Janeiro, Brazil (22.02196° S, 44.41166° W; Elev. 1812 m) in October, 2013. Professor Raymond Harley

(Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia, Brazil) carried out the identification and a voucher specimen was deposited in the herbarium of the Biology Institute, Universidade Federal do Rio de Janeiro, under accession number RFA39927.

**Extraction and Isolation.** The aerial parts of *H. pectinata* from the Dos Ríos collection (2.77 kg) were powdered and extracted by maceration at room temperature with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The extract was dried under reduced pressure to obtain 125.8 g of a greenish-brown residue (collection 1). For the removal of triterpenes, the extract was dissolved in methanol (50 mL per 1.0 g of extract) and kept for twelve hours at 0 °C. The extract was filtered and concentrated under reduced pressure to afford a triterpene-free extract. The same extraction procedure was used to obtain the CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-soluble extract from El Corso collection (2.79 kg, 169.3 g of extract; collection 2). For the removal of triterpenes, the extract was dissolved in a commercial mixture of hexanes (75 mL per 2.0 g of extract) and extracted with the same volume of a mixture of H<sub>2</sub>O-MeOH (4:1); the methanol was removed from the aqueous phase by concentration in vacuum, followed by consecutive extractions using CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and EtOAc.

Leaves from *Hyptis monticola* (1.05 kg) were dried in an oven at a temperature below 40 °C, pulverized in a Wiley mill, and extracted by macerations with ethanol-water (7:3). The resulting solution was concentrated to remove the ethanol and subjected to liquid-liquid partition with solvents of increasing polarity. The extracts were dried in a rotary evaporator to afford *n*-hexane (4.06 g), dichloromethane (7.02 g), ethyl acetate (13.18 g) and *n*-butanol (22.72 g) extracts.

The resulting triterpene-free extract (18.74 g) from *H. pectinata* collection 1 was fractionated using an open glass column packed with silica gel in a 1:20 ratio. The extract was adsorbed in silica gel (1:1) and the column eluted using a gradient of *n*-hexane-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, followed by CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-acetone and acetone-methanol in several proportions. A total of 65 eluates was obtained

(500 mL each), which were combined in 15 fractions. Fraction 9 (2.0 g, eluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-acetone, 9:1) was further fractionated by silica gel CC using a gradient of *n*-hexane-EtOAc, and 40 eluates were obtained (50 mL each), which were combined in 12 subfractions. Subfraction II (eluted with *n*-hexane-EtOAc, 4:1 and 7:3) afforded compound **6** (88.0 mg), subfraction VI (eluted with *n*-hexane-EtOAc, 3:2) afforded compound **2** (16.4 mg), subfraction VIII (eluted with *n*-hexane-EtOAc, 3:2) afforded compound **3** (20.3 mg), subfraction IV (eluted with *n*-hexane-EtOAc, 7:3) afforded compound **7** (8.6 mg), and subfraction IX (eluted with *n*-hexane-EtOAc, 7:3) afforded compound **8** (1.3 mg). Fraction 10 (1.8 g, eluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-acetone, 9:1) was resolved by HPLC on a Symmetry C<sub>18</sub> column (Waters, 7 μm, 19 × 300 mm) with an isocratic elution of MeOH-H<sub>2</sub>O (4:1) and a flow rate of 6.14 mL/min (sample injection, 500 μL; concentration, 0.05 mg/μL). The peak with *t<sub>R</sub>* value of 8.62 min was collected by the heart-cutting technique to afford pure compound **5** (20 mg). Fraction 12 (1.6 g, eluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-acetone, 7:3 and 1:1) was fractionated by silica gel CC, and seven pooled eluates were collected. Eluate V (49.0 mg, eluted with *n*-hexane-EtOAc, 1:1) was also resolved by HPLC on a Symmetry C<sub>18</sub> column (Waters, 7 μm, 19 × 300 mm) with an isocratic elution of MeOH-H<sub>2</sub>O (8:2) and a flow rate of 6.14 mL/min (sample injection, 500 μL; concentration, 0.05 mg/μL). The peak with *t<sub>R</sub>* value of 10.12 min was collected by heart cutting and re-injected (sample injection, 500 μL; concentration, 0.05 mg/μL) in the chromatograph operating in the recycle mode to achieve total homogeneity after three cycles. These techniques afforded pure compound **4** (10 mg).

The resulting triterpene-free extract (20.04 g) from collection 2 (*H. pectinata*) was fractionated under the same conditions described above. A total of 49 eluates was obtained (500 mL each) and combined in 11 fractions. Fraction 4 (0.6 g, eluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-acetone, 95:5 and 9:1) was further fractionated in silica gel CC using a gradient of *n*-hexane-EtOAc and 47 eluates were obtained (50 mL each), which were combined into 10 subfractions. Subfraction II

(eluted with *n*-hexane-EtOAc, 4:1) afforded compound **1** (15.0 mg) and subfraction III (eluted with *n*-hexane-EtOAc, 7:3) afforded compound **2** (4.2 mg). Fraction 9 (0.89 g, eluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-acetone, 3:7) was resolved by HPLC on a Symmetry C<sub>18</sub> column (Waters, 7 μm, 19 × 300 mm) with an isocratic elution of MeOH-H<sub>2</sub>O (8:2) and a flow rate of 6.14 mL/min (sample injection, 500 μL; concentration, 0.05 mg/μL) to yield pure compound **4** (10 mg).

Part of the CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-soluble extract (500 mg) from *H. monticola* was fractionated by HSCCC in a HTPrep™ Quattro CCC, equipped with a JASCO PU-2089s Plus pump and a fraction collector Merck L-7650 (HTPrep). The solvent system was *n*-hexane-EtOAc-MeOH-H<sub>2</sub>O (0.8:1:0.8:1) prepared in a separation funnel at room temperature.<sup>20</sup> The two phases were separated and degassed by sonication for 5 min. Then, the CCC column was first filled with the stationary phase (aqueous lower phase), and after set setting the rotation, the mobile phase (organic upper phase) was pumped in. Samples were dissolved in equal volumes of phases and were injected after the hydrodynamic equilibrium inside the column was reached. The stationary phase retention (*S<sub>f</sub>*) before injection was 84.2%. The CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extract was fractionated using the 95-mL coil, with a flow rate of 3 mL/min (upper phase as mobile), 860 rpm. A total of 65 fractions (3 mL) were collected with the rotation on. Afterwards, 30 additional fractions were collected pumping out the mobile phase. Fractions 14-21 afforded impure monticolide A (**9**, 32.9 mg), which was further purified by HPLC, silica gel column μPorasil, (3.9 × 300 mm, 10 μm), *n*-hexane-EtOAc as mobile phase, flow rate 2,0 mL/min, retention time 13.5 min. Fractions 56-67 afforded a complex mixture of 6-heptyl-5,6-dihydro-2*H*-pyran-2-ones.

*Pectinolide A (1)*: colorless oil; [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> +202 (*c* 0.15, MeOH); <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR, see Supporting Information, which was identified by comparison with an authentic sample.<sup>3</sup>

*Pectinolide B (2)*: colorless oil; [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> +90 (*c* 0.57, MeOH). <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR, see Supporting Information, which was identified by comparison with an authentic sample.<sup>3</sup>

*Pectinolide C (3)*: colorless oil;  $[\alpha]_D +81$  ( $c$  0.76, MeOH).  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, see Supporting Information, which was identified by comparison with an authentic sample.<sup>3</sup>

*Pectinolide I (4)*: colorless oil; ORD ( $c$  0.20, MeOH)  $[\alpha]_{589} +12.5$ ,  $[\alpha]_{578} +13.0$ ,  $[\alpha]_{546} +15.5$ ,  $[\alpha]_{436} +27.5$ ; ECD ( $c$   $8.8 \times 10^{-5}$  M, MeOH)  $\lambda_{\text{max}}(\Delta\epsilon)$  206 (+1.09), 212 (-0.90), 235 (+2.86), 263 (-0.26), 289 (+1.32);  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) and  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) data (Figures S19 and S20, Supporting Information), see Tables 1 and 2; positive HRESIMS  $m/z$  249.10969 (calcd for  $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{O}_4 + \text{Na}^+$  requires 249.10973,  $\delta = -0.1$  ppm).

*Pectinolide J (5)*: colorless oil; ORD ( $c$  0.39, MeOH)  $[\alpha]_{589} +63.8$ ,  $[\alpha]_{578} +65.9$ ,  $[\alpha]_{546} +76.4$ ,  $[\alpha]_{436} +143.3$ ; ECD ( $c$   $7.5 \times 10^{-5}$  M, MeOH)  $\lambda_{\text{max}}(\Delta\epsilon)$  228 (+2.56), 251 (-0.65), 278 (+0.57);  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) and  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) data (Figures S4 and S22, Supporting Information), see Tables 1 and 2; positive HRESIMS  $m/z$  291.12061 (calcd for  $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{O}_5 + \text{Na}^+$ , 291.12029,  $\delta = +1.1$  ppm).

*Pectinolide K (6)*: colorless oil; ORD ( $c$  0.15, MeOH)  $[\alpha]_{589} +98.7$ ,  $[\alpha]_{578} +103.3$ ,  $[\alpha]_{546} +120.0$ ,  $[\alpha]_{436} +224.0$ ,  $[\alpha]_{365} +402.8$ ; ECD ( $c$   $6.4 \times 10^{-5}$  M, MeOH)  $\lambda_{\text{max}}(\Delta\epsilon)$  214 (+24.7), 246 (+1.20), 265 (+2.45);  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) and  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) data (Figures S23 and S24, Supporting Information), see Tables 1 and 2; positive HRESIMS  $m/z$  333.13078 (calcd for  $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_6 + \text{Na}^+$  requires 333.13086,  $\delta = -0.2$  ppm).

*Pectinolide L (7)*: colorless oil; ORD ( $c$  0.04  $\text{CHCl}_3$ )  $[\alpha]_{589} -0.6$ ,  $[\alpha]_{578} -0.6$ ,  $[\alpha]_{546} -1.2$ ,  $[\alpha]_{436} +1.8$ ,  $[\alpha]_{365} +5.3$ ; ECD ( $c$   $5.0 \times 10^{-5}$  M, MeOH)  $\lambda_{\text{max}}(\Delta\epsilon)$  208 (+2.10);  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) and  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) data (Figures S25 and S26, Supporting Information), see Tables 1 and 2; positive HRESIMS  $m/z$  365.15729 (calcd for  $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{O}_7 + \text{Na}^+$ , 365.15707,  $\delta = +0.6$  ppm).



*Pectinolide M (8)*: colorless oil; ORD (*c* 0.17 CHCl<sub>3</sub>) [ $\alpha$ ]<sub>589</sub> -7.5, [ $\alpha$ ]<sub>578</sub> -7.5, [ $\alpha$ ]<sub>546</sub> -2.5, [ $\alpha$ ]<sub>436</sub> +2.5, [ $\alpha$ ]<sub>365</sub> +10.0; ECD (*c* 5.0 × 10<sup>-5</sup> M, MeOH)  $\lambda_{\max}$  ( $\Delta\epsilon$ ) 206 (+2.4); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) and <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) data, see Tables 1 and 2 (Figures S27 and S28, Supporting Information); positive HRESIMS *m/z* 323.14680 (calcd for C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>O<sub>6</sub> + Na<sup>+</sup>, 323.14651,  $\delta$  = +0.9 ppm).

*Monticolide A (9)*: colorless oil; ORD (*c* 0.06, MeOH) [ $\alpha$ ]<sub>589</sub> +83.3, [ $\alpha$ ]<sub>578</sub> +85.0, [ $\alpha$ ]<sub>546</sub> +100.0, [ $\alpha$ ]<sub>436</sub> +196.7, [ $\alpha$ ]<sub>365</sub> +363.3; ECD (*c* 4.7 × 10<sup>-5</sup> M, MeOH)  $\lambda_{\max}$  ( $\Delta\epsilon$ ) 209 (+34.30), 254 (-1.31), 268 (+0.75); <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR, see Figures S29 and S30, Supporting Information; positive HRESIMS *m/z* 451.15810 (calcd for C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>O<sub>10</sub> + Na<sup>+</sup>, 451.15746,  $\delta$  = +1.4 ppm).

*Monticolide B (10)*: colorless oil; ORD (*c* 0.39, CHCl<sub>3</sub>) [ $\alpha$ ]<sub>589</sub> +91.4, [ $\alpha$ ]<sub>578</sub> +94.9, [ $\alpha$ ]<sub>546</sub> +110.3, [ $\alpha$ ]<sub>436</sub> +210.8, [ $\alpha$ ]<sub>365</sub> +391.4; ECD (*c* 4.0 × 10<sup>-5</sup> M, MeOH)  $\lambda_{\max}$  ( $\Delta\epsilon$ ) 209 (+35.12), 255 (-1.52), 268 (+0.81); <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR, see Figures S31 and S32, Supporting Information; positive HRESIMS *m/z* 367.13601 (calcd for C<sub>16</sub>H<sub>24</sub>O<sub>8</sub> + Na<sup>+</sup>, 367.13634,  $\delta$  = -0.9 ppm).

**Oxidation of Compounds 1 and 6 with *m*-Chloroperbenzoic Acid/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** Compounds **1** and **6** (25.0 mg each) were individually dissolved in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10.0 mL), *m*-CPBA (18.0 mg) and 0.5 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50%) were added, and the mixture stirred and refluxed for three days. The reaction mixture of compound **1** was separated by silica gel CC using a gradient of CHCl<sub>3</sub>/Me<sub>2</sub>CO, fractions eluted with CHCl<sub>3</sub>-Me<sub>2</sub>CO (4:1), to afford compound **10** (14.6 mg). In the case of compound **6**, the mixture was separated in silica gel CC using a gradient of *n*-hexane/EtOAc, fractions eluted with *n*-hexane-EtOAc (6:4), to afford compound **14** (3.0 mg).

*Derivative 14*: colorless oil; ORD (*c* 0.29, CHCl<sub>3</sub>) [ $\alpha$ ]<sub>589</sub> +104.2, [ $\alpha$ ]<sub>578</sub> +109.7, [ $\alpha$ ]<sub>546</sub> +127.0, [ $\alpha$ ]<sub>436</sub> +240.6, [ $\alpha$ ]<sub>365</sub> +447.3; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) and <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) data

(Figures S33 and S34, Supporting Information), see Tables 1 and 2; 367.13689 (calcd for  $C_{16}H_{24}O_8 + Na^+$ , 367.13634,  $\delta = +1.5$  ppm).

**Oxidation of Compounds 4 and 6 with *m*-Chloroperbenzoic Acid.** Compounds 4 and 6 (25.0 mg each) were dissolved in  $CH_2Cl_2$  (5.0 mL) and treated with *m*-CPBA (18.0 mg) at room temperature for 48 h. For compound 4, the mixture obtained was separated by silica gel CC using a gradient of *n*-hexane/EtOAc, fractions eluted with *n*-hexane-EtOAc (11:9) were separated by HPLC on a  $\mu$ Porasil column (Waters, 10  $\mu$ m, 3.9  $\times$  300 mm), with a isocratic elution of *n*-hexane-EtOAc (1:1) and a flow rate of 0.3 mL/min (sample injection, 20  $\mu$ L; concentration, 0.2 mg/ $\mu$ L). The peaks with  $t_R$  values of 17.32 min and 20.01 min were collected to afford pure compounds 18 and 19. The reaction mixture of compound 6 was separated by silica gel CC, using a gradient of  $CHCl_3$ -EtOAc, and the fractions eluted with  $CHCl_3$ -EtOAc (24:1) afforded compound 17 (21.5 mg).

**Preparation of (*R*)- and (*S*)-MTPA Ester Derivatives of Compounds 4, 10 and 14.** Each compound (2.0 mg each) was independently dissolved in 0.5 mL of  $CDCl_3$ . This solution was transferred into two clean NMR tubes and 4-(dimethylamino)pyridine (0.8 mg), *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (20 mg), pyridine-*d*<sub>5</sub> (0.1 mL), and 20  $\mu$ L of (*S*)- or (*R*)- $\alpha$ -methoxy- $\alpha$ -(trifluoromethyl) phenylacetyl chloride [(*S*)- or (*R*)-MTPA-Cl] were added.<sup>21</sup> The reaction mixtures were purged with nitrogen and left for 24 h, then the <sup>1</sup>H NMR spectra were recorded.

**Hydrolysis of Pectinolide I (4):** Compound 4 (5 mg) was dissolved in 5 mL MeOH/H<sub>2</sub>O (80 %) containing 0.1 M KOH (2 mL) and stirred for 3 h. The usual workup of the reaction gave an oily residue that was purified by HPLC on a Symmetry C<sub>18</sub> column (Waters, 7  $\mu$ m, 19  $\times$  300 mm) with an isocratic elution of MeOH-H<sub>2</sub>O (8:2) and a flow rate of 4.5 mL/min, to afford 3.5 mg of 8 ( $t_R$  10.8 min), which was identical with an authentic sample of the natural product.

**Computational Methods.** Molecular building and the Monte Carlo searches for all compounds were carried out in the Spartan'10 program using the MMFF94 force-field calculations followed by single-point DFT calculations. All structures were DFT-optimized in the Gaussian 09 program on a Linux operating system in the HP Cluster Platform Intel E2670 with 5312 processors and 15 000 gigabytes RAM. The optimized structures were used to calculate the thermochemical parameters at 298 K and 1 atm. The free energy values were obtained from the vibrational frequency calculations as the sum electronic and thermal free energies. The Gibbs free energy equation ( $\Delta G = -RT \ln K$ ) was used to obtain the conformational populations, taking into account a cyclic equilibrium between the selected conformers within a  $\Delta G = 0\text{-}3$  kcal/mol range. Magnetic shielding tensors were calculated with the GIAO method and the NMR spin-spin coupling constants (SSCC)  $J$  were obtained by the sum of the Fermi contact, the diamagnetic spin-orbit, spin-dipolar, and paramagnetic spin-orbit values calculated from B3LYP/DGDZVP-optimized structures. Calculations taking into account the solvent ( $\text{CHCl}_3$ ) were carried out starting from DFT-optimized structures. Geometry optimization at the DFT B3LYP/DGDZVP level, calculation of the vibrational frequencies, thermochemical parameters, magnetic shielding tensors,  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR chemical shifts and the total  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  spin-spin coupling constants were also calculated using the PCM solvation algorithm included in the Gaussian 09 program.<sup>22</sup> For each job, eight processors were used, and each conformer required three different DFT jobs: geometric optimizations, frequency calculation, and SSCC estimations.

**Spectral Simulation.** Spectral simulation of  $^1\text{H}$  NMR chemical shifts and  $^3J_{\text{H,H}}$  coupling constants was performed through nonlinear adjustment of the spectral parameters with the original recorded spectra using MestReNova.

**Docking Study.** The AutoDock Tools 1.5.6 package (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA) was employed for addition of polar hydrogen atoms, Gasteiger-Marsili charges, and solvation parameters to the 1JFF.PDB structure of  $\alpha,\beta$ -tubulin which was combined with the molecular model of the analyzed 5,6-dihydro-2*H*-pyran-2-ones **3**, **6**, **9**, **10**, and **12**, as previously described for pironetin.<sup>9b</sup> Docking was carried out with AutoDock 4.2 software (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA) using the default parameters. The entire system was subjected to a surface scanning and refined docking, considering the  $\alpha$ Lys352 residue as flexible and a grid box size set at 40 Å × 40 Å × 40 Å in the x, y, and z dimensions centered at the nitrogen atom of the  $\alpha$ Lys352 residue. The Lamarckian genetic algorithm was applied. During the docking experiment, 100 runs were carried out.

**Cytotoxicity Assays.** Cytotoxic activity was evaluated by the sulforhodamine B (SRB) assay, as previously described.<sup>23</sup> All isolates were screened in vitro against three human cancer cell lines: HCT-15 (colorectal), HeLa (cervix), and MCF-7 (breast).<sup>24</sup>

## ASSOCIATED CONTENT

### Supporting Information

<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra for natural products **4-10** and derivative **14**. Simulated vs experimental <sup>1</sup>H NMR spectra of **3** and **5**. MTPA ester derivatives **11** and **16**. DFT B3LYP/DGDZVP total free energies, population, NMR chemical shifts, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H coupling constants, and NOE experiments of stereoisomers **3-5**. XYZ coordinates for all computed structures of **3** and **5**. 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](mailto:pereda@unam.mx).

## **Author Contributions**

Taken in part from the Ph.D. thesis of L. Martínez-Fructuoso (Posgrado en Ciencias Químicas, UNAM).

## **ORCID**

Lucero Martínez-Fructuoso: 0000-0002-2279-5479

Rogelio Pereda-Miranda: 0000-0002-0542-0085

Mabel Fragoso-Serrano: 0000-0002-7693-8391

Carlos M. Cerda-García-Rojas: 0000-0002-5590-7908

Suzana Guimarães Leitão: 0000-0001-7445-074X

## **Notes**

The authors declare no competing financial interest.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

Financial support was provided by CONACyT (Mexico, CB220535), DGAPA, (UNAM, IN215016), CNPq and FAPERJ (Brazil). We are indebted to Dirección General de Servicios de Cómputo Académico (UNAM: LANCAD-UNAM-DGTIC-204) for providing the resources to carry out computational calculations at Miztli supercomputer, and to the technical personnel of USAI, Facultad de Química (UNAM) for the recording of NMR spectra (especially to N. López Balbiaux and R. I. del Villar Morales). L.M.F. is grateful to CONACyT for a graduate student scholarship (288963).

## REFERENCES

- (1) Harley, R. M.; Atkins, S.; Budantsev, A. L.; Cantino, P. D.; Conn, B. J.; Grayer, R.; Harley, M. M.; De Kok, R.; Krestovskaja, T.; Morales, R.; Paton, A. J.; Ryding, O.; Upson, T. *Flowering Plants. Dicotyledons*, Vol. 7. Kadereit, J. W., Ed.; Springer-Verlag: Berlin, 2004, pp 167–275.
- (2) (a) Agra, M. de F.; França de Freitas, P.; Barbosa-Filho, J. M. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2007**, *17*, 114–140. (b) Pereda-Miranda, R. *Phytochemistry of Medicinal Plants*. Arnason, J. T., Mata, R., Romeo, J. T., Eds.; Plenum: New York, 1995; pp 83–112.
- (3) (a) Pereda-Miranda, R.; Hernández, L.; Villavicencio, M. J.; Novelo, M.; Ibarra, P.; Chai, H.; Pezzuto, M. J. *J. Nat. Prod.* **1993**, *56*, 583–593. (b) Fragoso-Serrano, C.; Gibbons, S.; Pereda-Miranda, R. *Planta Med.* **2005**, *71*, 278–280.
- (4) Novelo, M.; Cruz, J. G.; Hernandez, L.; Pereda-Miranda, R.; Chai, H., Mar, W.; Pezzuto, J. M. *J. Nat. Prod.* **1993**, *56*, 1728–1736.
- (5) Arrigoni-Blank, M. F.; Antonioli, A. R.; Caetano, L. C.; Campos, D. A.; Blank, A. F.; Alves, P. B. *Phytomedicine* **2008**, *15*, 334–339.
- (6) Falcão, R. E. A.; de Souza, S. A.; Camara, C. A.; Quintans, J. S. S.; Santos, P. L.; Correia, M. T.; Silva, T. M. S.; Lima, A. A. N.; Quintans-Júnior, L. J.; Guimarães, A. G. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2016**, *26*, 203–208.
- (7) (a) Nascimento, P. F. C.; Alviano, W. S.; Nascimento, A. L. C.; Santos, P. O.; Arrigoni-Blank, M. F.; de Jesus, R. A.; Azevedo, V. G.; Alviano, D. S.; Bolognese, A. M.; Trindade, R. C. *Oral Dis.* **2008**, *14*, 485–489. (b) Santos, P. O.; Costa, M. de J. C.; Alves, J. A. B.; Nascimento, P. F. C.; de Melo, D. L. F. M.; Barbosa Jr., A. M.; Trindade, R. de C.; Blank, A. F.; Arrigoni-Blank, M. F.; Alves, P. B.; do Nascimento, M. P. F. *Quim. Nova* **2008**, *31*, 1648–1652. (c) Perera, W. H.; Bizzo, H. R.; Gama, P. E.; Alviano, C. S.; Salimena, F. R.; Alviano, D. S.; Leitão, S. G. *J. Essent. Oil Res.* **2017**, *29*, 109–116.
- (8) (a) 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. (b) Bjerketorp, J.; Levenfors, J. J.; Sahlberg, C.; Nord, C. L.; Andersson, P. F.; Guss, B.; Öberg, B.; Broberg, A. *J. Nat. Prod.* **2017**, *80*, 2997–3002.
- (9) (a) Usui, T.; Watanabe, H.; Nakayama, H.; Tada, Y.; Kanoh, N.; Kondoh, M.; Asao, K.; Takio, K.; Watanabe, H.; Nishikawa, K.; Kitahara, T.; Osada, H. *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 799–806. (b) Bañuelos-Hernández, A. E.; Mendoza-Espinoza, J. A.; Pereda-Miranda, R.; Cerda García-Rojas, C. M. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 3752–3764. (c) Yang, J.; Wang, Y.; Wang, T.; Jiang, J.; Botting, C. H.; Liu, H.; Chen, Q.; Yang, J.; Naismith, J. H.; Zhu, X.; Chen, L. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 12103.

- (10) (a) Kingston, D. G. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 507–515. (b) Steinmetz, M. O.; Prota, A. E. *Trends Cell Biol.* **2018**, *28*, 776–792.
- (11) (a) Achman, S.; Hoyer, T.; Kjaer, S.; Makmur, L.; Norrestam, R. *Acta Chem. Scand.* **1987**, *B41*, 599–609. (b) Boalino D. M.; Connolly J. D.; McLean S.; Reynolds W. F.; Tinto, W. F. *Phytochemistry* **2003**, *64*, 1303–1307.
- (12) (a) López-Vallejo, F.; Fragoso-Serrano, M.; Suárez-Ortiz, G. A.; Hernández-Rojas, A.; Cerda-García-Rojas, C. M.; Pereda-Miranda, R. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 6057–6066. (b) Juárez-González, F.; Suárez-Ortiz, G. A.; Fragoso-Serrano, M.; Cerda-García-Rojas, C. M.; Pereda-Miranda, R. *Magn. Reson. Chem.* **2015**, *53*, 203–212. (c) Suárez-Ortiz, G. A.; Cerda-García-Rojas, C. M.; Fragoso-Serrano, M.; Pereda-Miranda, R. *J. Nat. Prod.* **2017**, *80*, 181–189.
- (13) (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, C., Eds.; Springer: New York, 1989, Vol. 55, pp 1–35. (b) Collett, 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, C., Eds.; Springer-Verlag: New York, 1998, Vol. 75, pp 182–209.
- (14) (a) Seco, J. M.; Martino, M.; Quiñoá, E.; Riguera, R. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 3261–3264. (b) Seco, J. M.; Quiñoá, E.; Riguera, R. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 17–117. (c) Seco, J. M.; Quiñoá, E.; Riguera, R. *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 4603–4641.
- (15) (a) Sabitha, G.; Das, S. K.; AnkiReddy, P.; Yadav, J. S. *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 1097–1099. (b) Ghogare, R. S.; Wadavrao, S. B.; Narsaiah, A. V. *Helv. Chim. Acta* **2016**, *99*, 247–254.
- (16) Gil, R. R.; Navarro-Vázquez, A. *Modern NMR Approaches to the Structure Elucidation of Natural Products*; Williams, A. J.; Martin, G. E.; Rovnyak, D., Eds.; Royal Society of Chemistry: Cambridge, UK, 2016; pp 1–38.
- (17) (a) Rahman, M. M.; Gibbons, S. *Fitoterapia* **2015**, *105*, 269–272. (b) Rivera-Chávez, J.; Figueroa, M.; González, M. D.; Glenn, A. E.; Mata, R. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 730–735.
- (18) Lee, Y. M.; Kim, M. J.; Li, H.; Zhang, P.; Bao, B.; Lee, K. J.; Jung, J. H. *Mar. Biotechnol.* **2013**, *15*, 499–519.
- (19) Niu, M. M.; Qin, J. Y.; Tian, C. P.; Yan, X. F.; Dong, F. G.; Cheng, Z. Q.; Fida, G.; Yang, M.; Chen, H.; Gu, Y. Q. *Acta Pharmacol. Sin.* **2014**, *35*, 967–979.
- (20) de Souza Figueiredo, F.; Celano, R.; de Sousa Silva, D.; das Neves Costa, F.; Hewitson, P.; Ignatova, S.; Piccinelli, A. L.; Rastrelli, L.; Leitão, S. G.; Leitão, G. G. *J. Chromatogr. A.* **2017**, *1481*, 92–100.

(21) (a) Fragoso-Serrano, M.; González-Chimeo, E.; Pereda-Miranda, R. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 45–50. (b) Hoye, T. R.; Jeffrey, C. S.; Shao, F. *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 2451–2458.

(22) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, Jr., J. A.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, N. J.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas, Ö.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J. *Gaussian 09, Revision A.1*, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.

(23) 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.

(24) Figueroa-González, G.; Jacobo-Herrera, N.; Zentella-Dehesa, A.; Pereda-Miranda, R. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 93–97.





## 5.1 Información suplementaria

### **Structure Elucidation, Conformation, and Configuration of Cytotoxic 6-Heptyl-5,6-dihydro-2*H*-pyran-2-ones from *Hyptis* Species and their Molecular Docking to $\alpha$ -Tubulin**

Lucero Martínez-Fructuoso,<sup>†</sup> Rogelio Pereda-Miranda,<sup>\*,†</sup> Daniel Rosas-Ramírez,<sup>†</sup>  
Mabel Fragoso-Serrano,<sup>†</sup> Carlos M. Cerda-García-Rojas,<sup>‡</sup> Aline Soares da Silva,<sup>§</sup>

Gilda Guimarães Leitão,<sup>⊥</sup> and Suzana Guimarães Leitão<sup>§</sup>

<sup>†</sup>Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Mexico City 04510, Mexico

<sup>‡</sup>Departamento de Química, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, A. P. 14-740, Mexico City 07000, Mexico

<sup>§</sup>Faculdade de Farmacia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, CCS, Bloco A, Ilha do Fundão, 21941-590, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>⊥</sup>Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, CCS, Bloco H, Ilha do Fundão, 21941-590, Rio de Janeiro, Brazil

<b>Table of contents</b>	<b>page</b>
<b>Table S1.</b> Comparison between DFT and experimental $^1\text{H}$ NMR chemical shifts for the most relevant conformers of <b>3</b> .	88
<b>Table S2.</b> Comparison between DFT and experimental $^1\text{H}$ NMR chemical shifts for the most relevant conformers of <b>3</b> considering PCM solvation in $\text{CHCl}_3$	89
<b>Table S3.</b> Comparison between DFT and experimental $^1\text{H}$ NMR chemical shifts for the most relevant conformers of <b>5</b> .	90
<b>Table S4.</b> Comparison between DFT and experimental $^1\text{H}$ NMR chemical shifts for the most relevant conformers of <b>5</b> considering PCM solvation in $\text{CHCl}_3$ .	91
<b>Table S5.</b> DFT B3LYP/DGDZVP relative free energies, population, and comparison between DFT and experimental $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ couplings for the most relevant conformers of <b>2</b> .	92
<b>Table S6.</b> DFT B3LYP/DGDZVP relative free energies, population, and comparison between DFT and experimental $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ couplings for the most relevant conformers of <b>2</b> considering PCM solvation in $\text{CHCl}_3$ .	93
<b>Table S7.</b> DFT B3LYP/DGDZVP relative free energies, population, and comparison between DFT and experimental $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ couplings for the most relevant conformers of <b>3</b> .	94
<b>Table S8.</b> DFT B3LYP/DGDZVP relative free energies, population, and comparison between DFT and experimental $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ couplings for the most relevant conformers of <b>3</b> considering PCM solvation in $\text{CHCl}_3$ .	95
<b>Table S9.</b> DFT B3LYP/DGDZVP relative free energies, population, and comparison between DFT and experimental $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ couplings for the most relevant conformers of <b>4</b> .	96
<b>Table S10.</b> DFT B3LYP/DGDZVP relative free energies, population, and comparison between DFT and experimental $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ couplings for the most relevant conformers of <b>4</b> considering PCM solvation in $\text{CHCl}_3$ .	97
<b>Table S11.</b> DFT B3LYP/DGDZVP relative free energies, population, and comparison between DFT and experimental $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ couplings for the most relevant conformers of <b>5</b> .	98
<b>Table S12.</b> DFT B3LYP/DGDZVP relative free energies, population, and comparison between DFT and experimental $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ couplings for the most relevant conformers of <b>5</b> considering PCM solvation in $\text{CHCl}_3$ .	99
<b>Table S13.</b> DFT B3LYP/DGDZVP relative free energies, population, and comparison between DFT and experimental $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ couplings for the most relevant conformers of <b>10</b> .	100

<b>Table S14.</b> DFT B3LYP/DGDZVP relative free energies, population, and comparison between DFT and experimental $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ couplings for the most relevant conformers of <b>10</b> considering PCM solvation in $\text{CHCl}_3$ .	101
<b>Table S15.</b> DFT B3LYP/DGDZVP relative free energies, population, and comparison between DFT and experimental $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ couplings for the most relevant conformers of <b>14</b> .	102
<b>Table S16.</b> DFT B3LYP/DGDZVP relative free energies, population, and comparison between DFT and experimental $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ couplings for the most relevant conformers of <b>14</b> considering PCM solvation in $\text{CHCl}_3$ .	103
<b>Table S17.</b> Comparison between DFT and experimental $^{13}\text{C}$ NMR chemical shifts for the most relevant conformers of <b>3</b> .	104
<b>Table S18.</b> Comparison between DFT and experimental $^{13}\text{C}$ NMR chemical shifts for the most relevant conformers of <b>3</b> in $\text{CHCl}_3$ .	105
<b>Table S19.</b> Comparison between DFT and experimental $^{13}\text{C}$ NMR chemical shifts for the most relevant conformers of <b>5</b> .	106
<b>Table S20.</b> Comparison between DFT and experimental $^{13}\text{C}$ NMR chemical shifts for the most relevant conformers of <b>5</b> in $\text{CHCl}_3$ .	107
<b>Table S21.</b> $^1\text{H}$ NMR Data of compounds <b>2</b> and <b>4</b> obtained by non-linear fit of the spectra to spectral parameters.	108
<b>Table S22.</b> $^1\text{H}$ NMR Data of compounds <b>3</b> and <b>5</b> obtained by non-linear fit of the spectra to spectral parameters.	108
<b>Table S23.</b> $^1\text{H}$ NMR Data of compounds <b>10</b> and <b>14</b> obtained by non-linear fit of the spectra to spectral parameters.	109
<b>Figure S1.</b> Simulated and experimental $^1\text{H}$ NMR spectrum of <b>3</b> .	110
<b>Figure S2.</b> Simulated and experimental $^1\text{H}$ NMR spectrum of <b>5</b> .	111
<b>Figure S3.</b> RMSD values for different percentajes of hydrogen bonded conformations of <b>3</b> .	112
<b>Table S24.</b> Corrected theoretical coupling constant for different percentages of hydrogen bonded conformations of <b>3</b> .	112
<b>Figure S4.</b> A) $^{13}\text{C}$ NMR spectrum of pectinolide C ( <b>3</b> ); B) $^{13}\text{C}$ NMR spectrum of pectinolide J ( <b>5</b> ).	113
<b>Figure S5.</b> A) $^1\text{H}$ NMR spectrum of pectinolide C ( <b>3</b> ); B) $^1\text{H}$ NMR spectrum of pectinolide J ( <b>5</b> ) in $\text{CDCl}_3$ (700 MHz).	114

<b>Figure S6.</b> NOE difference spectrum of pectinolide C ( <b>3</b> ) with <sup>1</sup> H NMR spectrum for comparison in CDCl <sub>3</sub> (700 MHz). Vertical arrow indicate the irradiation frequency of H-2' (δ = 5.66).	115
<b>Figure S7.</b> NOE difference spectrum of pectinolide J ( <b>5</b> ) with <sup>1</sup> H NMR spectrum for comparison in CDCl <sub>3</sub> (700 MHz). Vertical arrow indicate the irradiation frequency of H-2' (δ = 5.72).	116
<b>Figure S8.</b> The four most relevant conformers of <b>3</b> modeled in CHCl <sub>3</sub> solution and their contribution to the NOE effect between H-2' and H-4'.	117
<b>Figure S9.</b> The four most relevant conformers of <b>2</b> modeled in gas phase.	118
<b>Figure S10.</b> The four most relevant conformers of <b>2</b> modeled in CHCl <sub>3</sub> solution.	118
<b>Figure S11.</b> The four most relevant conformers of <b>3</b> modeled in gas phase.	119
<b>Figure S12.</b> The four most relevant conformers of <b>4</b> modeled in gas phase.	119
<b>Figure S13.</b> The four most relevant conformers of <b>4</b> modeled in CHCl <sub>3</sub> solution.	120
<b>Figure S14.</b> The four most relevant conformers of <b>5</b> modeled in gas phase.	120
<b>Figure S15.</b> The four most relevant conformers of <b>10</b> modeled in gas phase.	121
<b>Figure S16.</b> The four most relevant conformers of <b>10</b> modeled in CHCl <sub>3</sub> solution.	121
<b>Figure S17.</b> The four most relevant conformers of <b>14</b> modeled in gas phase.	122
<b>Figure S18.</b> The four most relevant conformers of <b>14</b> modeled in CHCl <sub>3</sub> solution.	122
Physical and spectroscopic of pectinolides A-C ( <b>1-3</b> ).	123
<b>Figure S19.</b> <sup>1</sup> H NMR spectra of pectinolide I ( <b>4</b> ) in CDCl <sub>3</sub> (400 MHz).	124
<b>Figure S20.</b> <sup>13</sup> C NMR spectra of pectinolide I ( <b>4</b> ) in CDCl <sub>3</sub> (100 MHz).	125
<b>Figure S21.</b> <sup>1</sup> H (400 MHz; insert) and <sup>13</sup> C (100 MHz) NMR spectra of pectinolide I ( <b>4</b> ) in CD <sub>3</sub> OD.	126
<b>Figure S22.</b> <sup>1</sup> H NMR spectra of pectinolide J ( <b>5</b> ) in CDCl <sub>3</sub> (400 MHz).	127
<b>Figure S23.</b> <sup>1</sup> H NMR spectra of pectinolide K ( <b>6</b> ) in CDCl <sub>3</sub> (400 MHz).	128
<b>Figure S24.</b> <sup>13</sup> C NMR spectra of pectinolide K ( <b>6</b> ) in CDCl <sub>3</sub> (100 MHz).	129
<b>Figure S25.</b> <sup>1</sup> H NMR spectra of pectinolide L ( <b>7</b> ) in CDCl <sub>3</sub> (400 MHz).	130
	90

<b>Figure S26.</b> $^{13}\text{C}$ NMR spectra of pectinolide L ( <b>7</b> ) in $\text{CDCl}_3$ (100 MHz).	131
<b>Figure S27.</b> $^1\text{H}$ NMR spectra of pectinolide M ( <b>8</b> ) in $\text{CDCl}_3$ (400 MHz).	132
<b>Figure S28.</b> $^{13}\text{C}$ NMR spectra of pectinolide M ( <b>8</b> ) in $\text{CDCl}_3$ (100 MHz).	133
<b>Figure S29.</b> $^1\text{H}$ NMR spectra of monticolide A ( <b>9</b> ) in $\text{CDCl}_3$ (400 MHz).	134
<b>Figure S30.</b> $^{13}\text{C}$ NMR spectra of monticolide A ( <b>9</b> ) in $\text{CDCl}_3$ (100 MHz).	135
<b>Figure S31.</b> $^1\text{H}$ NMR spectra of monticolide B ( <b>10</b> ) in $\text{CDCl}_3$ (400 MHz).	136
<b>Figure S32.</b> $^{13}\text{C}$ NMR spectra of monticolide B ( <b>10</b> ) in $\text{CDCl}_3$ (100 MHz).	137
<b>Figure S33.</b> $^1\text{H}$ NMR spectra of derivate <b>14</b> in $\text{CDCl}_3$ (300 MHz).	138
<b>Figure S34.</b> $^{13}\text{C}$ NMR spectra of derivate <b>14</b> in $\text{CDCl}_3$ (75 MHz).	139
<b>Figure S35.</b> $^1\text{H}$ NMR spectra of <i>R</i> - (cyan) and <i>S</i> -MTPA (red) ester derivatives <b>11</b> of compound <b>4</b> in $\text{CDCl}_3$ (300 MHz).	140
<b>Figure S36.</b> $^1\text{H}$ NMR spectra of <i>S</i> - (cyan) and <i>R</i> -MTPA (red) ester derivatives ( <b>16</b> ) of compound <b>14</b> in $\text{CDCl}_3$ (300 MHz). The preparation of these derivatives was performed in NMR tubes and $^1\text{H}$ spectra were recorded directly without purification of reaction mixtures.	141
<b>Figure S37.</b> Comparison of the $^1\text{H}$ NMR spectra (300 MHz in DMSO) for the mixture of 6-heptenyl-5,6-dihydro-2 <i>H</i> -pyran-2-ones from the analysed fraction of <i>H. monticola</i> (red) and monticolide B ( <b>10</b> ; black).	142
<b>Figure S38.</b> The most relevant conformer of pectinolides A ( <b>1</b> ) and K ( <b>6</b> ) modeled in phase. Arrows indicate the less hindered face of the side chain double bond for the interaction with epoxidation reagent ( <i>m</i> CPBA).	143
<b>Figure S39.</b> Complexes between docked compounds ( <b>3</b> , <b>6</b> , <b>9</b> , <b>10</b> , <b>12</b> and <b>20</b> ) and tubulin (A-F). The distance between the Lys352 amino group and $\beta$ carbon of the $\alpha,\beta$ -unsaturated lactone ( $\text{NH}_2\text{-C}\beta$ ), the docking energy ( $E_f$ ), and the hydrogen bond distances are indicated.	144
Coordinates for all computed conformers of epimers <b>3</b> and <b>5</b> .	145

**Table S1.** Comparison between DFT and experimental <sup>1</sup>H NMR chemical shifts for the most relevant conformers of **3**.

Conformer	$\Delta G^a$	$P^b$	H3	H4	H5	H6	H1'	H2'	H3'	H4' <sub>proS</sub>	H4' <sub>proR</sub>	H5' <sub>proS</sub>	H5' <sub>proR</sub>	H6' <sub>proS</sub>	H6' <sub>proR</sub>	H7'
<b>3-1</b>	0	0.4807	6.0544	6.9756	3.6902	5.0191	5.4824	5.7399	6.3774	1.5533	1.5411	1.5083	1.4708	1.4306	1.3124	1.1260
<b>3-2</b>	0.2391	0.3211	6.0521	6.9688	3.6941	5.0211	5.6222	5.6450	6.3698	1.4908	1.683	1.7084	1.2453	1.4241	1.3042	0.9841
<b>3-3</b>	1.3391	0.0501	6.0801	6.9950	3.7092	5.0549	5.4924	5.7574	6.5541	1.8137	1.5455	1.2962	1.7727	1.8123	1.4023	0.5097
<b>3-4</b>	1.4213	0.0436	6.0421	6.9649	3.6927	5.0359	5.5534	6.0189	6.4884	1.7496	1.807	1.4499	1.6338	1.337	1.3243	1.1495
<b>3-5</b>	1.6202	0.0312	6.0696	6.9906	3.7076	5.0451	5.6447	5.5955	6.4369	1.6511	1.669	1.3074	1.3049	2.5744	1.19	1.2479
<b>3-6</b>	1.8417	0.0215	6.1367	6.9448	3.6194	5.7542	6.1347	5.6050	5.0345	1.5838	1.5789	0.9816	1.3167	1.3562	1.347	1.1114
<b>3-7</b>	2.0281	0.0157	6.1322	6.9712	3.5867	4.8786	6.2435	5.9252	5.3541	1.3289	1.7282	0.9837	1.0705	1.3474	1.2861	0.8305
<b>3-8</b>	2.4059	0.0083	6.0472	6.9684	3.6906	5.0405	5.5547	6.0122	6.5302	2.0492	1.5742	1.721	1.5639	1.6469	1.3193	1.1479
<b>3-9</b>	2.5157	0.0069	6.0936	7.0484	3.9633	4.4773	5.6959	6.0387	5.7850	1.8277	2.4157	1.3728	1.564	1.4183	1.3167	0.8806
<b>3-10</b>	2.5546	0.0064	6.1396	6.9756	3.5586	4.9518	6.3036	5.8754	5.7048	1.5678	1.6075	1.1771	1.2862	1.3092	1.303	1.0812
<b>3-11</b>	2.7108	0.0050	6.0662	6.9882	3.7019	5.0385	5.6349	5.5898	6.4507	1.4519	1.9934	1.5963	1.3161	1.3669	2.4872	1.1527
<b>3-12</b>	2.8621	0.0038	6.1309	6.9401	3.6037	5.7683	5.7683	5.6101	5.0387	1.8857	1.3514	1.3514	1.2025	1.6111	1.3581	1.0966
<b>3-13</b>	3.0309	0.0029	6.1458	6.9558	3.6291	5.7940	6.1832	5.6011	5.3163	1.7622	1.5609	1.3169	1.3261	1.3514	1.211	0.8465
<b>3-14</b>	3.0635	0.0027	6.1372	6.9680	3.5114	4.8276	6.1238	6.2932	5.6562	2.0137	1.1104	1.4091	1.4915	1.2102	1.2205	1.1073
Weighted values <sup>c</sup>			6.0595	6.9740	3.6900	5.0374	5.5749	5.7230	6.3287	1.5638	1.6133	1.5313	1.4040	1.4768	1.3168	1.0468
Experimental values <sup>d</sup>			6.1799	7.0363	4.1775	5.3371	5.7705	5.717	5.5395	1.6591	1.7559	1.3851	1.3665	1.3561	1.3489	0.9432
RMSD																0.28

<sup>a</sup> In kcal/mol.<sup>b</sup> In molar fraction from  $\Delta G^\circ$  values at 298 K and 1 atm.<sup>c</sup> Shielding constants were obtained from the DFT optimized structures using GIAO-DFT B3LYP/DGDZVP calculated from the B3LYP/DGDZVP. Values were Boltzmann averaged with the equation  $\sum^i \delta^i \times P^i$ , where  $\delta^i$  is the <sup>1</sup>H NMR chemical shift value (in ppm) for each conformer and  $P^i$  is the population for the *i*th conformation.<sup>d</sup> In ppm, measured at 400 MHz from CDCl<sub>3</sub> solutions using TMS as the internal standard.

**Table S2.** Comparison between DFT and experimental  $^1\text{H}$  NMR chemical shifts for the most relevant conformers of **3** considering PCM solvation in  $\text{CHCl}_3$ .

Conformer	$\Delta G^a$	$P^b$	H3	H4	H5	H6	H1'	H2'	H3'	H4' <sub>proS</sub>	H4' <sub>proR</sub>	H5' <sub>proS</sub>	H5' <sub>proR</sub>	H6' <sub>proS</sub>	H6' <sub>proR</sub>	H7'
3-1	0	0.4114	6.1689	7.2533	3.879	5.1913	5.6632	5.9026	6.237	1.5761	1.6525	1.5395	1.4277	1.4555	1.3673	1.1484
3-2	0.4198	0.2025	6.166	7.2461	3.8815	5.1939	5.7982	5.7976	6.2532	1.5751	1.7433	1.572	1.2817	1.4641	1.3609	0.9597
3-3	0.4606	0.1891	6.2374	7.2682	3.7893	5.0438	6.3218	6.0912	5.4242	1.4495	1.7222	1.0858	1.0932	1.3712	1.3319	0.8515
3-4	1.2305	0.0515	6.2481	7.2613	3.8157	5.6764	6.205	5.8312	5.1315	1.6688	1.6483	1.0811	1.2598	1.3952	1.387	1.1226
3-5	1.3353	0.0432	6.1577	7.2426	3.881	5.2089	5.7334	6.1693	6.3596	1.806	1.8009	1.5275	1.6454	1.3643	1.3622	1.1652
3-6	1.5161	0.0318	6.241	7.2613	3.7392	5.0147	6.2045	6.4414	5.7218	1.9406	1.3148	1.4638	1.5228	1.2695	1.2534	1.1212
3-7	2.0018	0.0140	6.2608	7.27	3.823	5.7008	6.2576	5.8258	5.4039	1.8422	1.649	1.2872	1.3922	1.4085	1.2501	0.822
3-8	2.1241	0.0114	6.178	7.2613	3.889	5.209	5.8247	5.7449	6.3605	1.7525	1.7146	1.3224	1.3853	2.4088	1.256	1.2032
3-9	2.2772	0.0087	6.2412	7.2538	3.7978	5.6548	6.201	5.8352	5.1417	1.963	1.4279	1.2808	1.2248	1.6344	1.3994	1.1313
3-10	2.3745	0.0075	6.2536	7.2597	3.8345	5.7141	6.2665	5.8516	5.4282	1.6603	1.9412	1.5645	1.4051	1.4358	1.3109	1.1233
3-11	2.4454	0.0066	6.2129	7.3436	4.1492	4.6964	5.8806	6.1702	5.6806	1.9055	2.2177	1.4319	1.6068	1.4075	1.3603	0.9133
3-12	2.4592	0.0065	6.2528	7.2655	3.8214	5.7129	6.098	5.9193	5.3522	1.6614	1.7205	1.3722	1.8255	1.4699	1.4432	0.6625
3-13	2.6142	0.0050	6.1614	7.2481	3.8819	5.2127	5.734	6.1641	6.4016	2.1049	1.5733	1.7931	1.5781	1.6917	1.3486	1.1658
3-14	2.7567	0.0039	6.2414	7.2786	3.7631	5.0513	6.4066	6.0637	5.632	1.6522	1.6691	1.1271	1.3634	1.3131	1.4738	1.1094
3-15	2.8414	0.0034	6.1926	7.2661	3.8802	5.2041	5.6798	5.9024	6.424	1.8545	1.6543	1.371	1.8256	1.6518	1.4427	0.6207
3-16	2.8483	0.0034	6.2351	7.29	4.0144	5.5179	6.2195	6.304	5.3727	1.5807	1.8056	1.3452	1.3296	1.3535	1.3695	0.8934
Weighted values <sup>c</sup>			6.1907	7.2556	3.8544	5.1998	5.8917	5.9429	5.9789	1.5945	1.6846	1.4222	1.3409	1.4406	1.3544	1.4406
Experimental values <sup>d</sup>			6.1799	7.0363	4.1775	5.3371	5.7705	5.717	5.5395	1.6591	1.7559	1.3851	1.3665	1.3561	1.3489	1.3561
RMSD																0.18

<sup>a</sup> In kcal/mol.

<sup>b</sup> In molar fraction from  $\Delta G^\circ$  values at 298 K and 1 atm.

<sup>c</sup> Shielding constants were obtained from the DFT optimized structures using GIAO-DFT B3LYP/DGDZVP calculated from the B3LYP/DGDZVP. Values were Boltzmann averaged with the equation  $\sum^i \delta^i \times P^i$ , where  $\delta^i$  is the  $^1\text{H}$  NMR chemical shift value (in ppm) for each conformer and  $P^i$  is the population for the  $i$ th conformation.

<sup>d</sup> In ppm, measured at 400 MHz from  $\text{CDCl}_3$  solutions using TMS as the internal standard.



**Table S3.** Comparison between DFT and experimental <sup>1</sup>H NMR chemical shifts for the most relevant conformers of **5**.

Conformer	$\Delta G^a$	$P^b$	H3	H4	H5	H6	H1'	H2'	H3'	H4' <sub>proS</sub>	H4' <sub>proR</sub>	H5' <sub>proS</sub>	H5' <sub>proR</sub>	H6' <sub>proS</sub>	H6' <sub>proR</sub>	H7'
5-1	0	0.33227	6.1964	7.3074	4.0334	5.3788	6.2446	5.9666	5.2789	1.6658	1.4464	1.2274	1.5466	1.3412	1.3915	1.1236
5-2	0.26481	0.21250	6.2252	7.1681	4.2699	5.3338	6.3407	5.9026	5.2803	1.6640	1.4458	1.2216	1.5370	1.3404	1.3934	0.8593
5-3	0.63504	0.11375	6.2044	7.3044	4.0652	7.3044	6.3463	5.8843	5.2559	1.6586	1.6130	1.2536	1.1727	1.3845	1.3594	1.0960
5-4	0.97954	0.06356	6.2036	7.3051	4.1346	5.3415	6.2103	5.9242	5.4776	1.8410	1.4493	1.5616	1.3536	1.2065	1.5427	0.7805
5-5	1.04920	0.05654	6.1941	7.3044	4.0997	5.3026	6.3166	6.2964	5.4603	1.5831	1.7436	1.6303	1.5399	1.3278	1.3058	1.1414
5-6	1.20545	0.04343	6.1995	7.3071	4.0946	5.3577	6.2375	5.9663	5.2138	1.4381	1.7420	1.1977	1.7613	1.6449	1.3486	0.6790
5-7	1.31338	0.03620	6.2363	7.1659	4.1942	5.3596	6.4847	5.8455	5.2595	1.6550	1.6030	1.2760	1.1802	1.3837	1.3615	1.0971
5-8	1.35981	0.03347	6.2361	7.1657	4.1933	5.3595	6.4847	5.8453	5.2606	1.6552	1.6035	1.2762	1.1802	1.3838	1.3617	1.0972
5-9	1.58509	0.02288	6.1948	7.3106	4.1168	5.3419	6.2327	5.9776	5.2597	1.9724	1.2143	1.4502	1.5305	1.4126	1.6302	0.6935
5-10	1.65537	0.02032	6.2142	7.3048	4.0838	5.3692	6.3746	5.8410	5.4603	1.6705	1.7859	1.3632	1.3452	1.5238	1.1842	0.8782
5-11	1.97791	0.01179	6.1965	7.1452	4.5977	5.0811	6.0339	5.9114	5.0637	1.5459	1.7600	1.6028	1.4674	1.2894	1.2960	0.9090
5-12	2.17432	0.00846	6.2074	7.3121	4.1000	5.3761	6.2424	5.9517	5.4607	1.6852	1.7232	1.8144	1.3670	1.4856	1.4335	1.0750
5-13	2.23896	0.00759	6.2027	7.2988	3.8187	5.4305	6.5144	6.4266	5.5338	1.9559	1.5741	1.9057	1.4823	1.3322	1.7015	1.0928
5-14	2.24335	0.00753	6.2139	7.3119	4.0003	5.4160	6.3987	5.8670	5.4487	1.9529	1.6083	1.3903	1.6066	1.4650	1.4447	1.0803
5-15	2.32367	0.00658	6.2407	7.1708	4.2136	5.3900	6.3866	5.9242	5.4678	1.6831	1.7299	1.8028	1.3668	1.4829	1.4306	0.9838
5-16	2.44039	0.00540	6.1974	7.3062	4.1167	5.3092	6.2971	6.2880	5.5142	1.3546	2.0412	1.5707	1.8033	1.6824	1.3110	1.0025
5-17	2.48808	0.00498	6.2396	7.2101	4.6557	5.1154	6.1659	6.1781	5.4061	1.3446	2.0329	1.5488	1.7613	1.6708	1.3077	1.0701
5-18	2.57718	0.00429	6.1995	7.1487	4.6020	5.0844	6.0322	5.8997	5.1016	1.3140	2.0787	1.5436	1.7183	1.6721	1.2784	1.0531
5-19	2.78614	0.00301	6.2131	7.3166	4.0534	5.4417	6.3085	6.0051	5.3113	1.8660	1.6631	1.3184	1.5029	1.7558	1.1624	0.7161
5-20	2.83509	0.00277	6.2131	7.3166	4.0531	5.4411	6.3085	6.0044	5.3116	1.8666	1.6635	1.3184	1.5031	1.1625	1.7557	0.7161
5-21	2.86458	0.00264	6.2489	7.2125	4.5463	5.1729	6.2666	5.7845	5.3810	1.9393	1.5653	1.3773	1.6086	1.4878	1.3775	0.6213
Weighted values <sup>c</sup>			6.2078	7.2629	4.1281	5.5722	6.2981	5.9526	5.3035	1.6678	1.5280	1.3084	1.4681	1.3665	1.3915	0.9981
Experimental values <sup>d</sup>			6.1036	6.9846	4.1233	5.3068	5.7577	5.6589	5.464	1.6990	1.5909	1.3075	1.3530	1.3001	1.3017	0.8999
RMSD																0.20

<sup>a</sup> In kcal/mol.<sup>b</sup> In molar fraction from  $\Delta G^\circ$  values at 298 K and 1 atm.<sup>c</sup> Shielding constants were obtained from the DFT optimized structures using GIAO-DFT B3LYP/DGDZVP calculated from the B3LYP/DGDZVP. Values were Boltzmann averaged with the equation  $\sum \delta^i \times P^i$ , where  $\delta^i$  is the <sup>1</sup>H NMR chemical shift value (in ppm) for each conformer and  $P^i$  is the population for the *i*th conformation.<sup>d</sup> In ppm, measured at 400 MHz from CDCl<sub>3</sub> solutions using TMS as the internal standard.

**Table S4.** Comparison between DFT and experimental <sup>1</sup>H NMR chemical shifts for the most relevant conformers of **5** considering PCM solvation in CHCl<sub>3</sub>.

Conformer	$\Delta G^a$	$P^b$	H3	H4	H5	H6	H1'	H2'	H3'	H4' <sub>proS</sub>	H4' <sub>proR</sub>	H5' <sub>proS</sub>	H5' <sub>proR</sub>	H6' <sub>proS</sub>	H6' <sub>proR</sub>	H7'
5-1	0.0000	0.3290	6.1036	7.0775	4.0119	5.3145	6.2813	5.7744	5.2212	1.6241	1.4502	1.2022	1.5822	1.3374	1.4019	1.155
5-2	0.1995	0.2349	6.1106	7.0797	4.0276	5.2922	6.3802	5.6957	5.1926	1.6335	1.5617	1.3344	1.1623	1.3761	1.3482	1.1143
5-3	0.8465	0.0788	6.108	7.0828	4.0476	5.2998	6.2702	5.7432	5.4297	1.7997	1.4524	1.606	1.3244	1.2174	1.5485	0.7927
5-4	0.9293	0.0685	6.106	7.0786	4.0736	5.2873	6.2746	5.7768	5.167	1.3875	1.7503	1.1718	1.7886	1.6527	1.3422	0.7033
5-5	0.9375	0.0676	6.1211	7.0935	4.014	5.3461	6.4261	5.679	5.4102	1.654	1.7273	1.3169	1.4198	1.5602	1.137	0.9764
5-6	1.3128	0.0359	6.1014	7.0808	4.0851	5.276	6.2725	5.793	5.2132	1.9384	1.21	1.4221	1.5677	1.4243	1.6397	0.7024
5-7	1.3899	0.0315	6.1002	7.0763	4.0456	5.24	6.3609	6.13	5.4164	1.5796	1.7075	1.6738	1.5173	1.3401	1.3018	1.1729
5-8	1.4458	0.0287	6.1825	6.7745	4.2388	5.2707	6.4706	5.7131	5.2376	1.6231	1.4617	1.1994	1.5671	1.3363	1.4075	0.8684
5-9	1.6347	0.0208	6.1135	6.8827	4.4852	4.9	6.1759	5.6917	5.0249	1.5061	1.7051	1.6228	1.4861	1.3005	1.2883	0.9364
5-10	1.6685	0.0197	6.1295	7.0284	3.706	5.5604	6.5184	6.3037	5.5311	2.0877	1.5371	1.934	1.43	1.337	1.6963	1.1559
5-11	1.7018	0.0186	6.1928	6.7779	4.2002	5.2736	6.5872	5.645	5.2151	1.6227	1.5551	1.3713	1.166	1.3733	1.3518	1.1137
5-12	1.7037	0.0185	6.1927	6.7777	4.1995	5.2742	6.5875	5.6453	5.215	1.6227	1.5554	1.3712	1.1661	1.3732	1.3519	1.1137
5-13	2.1731	0.0084	6.122	7.0921	4.0194	5.3794	6.343	5.8362	5.2498	1.8412	1.6285	1.3329	1.4809	1.1146	1.8633	0.6994
5-14	2.1737	0.0084	6.1132	7.0875	4.0545	5.3171	6.2895	5.7729	5.4235	1.6399	1.7312	1.8432	1.3412	1.4899	1.4328	1.1
5-15	2.1957	0.0081	6.12	7.0909	3.9685	5.3792	6.428	5.6897	5.4053	1.9378	1.5526	1.3556	1.6676	1.5076	1.5153	1.0356
5-16	2.2208	0.0077	6.1016	7.0798	4.0647	5.2459	6.3408	6.1199	5.4711	1.3433	2.0099	1.6117	1.7834	1.6885	1.3211	1.0355
5-17	2.5226	0.0047	6.1518	7.0566	3.7419	5.6459	6.5168	6.0385	5.2842	1.8557	1.6162	1.6417	1.4823	1.7795	1.105	0.7091
5-18	2.6205	0.0039	6.1269	6.912	4.5936	4.95	6.1234	5.4679	5.0204	1.6317	1.639	1.8479	1.3319	1.3996	1.4476	0.6598
5-19	2.6211	0.0039	6.1269	6.9119	4.5938	4.9502	6.1235	5.4678	5.0203	1.6317	1.6391	1.848	1.3319	1.3996	1.4477	1.0121
5-20	2.9725	0.0022	6.1072	7.0815	3.9988	5.3321	6.2466	5.7936	5.2942	2.049	1.4025	1.5483	1.7697	1.4627	1.5677	1.3939
Weighted values <sup>c</sup>			6.1126	7.0524	4.0467	5.2964	6.3352	5.7614	5.2513	1.6465	1.5374	1.3414	1.4400	1.3835	1.3894	1.0334
Experimental values <sup>d</sup>			6.1036	6.9846	4.1233	5.3068	5.7577	5.6589	5.464	1.6990	1.5909	1.3075	1.3530	1.3001	1.3017	0.8999
RMSD																0.17

<sup>a</sup> In kcal/mol.

<sup>b</sup> In molar fraction from  $\Delta G^\circ$  values at 298 K and 1 atm.

<sup>c</sup> Shielding constants were obtained from the DFT optimized structures using GIAO-DFT B3LYP/DGDZVP calculated from the B3LYP/DGDZVP. Values were Boltzmann averaged with the equation  $\sum^i \delta^i \times P^i$ , where  $\delta^i$  is the <sup>1</sup>H NMR chemical shift value (in ppm) for each conformer and  $P^i$  is the population for the *i*th conformation.

<sup>d</sup> In ppm, measured at 400 MHz from CDCl<sub>3</sub> solutions using TMS as the internal st

**Table S5.** DFT B3LYP/DGDZVP relative free energies,<sup>a</sup> population,<sup>b</sup> and comparison between DFT<sup>c</sup> and experimental <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H couplings for the most relevant conformers of **2**.

Conformers	$\Delta G^a$	$J_{5,6}$	$J_{6,1'}$	$J_{1',2'}$	$J_{2',3'}$	$J_{3',4'proR}$	$J_{3',4'proS}$	$P^b$	$PJ_{5,6}$	$PJ_{6,1'}$	$PJ_{1',2'}$	$PJ_{2',3'}$	$PJ_{3',4'proR}$	$PJ_{3',4'proS}$
2-1	0	3.38	10.01	11.86	9.75	10.46	3.49	0.2121	0.72	2.12	2.52	2.07	2.22	0.74
2-2	0.2567	3.47	7.22	13.15	4.13	5.08	2.02	0.1380	0.48	1.00	1.81	0.57	0.70	0.28
2-3	0.2774	5.12	6.03	12.93	5.35	1.58	10.61	0.1333	0.68	0.80	1.72	0.71	0.21	1.41
2-4	0.6382	3.57	9.52	11.82	9.46	2.46	11.30	0.0725	0.26	0.69	0.86	0.69	0.18	0.82
2-5	0.6583	3.57	9.52	11.82	9.46	2.46	11.30	0.0701	0.25	0.67	0.83	0.66	0.17	0.79
2-6	0.8202	3.39	8.04	12.96	5.15	10.68	4.36	0.0533	0.18	0.43	0.69	0.27	0.57	0.23
2-7	0.9469	5.07	6.39	12.89	5.52	10.92	4.14	0.0430	0.22	0.28	0.55	0.24	0.47	0.18
2-8	1.0046	3.48	7.35	12.99	4.33	1.56	10.57	0.0390	0.14	0.29	0.51	0.17	0.06	0.41
2-9	1.2487	4.20	7.64	12.13	9.85	4.50	2.87	0.0259	0.11	0.20	0.31	0.25	0.12	0.07
2-10	1.2600	4.05	7.38	12.11	9.33	1.54	10.54	0.0254	0.10	0.19	0.31	0.24	0.04	0.27
2-11	1.2682	3.48	9.77	11.87	9.71	10.33	3.56	0.0250	0.09	0.24	0.30	0.24	0.26	0.09
2-12	1.2883	3.36	7.08	12.59	2.45	5.15	2.76	0.0242	0.08	0.17	0.30	0.06	0.12	0.07
2-13	1.4546	5.11	6.04	12.92	5.33	1.62	10.54	0.0183	0.09	0.11	0.24	0.10	0.03	0.19
2-14	1.7043	5.12	6.09	12.90	5.40	2.06	11.36	0.0120	0.06	0.07	0.15	0.06	0.02	0.14
2-15	1.7231	3.48	9.43	12.26	7.95	4.23	2.43	0.0116	0.04	0.11	0.14	0.09	0.05	0.03
2-16	1.7288	3.58	9.72	11.90	9.79	11.00	3.59	0.0115	0.04	0.11	0.14	0.11	0.13	0.04
2-17	1.7696	3.53	9.67	11.83	9.47	2.48	11.31	0.0107	0.04	0.10	0.13	0.10	0.03	0.12
2-18	1.8505	3.57	9.37	12.09	9.60	4.36	2.99	0.0094	0.03	0.09	0.11	0.09	0.04	0.03
2-19	1.8662	5.29	5.76	13.19	5.19	5.64	2.22	0.0091	0.05	0.05	0.12	0.05	0.05	0.02
2-20	1.9710	5.06	6.28	12.98	5.45	11.32	4.64	0.0076	0.04	0.05	0.10	0.04	0.09	0.04
2-21	2.0846	3.43	7.48	12.95	4.50	11.26	1.64	0.0063	0.02	0.05	0.08	0.03	0.07	0.01
2-22	2.1097	3.55	9.71	11.83	9.99	10.08	4.12	0.0060	0.02	0.06	0.07	0.06	0.06	0.02
2-23	2.1467	3.42	10.03	11.87	9.79	10.97	3.48	0.0057	0.02	0.06	0.07	0.06	0.06	0.02
2-24	2.2182	4.06	8.30	12.39	8.43	4.23	2.49	0.0050	0.02	0.04	0.06	0.04	0.02	0.01
2-25	2.2490	3.84	4.59	13.18	1.95	2.79	12.75	0.0048	0.02	0.02	0.06	0.01	0.01	0.06
2-26	2.3494	5.26	5.78	13.22	5.18	5.67	2.30	0.0040	0.02	0.02	0.05	0.02	0.02	0.01
2-27	2.4918	3.23	6.50	12.34	9.53	2.00	10.83	0.0032	0.01	0.02	0.04	0.03	0.01	0.03
2-28	2.5107	3.48	7.89	12.97	5.21	11.01	4.66	0.0031	0.01	0.02	0.04	0.02	0.03	0.01
2-29	2.5571	3.79	4.97	13.27	2.00	4.78	2.94	0.0028	0.01	0.01	0.04	0.01	0.01	0.01
2-30	2.5703	3.39	6.33	12.53	8.75	1.81	10.60	0.0028	0.01	0.02	0.03	0.02	0.01	0.03
2-31	2.8031	5.21	5.80	13.23	5.19	5.73	2.23	0.0019	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.004
2-32	2.8709	2.53	4.66	13.19	6.30	12.19	3.37	0.0017	0.004	0.01	0.02	0.01	0.02	0.01
								Weighted values <sup>c</sup>	3.87	8.11	12.44	7.13	5.90	6.20
								Corrected weighted values <sup>d</sup>	3.52	7.54	12.15	6.63	5.37	5.64
								Experimental values <sup>e</sup>	2.99	8.2	11.45	7.65	6.4	7.25
								RMSD						0.99

<sup>a</sup> In kcal/mol.<sup>b</sup> In molar fraction from AG<sup>o</sup> values at 298 K and 1 atm.<sup>c</sup> In Hz, calculated from the B3LYP/DGDZVP structures with equation  $\sum^i J_i \times P^i$ , where  $J_i$  is the spin-spin coupling constant value for each conformer and  $P^i$  is the population for the  $i$ th conformation.<sup>d</sup> The scaling factors were as follows:  $f_{H(sp3)-H(sp3)} = 0.910$ ;  $f_{H(sp3)-H(sp2)} = 0.929$  and  $f_{H(sp2)-H(sp2)} = 0.977$ .<sup>e</sup> Experimental coupling constants obtained by spectra simulation.

**Table S6.** DFT B3LYP/DGDZVP relative free energies,<sup>a</sup> population,<sup>b</sup> and comparison between DFT<sup>c</sup> and experimental <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H couplings for the most relevant conformers of **2** considering PCM solvation in CHCl<sub>3</sub>.

Conformers	$\Delta G^a$	$J_{5,6}$	$J_{6,1'}$	$J_{1,2'}$	$J_{2,3'}$	$J_{3',4'proR}$	$J_{3',4'proS}$	$P^b$	$PJ_{5,6}$	$PJ_{6,1'}$	$PJ_{1,2'}$	$PJ_{2,3'}$	$PJ_{3',4'proR}$	$PJ_{3',4'proS}$
2-1	0	3.63	9.45	11.77	9.40	2.35	11.40	0.1547	0.56	1.46	1.82	1.45	0.36	1.76
2-2	0.1042	3.51	7.79	12.87	4.53	1.55	10.53	0.1297	0.46	1.01	1.67	0.59	0.20	1.37
2-3	0.2171	3.52	7.47	13.06	4.13	5.29	2.03	0.1072	0.38	0.80	1.40	0.44	0.57	0.22
2-4	0.2309	3.54	9.89	11.83	9.81	10.55	3.55	0.1047	0.37	1.04	1.24	1.03	1.11	0.37
2-5	0.3847	3.63	9.46	11.77	9.40	2.35	11.40	0.0808	0.29	0.76	0.95	0.76	0.19	0.92
2-6	0.4298	3.54	9.80	11.97	9.01	1.90	10.87	0.0749	0.27	0.73	0.90	0.67	0.14	0.81
2-7	0.5240	3.47	8.21	12.86	5.21	10.62	4.44	0.0639	0.22	0.52	0.82	0.33	0.68	0.28
2-8	0.7091	3.46	9.89	12.15	8.82	4.19	2.51	0.0467	0.16	0.46	0.57	0.41	0.20	0.12
2-9	0.7511	3.50	9.78	11.97	9.23	4.21	3.12	0.0435	0.15	0.43	0.52	0.40	0.18	0.14
2-10	0.8929	3.53	9.95	11.82	9.77	10.45	3.60	0.0343	0.12	0.34	0.41	0.33	0.36	0.12
2-11	0.9275	3.46	9.89	12.15	8.82	4.19	2.51	0.0323	0.11	0.32	0.39	0.28	0.14	0.08
2-12	1.3347	3.39	10.41	12.41	1.63	2.71	12.72	0.0163	0.06	0.17	0.20	0.03	0.04	0.21
2-13	1.3692	5.38	6.33	12.88	5.44	1.50	10.55	0.0153	0.08	0.10	0.20	0.08	0.02	0.16
2-14	1.5474	3.43	10.37	12.38	1.67	2.72	12.76	0.0114	0.04	0.12	0.14	0.02	0.03	0.14
2-15	1.5487	3.53	7.61	12.89	4.46	11.10	1.45	0.0113	0.04	0.09	0.15	0.05	0.13	0.02
2-16	1.6315	5.28	6.66	12.88	5.65	10.98	4.18	0.0098	0.05	0.07	0.13	0.06	0.11	0.04
2-17	1.7420	3.50	10.04	11.84	9.93	11.01	3.45	0.0082	0.03	0.08	0.10	0.08	0.09	0.03
2-18	1.7646	3.33	7.50	12.67	2.35	5.14	2.74	0.0079	0.03	0.06	0.10	0.02	0.04	0.02
2-19	1.8010	3.95	5.49	13.29	1.95	4.67	3.03	0.0074	0.03	0.04	0.10	0.01	0.03	0.02
2-20	1.8869	3.39	10.47	12.54	1.78	4.71	2.96	0.0064	0.02	0.07	0.08	0.01	0.03	0.02
2-21	1.9509	3.61	9.50	12.04	9.55	4.33	3.04	0.0057	0.02	0.05	0.07	0.05	0.02	0.02
2-22	2.0407	3.45	10.01	11.77	10.10	10.17	4.06	0.0049	0.02	0.05	0.06	0.05	0.05	0.02
2-23	2.1586	2.72	2.57	13.37	6.82	1.71	11.82	0.0040	0.01	0.01	0.05	0.03	0.01	0.05
2-24	2.1731	3.54	7.74	13.11	3.98	4.53	2.71	0.0039	0.01	0.03	0.05	0.02	0.02	0.01
2-25	2.3801	5.34	6.37	12.86	5.46	1.56	10.52	0.0028	0.01	0.02	0.04	0.02	0.00	0.03
2-26	2.3958	5.34	6.38	12.87	5.54	1.74	11.21	0.0027	0.01	0.02	0.03	0.02	0.00	0.03
2-27	2.4310	3.40	10.18	11.85	9.81	11.07	3.11	0.0026	0.01	0.03	0.03	0.03	0.03	0.01
2-28	2.5904	5.26	6.54	12.96	5.56	11.39	4.62	0.0020	0.01	0.01	0.03	0.01	0.02	0.01
2-29	2.6487	3.57	9.55	11.78	9.35	2.41	11.45	0.0018	0.01	0.02	0.02	0.02	0.004	0.02
2-30	2.7818	3.34	6.53	12.41	9.68	2.05	10.89	0.0014	0.005	0.01	0.02	0.01	0.003	0.02
2-31	2.7887	3.38	6.45	12.57	8.99	1.75	10.59	0.0140	0.05	0.09	0.18	0.13	0.02	0.15
								Weighted values <sup>c</sup>	3.64	9.00	12.45	7.44	4.84	7.21
								Corrected weighted values <sup>d</sup>	3.31	8.36	12.16	6.92	4.40	6.56
								Experimental values <sup>e</sup>	2.99	8.2	11.45	7.65	6.4	7.25
								RMSD						0.97

<sup>a</sup> In kcal/mol.

<sup>b</sup> In molar fraction from  $\Delta G^\circ$  values at 298 K and 1 atm.

<sup>c</sup> In Hz, calculated from the B3LYP/DGDZVP structures with equation  $\sum^i J_i \times P^i$ , where  $J_i$  is the spin-spin coupling constant value for each conformer and  $P^i$  is the population for the  $i$ th conformation.

<sup>d</sup> The scaling factors were as follows:  $f_{H(sp^3)-H(sp^3)} = 0.910$ ;  $f_{H(sp^3)-H(sp^2)} = 0.929$  and  $f_{H(sp^2)-H(sp^2)} = 0.977$ .

<sup>e</sup> Experimental coupling constants obtained by spectra simulation.

**Table S7.** DFT B3LYP/DGDZVP relative free energies,<sup>a</sup> population,<sup>b</sup> and comparison between DFT<sup>c</sup> and experimental <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H couplings for the most relevant conformers of **3**.

Conformers	$\Delta G^a$	$J_{5,6}$	$J_{6,1'}$	$J_{1',2'}$	$J_{2',3'}$	$J_{3',4'proR}$	$J_{3',4'proS}$	$P^b$	$PJ_{5,6}$	$PJ_{6,1'}$	$PJ_{1',2'}$	$PJ_{2',3'}$	$PJ_{3',4'proR}$	$PJ_{3',4'proS}$
3-1	0	4.85	4.7	12.82	10.09	11.35	1.93	0.4807	2.33	2.26	6.16	4.85	5.46	0.93
3-2	0.2391	4.81	4.64	12.96	10	4.08	11.68	0.3211	1.54	1.49	4.16	3.21	1.31	3.75
3-3	1.3391	4.86	4.64	12.83	10.03	11.65	1.72	0.0501	0.24	0.23	0.64	0.5	0.58	0.09
3-4	1.4213	4.88	4.67	13.05	10.4	3.04	4.61	0.0436	0.21	0.2	0.57	0.45	0.13	0.2
3-5	1.6202	4.74	4.54	13.07	9.98	3.48	12.08	0.0312	0.15	0.14	0.41	0.31	0.11	0.38
3-6	1.8417	3.22	8.02	11.82	10.32	3.53	11.58	0.0215	0.07	0.17	0.25	0.22	0.08	0.25
3-7	2.0281	2.97	9.95	11.9	10.71	3.61	10.88	0.0158	0.05	0.16	0.19	0.17	0.06	0.17
3-8	2.4059	4.9	4.66	13.06	10.46	3.12	4.61	0.0083	0.04	0.04	0.11	0.09	0.03	0.04
3-9	2.5157	1.76	7.27	12.79	8.56	3.27	4.3	0.0069	0.01	0.05	0.09	0.06	0.02	0.03
3-10	2.5546	2.97	10.14	11.83	10.85	3.87	11.41	0.0064	0.02	0.07	0.08	0.07	0.02	0.07
3-11	2.7108	4.67	4.49	13.09	10	3.57	12.05	0.0049	0.02	0.02	0.06	0.05	0.02	0.06
3-12	2.8621	3.18	8.06	11.85	10.31	3.71	11.42	0.0038	0.01	0.03	0.05	0.04	0.01	0.04
3-13	3.0309	3.2	8.5	11.88	10.24	3.61	12.02	0.0029	0.01	0.02	0.03	0.03	0.01	0.03
3-14	3.0635	2.99	9.83	12.1	9.52	2.84	4.42	0.0027	0.01	0.03	0.03	0.03	0.01	0.01
								Weighted values <sup>c</sup>	4.72	4.91	12.84	10.08	7.85	6.05
								Corrected weighted values <sup>d</sup>	4.29	4.56	12.54	9.36	7.14	5.50
								Experimental values <sup>e</sup>	2.98	6.62	11.65	8.5	7.54	5.68
								RMSD						1.13

<sup>a</sup> In kcal/mol.<sup>b</sup> In molar fraction from  $\Delta G^\circ$  values at 298 K and 1 atm.<sup>c</sup> In Hz, calculated from the B3LYP/DGDZVP structures with equation  $\sum^i J_i \times P^i$ , where  $J_i$  is the spin-spin coupling constant value for each conformer and  $P^i$  is the population for the  $i$ th conformation.<sup>d</sup> The scaling factors were as follows:  $f_{H(sp3)-H(sp3)} = 0.910$ ;  $f_{H(sp3)-H(sp2)} = 0.929$  and  $f_{H(sp2)-H(sp2)} = 0.977$ .<sup>e</sup> Experimental coupling constants obtained by spectra simulation.

**Table S8.** DFT B3LYP/DGDZVP relative free energies,<sup>a</sup> population,<sup>b</sup> and comparison between DFT<sup>c</sup> and experimental <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H couplings for the most relevant conformers of **3** considering PCM solvation in CHCl<sub>3</sub>.

Conformers	$\Delta G^a$	$J_{5,6}$	$J_{6,1'}$	$J_{1',2'}$	$J_{2',3'}$	$J_{3',4'proR}$	$J_{3',4'proS}$	$P^b$	$PJ_{5,6}$	$PJ_{6,1'}$	$PJ_{1',2'}$	$PJ_{2',3'}$	$PJ_{3',4'proR}$	$PJ_{3',4'proS}$
3-1	0	4.71	4.83	12.87	10.18	11.38	1.94	0.4114	1.94	1.99	5.29	4.19	4.68	0.80
3-2	0.4198	4.61	4.71	13.05	10.17	4.03	11.65	0.2025	0.93	0.95	2.64	2.06	0.82	2.36
3-3	0.4606	3.33	10.09	11.85	10.65	3.65	10.95	0.1891	0.63	1.91	2.24	2.01	0.69	2.07
3-4	1.2305	3.46	8.71	11.71	10.39	3.71	11.51	0.0515	0.18	0.45	0.60	0.54	0.19	0.59
3-5	1.3353	4.75	4.80	13.09	10.51	3.04	4.59	0.0432	0.21	0.21	0.57	0.45	0.13	0.20
3-6	1.5161	3.38	9.93	12.05	9.80	2.85	4.38	0.0318	0.11	0.32	0.38	0.31	0.09	0.14
3-7	2.0018	3.45	9.14	11.78	10.35	3.75	11.99	0.0140	0.05	0.13	0.17	0.15	0.05	0.17
3-8	2.1241	4.48	4.60	13.13	10.13	3.48	12.06	0.0114	0.05	0.05	0.15	0.12	0.04	0.14
3-9	2.2772	3.45	8.94	11.76	10.40	3.93	11.33	0.0087	0.03	0.08	0.10	0.09	0.03	0.10
3-10	2.3745	3.42	9.54	11.78	10.28	3.74	11.93	0.0075	0.03	0.07	0.09	0.08	0.03	0.09
3-11	2.4454	1.73	7.25	12.92	8.79	3.20	4.35	0.0066	0.01	0.05	0.09	0.06	0.02	0.03
3-12	2.4592	3.50	8.66	11.63	10.39	11.93	2.18	0.0065	0.02	0.06	0.08	0.07	0.08	0.01
3-13	2.6142	4.75	4.80	13.10	10.58	3.10	4.60	0.0050	0.02	0.02	0.07	0.05	0.02	0.02
3-14	2.7567	3.25	10.43	11.85	10.72	3.41	11.42	0.0039	0.01	0.04	0.05	0.04	0.01	0.04
3-15	2.8414	4.62	4.86	12.91	10.05	11.92	2.19	0.0034	0.02	0.02	0.04	0.03	0.04	0.01
3-16	2.8483	3.36	9.89	12.46	7.09	4.40	11.22	0.0034	0.01	0.03	0.04	0.02	0.01	0.04
								Weighted values <sup>c</sup>	4.24	6.37	12.59	10.27	6.94	6.81
								Corrected weighted values <sup>d</sup>	3.86	5.92	12.30	9.54	6.31	6.20
								Experimental values <sup>e</sup>	2.98	6.62	11.65	8.5	7.54	5.68
								RMSD						0.87

<sup>a</sup> In kcal/mol.

<sup>b</sup> In molar fraction from  $AG^\circ$  values at 298 K and 1 atm.

<sup>c</sup> In Hz, calculated from the B3LYP/DGDZVP structures with equation  $\sum^i J_i \times P_i$ , where  $J_i$  is the spin-spin coupling constant value for each conformer and  $P_i$  is the population for the  $i$ th conformation.

<sup>d</sup> The scaling factors were as follows:  $f_{H(sp3)-H(sp3)} = 0.910$ ;  $f_{H(sp3)-H(sp2)} = 0.929$  and  $f_{H(sp2)-H(sp2)} = 0.977$ .

<sup>e</sup> Experimental coupling constants obtained by spectra simulation.

**Table S9.** DFT B3LYP/DGDZVP relative free energies,<sup>a</sup> population,<sup>b</sup> and comparison between DFT<sup>c</sup> and experimental <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H couplings for the most relevant conformers of **4**.

Conformers	$\Delta G^a$	$J_{5,6}$	$J_{6,1'}$	$J_{1',2'}$	$J_{2',3'}$	$J_{3',4'proR}$	$J_{3',4'proS}$	$P^b$	$PJ_{5,6}$	$PJ_{6,1'}$	$PJ_{1',2'}$	$PJ_{2',3'}$	$PJ_{3',4'proR}$	$PJ_{3',4'proS}$
4-1	0	4.01	8.41	13.88	2.70	11.21	1.83	0.2525	1.01	2.12	3.51	0.68	2.83	0.46
4-2	0.1023	2.85	10.53	11.79	9.66	3.44	10.53	0.2124	0.60	2.24	2.50	2.05	0.73	2.24
4-3	0.2083	2.84	10.59	11.64	9.66	11.28	2.36	0.1776	0.50	1.88	2.07	1.72	2.00	0.42
4-4	0.6959	3.08	6.77	12.65	2.59	2.67	5.27	0.0780	0.24	0.53	0.99	0.20	0.21	0.41
4-5	0.8936	4.04	8.40	13.86	2.75	11.86	2.17	0.0559	0.23	0.47	0.77	0.15	0.66	0.12
4-6	0.9507	2.81	10.57	11.91	9.85	2.92	4.29	0.0507	0.14	0.54	0.60	0.50	0.15	0.22
4-7	1.0686	2.85	10.54	11.81	9.72	3.57	10.36	0.0416	0.12	0.44	0.49	0.40	0.15	0.43
4-8	1.1471	4.04	8.00	13.94	2.17	2.86	5.13	0.0364	0.15	0.29	0.51	0.08	0.10	0.19
4-9	1.1477	4.56	5.66	12.73	4.62	3.21	12.04	0.0364	0.17	0.21	0.46	0.17	0.12	0.44
4-10	1.6685	4.15	5.97	12.70	6.91	3.35	11.58	0.0151	0.06	0.09	0.19	0.10	0.05	0.17
4-11	1.7175	3.10	6.96	12.63	2.47	2.70	5.28	0.0139	0.04	0.10	0.18	0.03	0.04	0.07
4-12	1.8430	3.15	6.43	12.61	2.87	11.86	2.09	0.0113	0.04	0.07	0.14	0.03	0.13	0.02
4-13	2.2415	4.07	8.51	14.14	2.80	4.38	11.66	0.0057	0.02	0.05	0.08	0.02	0.03	0.07
4-14	2.4052	4.09	5.99	12.70	6.98	3.56	12.04	0.0044	0.02	0.03	0.06	0.03	0.02	0.05
4-15	2.4103	4.02	8.43	13.87	2.79	11.96	2.38	0.0043	0.02	0.04	0.06	0.01	0.05	0.01
4-16	2.8746	1.76	7.84	12.08	10.05	3.66	10.97	0.0020	0.00	0.02	0.02	0.02	0.01	0.02
4-17	2.9305	4.08	8.51	14.12	2.82	3.78	11.69	0.0018	0.01	0.02	0.03	0.01	0.01	0.02
								Weighted values <sup>c</sup>	3.37	9.11	12.66	6.21	7.28	5.37
								Corrected weighted values <sup>d</sup>	3.07	8.47	12.37	5.77	6.63	4.88
								Experimental values <sup>e</sup>	3.30	7.65	11.70	7.60	6.70	6.40
								RMSD						1.06

<sup>a</sup> In kcal/mol.<sup>b</sup> In molar fraction from  $\Delta G^\circ$  values at 298 K and 1 atm.<sup>c</sup> In Hz, calculated from the B3LYP/DGDZVP structures with equation  $\sum^i J^i \times P^i$ , where  $J_i$  is the spin-spin coupling constant value for each conformer and  $P^i$  is the population for the  $i$ th conformation.<sup>d</sup> The scaling factors were as follows:  $f_{H(sp3)-H(sp3)} = 0.910$ ;  $f_{H(sp3)-H(sp2)} = 0.929$  and  $f_{H(sp2)-H(sp2)} = 0.977$ .<sup>e</sup> Experimental coupling constants obtained by spectra simulation.

**Table S10.** DFT B3LYP/DGDZVP relative free energies,<sup>a</sup> population,<sup>b</sup> and comparison between DFT<sup>c</sup> and experimental <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H couplings for the most relevant conformers of **4** considering PCM solvation in CHCl<sub>3</sub>.

Conformers	$\Delta G^a$	$J_{5,6}$	$J_{6,1'}$	$J_{1',2'}$	$J_{2',3'}$	$J_{3',4'proR}$	$J_{3',4'proS}$	$P^b$	$PJ_{5,6}$	$PJ_{6,1'}$	$PJ_{1',2'}$	$PJ_{2',3'}$	$PJ_{3',4'proR}$	$PJ_{3',4'proS}$
4-1	0	3.20	10.44	11.78	9.71	3.52	10.61	0.3851	1.23	4.02	4.54	3.74	1.35	4.09
4-2	0.3043	3.13	10.68	11.66	9.68	11.28	2.23	0.2304	0.72	2.46	2.69	2.23	2.60	0.51
4-3	0.6237	3.26	3.95	11.78	9.77	3.78	10.44	0.1344	0.44	0.53	1.58	1.31	0.51	1.40
4-4	0.6670	3.33	10.01	11.97	9.43	3.05	4.24	0.1249	0.42	1.25	1.49	1.18	0.38	0.53
4-5	1.4721	3.27	7.25	12.73	2.43	2.63	5.28	0.0321	0.11	0.23	0.41	0.08	0.08	0.17
4-6	1.5173	4.12	8.48	13.96	2.57	11.28	1.81	0.0297	0.12	0.25	0.42	0.08	0.34	0.05
4-7	1.6767	4.40	5.85	12.89	4.79	3.18	11.93	0.0227	0.10	0.13	0.29	0.11	0.07	0.27
4-8	2.0789	4.25	6.00	12.79	6.92	3.44	11.59	0.0115	0.05	0.07	0.15	0.08	0.04	0.13
4-9	2.2703	4.11	8.46	13.95	2.63	11.84	2.01	0.0083	0.03	0.07	0.12	0.02	0.10	0.02
4-10	2.4303	4.09	8.04	14.01	2.11	2.96	5.02	0.0064	0.03	0.05	0.09	0.01	0.02	0.03
4-11	2.5853	3.36	6.82	12.67	2.87	11.81	2.06	0.0049	0.02	0.03	0.06	0.01	0.06	0.01
4-12	2.7341	1.73	7.92	12.26	9.98	3.58	11.05	0.0038	0.01	0.03	0.05	0.04	0.01	0.04
4-13	2.8420	3.30	7.30	12.72	2.39	2.71	5.22	0.0032	0.01	0.02	0.04	0.01	0.01	0.02
4-14	2.9455	4.12	6.00	12.81	6.89	3.61	12.07	0.0027	0.01	0.02	0.03	0.02	0.01	0.03
							Weighted values <sup>c</sup>		3.29	9.17	11.95	8.92	5.58	7.31
							Corrected weighted values <sup>d</sup>		2.99	8.52	11.68	8.28	5.08	6.65
							Experimental values <sup>e</sup>		3.30	7.65	11.70	7.60	6.70	6.40
							RMSD							0.82

<sup>a</sup> In kcal/mol.

<sup>b</sup> In molar fraction from AG<sup>o</sup> values at 298 K and 1 atm.

<sup>c</sup> In Hz, calculated from the B3LYP/DGDZVP structures with equation  $\sum^i J_i \times P^i$ , where  $J_i$  is the spin-spin coupling constant value for each conformer and  $P^i$  is the population for the  $i$ th conformation.

<sup>d</sup> The scaling factors were as follows:  $f_{H(sp3)-H(sp3)} = 0.910$ ;  $f_{H(sp3)-H(sp2)} = 0.929$  and  $f_{H(sp2)-H(sp2)} = 0.977$ .

<sup>e</sup> Experimental coupling constants obtained by spectra simulation.



**Table S11.** DFT B3LYP/DGDZVP relative free energies,<sup>a</sup> population,<sup>b</sup> and comparison between DFT<sup>c</sup> and experimental <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H couplings for the most relevant conformers of **5**.

Conformers	$\Delta G^a$	$J_{5,6}$	$J_{6,1'}$	$J_{1',2'}$	$J_{2',3'}$	$J_{3',4'proR}$	$J_{3',4'proS}$	$P^b$	$PJ_{5,6}$	$PJ_{6,1'}$	$PJ_{1',2'}$	$PJ_{2',3'}$	$PJ_{3',4'proR}$	$PJ_{3',4'proS}$
5-1	0	3.22	10.57	11.68	10.43	1.88	11.27	0.3323	1.07	3.51	3.88	3.46	0.62	3.74
5-2	0.2648	3.46	10.21	11.77	10.43	1.92	11.35	0.2125	0.73	2.17	2.50	2.22	0.41	2.41
5-3	0.635	3.25	10.47	11.77	10.23	11.46	3.79	0.1138	0.37	1.19	1.34	1.16	1.30	0.43
5-4	0.9795	3.34	10.39	11.71	10.28	2.17	11.87	0.0636	0.21	0.66	0.74	0.65	0.14	0.75
5-5	1.0492	3.22	10.53	11.95	10.96	4.85	2.75	0.0565	0.18	0.60	0.68	0.62	0.27	0.16
5-6	1.2054	3.27	10.50	11.72	10.43	1.78	11.24	0.0434	0.14	0.46	0.51	0.45	0.08	0.49
5-7	1.3134	3.39	10.32	11.79	10.23	11.48	3.75	0.0362	0.12	0.37	0.43	0.37	0.42	0.14
5-8	1.3598	3.39	10.32	11.80	10.23	11.48	3.75	0.0335	0.11	0.35	0.39	0.34	0.38	0.13
5-9	1.5851	3.21	10.47	11.71	10.41	1.90	11.22	0.0229	0.07	0.24	0.27	0.24	0.04	0.26
5-10	1.6554	3.34	10.46	11.84	10.27	11.89	3.87	0.0203	0.07	0.21	0.24	0.21	0.24	0.08
5-11	1.9779	4.65	4.98	12.94	10.08	4.31	3.09	0.0118	0.05	0.06	0.15	0.12	0.05	0.04
5-12	2.1743	3.30	10.50	11.69	10.23	2.12	11.86	0.0085	0.03	0.09	0.10	0.09	0.02	0.10
5-13	2.239	3.13	9.59	11.65	10.88	4.77	2.94	0.0076	0.02	0.07	0.09	0.08	0.04	0.02
5-14	2.2433	3.23	10.64	11.77	10.26	11.89	3.94	0.0075	0.02	0.08	0.09	0.08	0.09	0.03
5-15	2.3237	3.40	10.39	11.70	10.23	2.11	11.86	0.0066	0.02	0.07	0.08	0.07	0.01	0.08
5-16	2.4404	3.23	10.46	11.99	11.00	4.91	2.78	0.0054	0.02	0.06	0.06	0.06	0.03	0.02
5-17	2.4881	3.33	9.56	12.13	10.73	4.81	2.79	0.005	0.02	0.05	0.06	0.05	0.02	0.01
5-18	2.5772	4.64	5.01	12.91	10.05	4.42	3.13	0.0043	0.02	0.02	0.06	0.04	0.02	0.01
5-19	2.7861	3.23	10.55	11.76	10.34	11.21	3.86	0.003	0.01	0.03	0.04	0.03	0.03	0.01
5-20	2.8351	3.23	10.55	11.76	10.34	11.21	3.86	0.0028	0.01	0.03	0.03	0.03	0.03	0.01
5-21	2.8646	3.27	9.99	11.95	10.30	11.98	3.84	0.0026	0.01	0.03	0.03	0.03	0.03	0.01
								Weighted values <sup>c</sup>	3.32	10.34	11.77	10.41	4.28	8.92
								Corrected weighted values <sup>d</sup>	3.02	9.60	11.50	9.67	3.90	8.12
								Experimental values <sup>e</sup>	3.04	7.52	11.46	9.10	5.90	7.38
								RMSD						1.24

<sup>a</sup> In kcal/mol.

<sup>b</sup> In molar fraction from  $\Delta G^\circ$  values at 298 K and 1 atm.

<sup>c</sup> In Hz, calculated from the B3LYP/DGDZVP structures with equation  $\sum^i J^i \times P^i$ , where  $J^i$  is the spin-spin coupling constant value for each conformer and  $P^i$  is the population for the  $i$ th conformation.

<sup>d</sup> The scaling factors were as follows:  $f_{H(sp3)-H(sp3)} = 0.910$ ;  $f_{H(sp3)-H(sp2)} = 0.929$  and  $f_{H(sp2)-H(sp2)} = 0.977$ .

<sup>e</sup> Experimental coupling constants obtained by spectra simulation.

**Table S12.** DFT B3LYP/DGDZVP relative free energies,<sup>a</sup> population,<sup>b</sup> and comparison between DFT<sup>c</sup> and experimental <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H couplings for the most relevant conformers of **5** considering PCM solvation in CHCl<sub>3</sub>.

Conformers	$\Delta G^a$	$J_{5,6}$	$J_{6,1'}$	$J_{1',2'}$	$J_{2',3'}$	$J_{3',4'proR}$	$J_{3',4'proS}$	$P^b$	$PJ_{5,6}$	$PJ_{6,1'}$	$PJ_{1',2'}$	$PJ_{2',3'}$	$PJ_{3',4'proR}$	$PJ_{3',4'proS}$
5-1	0	2.91	10.5	11.7	10.31	1.89	11.32	0.329	0.96	3.45	3.85	3.39	0.62	3.72
5-2	0.1995	2.91	10.45	11.76	10.08	11.53	3.7	0.2349	0.68	2.46	2.76	2.37	2.71	0.87
5-3	0.8465	2.93	10.45	11.7	10.16	2.16	11.87	0.0788	0.23	0.82	0.92	0.8	0.17	0.94
5-4	0.9293	2.95	10.43	11.75	10.32	1.77	11.27	0.0685	0.2	0.71	0.81	0.71	0.12	0.77
5-5	0.9375	2.92	10.52	11.78	10.18	11.87	4.15	0.0676	0.2	0.71	0.8	0.69	0.8	0.28
5-6	1.3128	2.91	10.43	11.72	10.3	1.94	11.27	0.0359	0.1	0.37	0.42	0.37	0.07	0.4
5-7	1.3899	2.88	10.51	11.96	10.85	4.91	2.72	0.0315	0.09	0.33	0.38	0.34	0.15	0.09
5-8	1.4458	3.36	10.2	11.76	10.33	1.9	11.35	0.0287	0.1	0.29	0.34	0.3	0.05	0.33
5-9	1.6347	4.77	5.43	12.78	9.97	4.28	3.09	0.0208	0.1	0.11	0.27	0.21	0.09	0.06
5-10	1.6685	3.06	7.44	11.43	10.74	4.79	2.99	0.0197	0.06	0.15	0.22	0.21	0.09	0.06
5-11	1.7018	3.3	10.21	11.78	10.09	11.55	3.66	0.0186	0.06	0.19	0.22	0.19	0.21	0.07
5-12	1.7037	3.3	10.21	11.78	10.09	11.55	3.67	0.0185	0.06	0.19	0.22	0.19	0.21	0.07
5-13	2.1731	2.93	10.53	11.74	10.19	11.27	3.76	0.0084	0.02	0.09	0.1	0.09	0.09	0.03
5-14	2.1737	2.93	10.48	11.67	10.14	2.15	11.89	0.0084	0.02	0.09	0.1	0.09	0.02	0.1
5-15	2.1957	2.91	10.57	11.73	10.14	11.92	4.02	0.0081	0.02	0.09	0.09	0.08	0.1	0.03
5-16	2.2208	2.89	10.46	11.99	10.9	4.95	2.78	0.0077	0.02	0.08	0.09	0.08	0.04	0.02
5-17	2.5226	3.01	8.68	11.31	10.18	11.3	3.82	0.0047	0.01	0.04	0.05	0.05	0.05	0.02
5-18	2.6205	4.82	5.34	12.58	9.62	2.15	12.19	0.0039	0.02	0.02	0.05	0.04	0.01	0.05
5-19	2.6211	4.82	5.34	12.58	9.62	2.15	12.19	0.0039	0.02	0.02	0.05	0.04	0.01	0.05
5-20	2.9725	2.9	10.51	11.7	10.33	0.88	10.27	0.0022	0.01	0.02	0.03	0.02	0	0.02
							Weighted values <sup>c</sup>		3.00	10.24	11.76	10.24	5.63	7.98
							Corrected weighted values <sup>d</sup>		2.73	9.51	11.48	9.51	5.12	7.26
							Experimental values <sup>e</sup>		3.04	7.52	11.46	9.10	5.90	7.38
							RMSD							0.90

<sup>a</sup> In kcal/mol.

<sup>b</sup> In molar fraction from  $\Delta G^\circ$  values at 298 K and 1 atm.

<sup>c</sup> In Hz, calculated from the B3LYP/DGDZVP structures with equation  $\sum^i J_i \times P_i$ , where  $J_i$  is the spin-spin coupling constant value for each conformer and  $P_i$  is the population for the  $i$ th conformation.

<sup>d</sup> The scaling factors were as follows:  $f_{H(sp^3)-H(sp^3)} = 0.910$ ;  $f_{H(sp^3)-H(sp^2)} = 0.929$  and  $f_{H(sp^2)-H(sp^2)} = 0.977$ .

<sup>e</sup> Experimental coupling constants obtained by spectra simulation.

**Table S13.** DFT B3LYP/DGDZVP relative free energies,<sup>a</sup> population,<sup>b</sup> and comparison between DFT<sup>c</sup> and experimental <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H couplings for the most relevant conformers of **10**.

Conformers	$\Delta G^a$	$J_{5,6}$	$J_{6,1'}$	$J_{1',2'}$	$J_{2',3'}$	$J_{3',4'proR}$	$J_{3',4'proS}$	$P^b$	$PJ_{5,6}$	$PJ_{6,1'}$	$PJ_{1',2'}$	$PJ_{2',3'}$	$PJ_{3',4'proR}$	$PJ_{3',4'proS}$
<b>10-1</b>	0	3.27	9.22	0.92	4.82	12.48	2.59	0.59787	1.95	5.51	0.55	2.88	7.46	1.55
<b>10-2</b>	0.7549	2.30	9.63	0.53	1.40	11.88	1.81	0.16719	0.38	1.61	0.09	0.23	1.99	0.30
<b>10-3</b>	0.9344	3.30	9.20	0.88	5.11	12.36	2.59	0.12349	0.41	1.14	0.11	0.63	1.53	0.32
<b>10-4</b>	1.5882	3.22	9.22	0.61	6.37	0.46	10.77	0.04096	0.13	0.38	0.02	0.26	0.02	0.44
<b>10-5</b>	1.9848	3.16	8.74	9.52	3.71	12.52	1.99	0.02097	0.07	0.18	0.20	0.08	0.26	0.04
<b>10-6</b>	2.0984	2.31	9.62	0.59	1.58	3.51	11.94	0.01731	0.04	0.17	0.01	0.03	0.06	0.21
<b>10-7</b>	2.1756	2.01	9.20	1.35	10.15	3.02	4.44	0.01520	0.03	0.14	0.02	0.15	0.05	0.07
<b>10-8</b>	2.4015	3.17	8.78	9.42	3.90	4.47	12.64	0.01038	0.03	0.09	0.10	0.04	0.05	0.13
<b>10-9</b>	2.6663	2.31	9.64	0.59	1.61	12.20	4.53	0.00664	0.02	0.06	0.004	0.01	0.08	0.03
								Weighted values <sup>c</sup>	3.06	9.28	1.10	4.32	11.49	3.09
								Corrected weighted values <sup>d</sup>	2.79	8.62	1.08	4.01	10.46	2.81
								Experimental values <sup>e</sup>	2.30	9.50	0.95	5.60	7.20	5.05
								RMSD						1.79

<sup>a</sup> In kcal/mol.

<sup>b</sup> In molar fraction from  $\Delta G^\circ$  values at 298 K and 1 atm.

<sup>c</sup> In Hz, calculated from the B3LYP/DGDZVP structures with equation  $\sum^i J^i \times P^i$ , where  $J^i$  is the spin-spin coupling constant value for each conformer and  $P^i$  is the population for the  $i$ th conformation.

<sup>d</sup> The scaling factors were as follows:  $f_{H(sp3)-H(sp3)} = 0.910$ ;  $f_{H(sp3)-H(sp2)} = 0.929$  and  $f_{H(sp2)-H(sp2)} = 0.977$ .

<sup>e</sup> Experimental coupling constants obtained by spectra simulation.

**Table S14.** DFT B3LYP/DGDZVP relative free energies,<sup>a</sup> population,<sup>b</sup> and comparison between DFT<sup>c</sup> and experimental <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H couplings for the most relevant conformers of **10** considering PCM solvation in CH<sub>3</sub>Cl<sub>3</sub>.

Conformers	$\Delta G^a$	$J_{5,6}$	$J_{6,1'}$	$J_{1',2'}$	$J_{2',3'}$	$J_{3',4'proR}$	$J_{3',4'proS}$	$P^b$	$PJ_{5,6}$	$PJ_{6,1'}$	$PJ_{1',2'}$	$PJ_{2',3'}$	$PJ_{3',4'proR}$	$PJ_{3',4'proS}$
<b>10-1</b>	0	3.27	9.41	0.90	5.79	12.39	2.70	0.63664	2.08	5.99	0.58	3.69	7.89	1.72
<b>10-2</b>	0.90236	2.29	9.71	0.60	1.15	11.81	1.75	0.13880	0.32	1.35	0.08	0.16	1.64	0.24
<b>10-3</b>	0.93499	3.30	9.40	0.88	6.10	12.25	2.67	0.13136	0.43	1.23	0.12	0.80	1.61	0.35
<b>10-4</b>	1.62588	2.24	9.41	1.29	9.96	2.97	4.48	0.04093	0.09	0.39	0.05	0.41	0.12	0.18
<b>10-5</b>	2.25025	3.25	9.40	0.59	7.44	0.28	10.25	0.01427	0.05	0.13	0.01	0.11	0.00	0.15
<b>10-6</b>	2.35253	2.29	9.72	0.64	12.91	3.58	11.93	0.01200	0.03	0.12	0.01	0.15	0.04	0.14
<b>10-7</b>	2.54581	2.28	9.71	0.65	1.31	12.24	4.35	0.00866	0.02	0.08	0.01	0.01	0.11	0.04
<b>10-8</b>	2.56150	2.20	9.40	1.19	9.47	12.36	2.63	0.00844	0.02	0.08	0.01	0.08	0.10	0.02
<b>10-9</b>	2.86270	3.11	8.92	9.52	3.64	12.46	2.08	0.00507	0.02	0.05	0.05	0.02	0.06	0.01
<b>10-10</b>	3.02836	3.18	8.95	9.39	3.82	4.23	12.60	0.00384	0.01	0.03	0.04	0.01	0.02	0.05
								Weighted values <sup>c</sup>	3.06	9.45	0.94	5.44	11.60	2.90
								Corrected weighted values <sup>d</sup>	2.79	8.78	0.92	5.05	10.55	2.64
								Experimental values <sup>e</sup>	2.30	9.50	0.95	5.60	7.20	5.05
								RMSD						1.74

<sup>a</sup> In kcal/mol.

<sup>b</sup> In molar fraction from AG<sup>o</sup> values at 298 K and 1 atm.

<sup>c</sup> In Hz, calculated from the B3LYP/DGDZVP structures with equation  $\sum^i J_i \times P_i$ , where  $J_i$  is the spin-spin coupling constant value for each conformer and  $P_i$  is the population for the  $i$ th conformation.

<sup>d</sup> The scaling factors were as follows:  $f_{H(sp3)-H(sp3)} = 0.910$ ;  $f_{H(sp3)-H(sp2)} = 0.929$  and  $f_{H(sp2)-H(sp2)} = 0.977$ .

<sup>e</sup> Experimental coupling constants obtained by spectra simulation.

**Table S15.** DFT B3LYP/DGDZVP relative free energies,<sup>a</sup> population,<sup>b</sup> and comparison between DFT<sup>c</sup> and experimental <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H couplings for the most relevant conformers of **14**.

Conformers	$\Delta G^a$	$J_{5,6}$	$J_{6,1'}$	$J_{1',2'}$	$J_{2',3'}$	$J_{3',4'proR}$	$J_{3',4'proS}$	$P^b$	$PJ_{5,6}$	$PJ_{6,1'}$	$PJ_{1',2'}$	$PJ_{2',3'}$	$PJ_{3',4'proR}$	$PJ_{3',4'proS}$
14-1	0	3.06	9.20	2.55	8.72	1.80	11.56	0.55048	1.68	5.06	1.40	4.80	0.99	6.36
14-2	0.5673	3.23	9.32	0.49	0.58	2.30	12.47	0.21129	0.68	1.97	0.10	0.12	0.49	2.63
14-3	1.3058	3.26	9.75	0.27	0.42	2.12	12.50	0.06074	0.20	0.59	0.02	0.03	0.13	0.76
14-4	1.4144	3.26	9.75	0.32	0.43	12.95	3.88	0.05057	0.16	0.49	0.02	0.02	0.65	0.20
14-5	1.6171	3.03	8.72	9.38	0.33	1.75	11.94	0.03592	0.11	0.31	0.34	0.01	0.06	0.43
14-6	1.6246	3.03	8.72	9.38	0.33	1.75	11.94	0.03546	0.11	0.31	0.33	0.01	0.06	0.42
14-7	1.9365	3.27	9.75	0.31	0.43	12.91	3.42	0.02095	0.07	0.20	0.01	0.01	0.27	0.07
14-8	2.1630	3.56	0.38	0.42	2.46	1.86	12.00	0.01429	0.05	0.01	0.01	0.04	0.03	0.17
14-9	2.6581	1.94	9.33	0.80	0.38	2.08	12.75	0.00620	0.01	0.06	0.00	0.002	0.01	0.08
14-10	2.6958	3.01	8.72	9.36	0.34	1.81	11.98	0.00581	0.02	0.05	0.05	0.002	0.01	0.07
14-11	2.8909	3.53	0.40	0.41	2.47	1.89	12.00	0.00418	0.01	0.002	0.002	0.01	0.01	0.05
14-12	2.9010	3.24	9.75	4.49	0.14	1.72	11.56	0.00411	0.01	0.04	0.02	0.001	0.01	0.05
								Weighted values <sup>c</sup>	3.12	9.10	2.30	5.05	2.72	11.30
								Corrected weighted values <sup>d</sup>	2.84	8.45	2.25	4.69	2.48	10.28
								Experimental values <sup>e</sup>	2.50	10.0	1.30	6.50	5.50	7.86
								RMSD						1.90

<sup>a</sup> In kcal/mol.

<sup>b</sup> In molar fraction from  $\Delta G^\circ$  values at 298 K and 1 atm.

<sup>c</sup> In Hz, calculated from the B3LYP/DGDZVP structures with equation  $\sum^i J^i \times P^i$ , where  $J^i$  is the spin-spin coupling constant value for each conformer and  $P^i$  is the population for the  $i$ th conformation.

<sup>d</sup> The scaling factors were as follows:  $f_{H(sp3)-H(sp3)} = 0.910$ ;  $f_{H(sp3)-H(sp2)} = 0.929$  and  $f_{H(sp2)-H(sp2)} = 0.977$ .

<sup>e</sup> Experimental coupling constants obtained by spectra simulation.

**Table S16.** DFT B3LYP/DGDZVP relative free energies,<sup>a</sup> population,<sup>b</sup> and comparison between DFT<sup>c</sup> and experimental <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H couplings for the most relevant conformers of **14** considering PCM solvation in CH<sub>3</sub>Cl<sub>3</sub>.

Conformers	$\Delta G^a$	$J_{5,6}$	$J_{6,1'}$	$J_{1',2'}$	$J_{2',3'}$	$J_{3',4'proR}$	$J_{3',4'proS}$	$P^b$	$PJ_{5,6}$	$PJ_{6,1'}$	$PJ_{1',2'}$	$PJ_{2',3'}$	$PJ_{3',4'proR}$	$PJ_{3',4'proS}$
<b>14-1</b>	0	3.11	9.25	2.40	8.90	1.88	11.63	0.7994	2.48	7.39	1.92	7.11	1.51	9.30
<b>14-2</b>	1.4201	3.24	9.52	0.53	0.59	2.43	12.57	0.0727	0.24	0.69	0.04	0.04	0.18	0.91
<b>14-3</b>	1.4910	3.27	9.85	0.25	0.51	2.04	12.37	0.0645	0.21	0.64	0.02	0.03	0.13	0.80
<b>14-4</b>	1.8681	3.28	9.85	0.29	0.46	12.98	3.37	0.0341	0.11	0.34	0.01	0.02	0.44	0.12
<b>14-5</b>	2.1178	3.28	9.84	0.29	0.51	12.90	3.15	0.0224	0.07	0.22	0.01	0.01	0.29	0.07
<b>14-6</b>	2.8288	3.08	8.82	9.41	0.35	2.08	12.14	0.0067	0.02	0.06	0.06	0.002	0.01	0.08
								Weighted values <sup>c</sup>	3.14	9.34	2.05	7.22	2.56	11.28
								Corrected weighted values <sup>d</sup>	2.85	8.68	2.01	6.71	2.33	10.27
								Experimental values <sup>e</sup>	2.50	10.0	1.30	6.50	5.50	7.86
								RMSD						1.74

<sup>a</sup> In kcal/mol.

<sup>b</sup> In molar fraction from  $\Delta G^\circ$  values at 298 K and 1 atm.

<sup>c</sup> In Hz, calculated from the B3LYP/DGDZVP structures with equation  $\sum^i J_i \times P^i$ , where  $J_i$  is the spin-spin coupling constant value for each conformer and  $P^i$  is the population for the  $i$ th conformation.

<sup>d</sup> The scaling factors were as follows:  $f_{H(sp3)-H(sp3)} = 0.910$ ;  $f_{H(sp3)-H(sp2)} = 0.929$  and  $f_{H(sp2)-H(sp2)} = 0.977$ .

<sup>e</sup> Experimental coupling constants obtained by spectra simulation.

**Table S17.** Comparison between DFT and experimental  $^{13}\text{C}$  NMR chemical shifts for the most relevant conformers of **3**.

Conformer	$\Delta G^a$	$P^b$	C2	C3	C4	C5	C6	C1'	C2'	C3'	C4'	C5'	C6'	C7'	COCH <sub>3</sub>	COCH <sub>3</sub>
3-1	0.0000	0.4807	168.6947	127.8572	155.2909	68.9182	89.5518	135.4852	141.4963	82.4205	42.9467	35.224	29.9766	19.3346	183.1498	26.3016
3-2	0.2391	0.3211	168.7447	127.9326	155.3102	68.9037	89.4231	137.9551	141.2562	81.531	42.8605	33.6962	30.4887	19.3011	182.3721	26.5523
3-3	1.3391	0.0501	168.8293	127.7703	155.3953	68.9008	89.6226	135.5517	141.6461	78.1342	36.43	30.728	23.4308	16.9067	183.397	26.3362
3-4	1.4213	0.0436	168.6377	127.8386	155.2867	68.9676	89.5849	135.9948	139.5566	80.4487	42.3854	30.762	30.2495	19.486	182.6235	26.3933
3-5	1.6202	0.0312	169.0077	127.8229	155.4821	68.802	89.4269	138.7352	140.8917	80.6169	42.0886	32.498	27.5504	19.6726	182.5055	26.6057
3-6	1.8417	0.0215	169.3864	131.5188	152.9633	72.9604	86.0661	144.3199	139.1772	77.2179	42.0447	34.7655	30.253	19.3031	179.5718	25.773
3-7	2.0281	0.0157	169.0969	131.4157	153.4333	71.8954	84.3526	138.2202	142.1302	77.3537	41.6221	35.0263	29.9569	19.3098	179.4848	25.8972
3-8	2.4059	0.0083	168.6411	127.8554	155.3005	68.9156	89.5606	136.1717	139.4006	80.3175	38.9747	28.3112	27.6288	16.8266	182.7025	26.4054
3-9	2.5157	0.0069	170.2675	130.708	155.3703	71.3643	87.4902	133.039	149.4275	86.3548	42.4541	31.2325	29.9869	19.5655	184.0261	26.1379
3-10	2.5546	0.0064	169.0755	131.4391	153.363	72.0944	84.548	139.187	142.0418	73.4847	40.7235	33.0898	27.9766	19.2385	178.8423	25.9314
3-11	2.7108	0.0050	168.965	127.8642	155.4567	68.8202	89.4516	138.8561	140.8084	80.0163	36.656	30.3286	23.5662	16.2031	182.5443	26.6399
3-12	2.8621	0.0038	169.3963	131.5003	153.0697	73.0382	86.0934	144.3035	139.3861	77.5424	39.179	32.4444	28.2634	16.9623	179.6523	25.7965
3-13	3.0309	0.0029	169.3672	131.5485	152.9676	73.1719	85.9797	144.6701	139.2881	74.8844	41.0444	32.0433	28.6065	19.0249	179.7968	25.7958
3-14	3.0635	0.0027	169.0753	131.3296	153.3779	72.252	84.0961	135.2629	142.4505	77.511	43.8027	30.5229	30.2226	19.3575	178.853	25.7022
Weighted values <sup>c</sup>			168.7658	128.0864	155.1976	69.11862	89.26994	136.7269	141.3088	81.47281	42.40147	34.05981	29.68078	19.17295	182.6719	26.37363
Experimental values <sup>d</sup>			162.857	123.0075	144.3283	63.2989	78.0568	125.6675	134.3283	71.1361	34.379	27.3426	22.6007	14.085	171.2096	21.3494
RMSD																8.27

<sup>a</sup> In kcal/mol.

<sup>b</sup> In molar fraction from  $\Delta G^\circ$  values at 298 K and 1 atm.

<sup>c</sup> Shielding constants were obtained from the DFT optimized structures using GIAO-DFT B3LYP/DGDZVP calculated from the B3LYP/DGDZVP. Values were Boltzmann averaged with the equation  $\sum \delta^i \times P^i$ , where  $\delta^i$  is the  $^{13}\text{C}$  NMR chemical shift value (in ppm) for each conformer and  $P^i$  is the population for the  $i$ th conformation.

<sup>d</sup> In ppm, measured at 400 MHz from  $\text{CDCl}_3$  solutions using TMS as the internal standard.

**Table S18.** Comparison between DFT and experimental  $^{13}\text{C}$  NMR chemical shifts for the most relevant conformers of **3** considering PCM solvation in  $\text{CHCl}_3$ .

Conformer	$\Delta G^a$	$P^b$	C2	C3	C4	C5	C6	C1'	C2'	C3'	C4'	C5'	C6'	C7'	$\underline{\text{C}}\text{OCH}_3$	$\overline{\text{C}}\text{OCH}_3$
3-1	0.0000	0.4114	172.2233	126.7860	157.7934	68.2666	89.9216	134.9332	141.7458	82.6571	42.6402	35.1927	29.6499	18.9988	185.5288	26.1403
3-2	0.4198	0.2025	172.2359	126.9423	157.8306	68.2391	89.8462	137.7417	141.2293	81.8098	42.4653	33.7925	30.0914	18.9884	184.7092	26.4384
3-3	0.4606	0.1891	172.6601	129.8417	156.1570	71.3395	85.0535	137.5598	143.1330	78.2155	41.2464	34.5236	29.7567	18.9652	182.1253	25.9461
3-4	1.2305	0.0515	172.9462	129.8844	156.0314	72.1018	86.6666	141.4844	141.2388	77.9171	41.4396	34.3664	29.9431	18.9917	181.9381	25.7760
3-5	1.3353	0.0432	172.2144	126.8060	157.7890	68.2950	89.9642	135.4296	139.9231	80.6589	42.3433	30.5241	30.0035	19.1061	185.0057	26.2694
3-6	1.5161	0.0318	172.6533	129.7590	156.1039	71.5607	84.7595	143.0499	134.8076	78.0513	43.1279	30.4301	29.9565	19.0163	181.5537	25.7735
3-7	2.0018	0.0140	172.8865	130.0036	155.9454	72.3124	86.5762	141.8127	141.3508	75.6792	40.4044	31.9846	28.0239	18.8737	182.0888	25.7901
3-8	2.1241	0.0114	172.3355	126.9273	157.8990	68.1747	89.8095	138.6627	140.6584	80.7850	41.6345	32.1886	27.4136	19.1122	184.7376	26.4791
3-9	2.2772	0.0087	172.9261	129.8722	156.0568	72.0654	86.5781	141.2132	141.4729	78.1915	38.6589	32.0586	28.1436	16.6109	181.9602	25.8099
3-10	2.3745	0.0075	172.8579	129.9774	155.9574	71.9536	86.3823	141.5701	141.8264	74.6172	35.0984	29.6627	24.2473	15.5061	182.1438	25.8348
3-11	2.4454	0.0066	173.8324	129.7371	158.2648	70.7211	88.1403	133.0861	148.6686	85.9156	42.6471	30.8719	29.8425	19.1525	186.4165	26.0068
3-12	2.4592	0.0065	172.8367	129.8675	155.9539	72.2046	86.5151	139.5649	141.1245	73.3972	35.4623	29.9270	23.1420	15.7394	182.8932	25.5342
3-13	2.6142	0.0050	172.2248	126.7940	157.8786	68.2750	89.9355	135.6064	139.7892	80.5215	38.9697	39.6335	27.3833	16.4566	185.0777	26.2773
3-14	2.7567	0.0039	172.6365	129.8063	156.2304	71.3308	84.9783	138.1419	143.4723	75.6842	40.2858	32.7482	27.6714	19.0457	181.6806	25.9872
3-15	2.8414	0.0034	172.2954	126.8212	157.8888	68.2428	89.8732	135.3446	141.7950	77.9946	36.0549	30.3472	23.2422	16.4851	185.5850	26.1625
3-16	2.8483	0.0034	173.0213	129.5536	156.7113	70.7782	87.0455	137.7967	143.1129	81.8252	44.7037	34.3225	30.0508	18.9051	181.6648	26.0296
Weighted values <sup>c</sup>			172.3869	127.7995	157.2637	69.3193	88.4822	136.8942	141.5912	80.8492	42.0555	34.1667	29.6152	18.9049	184.2164	26.1259
Experimental values <sup>d</sup>			162.857	123.0075	144.3283	63.2989	78.0568	125.6675	134.3283	71.1361	34.379	27.3426	22.6007	14.085	171.2096	21.3494
RMSD																8.74

<sup>a</sup> In kcal/mol.

<sup>b</sup> In molar fraction from  $\Delta G^\circ$  values at 298 K and 1 atm.

<sup>c</sup> Shielding constants were obtained from the DFT optimized structures using GIAO-DFT B3LYP/DGDZVP calculated from the B3LYP/DGDZVP. Values were Boltzmann averaged with the equation  $\sum^i \delta^i \times P^i$ , where  $\delta^i$  is the  $^{13}\text{C}$  NMR chemical shift value (in ppm) for each conformer and  $P^i$  is the population for the  $i$ th conformation.

<sup>d</sup> In ppm, measured at 400 MHz from  $\text{CDCl}_3$  solutions using TMS as the internal standard.



**Table S19.** Comparison between DFT and experimental  $^{13}\text{C}$  NMR chemical shifts for the most relevant conformers of **5**.

Conformer	$\Delta G^a$	$P^b$	C2	C3	C4	C5	C6	C1'	C2'	C3'	C4'	C5'	C6'	C7'	$\text{COCH}_3$	$\text{COCH}_3$
5-1	0	0.33227	173.3566	129.3803	157.6177	70.8072	85.3397	137.3499	143.0497	79.891	42.3893	35.3625	29.6618	19.0827	183.8361	25.9917
5-2	0.26481	0.21250	173.213	129.8627	157.1169	70.0476	84.8134	137.8878	141.5538	80.2502	42.47	35.4291	29.6198	19.1003	183.8315	26.029
5-3	0.63504	0.11375	173.3889	129.3622	157.6147	70.9401	85.6932	139.9971	143.2619	79.1799	41.9271	33.8564	30.1295	19.0076	183.0198	26.2009
5-4	0.97954	0.06356	173.3549	129.3785	157.567	70.919	85.5251	137.9369	142.7999	75.8979	41.052	32.5324	26.8258	19.0808	184.0203	26.0114
5-5	1.04920	0.05654	173.3905	129.3746	157.6263	70.6783	85.2621	138.0659	140.2718	77.9602	42.0601	30.4391	30.0727	19.1631	183.3589	26.0891
5-6	1.20545	0.04343	173.3348	129.3781	157.6088	70.7702	85.4164	137.4116	142.8143	80.0715	39.6876	32.6825	27.8286	16.7024	183.9408	26.0295
5-7	1.31338	0.03620	173.204	129.956	157.0693	70.227	84.9145	140.3308	142.3308	79.3191	42.0039	33.8365	30.149	19.004	182.9465	26.2159
5-8	1.35981	0.03347	173.1986	129.9581	157.0603	70.2251	84.9183	140.3357	142.3228	79.3213	42.0003	33.8379	30.148	19.0041	182.9439	26.2179
5-9	1.58509	0.02288	173.3834	129.3421	157.7275	70.7858	85.5471	137.5417	142.8102	80.3221	39.4281	33.28	27.9502	16.8178	183.8815	26.0241
5-10	1.65537	0.02032	173.3092	129.3656	157.53	70.9771	85.8263	140.412	142.4443	77.4559	40.8163	32.2482	27.8747	19.1891	183.1494	26.1981
5-11	1.97791	0.01179	172.7737	129.5365	154.9567	66.6433	87.4581	141.1393	137.1847	82.7604	42.0921	30.5513	29.98	19.1217	185.9721	26.1655
5-12	2.17432	0.00846	173.3307	129.3708	157.6067	70.8565	85.4217	137.6932	143.017	74.9542	35.7149	29.9258	23.3782	15.617	183.9643	25.9873
5-13	2.23896	0.00759	173.4115	129.5803	156.9524	69.5591	83.9791	135.8366	144.9453	78.4918	39.7971	28.4425	28.4581	16.5516	182.7754	25.8885
5-14	2.24335	0.00753	173.3067	129.4596	157.4933	70.8363	85.4593	140.0634	143.0511	76.6267	35.2096	29.8255	23.8078	15.541	183.1966	26.1551
5-15	2.32367	0.00658	173.1374	130.0596	157.017	70.163	84.6014	137.9343	142.206	75.0751	35.781	29.9628	23.3935	15.6291	183.897	25.9802
5-16	2.44039	0.00540	173.3959	129.3864	157.6381	70.8077	85.33	138.3524	139.8901	77.6514	38.6466	27.9623	27.4404	16.5077	183.3525	26.1021
5-17	2.48808	0.00498	173.4727	130.5503	155.1562	69.4265	85.2376	137.3702	140.7708	79.1185	39.3616	27.8028	27.4982	16.4501	183.8266	25.9822
5-18	2.57718	0.00429	172.8283	129.5424	154.977	66.6432	87.4197	141.1252	137.3021	82.6183	39.0916	28.0758	27.6762	16.4738	185.94	26.1161
5-19	2.78614	0.00301	173.383	129.3806	157.7099	70.9511	85.6459	138.6812	144.4406	80.6688	40.7881	34.1157	29.4302	19.1584	182.7127	26.2367
5-20	2.83509	0.00277	173.3859	129.3773	157.7145	70.9545	85.6435	138.6918	144.4323	80.6633	40.7895	34.1164	29.4303	19.1582	182.714	26.2385
5-21	2.86458	0.00264	173.4494	130.5305	155.222	70.0708	85.4946	139.5726	142.6255	77.7446	35.3156	29.8976	24.2174	15.6238	183.5155	26.1139
Weighted values <sup>c</sup>			173.3042	129.5329	157.3942	70.5312	85.2830	138.2114	142.3932	79.3690	41.7502	34.0493	29.2360	18.7788	183.6633	26.0568
Experimental values <sup>d</sup>			163.119	122.7925	144.5857	63.3476	77.9432	125.9883	133.989	70.8769	34.3643	27.3082	22.5876	14.0611	171.1353	21.3265
RMSD																8.13

<sup>a</sup> In kcal/mol.<sup>b</sup> In molar fraction from  $\Delta G^\circ$  values at 298 K and 1 atm.<sup>c</sup> Shielding constants were obtained from the DFT optimized structures using GIAO-DFT B3LYP/DGDZVP calculated from the B3LYP/DGDZVP. Values were Boltzmann averaged with the equation  $\sum \delta^i \times P^i$ , where  $\delta^i$  is the  $^{13}\text{C}$  NMR chemical shift value (in ppm) for each conformer and  $P^i$  is the population for the  $i$ th conformation.<sup>d</sup> In ppm, measured at 400 MHz from  $\text{CDCl}_3$  solutions using TMS as the internal standard.

**Table S20.** Comparison between DFT and experimental  $^{13}\text{C}$  NMR chemical shifts for the most relevant conformers of **5** considering PCM solvation in  $\text{CHCl}_3$ .

Conformer	$\Delta G^a$	$P^b$	C2	C3	C4	C5	C6	C1'	C2'	C3'	C4'	C5'	C6'	C7'	COCH <sub>3</sub>	COCH <sub>3</sub>
5-1	0.0000	0.3290	169.6797	130.2394	155.3689	70.6346	84.3291	139.5319	140.4641	79.6344	42.5082	35.4386	29.6958	19.186	181.5151	25.9043
5-2	0.1995	0.2349	169.7404	130.1895	155.4113	70.7108	84.6568	141.8194	141.0397	78.9131	42.1821	33.8261	30.2725	19.0499	180.78	26.0989
5-3	0.8465	0.0788	169.7007	130.1822	155.4193	70.7431	84.4187	140.0106	140.5605	75.5743	41.2289	32.564	26.801	19.2046	181.7073	25.9158
5-4	0.9293	0.0685	169.6654	130.2378	155.3852	70.6623	84.4411	139.7056	140.1957	79.7164	39.8041	32.7389	27.8647	16.7839	181.6207	25.9373
5-5	0.9375	0.0676	169.7545	130.164	155.4795	70.6685	84.6784	141.8377	140.4416	77.2759	40.7281	32.2438	27.7795	19.3282	180.998	26.0738
5-6	1.3128	0.0359	169.6983	130.2067	155.4775	70.6323	84.5034	139.7607	140.2754	79.99	39.5023	33.3423	27.9468	16.9327	181.5412	25.9322
5-7	1.3899	0.0315	169.7021	130.2273	155.3832	70.5284	84.1713	140.1734	137.5964	77.6058	42.0157	30.4342	30.0914	19.2728	181.0069	25.9887
5-8	1.4458	0.0287	168.9394	132.5203	152.3062	70.0554	83.4961	140.369	138.66	80.0213	42.6649	35.4975	29.6737	19.2073	181.4583	25.9857
5-9	1.6347	0.0208	168.7709	130.5808	151.5994	66.806	86.0849	144.6792	133.7084	82.501	42.3683	30.4189	30.0024	19.2023	183.5263	26.0234
5-10	1.6685	0.0197	169.9649	130.6566	153.921	69.2929	83.1612	136.9045	144.5447	78.8549	39.3543	28.5854	28.5649	16.6572	180.1514	25.716
5-11	1.7018	0.0186	168.9888	132.5741	152.3008	70.1852	83.7412	142.5651	139.4881	79.1996	42.3149	33.7989	30.3088	19.0476	180.6813	26.1765
5-12	1.7037	0.0185	168.9904	132.5707	152.3023	70.1834	83.7374	142.5691	139.4923	79.1933	42.3135	33.7984	30.3089	19.0478	180.68	26.1777
5-13	2.1731	0.0084	169.7482	130.2381	155.463	70.6387	84.5609	140.2315	142.5675	80.5322	40.9556	34.4013	29.3754	19.2284	180.4702	26.1311
5-14	2.1737	0.0084	169.6953	130.2261	155.4166	70.6923	84.3893	139.779	140.6615	74.6001	35.8205	29.9442	23.3474	15.6444	181.6438	25.8919
5-15	2.1957	0.0081	169.7089	130.2559	155.3334	70.5396	84.4461	141.5808	141.0022	76.3892	35.2862	29.6737	23.626	15.5477	181.0108	26.0573
5-16	2.2208	0.0077	169.719	130.1676	155.4826	70.6409	84.2359	140.4721	137.2373	77.3097	38.547	27.935	27.3927	16.6387	181.0335	25.9873
5-17	2.5226	0.0047	169.9582	130.6074	154.2452	69.4179	83.3061	137.1803	147.8842	81.0051	40.5281	33.6399	29.5215	18.9345	179.5595	25.8794
5-18	2.6205	0.0039	168.8457	130.5658	151.7616	67.0214	86.0511	144.6238	135.444	79.1842	35.6839	29.6248	23.0648	15.8044	183.7646	25.9533
5-19	2.6211	0.0039	168.8451	130.566	151.7588	67.0208	86.0516	144.6248	135.4432	79.1816	35.6839	29.622	23.0653	15.8016	183.7641	25.9529
5-20	2.9725	0.0022	169.7032	130.2236	155.3595	70.6607	84.3857	138.225	140.5946	81.8147	35.1255	35.8651	25.6111	15.9883	181.3859	26.4484
Weighted values <sup>c</sup>			169.6031	130.3614	155.0244	70.4742	84.4080	140.5248	140.3086	78.8921	41.5886	33.6816	29.1137	18.7515	181.2534	25.9795
Experimental values <sup>d</sup>			163.119	122.7925	144.5857	63.3476	77.9432	125.9883	133.989	70.8769	34.3643	27.3082	22.5876	14.0611	171.1353	21.3265
RMSD																7.49

<sup>a</sup> In kcal/mol.

<sup>b</sup> In molar fraction from  $\Delta G^\circ$  values at 298 K and 1 atm.

<sup>c</sup> Shielding constants were obtained from the DFT optimized structures using GIAO-DFT B3LYP/DGDZVP calculated from the B3LYP/DGDZVP. Values were Boltzmann averaged with the equation  $\sum^i \delta^i \times P^i$ , where  $\delta^i$  is the  $^{13}\text{C}$  NMR chemical shift value (in ppm) for each conformer and  $P^i$  is the population for the  $i$ th conformation.

<sup>d</sup> In ppm, measured at 400 MHz from  $\text{CDCl}_3$  solutions using TMS as the internal standard.

**Table S21.** <sup>1</sup>H NMR data of compounds **2** and **4** obtained by non-linear fit of the spectra to spectral parameters<sup>a</sup>

H	2	4
3	6.2258 (1H d, $J_{3,4}=9.29$ )	6.1280 (1H d, $J_{3,4}=9.80$ )
4	7.0016 (1H dd, $J_{3,4}=9.29$ , $J_{4,5}=5.60$ )	6.9773 (1H dd, $J_{3,4}=9.80$ , $J_{4,5}=4.90$ )
5	5.2723 (1H dd, $J_{4,5}=5.60$ , $J_{5,6}=2.99$ )	4.2442 (1H dd, $J_{4,5}=4.90$ , $J_{5,6}=3.30$ )
6	5.5215 (1H dd, $J_{5,6}=2.99$ , $J_{6,1}=8.20$ )	5.3591 (1H ddd, $J_{5,6}=3.30$ , $J_{6,1}=7.65$ )
1'	5.6511 (1H dd, $J_{6,1}=8.20$ , $J_{1',2'}=11.45$ )	5.7850 (1H dd, $J_{6,1}=7.65$ , $J_{1',2'}=11.70$ )
2'	5.7610 (1H dd, $J_{1',2'}=11.45$ , $J_{2',3'}=7.65$ )	5.8380 (1H ddd, $J_{1',2'}=11.70$ , $J_{2',3'}=7.60$ )
3	4.4089 (1H ddd, $J_{2',3'}=7.65$ , $J_{3',4'proR}=7.25$ , $J_{3',4'proS}=6.40$ )	4.4723 (1H ddd, $J_{2',3'}=7.60$ , $J_{3',4'proR}=6.70$ , $J_{3',4'proS}=6.40$ )

<sup>a</sup>Coupling constants in Hz.**Table S22.** <sup>1</sup>H NMR data of compounds **3** and **5** obtained by non-linear fit of the spectra to spectral parameters<sup>a</sup>

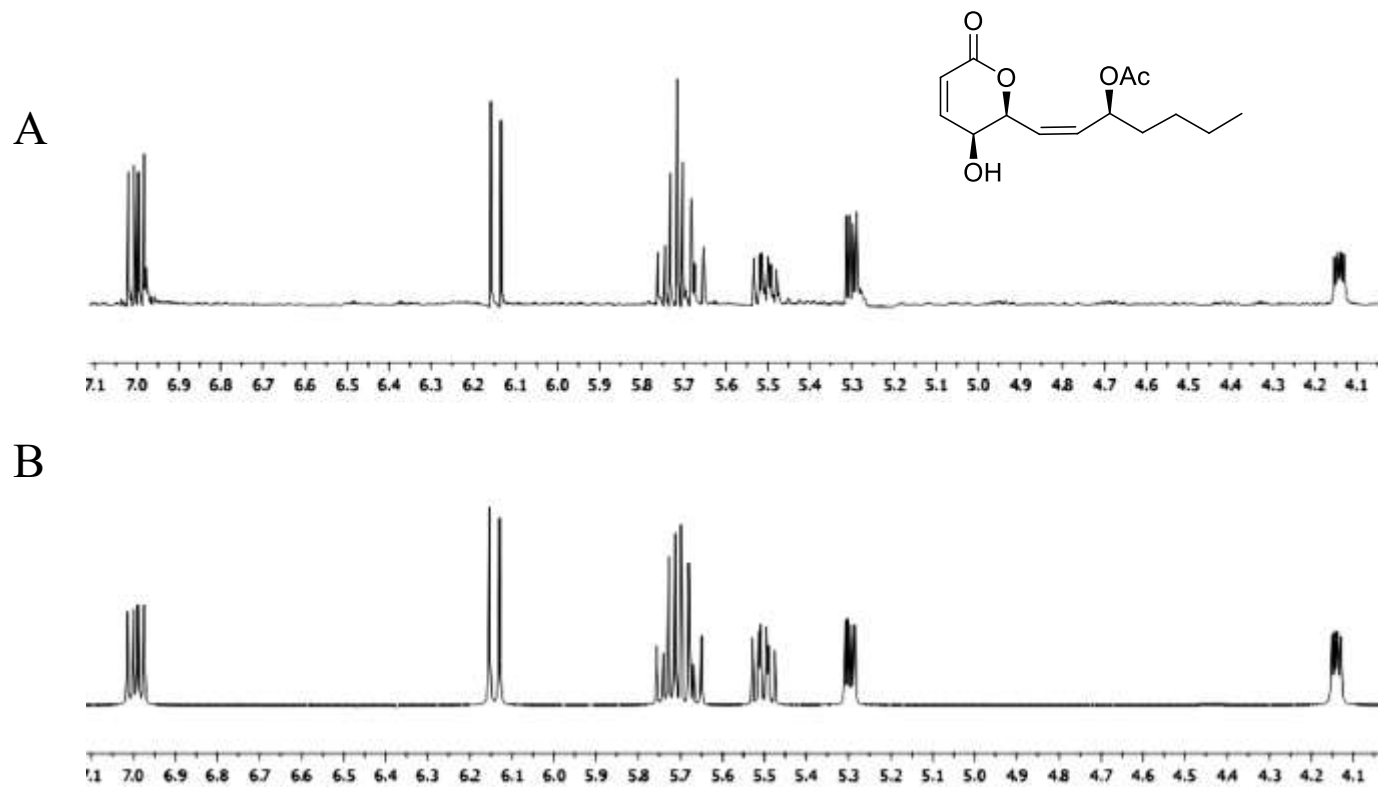
H	3	5
3	6.1799 (1H d, $J_{3,4}=9.75$ )	6.1036 (1H d, $J_{3,4}=9.76$ )
4	7.0363 (1H dd, $J_{3,4}=9.75$ , $J_{4,5}=5.57$ )	6.9846 (1H dd, $J_{3,4}=9.76$ , $J_{4,5}=5.53$ )
5	4.1775 (1H dd, $J_{4,5}=5.57$ , $J_{5,6}=2.98$ )	4.1233 (1H dd, $J_{4,5}=5.53$ , $J_{5,6}=3.04$ )
6	5.3371 (1H dd, $J_{5,6}=2.98$ , $J_{6,1}=6.62$ , $J_{6,2}=-1.10$ )	5.3068 (1H ddd, $J_{5,6}=3.04$ , $J_{6,1}=7.52$ , $J_{6,2}=0.92$ )
1'	5.7705 (1H dd, $J_{6,1}=6.62$ , $J_{1',2'}=11.60$ )	5.7577 (1H dd, $J_{6,1}=7.52$ , $J_{1',2'}=11.46$ )
2'	5.7170 (1H dd, $J_{1',2'}=11.60$ , $J_{2',3'}=8.60$ , $J_{6,2}=-1.1$ )	5.6589 (1H ddd, $J_{1',2'}=11.46$ , $J_{2',3'}=9.10$ , $J_{6,2}=0.92$ )
3'	5.5395 (1H ddd, $J_{2',3'}=8.60$ , $J_{3',4'proR}=7.54$ , $J_{3',4'proS}=5.67$ )	5.4640 (1H ddd, $J_{2',3'}=9.10$ , $J_{3',4'proR}=5.90$ , $J_{3',4'proS}=7.38$ )
4' <sub>proS</sub>	1.6591 (1H dddd, $J_{3',4'proS}=5.67$ , $J_{4'proS,4'proR}=-14.50$ , $J_{4'proS,5'proS}=9.65$ , $J_{4'proS,5'proR}=6.30$ )	1.6990 (1H dddd, $J_{3',4'proS}=7.38$ , $J_{4'proS,4'proR}=-14.50$ , $J_{4'proS,5'proS}=9.80$ , $J_{4'proS,5'proR}=4.50$ )
4' <sub>proR</sub>	1.7559 (1H dddd, $J_{3',4'proR}=7.54$ , $J_{4'proS,4'proR}=-14.50$ , $J_{4'proR,5'proS}=4.65$ , $J_{4'proR,5'proR}=9.80$ )	1.5909 (1H dddd, $J_{3',4'proR}=5.90$ , $J_{4'proS,4'proR}=-14.50$ , $J_{4'proR,5'proS}=6.00$ , $J_{4'proR,5'proR}=9.30$ )
5' <sub>proS</sub>	1.3851 (1H dddd, $J_{5'proS,4'proS}=9.65$ , $J_{5'proS,4'proR}=4.65$ , $J_{5'proR,5'proS}=-14.5$ , $J_{5'proS,6'proS}=6.90$ , $J_{5'proS,6'proR}=6.90$ )	1.3075 (1H dddd, $J_{4'proS,5'proS}=9.80$ , $J_{4'proR,5'proS}=6.00$ , $J_{5'proS,5'proR}=-14.5$ , $J_{5'proS,6'proS}=6.90$ , $J_{5'proS,6'proR}=6.90$ )
5' <sub>proR</sub>	1.3665 (1H dddd, $J_{5'proR,4'proS}=6.30$ , $J_{5'proR,4'proR}=9.80$ , $J_{5'proR,5'proS}=-14.5$ , $J_{5'proS,6'proS}=6.90$ , $J_{5'proS,6'proR}=6.90$ )	1.3530 (1H dddd, $J_{4'proS,5'proR}=4.50$ , $J_{4'proR,5'proR}=9.30$ , $J_{5'proS,5'proR}=-14.5$ , $J_{5'proS,6'proS}=6.90$ , $J_{5'proS,6'proR}=6.90$ )
6' <sub>proS</sub>	1.3561 (1H dddd, $J_{5'proS,6'proS}=6.90$ , $J_{5'proR,6'proS}=6.90$ , $J_{6'proS,6'proR}=-14.50$ , $J_{6',7'}=6.95$ )	1.3001 (1H dddd, $J_{5'proS,6'proS}=6.90$ , $J_{5'proR,6'proS}=6.90$ , $J_{6'proS,6'proR}=-14.50$ , $J_{6',7'}=6.94$ )
6' <sub>proR</sub>	1.3489 (1H dddd, $J_{5'proS,6'proR}=6.90$ , $J_{5'proR,6'proR}=6.90$ , $J_{6'proS,6'proR}=-14.50$ , $J_{6',7'}=6.95$ )	1.3017 (1H dddd, $J_{5'proS,6'proR}=6.90$ , $J_{5'proR,6'proR}=6.90$ , $J_{6'proS,6'proR}=-14.50$ , $J_{6',7'}=6.94$ )
7'	0.9432 (3H t, $J_{6',7'}=6.95$ )	0.8999 (3H t, $J_{6',7'}=6.94$ )

<sup>a</sup>Coupling constants in Hz.

**Table S23.**  $^1\text{H}$  NMR data of compounds **10** and **14** obtained by non-linear fit of the spectra to spectral parameters<sup>a</sup>

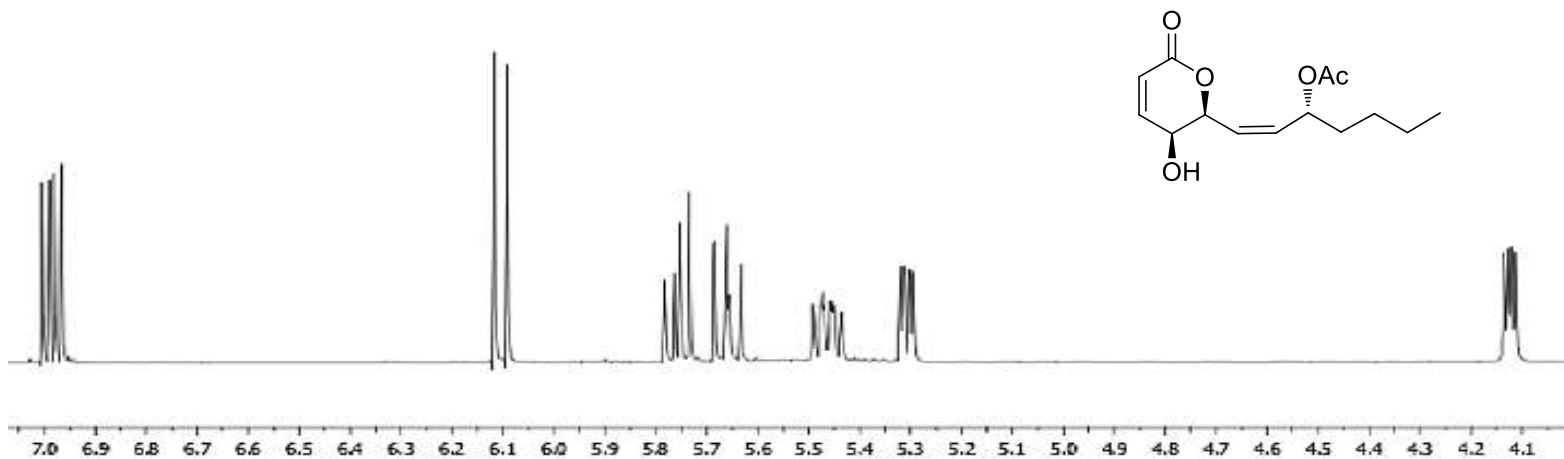
<b>H</b>	<b>10</b>	<b>14</b>
3	6.2299 (1H d, $J_{3,4}$ = 9.60)	6.2316 (1H d, $J_{3,4}$ = 9.65)
4	7.0854 (1H dd, $J_{3,4}$ = 9.60, $J_{4,5}$ = 6.10)	7.1269 (1H dd, $J_{3,4}$ = 9.65, $J_{4,5}$ = 6.15)
5	5.4059 (1H dd, $J_{4,5}$ = 6.10, $J_{5,6}$ = 2.30)	5.4385 (1H dd, $J_{4,5}$ = 6.15, $J_{5,6}$ = 2.50)
6	4.5521 (1H dd, $J_{5,6}$ = 2.30, $J_{6,1}$ = 9.50)	4.8018 (1H ddd, $J_{5,6}$ = 2.50, $J_{6,1}$ = 10.00)
1'	3.8900 (1H dd, $J_{6,1}$ = 9.50)	4.2046 (1H dd, $J_{6,1}$ = 10.00, $J_{1',2'}$ = 1.30)
2'	4.0239 (1H dd, $J_{2',3'}$ = 5.60)	4.2527 (1H ddd, $J_{1',2'}$ = 1.30, $J_{2',3'}$ = 6.50)
3'	5.0608 (1H ddd, $J_{2',3'}$ = 5.60, $J_{3',4'proR}$ = 7.20, $J_{3',4'proS}$ = 5.05)	5.1253 (1H ddd, $J_{2',3'}$ = 6.50, $J_{3',4'proR}$ = 5.50, $J_{3',4'proS}$ = 7.86)

<sup>a</sup>Coupling constants in Hz.

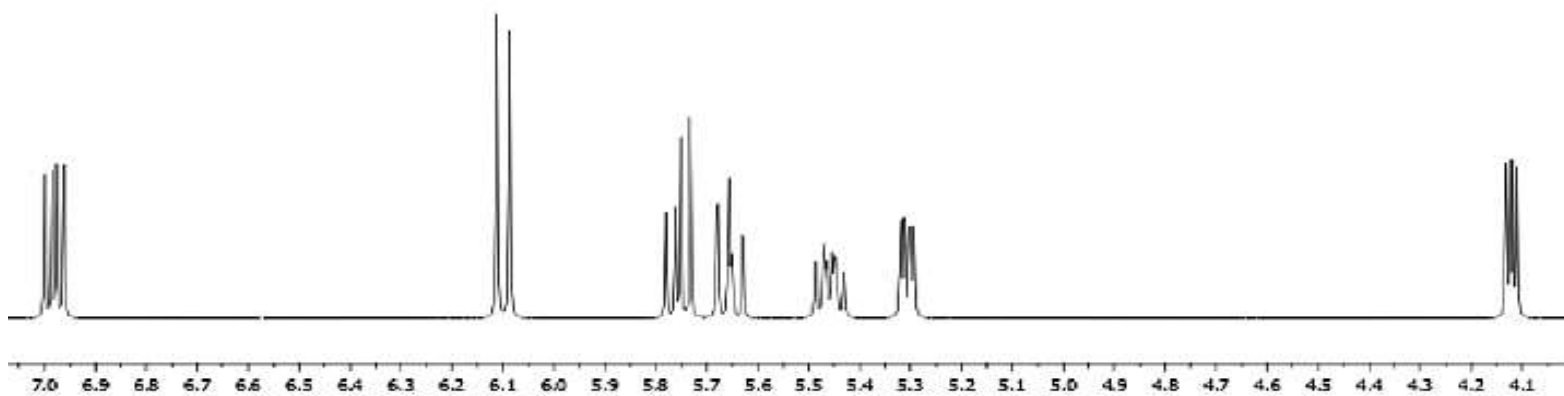


**Figure S1.** Experimental (A) and simulated (B)  $^1\text{H}$  NMR spectra (400 MHz) of **3**.

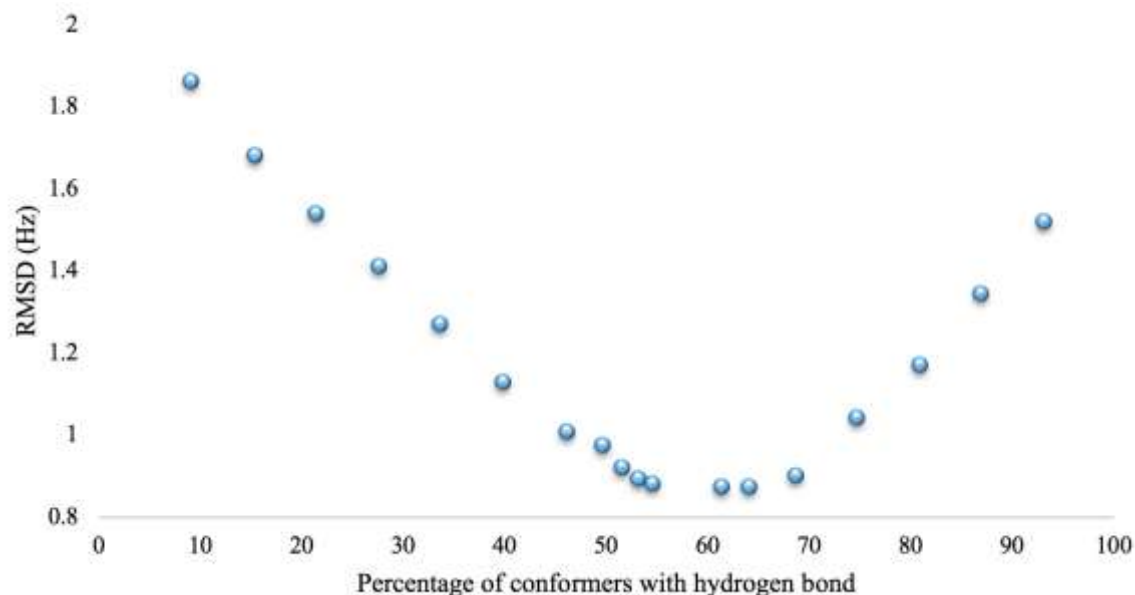
A



B



**Figure S2.** Experimental (A) and simulated (B)  $^1\text{H}$  NMR spectra (400 MHz) of **5**.

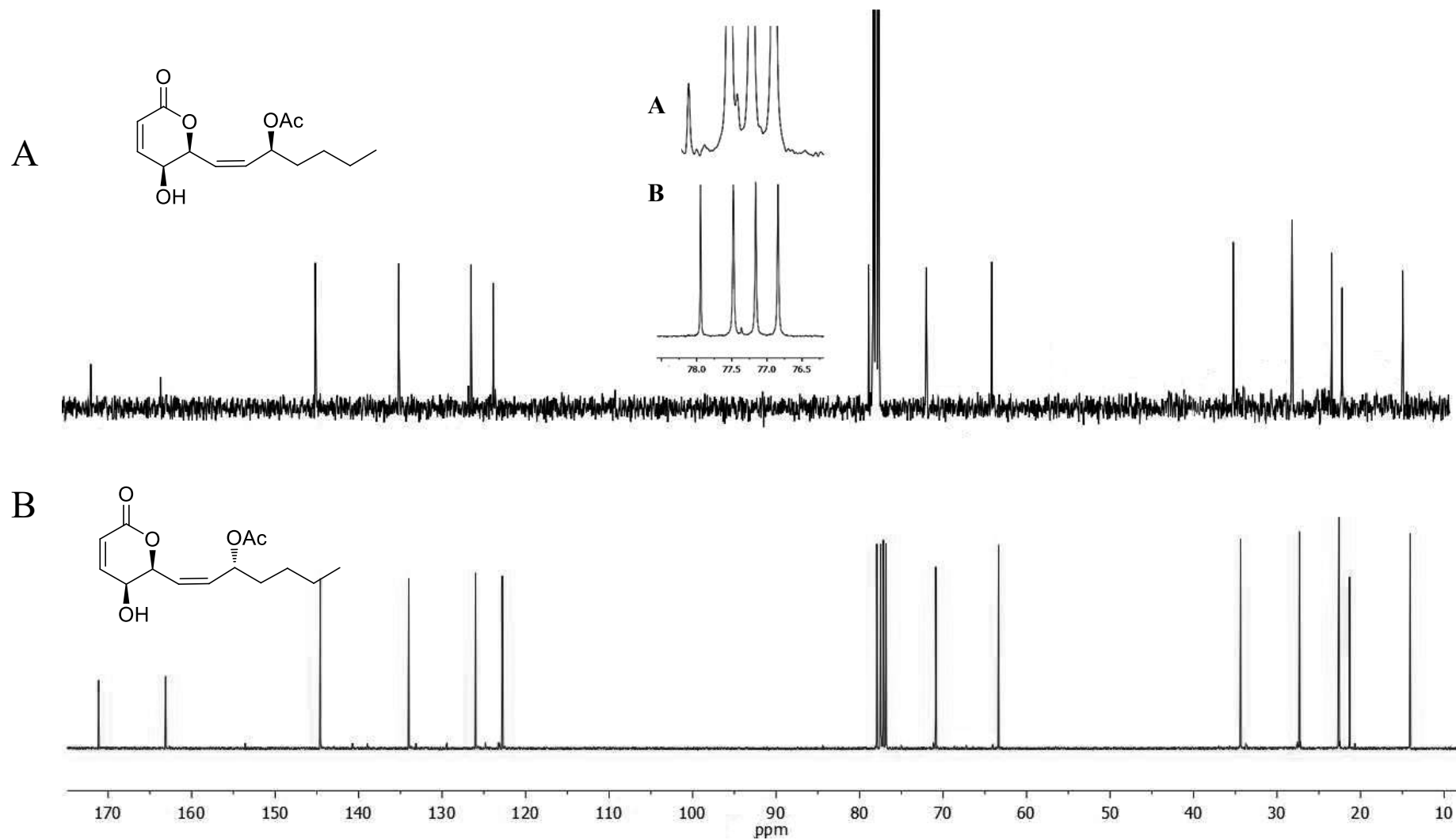


**Figure S3.** RMSD values for different percentages of hydrogen bonded conformations of **3**.

**Table S24.** Corrected theoretical coupling constant for different percentages of hydrogen bonded conformations of **3**.

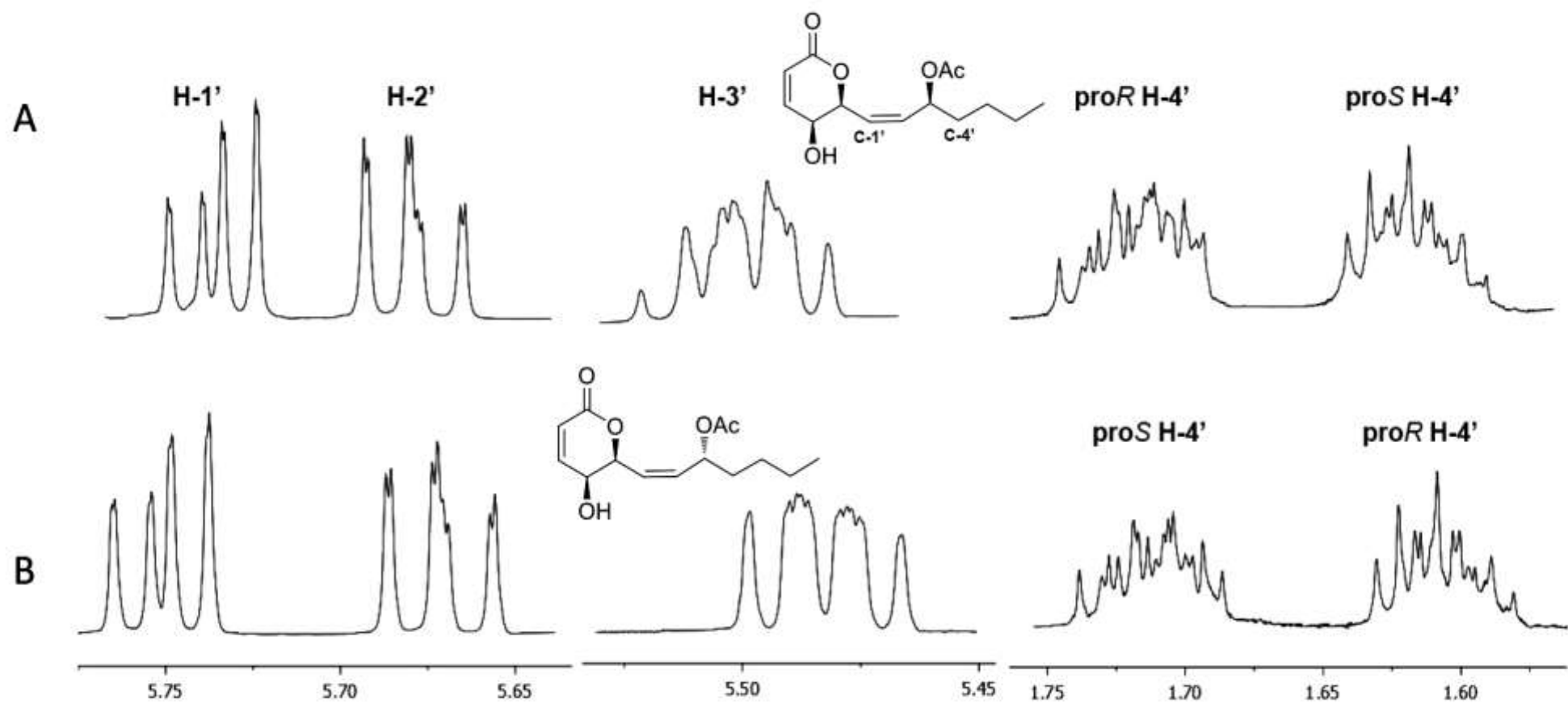
Percentaje <sup>b</sup>	RMSD	Corrected coupling constant ( <i>J</i> ) in Hz <sup>a</sup>					
		<i>J</i> <sub>5,6</sub>	<i>J</i> <sub>6,1'</sub>	<i>J</i> <sub>1',2'</sub>	<i>J</i> <sub>2',3'</sub>	<i>J</i> <sub>3',4'proR</sub>	<i>J</i> <sub>3',4'proS</sub>
93.2	1.52	4.57	5.68	13.97	10.61	8.23	5.96
87.1	1.34	4.43	5.73	13.65	10.41	7.86	6.01
81.0	1.17	4.30	5.77	13.33	10.20	7.49	6.05
74.8	1.04	4.16	5.82	13.01	9.99	7.12	6.10
68.7	0.90	4.00	5.80	12.59	9.71	6.73	6.08
64.2	0.87	3.89	5.87	12.35	9.56	6.41	6.15
61.4	0.87	3.86	5.92	12.3	9.54	6.31	6.20
54.7	0.88	3.71	5.97	11.96	9.31	5.91	6.24
53.4	0.89	3.68	5.98	11.89	9.27	5.83	6.25
51.5	0.92	3.65	6.02	11.82	9.24	5.73	6.29
49.7	0.97	3.63	5.96	11.00	9.05	5.64	6.36
46.1	1.01	3.60	6.22	11.79	9.25	5.48	6.50
40	1.13	3.53	6.45	11.72	9.26	5.18	6.74
33.8	1.27	3.48	6.71	11.71	9.31	4.90	7.01
27.7	1.41	3.41	6.93	11.63	9.30	4.60	7.23
21.5	1.54	3.28	6.98	11.32	9.09	4.23	7.28
15.4	1.68	3.12	6.98	10.94	8.84	3.85	7.28
9.3	1.86	3.16	7.47	11.25	9.15	3.66	7.79

<sup>a</sup>Calculated considering PCM solvation in CHCl<sub>3</sub>. The scaling factors were as follows:  $f_{H(sp^3)-H(sp^3)} = 0.910$ ;  $f_{H(sp^3)-H(sp^2)} = 0.929$  and  $f_{H(sp^2)-H(sp^2)} = 0.977$ . <sup>b</sup>Percentaje of total hydrogen bonded conformations.  $f_{H(sp^2)-H(sp^2)} = 0.977$ . <sup>c</sup>Percentaje of total hydrogen bonded conformation.

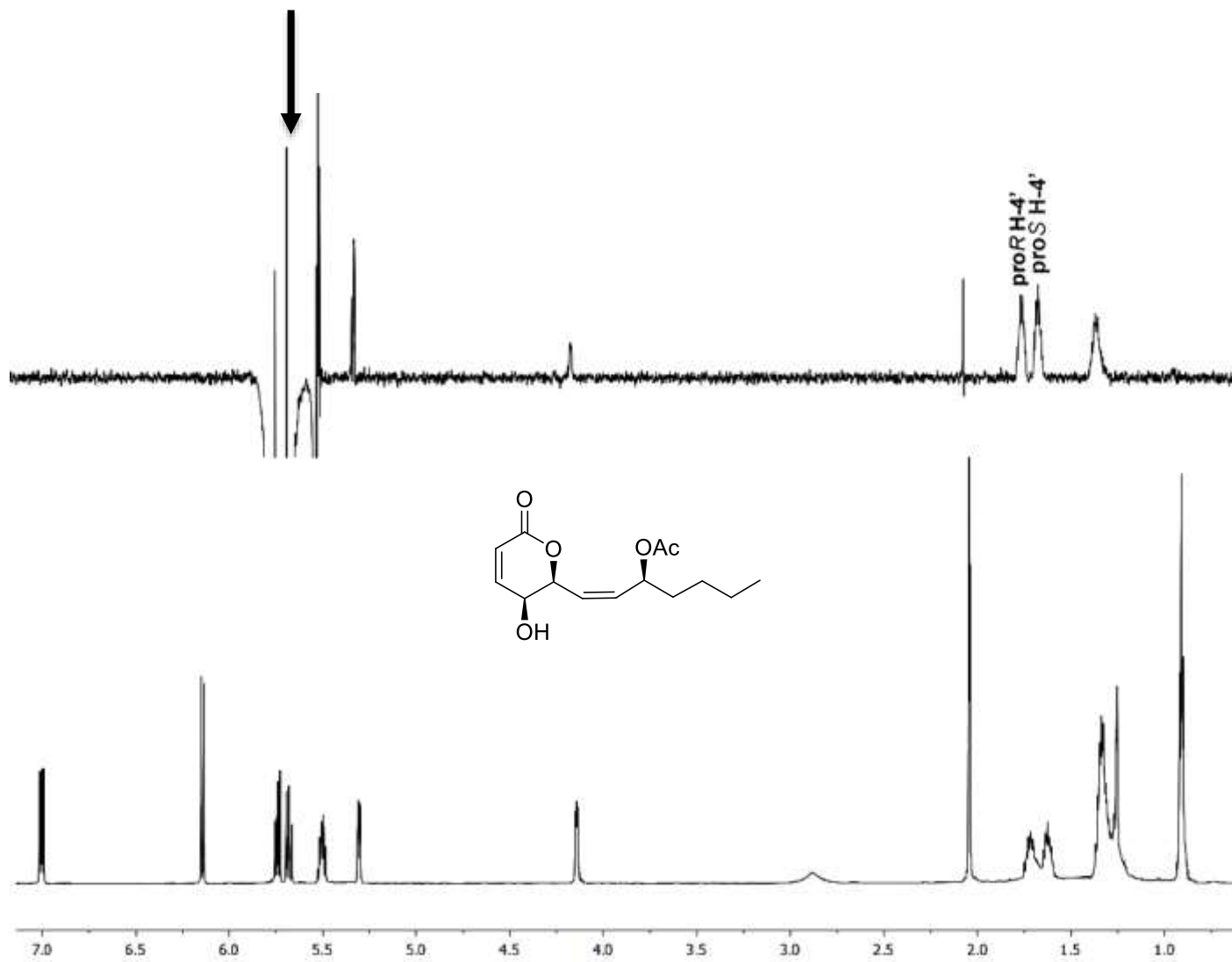


**Figure S4.** A)  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum in  $\text{CDCl}_3$  (100 MHz) of pectinolide C (**3**); B)  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of pectinolide J (**5**).

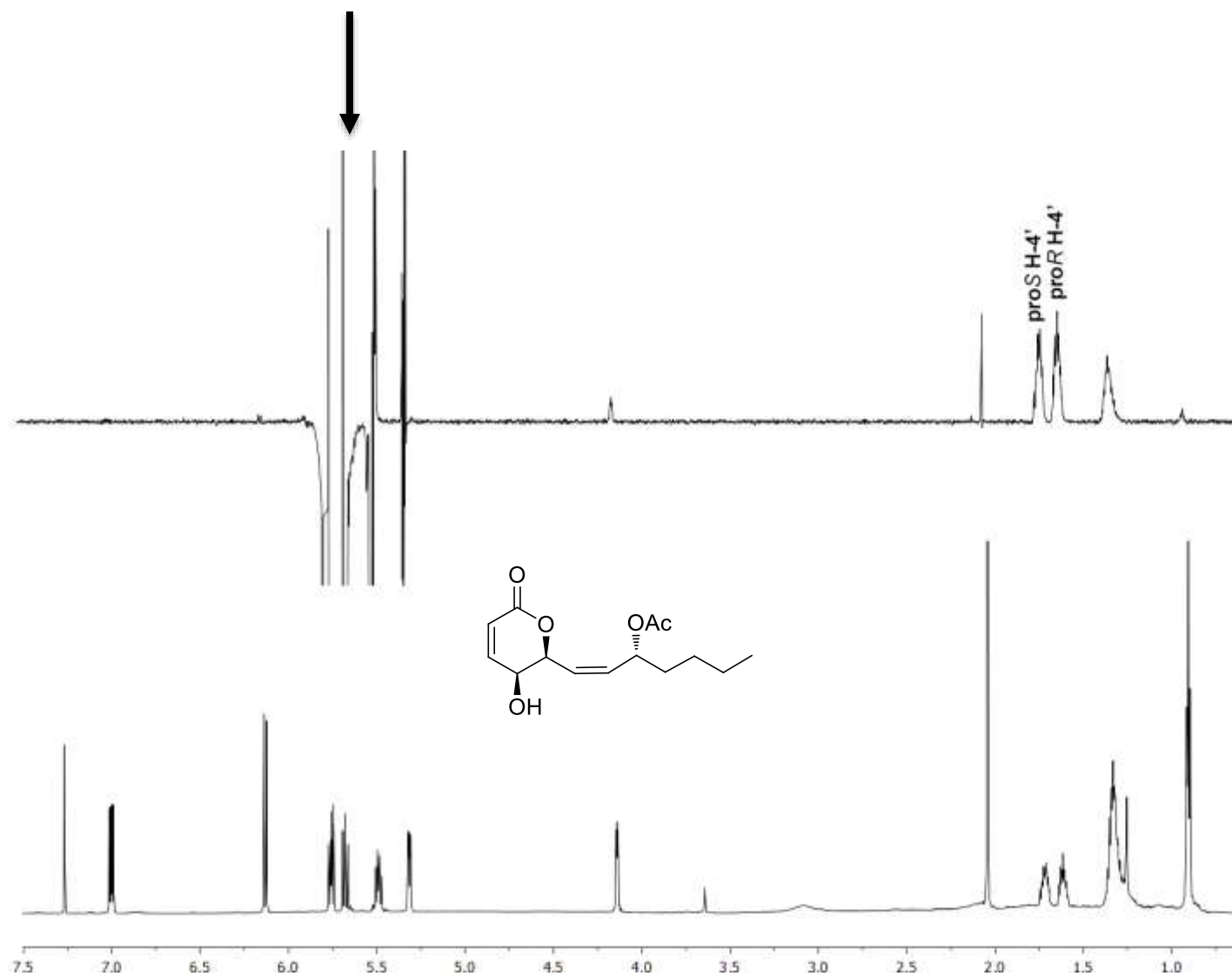




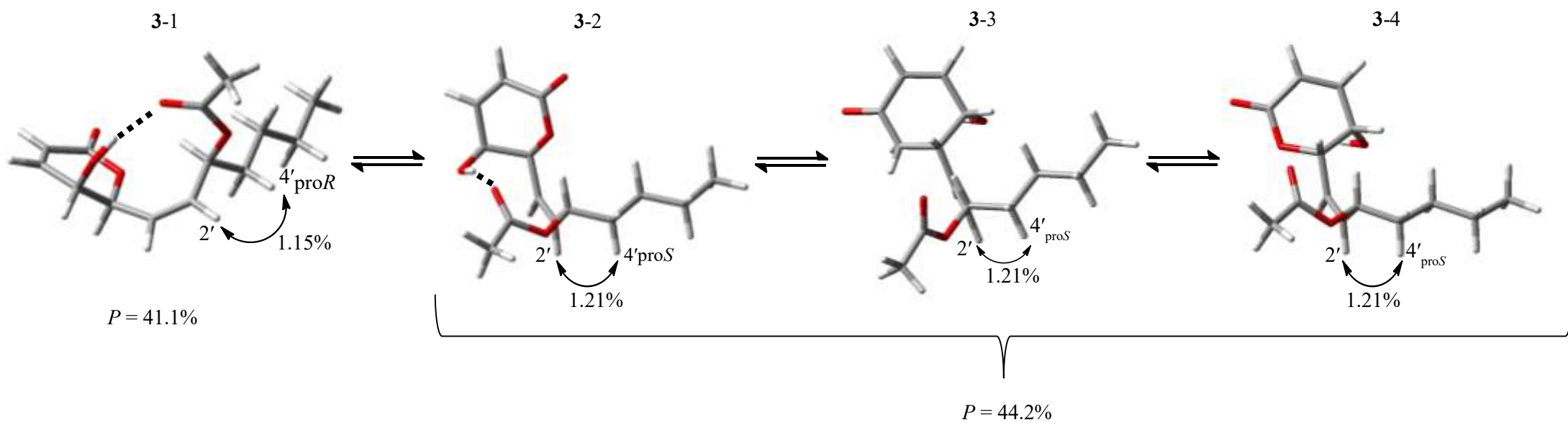
**Figure S5.** A) <sup>1</sup>H NMR spectrum of pectinolide C (3); and B) <sup>1</sup>H NMR spectrum of pectinolide J (5) in CDCl<sub>3</sub> (700 MHz).



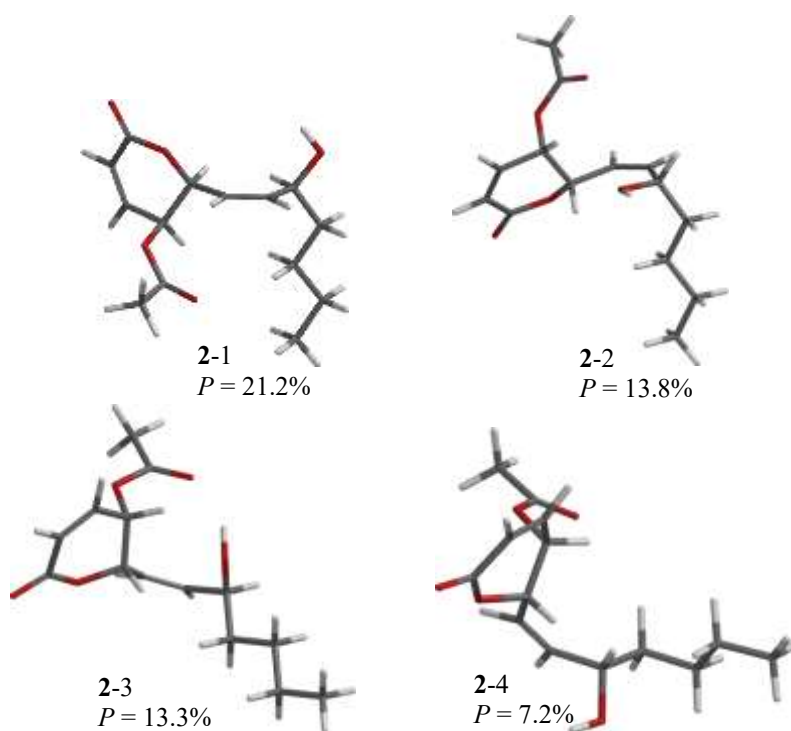
**Figure S6.** NOE difference spectrum of pectinolide C (**3**) with <sup>1</sup>H NMR spectrum for comparison in CDCl<sub>3</sub> (700 MHz). Vertical arrow indicate the irradiation frequency of H-2' (δ = 5.66).



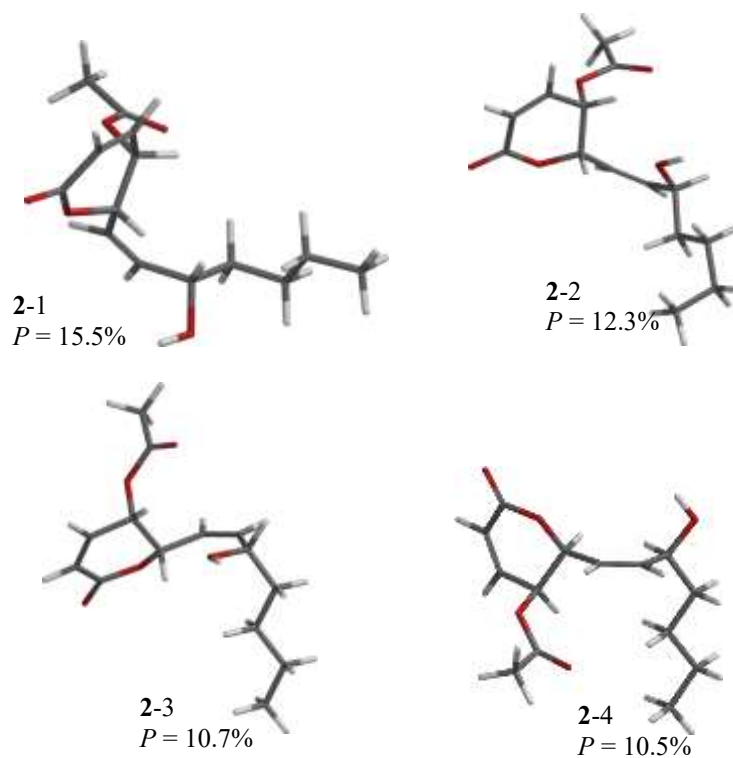
**Figure S7.** NOE difference spectrum of pectinolide J (**5**) with <sup>1</sup>H NMR spectrum for comparison in CDCl<sub>3</sub> (700 MHz). Vertical arrow indicate the irradiation frequency of H-2' ( $\delta = 5.72$ ).



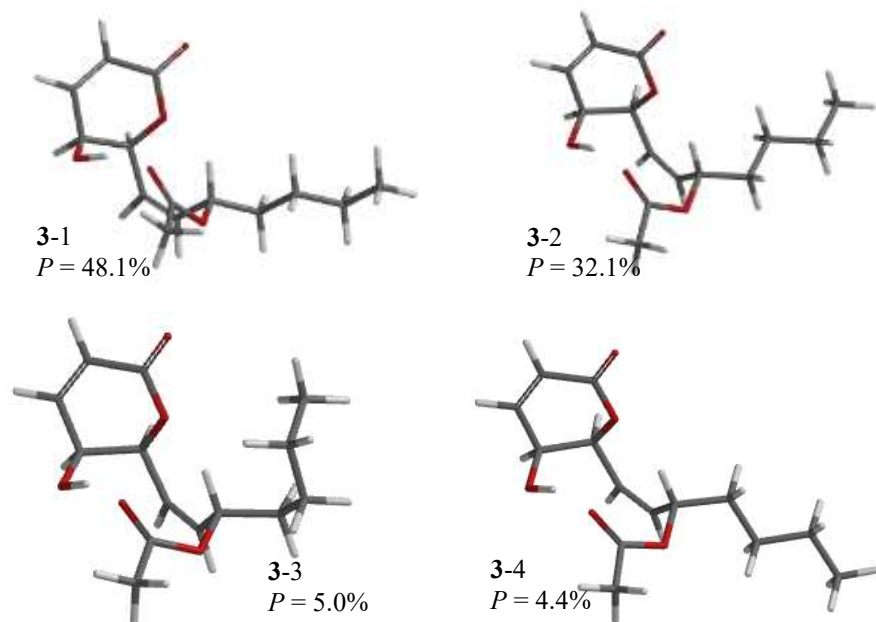
**Figure S8.** The four most relevant conformers of **3** modeled in  $\text{CHCl}_3$  solution and their contribution to the NOE effect between H-2' and H-4'.



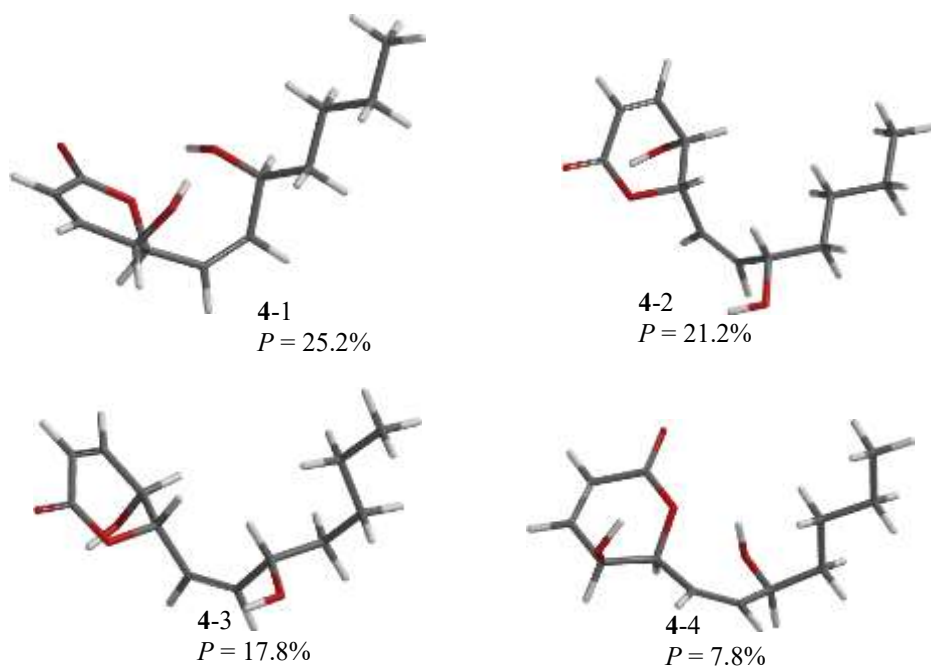
**Figure S9.** The four most relevant conformers of **2** modeled in gas phase.



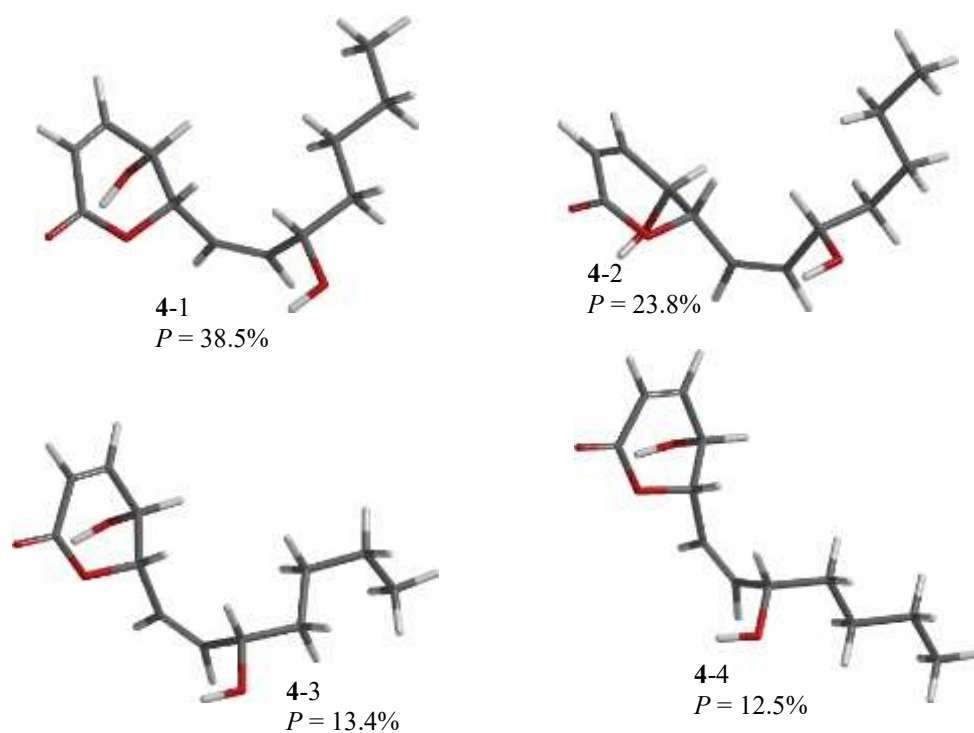
**Figure S10.** The four most relevant conformers of **2** modeled in  $\text{CHCl}_3$  solution.



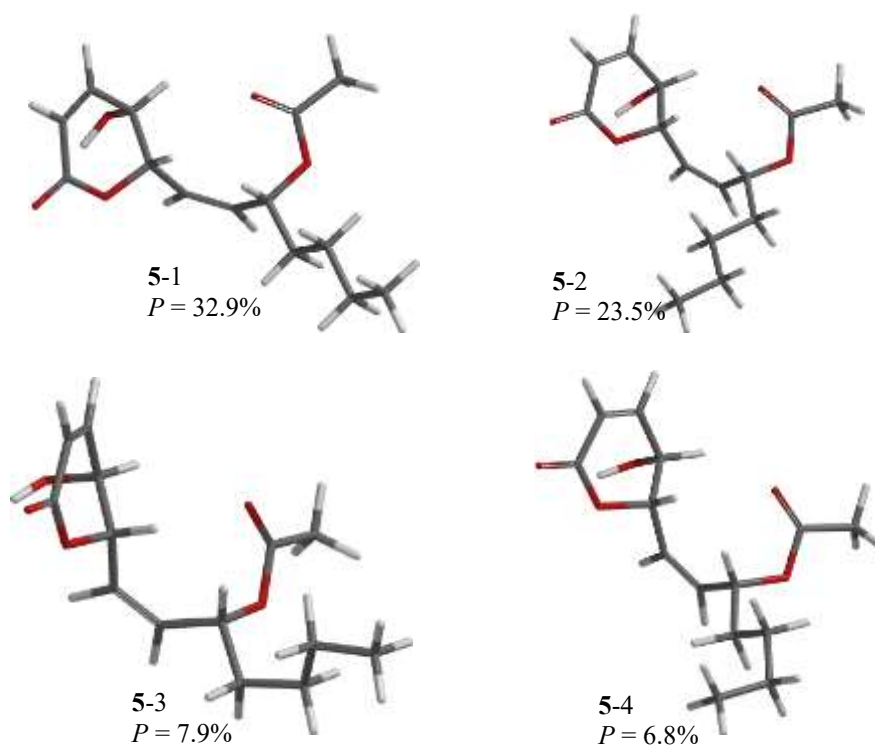
**Figure S11.** The four most relevant conformers of **3** modeled in gas phase.



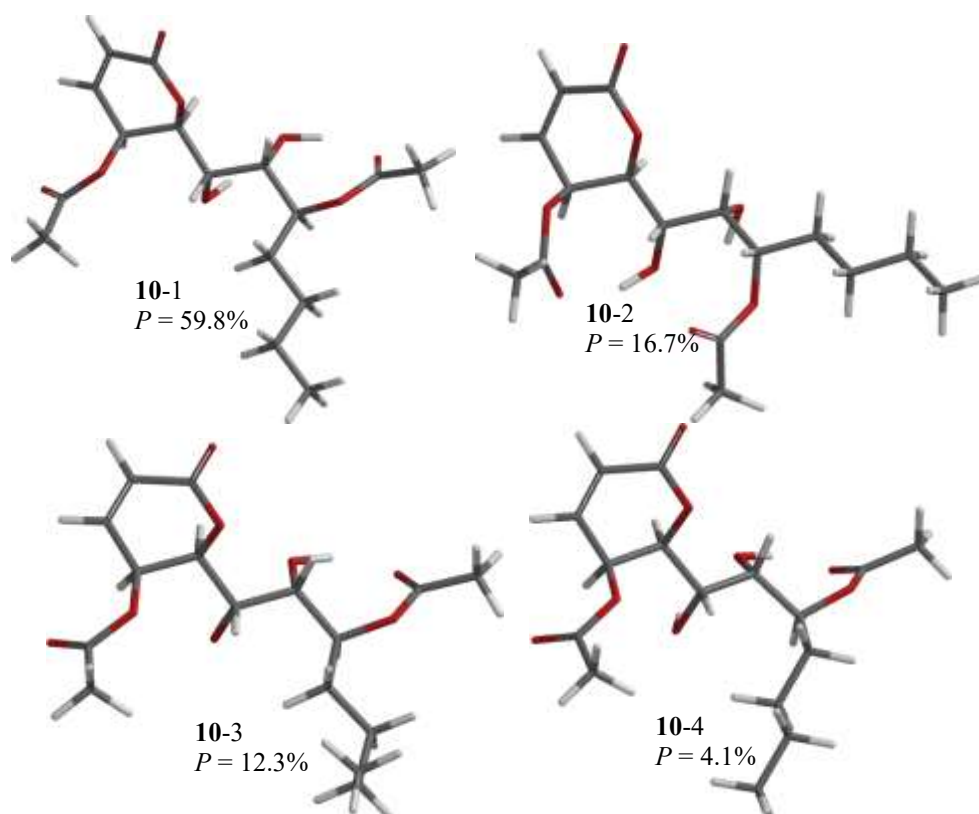
**Figure S12.** The four most relevant conformers of **4** modeled in gas phase.



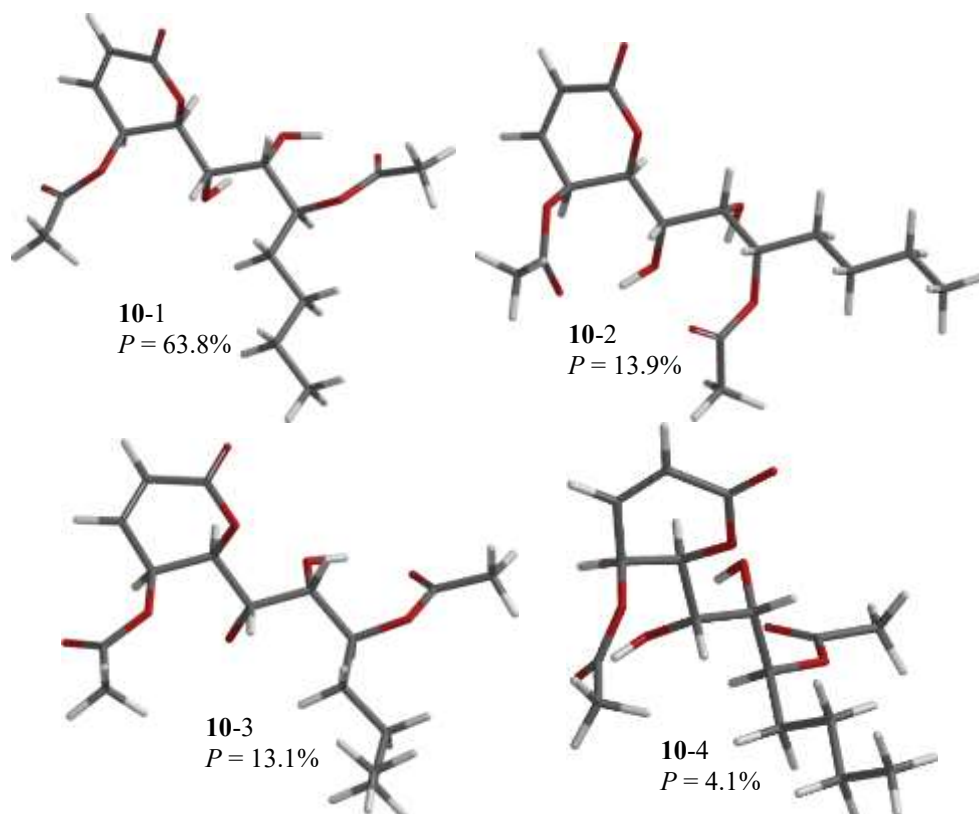
**Figure S13.** The four most relevant conformers of **4** modeled in  $\text{CHCl}_3$  solution.



**Figure S14.** The four most relevant conformers of **5** modeled in gas phase.

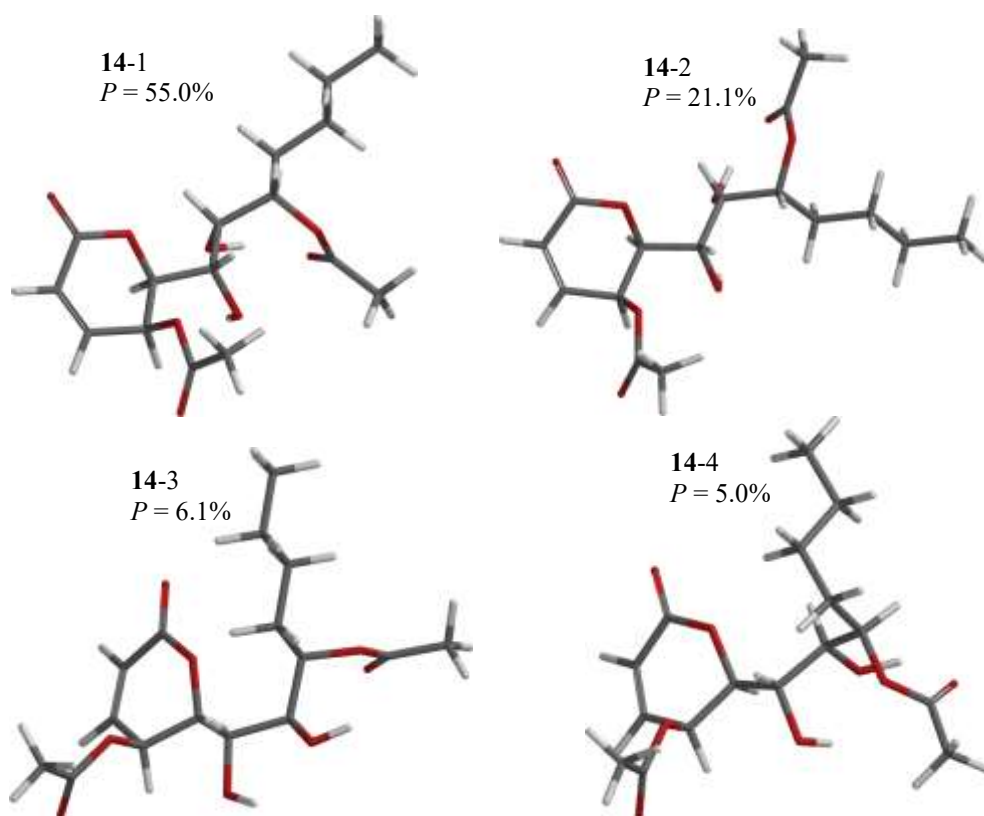


**Figure S15.** The four most relevant conformers of **10** modeled in gas phase.

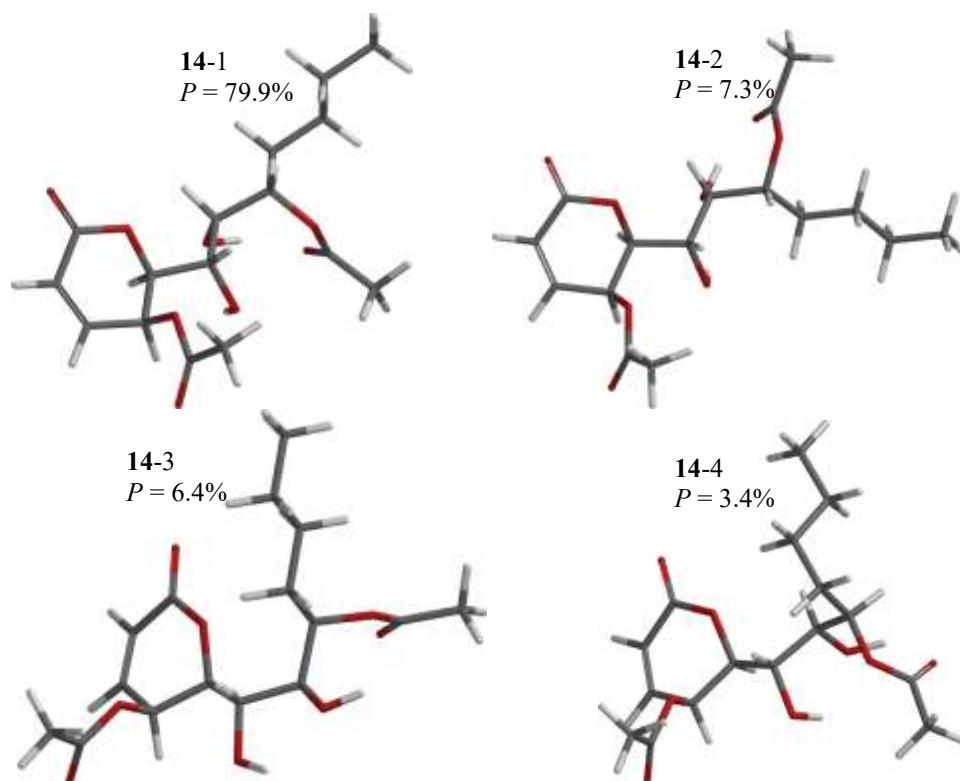


**Figure S16.** The four most relevant conformers of **10** modeled in  $\text{CHCl}_3$  solution.





**Figure S17.** The four most relevant conformers of **14** modeled in gas phase.



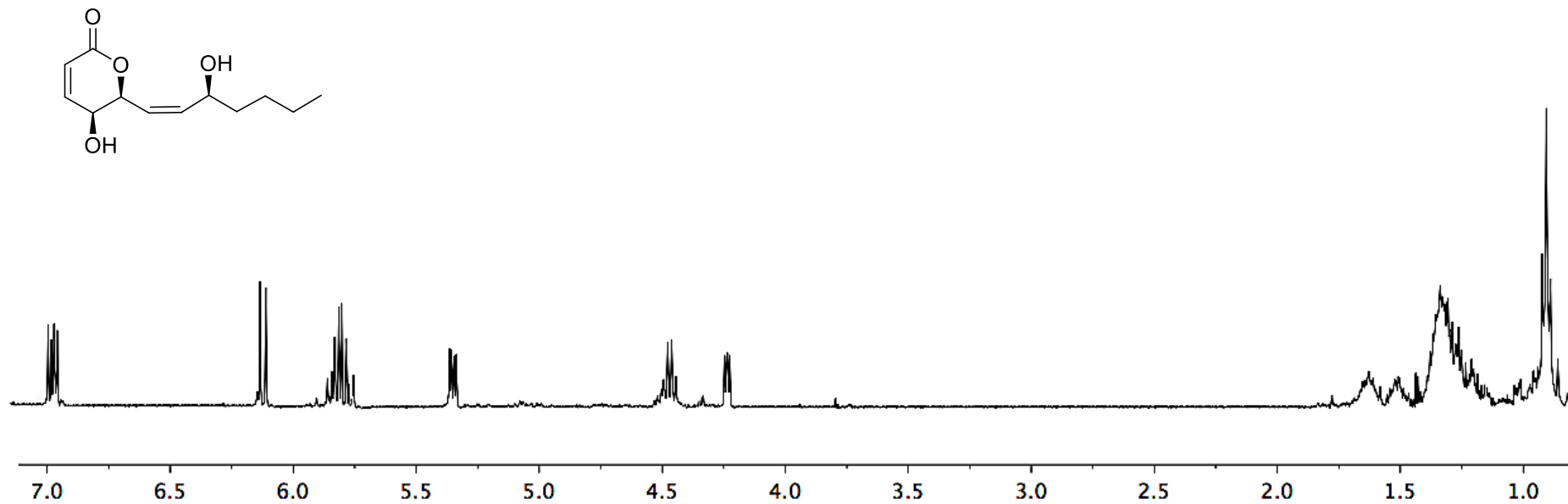
**Figure S18.** The four most relevant conformers of **14** modeled in  $\text{CHCl}_3$  solution.

**Physical and spectroscopic constants of petinolides A-C (1-3):**

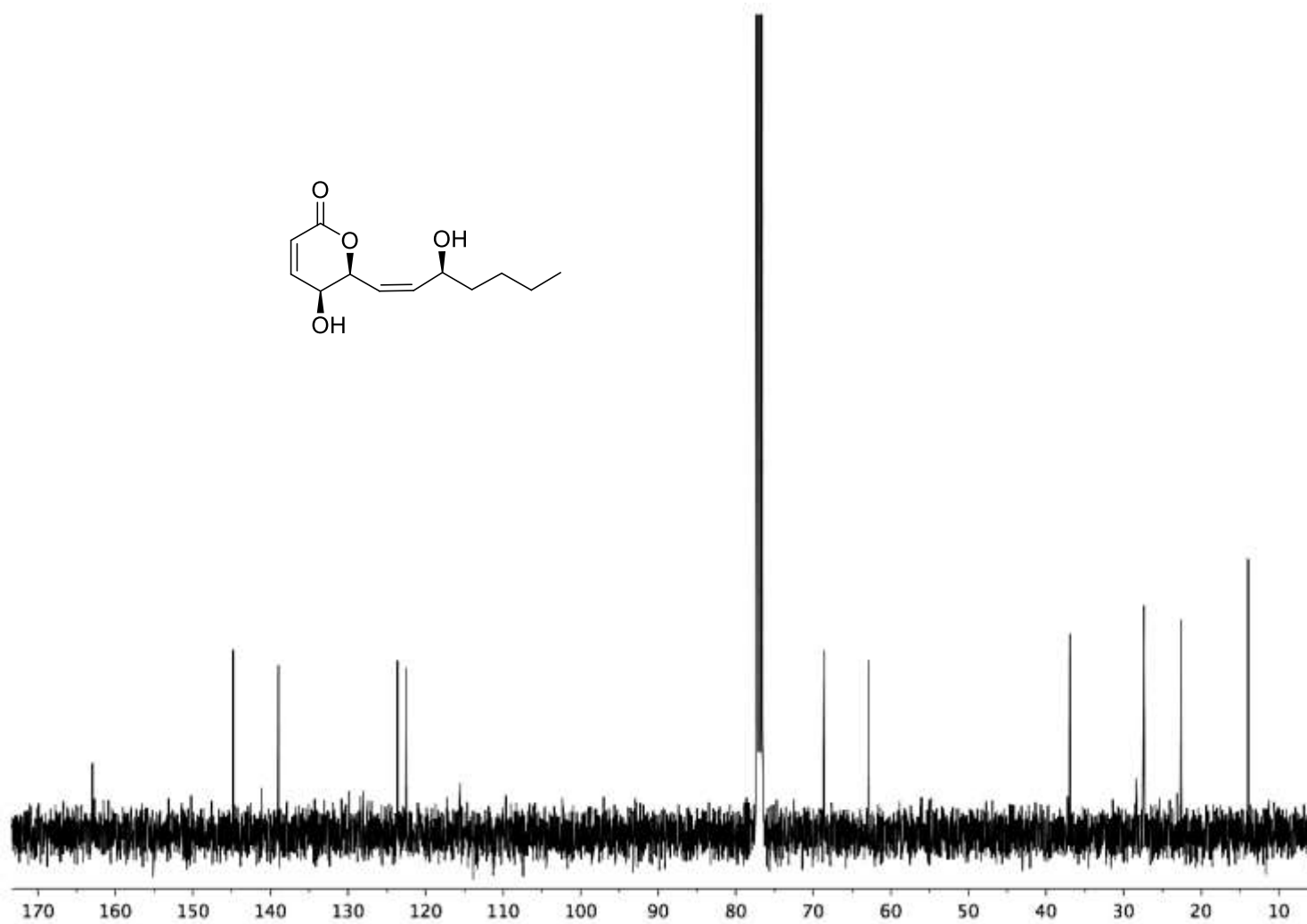
*Pectinolide A (1)*: colorless oil;  $[\alpha]_D^{+202.0^\circ}$  ( $c$  0.15, MeOH);  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.95 (dd,  $J = 9.7, 5.7$  Hz, 1H, H-4), 6.24 (d,  $J = 9.7$  Hz, 1H, H-3), 5.73 (dd,  $J = 10.9, 8.4$  Hz, 1H, H-1'), 5.64 (dd,  $J = 10.5, 10.1$  Hz, 1H, H-2'), 5.59 (dd,  $J = 8.1, 12.9$  Hz, 1H, H-6), 5.35 (ddd,  $J = 10.1, 7.4, 6.3$  Hz, 1H, H-3'), 5.18 (dd,  $J = 5.7, 3.0$  Hz, 1H, H-5), 2.08 (s, 3H, 5-OAc), 2.04 (s, 3H, 3'-OAc), 1.70 (m, 2H, H-4'), 1.54 (m, 2H, H-5'), 1.30 (m, 2H, H-6'), 0.90 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H, H-7').  $^{13}\text{C NMR}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  170.26, 169.81 (Me-CO-), 162.09 (C-2), 139.89 (C-4), 133.16 (C-1'), 126.24 (C-2'), 124.81 (C-3), 75.07 (C-6), 69.39 (C-3'), 64.49 (C-5), 34.05 (C-4'), 27.23 (C-5'), 22.46 (C-6'), 21.10 (Me-CO-), 20.49 (Me-CO-), 13.88 (C-7').

*Pectinolide B (2)*: colorless oil;  $[\alpha]_D^{+89.6^\circ}$  ( $c$  0.57, MeOH).  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.97 (dd,  $J = 9.7, 5.6$  Hz, 1H, H-4), 6.22 (d,  $J = 9.7$  Hz, 1H, H-3), 5.76 (dd,  $J = 11.4, 7.8$  Hz, 1H, H-2'), 5.65 (dd,  $J = 11.4, 8.2$  Hz, 1H, H-1'), 5.52 (dd,  $J = 8.2, 3.1$  Hz, 1H, H-6), 5.27 (dd,  $J = 5.5, 3.1$  Hz, 1H, H-5), 4.41 (dd,  $J = 14.0, 7.0$  Hz, 1H, H-3'), 2.10 (s, 3H, 5-OAc), 1.61 (m, 1H, H-4'<sub>proR</sub>), 1.48 (m, 1H, H-4'<sub>proS</sub>), 1.35 (m, 4H, H-5', H-6'), 0.91 (t,  $J = 6.0$  Hz, 3H, H-7').  $^{13}\text{C NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  170.14 (Me-CO-), 162.59 (C-2), 140.50 (C-4), 139.03 (C-2'), 124.81 (C-3), 123.04 (C-1'), 74.84 (C-6), 68.39 (C-3'), 63.82 (C-5), 37.05 (C-4'), 27.43 (C-5'), 22.74 (C-6'), 20.56 (Me-CO-), 14.13 (C-7').

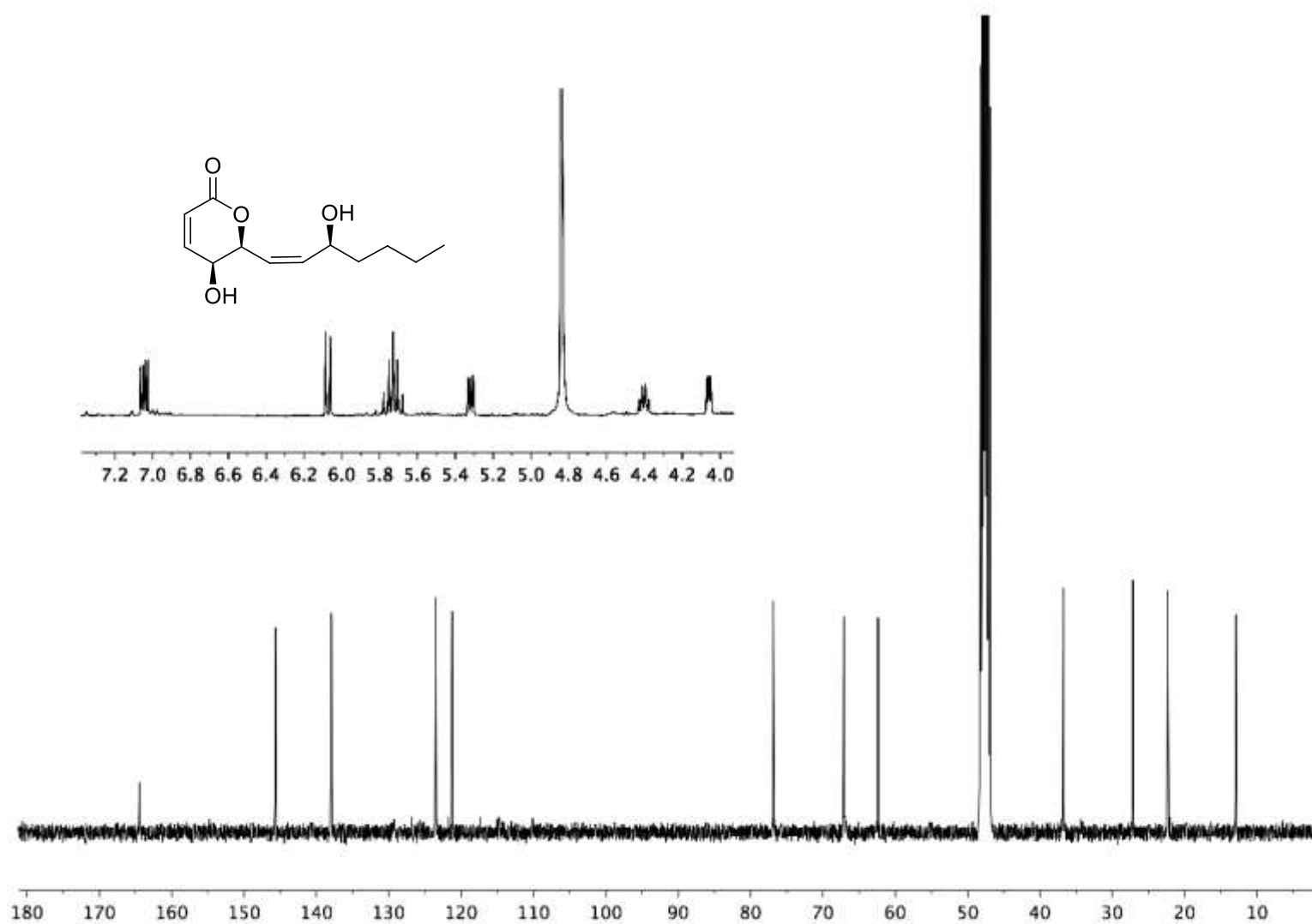
*Pectinolide C (3)*: colorless oil;  $[\alpha]_D^{+80.9^\circ}$  ( $c$  0.76, MeOH).  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.01 (dd,  $J = 9.8, 5.4$  Hz, 1H, H-4), 6.08 (d,  $J = 9.8$  Hz, 1H, H-3), 5.82 (dd,  $J = 11.2, 8$  Hz, 1H, H-1'), 5.66 (dd,  $J = 11.2, 9.2$  Hz, 1H, H-2'), 5.44 (ddd,  $J = 9.2, 6.8, 5.8$  Hz, 1H, H-3'), 5.35 (dd,  $J = 8.0, 3.0$  Hz, 1H, H-6), 4.12 (dd,  $J = 5.4, 3.0$  Hz, 1H, H-5), 2.04 (s, 3H, MeOAc), 1.68 (m, 2H, H-4'), 1.55 (m, 2H, H-5'), 1.29 (m, 2H, H-6'), 0.90 (t,  $J = 6.9$  Hz, 3H, H-7').  $^{13}\text{C NMR}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  171.03 (Me-CO-), 162.67 (C-2), 144.14 (C-4), 134.15 (C-2'), 125.49 (C-1'), 122.83 (C-3), 77.88 (C-6), 70.96 (C-3'), 63.13 (C-5), 34.21 (C-4'), 27.17 (C-5'), 22.44 (C-6'), 21.18 (Me-CO-), 13.92 (C-7').



**Figure S19.** <sup>1</sup>H NMR spectra of pectinolide I (**4**) in CDCl<sub>3</sub> (400 MHz).



**Figure S20.** <sup>13</sup>C NMR spectra of pectinolide I (4) in CDCl<sub>3</sub> (100 MHz).



**Figure S21.**  $^1\text{H}$  (400 MHz; insert) and  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) NMR spectra of pectinolide I (4) in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

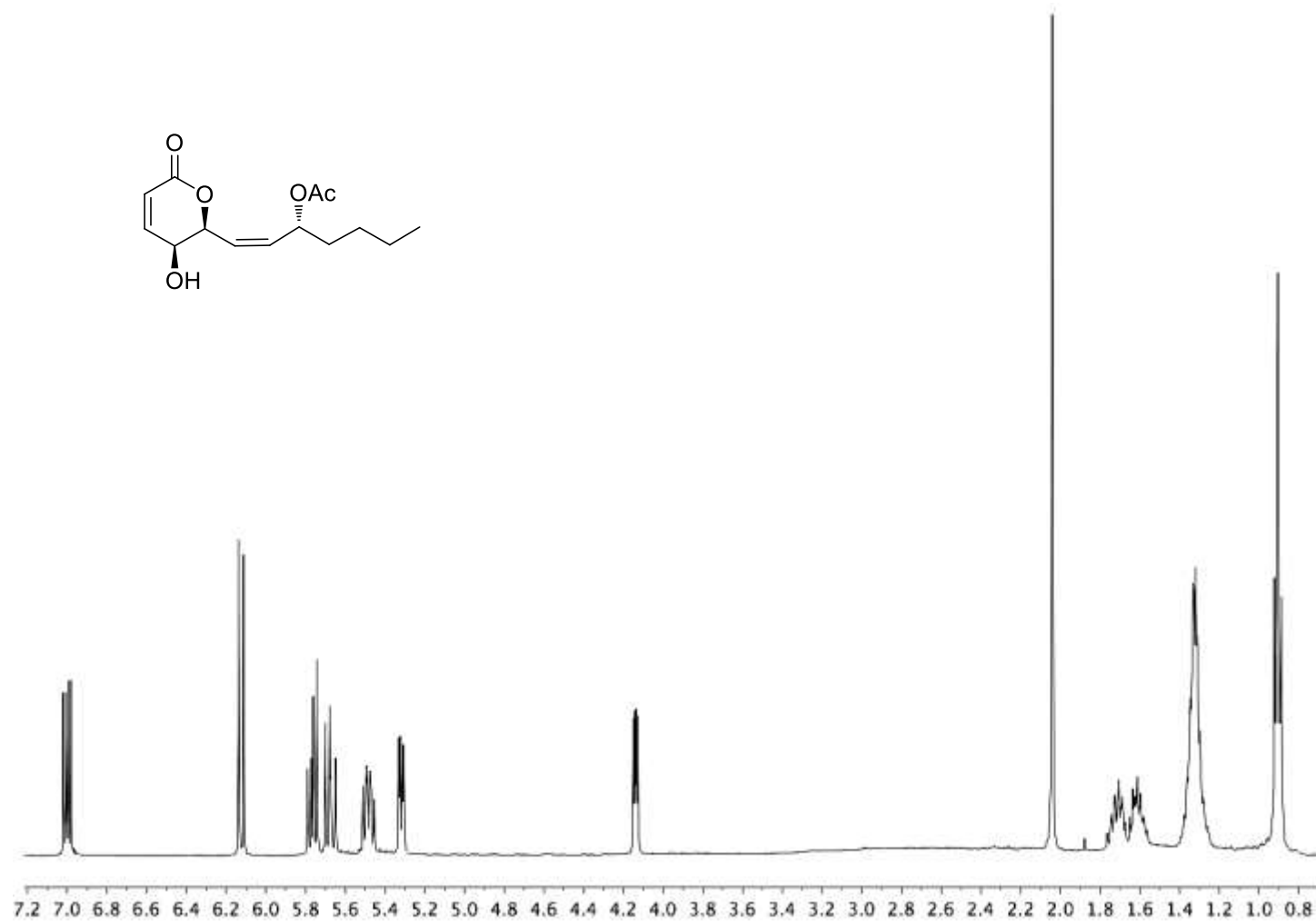
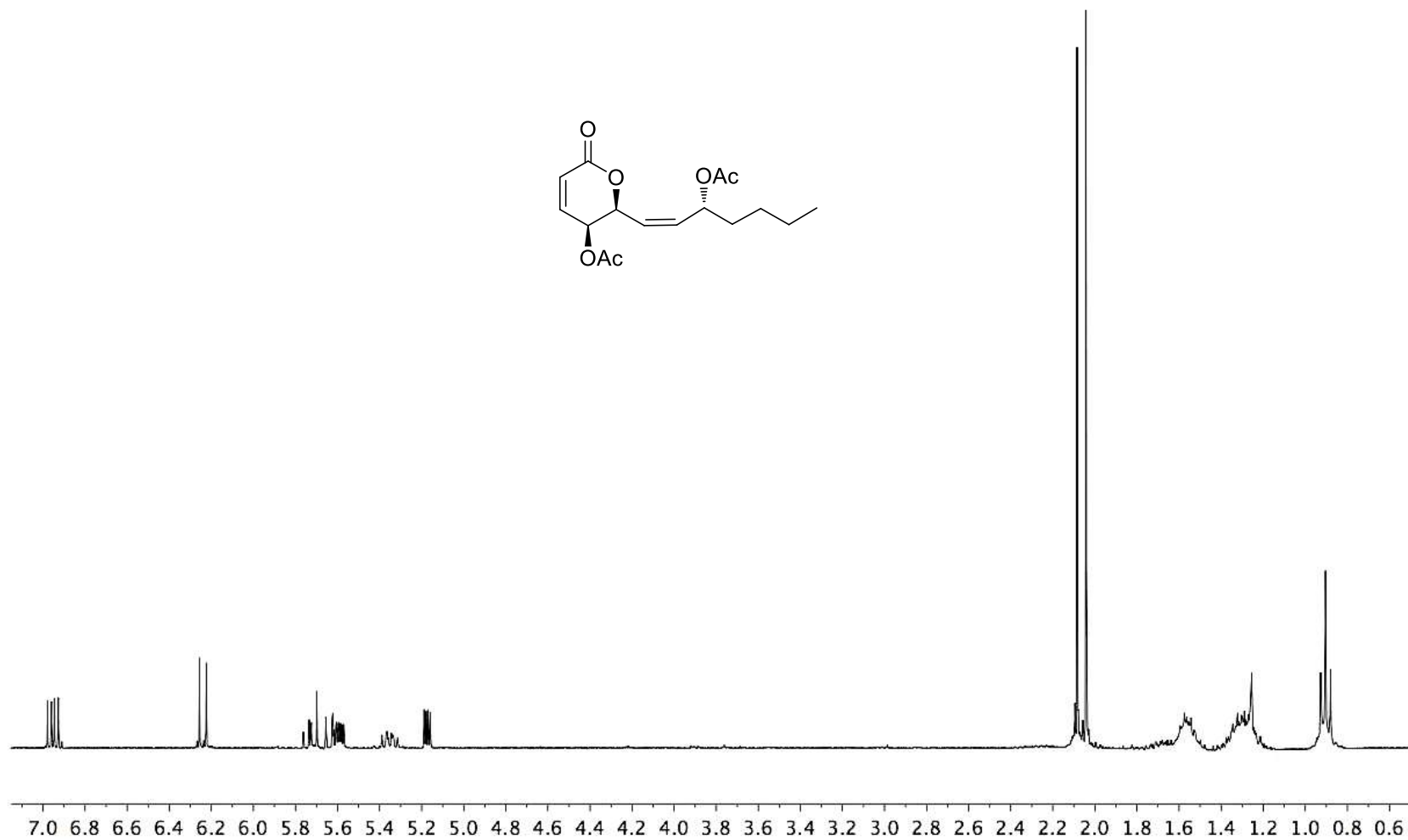
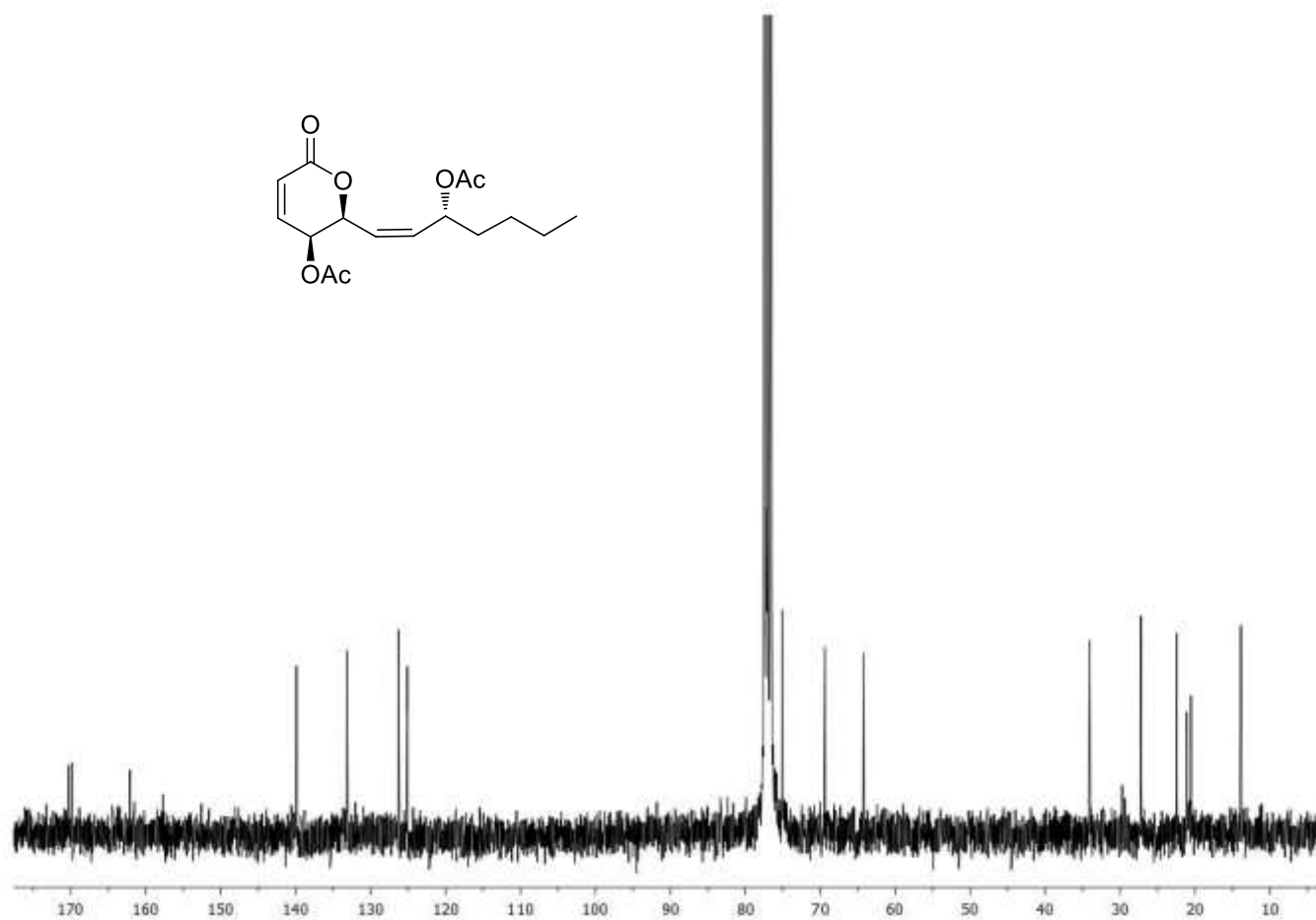


Figure S22. <sup>1</sup>H NMR spectra of pectinolide J (5) in CDCl<sub>3</sub> (400 MHz).

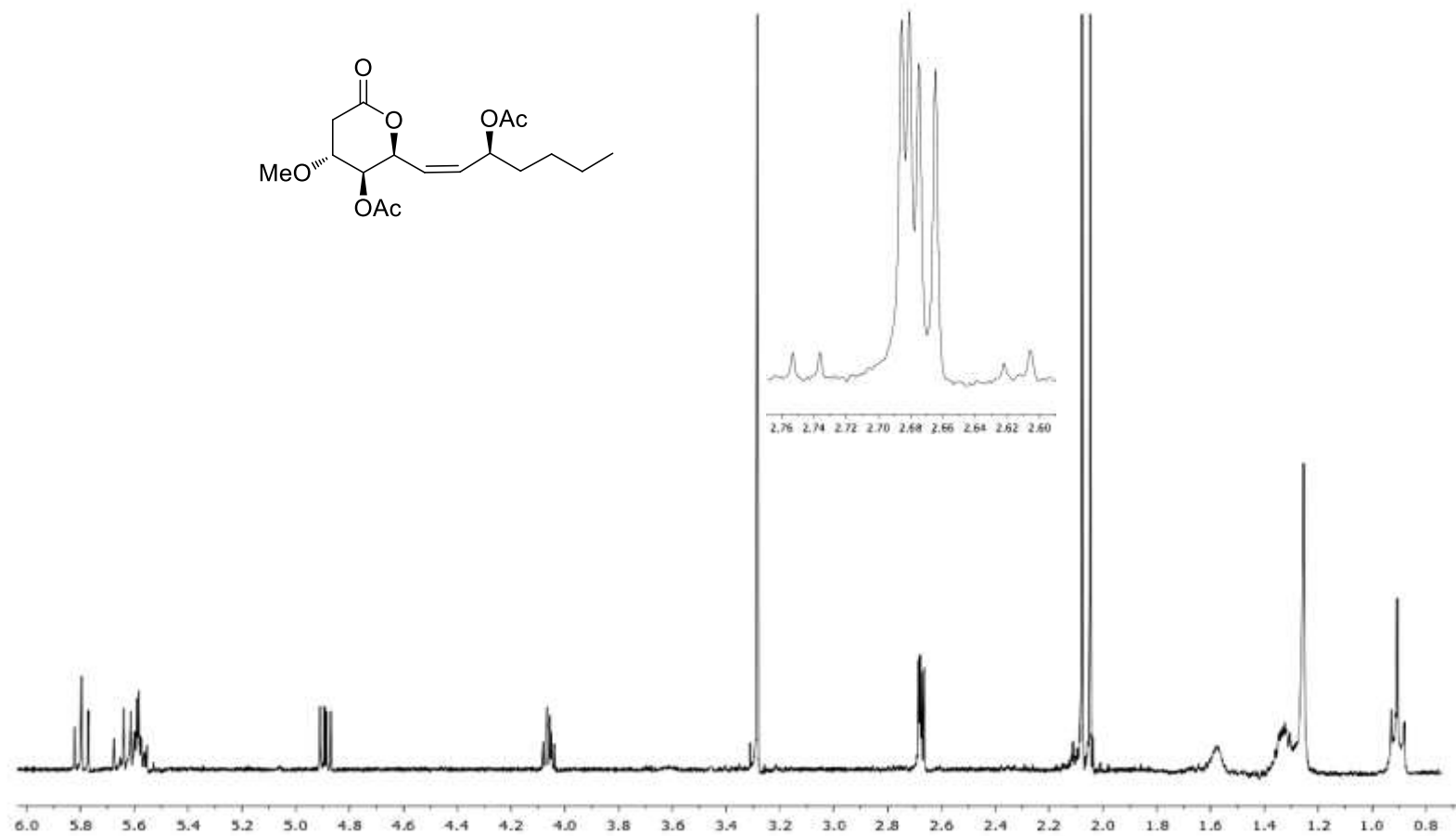


**Figure S23.** <sup>1</sup>H NMR spectra of pectinolide K (6) in CDCl<sub>3</sub> (400 MHz).

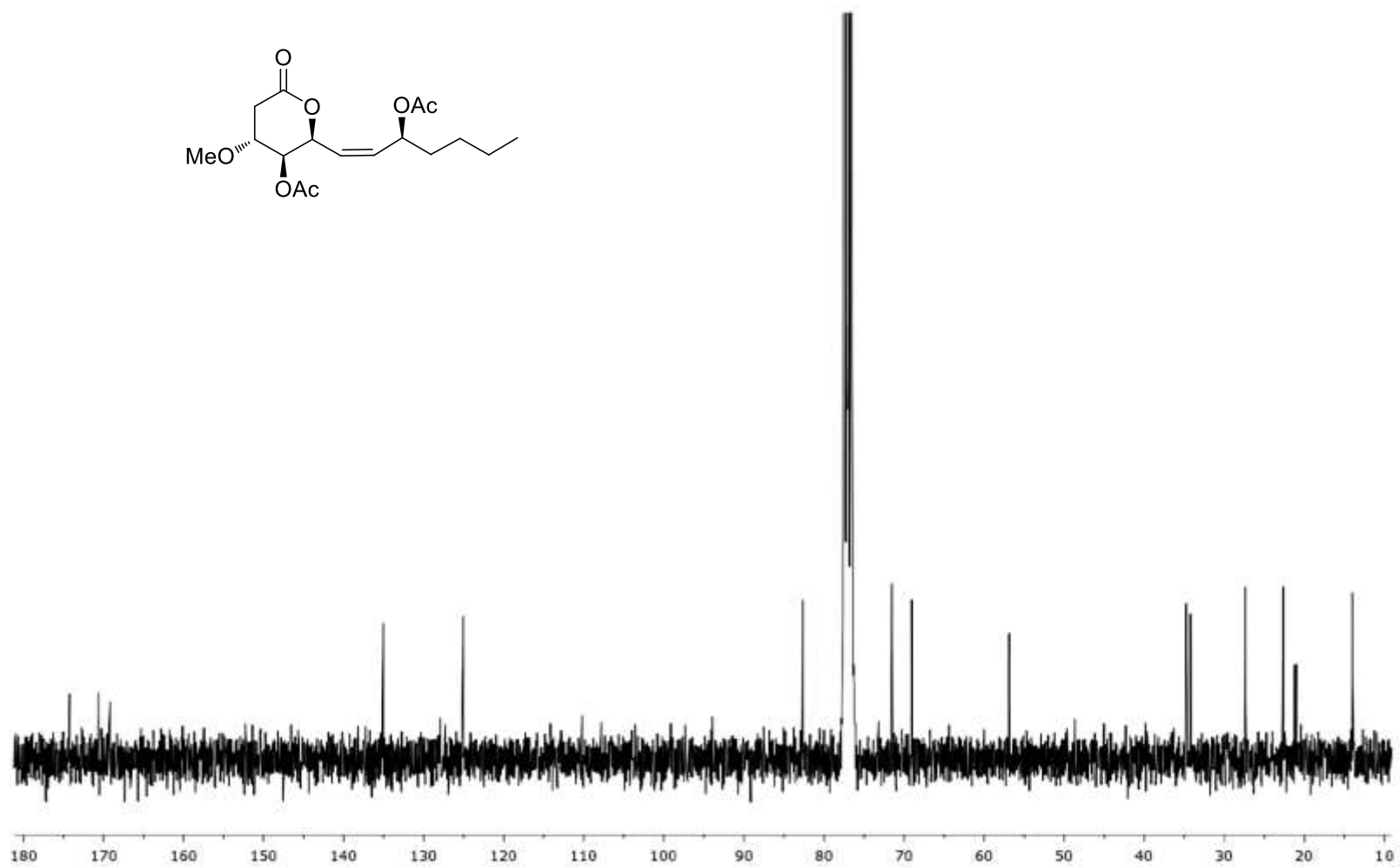


**Figure S24.** <sup>13</sup>C NMR spectra of pectinolide K (6) in CDCl<sub>3</sub> (100 MHz).

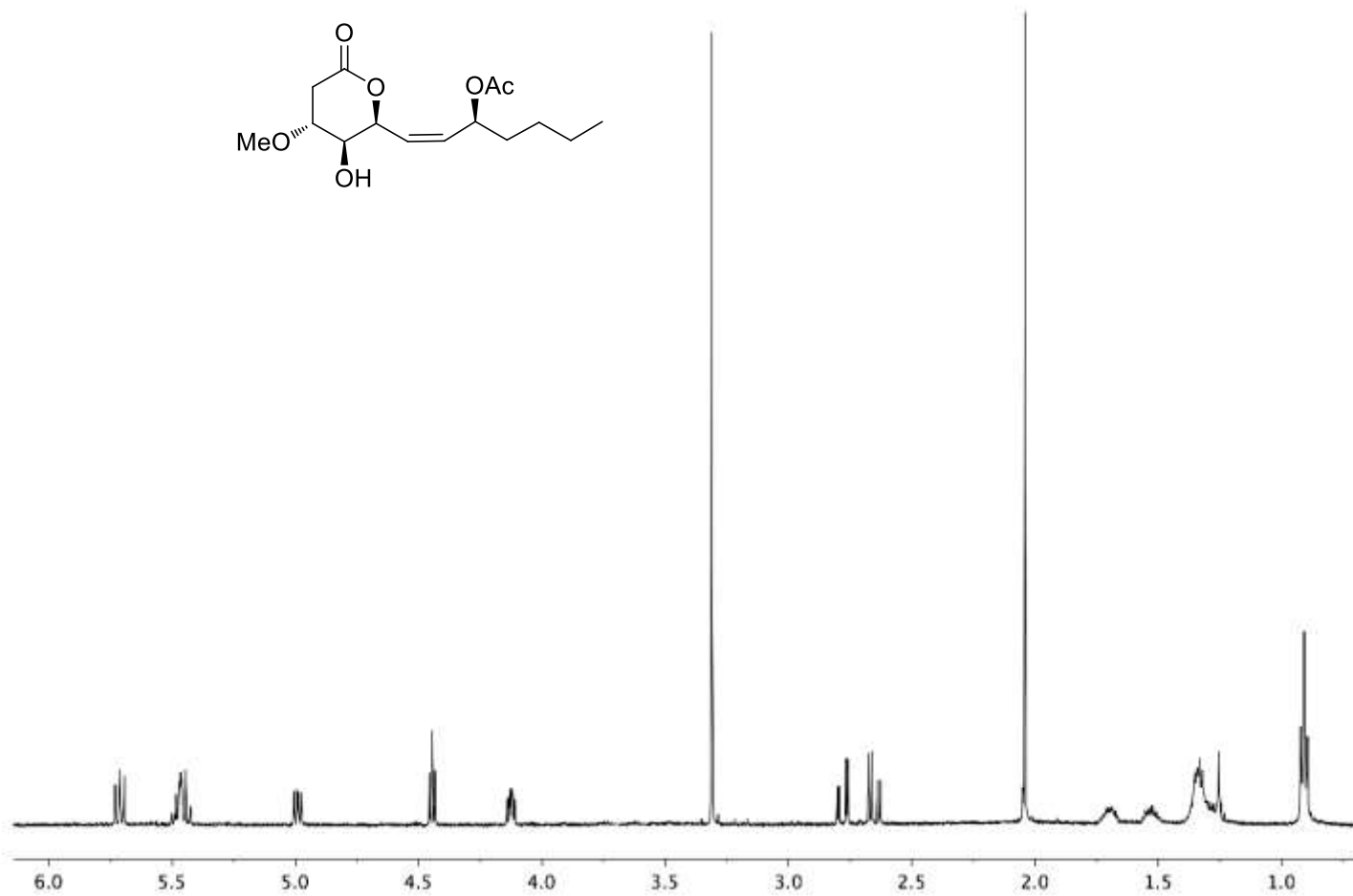




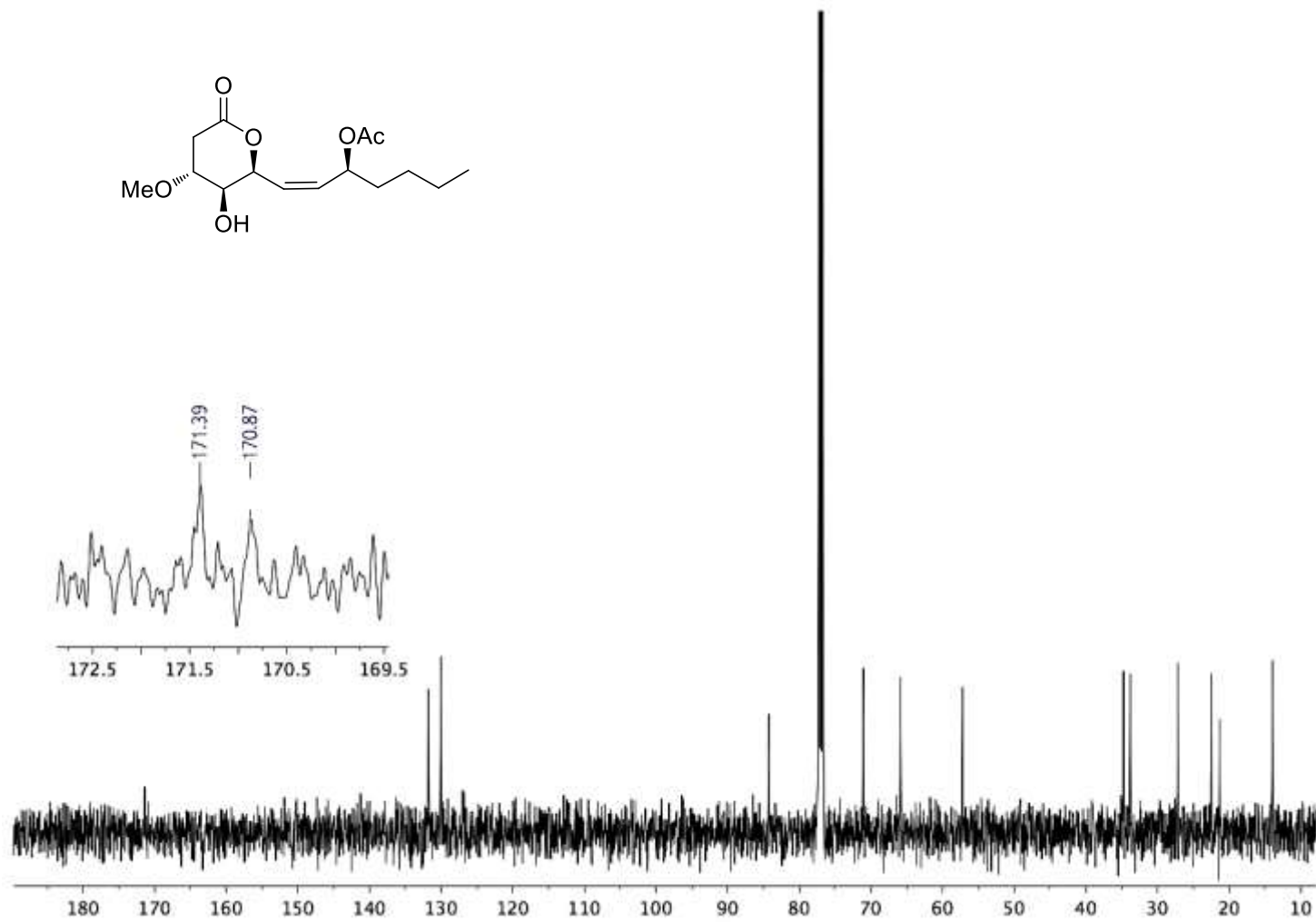
**Figure S25.** <sup>1</sup>H NMR spectra of pectinolide L (7) in CDCl<sub>3</sub> (400 MHz).



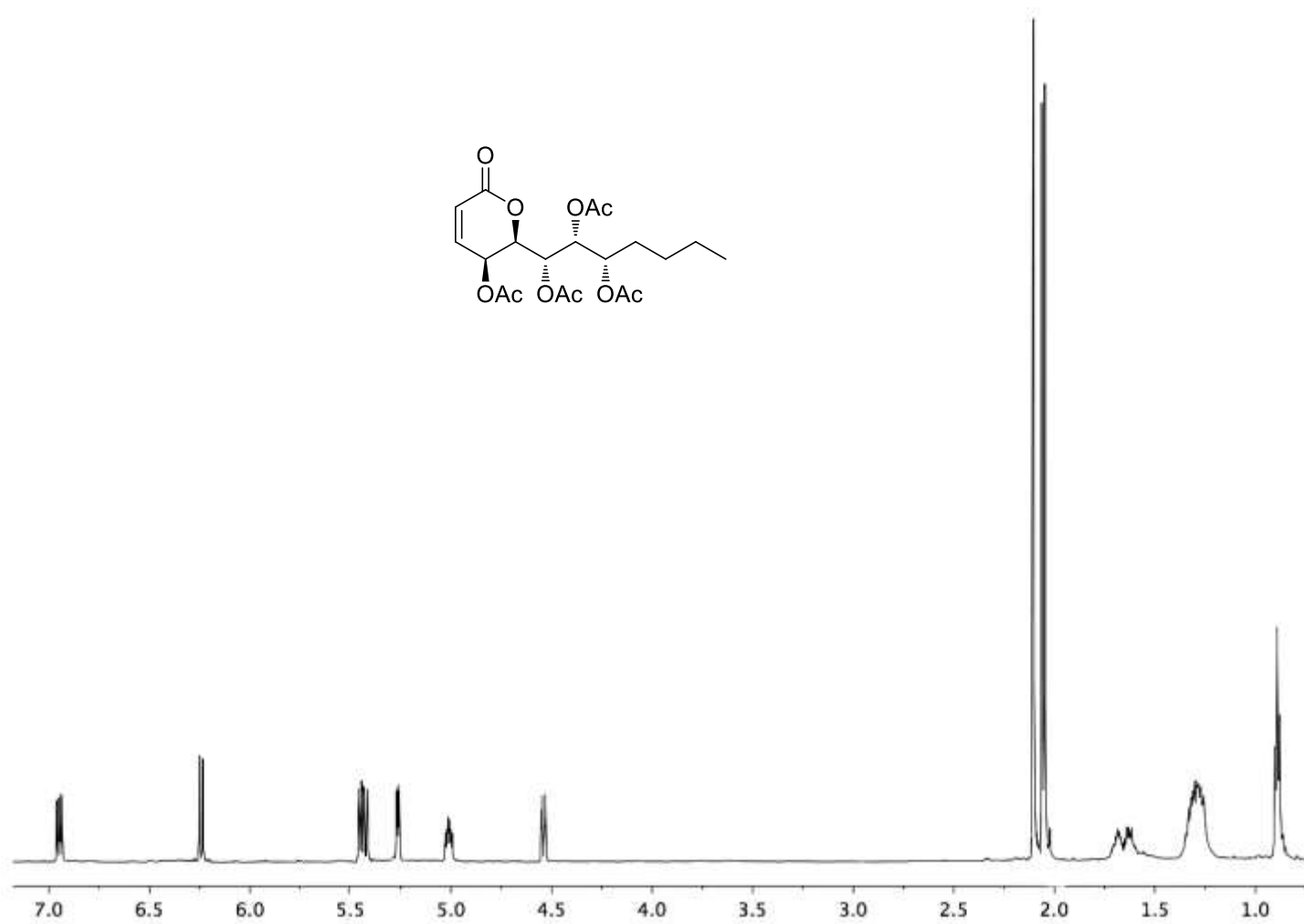
**Figure S26.**  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of pectinolide L (7) in  $\text{CDCl}_3$  (100 MHz).



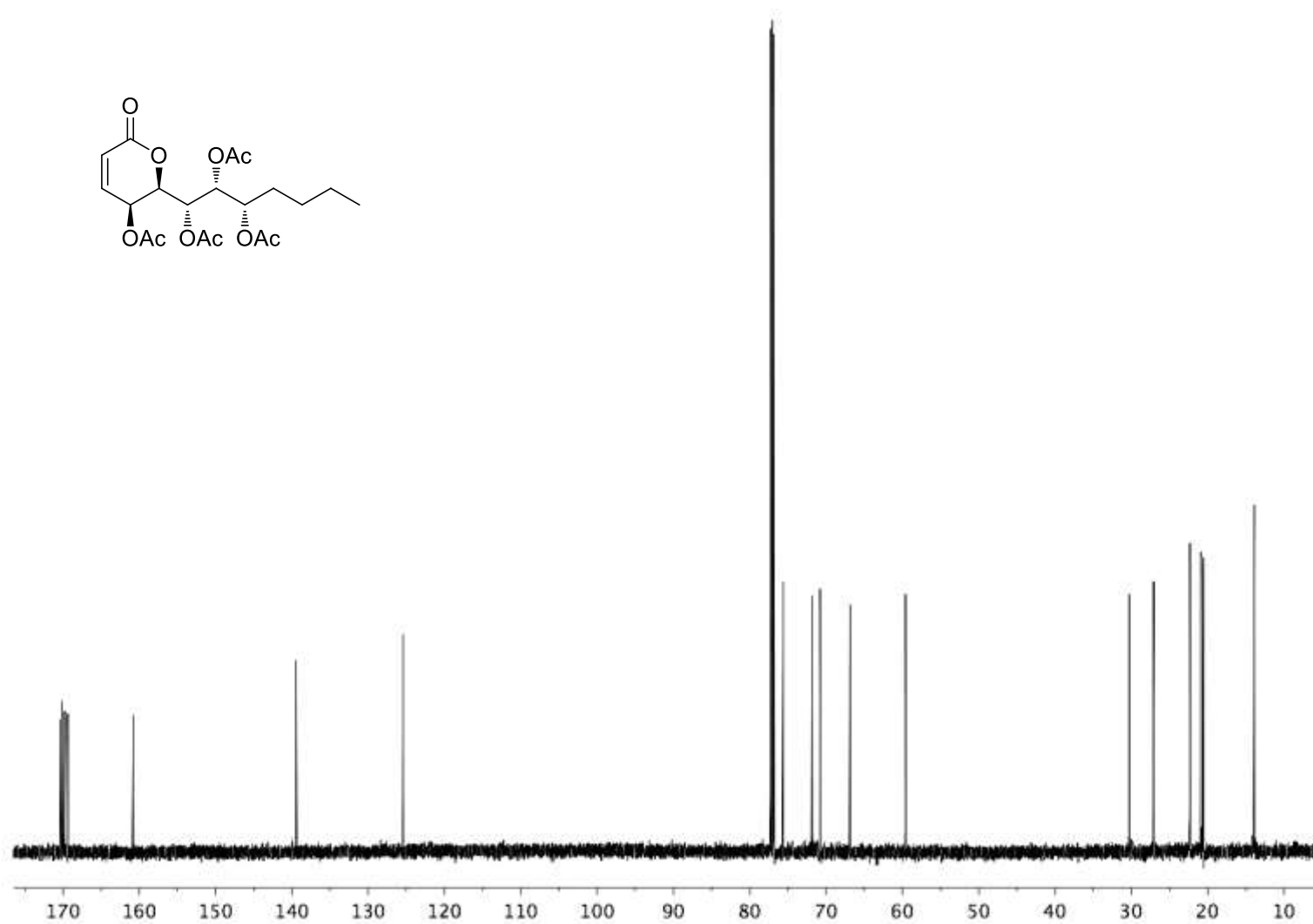
**Figure S27.** <sup>1</sup>H NMR spectra of pectinolide M (**8**) in CDCl<sub>3</sub> (400 MHz).



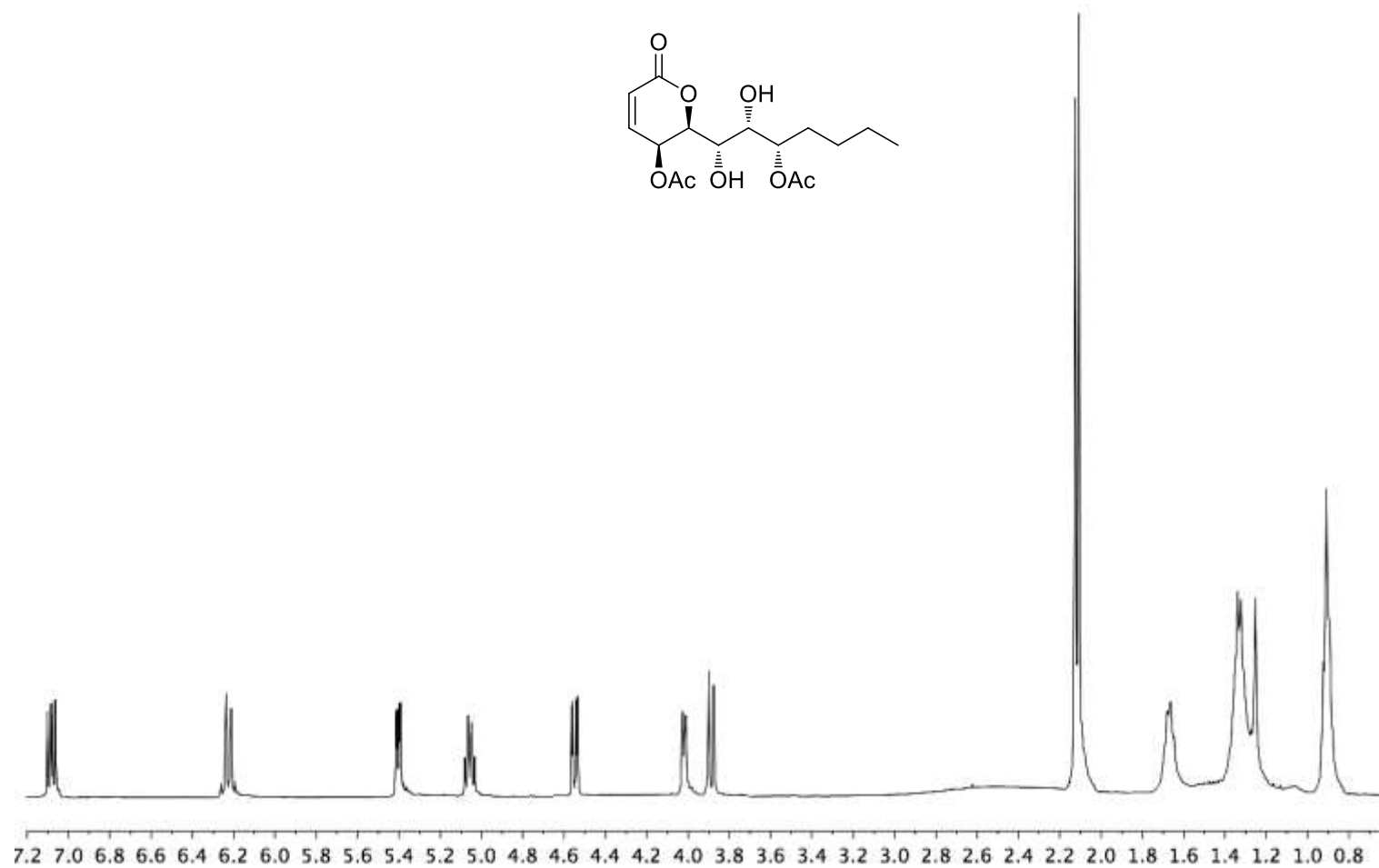
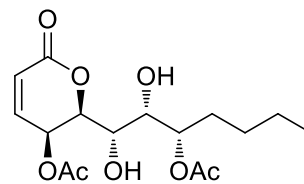
**Figure S28.**  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of pectinolide M (**8**) in  $\text{CDCl}_3$  (100 MHz).



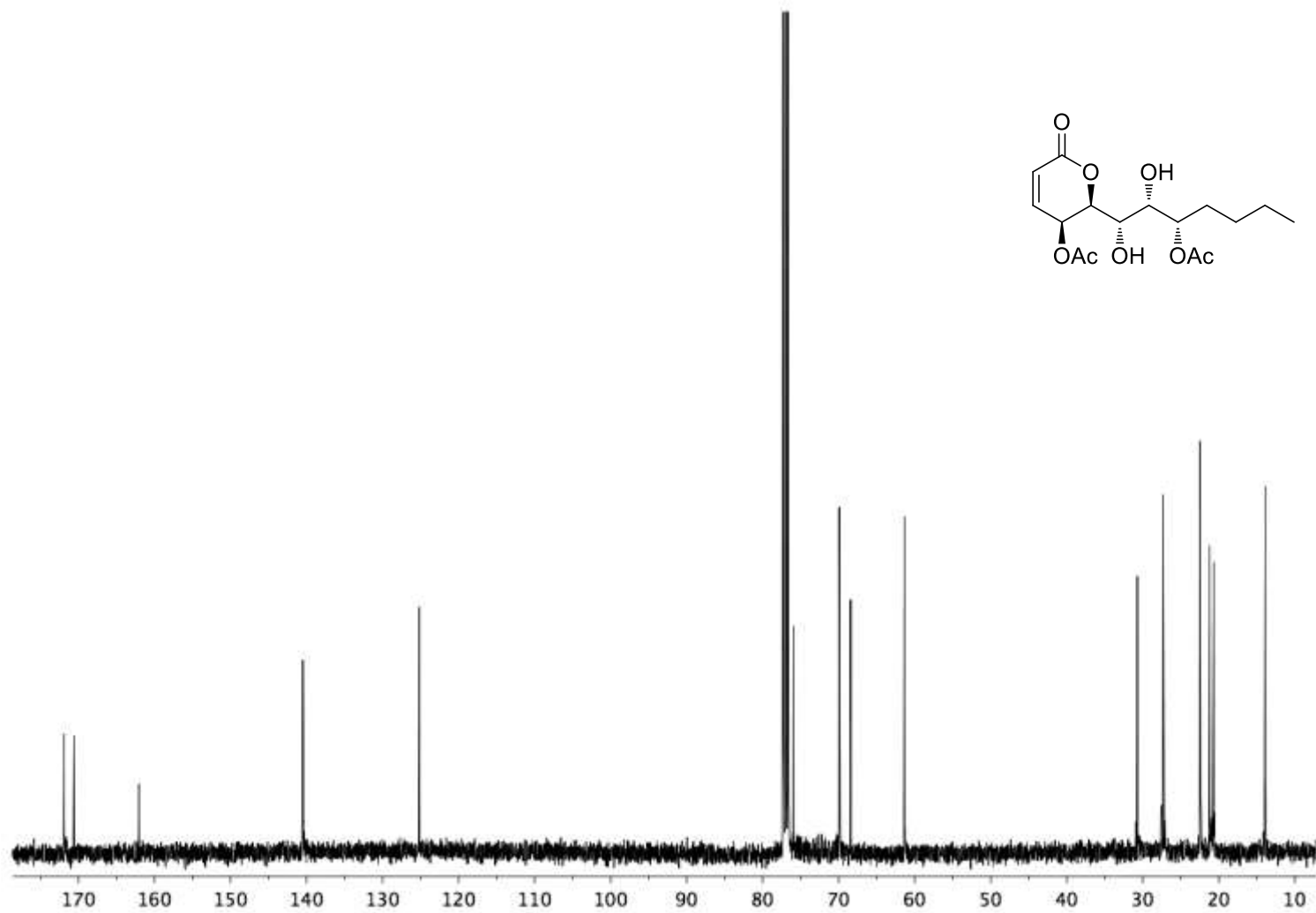
**Figure S29.** <sup>1</sup>H NMR spectra of monticolide A (**9**) in CDCl<sub>3</sub> (400 MHz).



**Figure S30.** <sup>13</sup>C NMR spectra of monticolide A (**9**) in CDCl<sub>3</sub> (100 MHz).

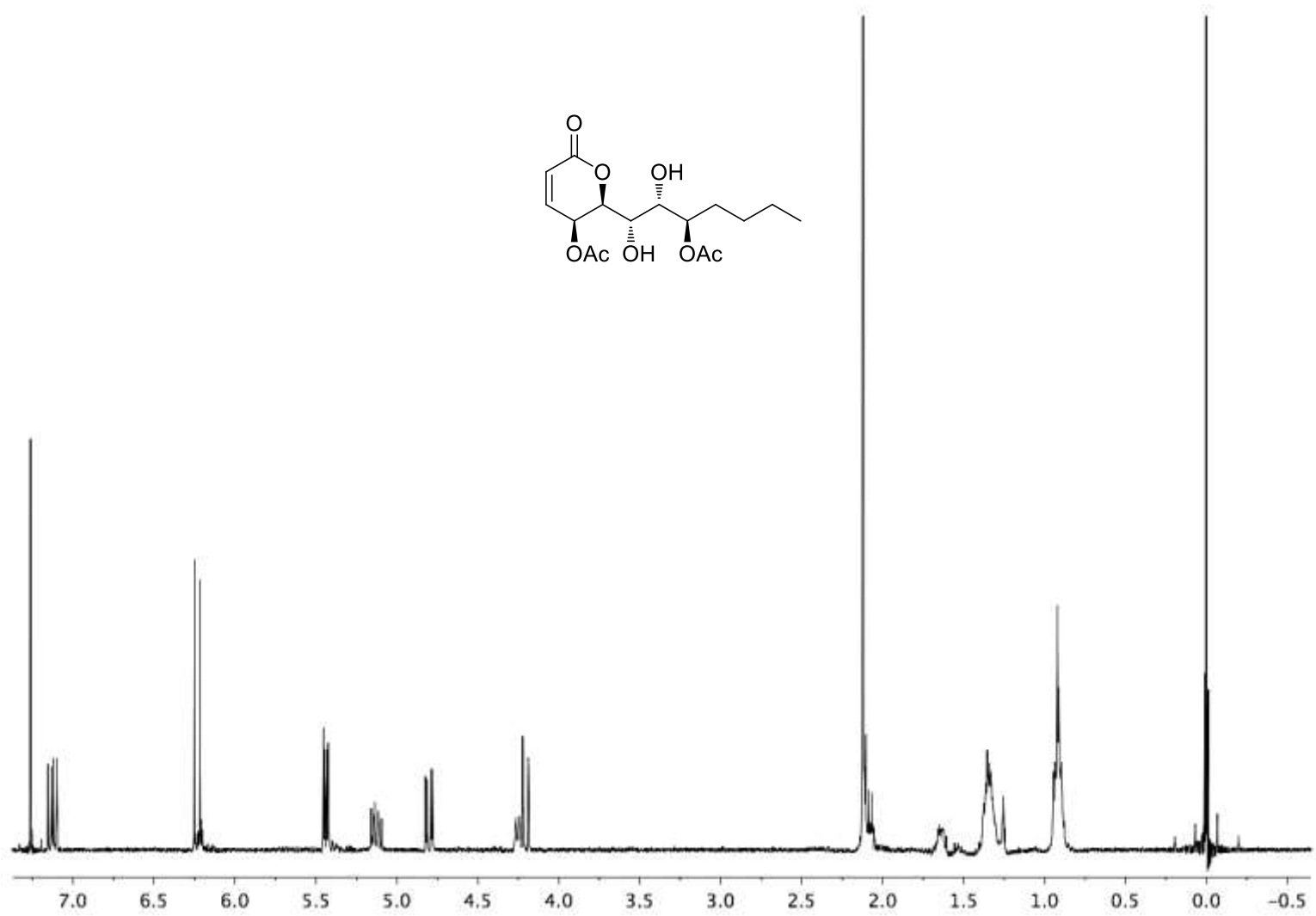


**Figure S31.** <sup>1</sup>H NMR spectra of monticolide B (**10**) in CDCl<sub>3</sub> (400 MHz).

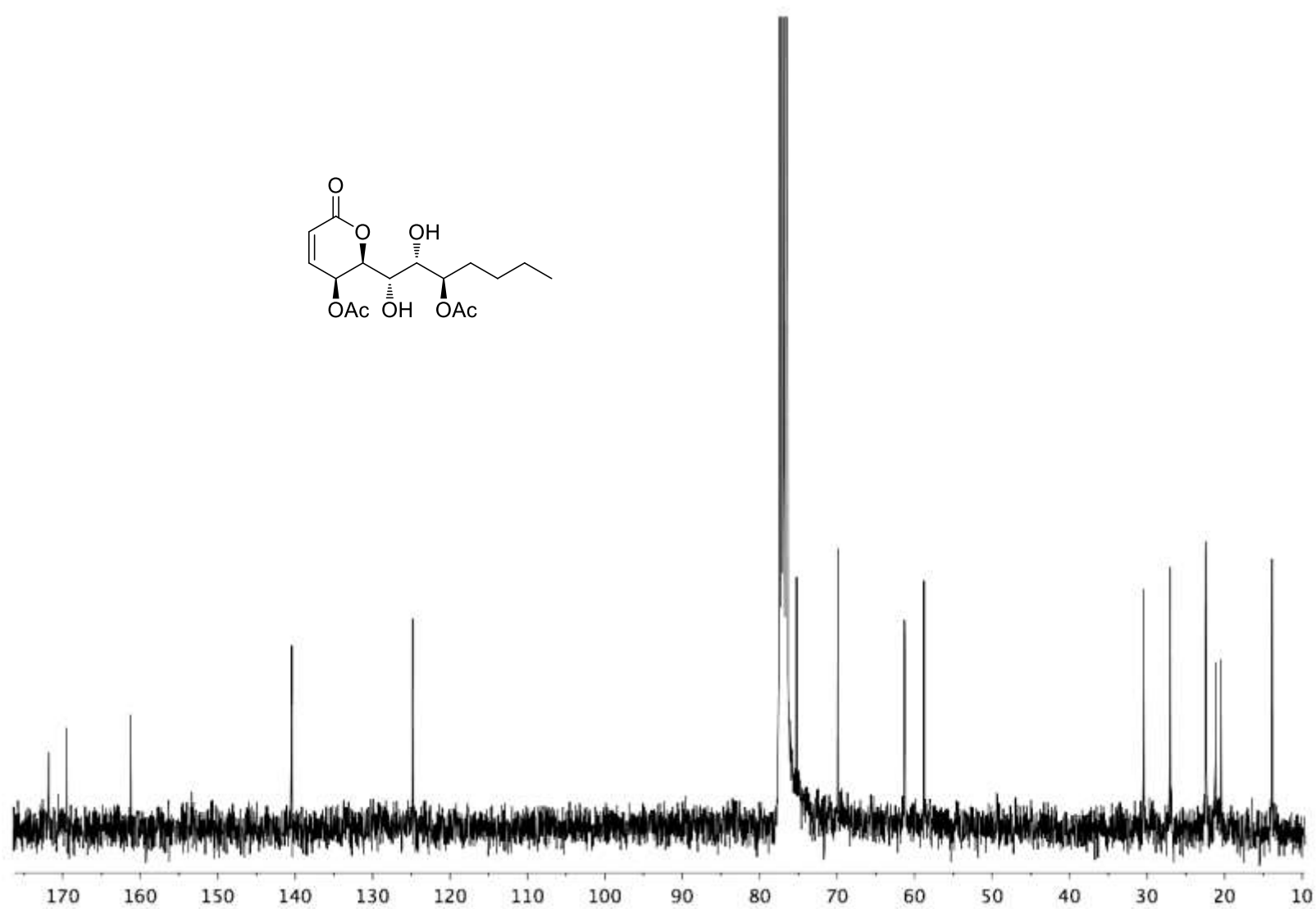


**Figure S32.** <sup>13</sup>C NMR spectra of monticolide B (**10**) in CDCl<sub>3</sub> (100 MHz).

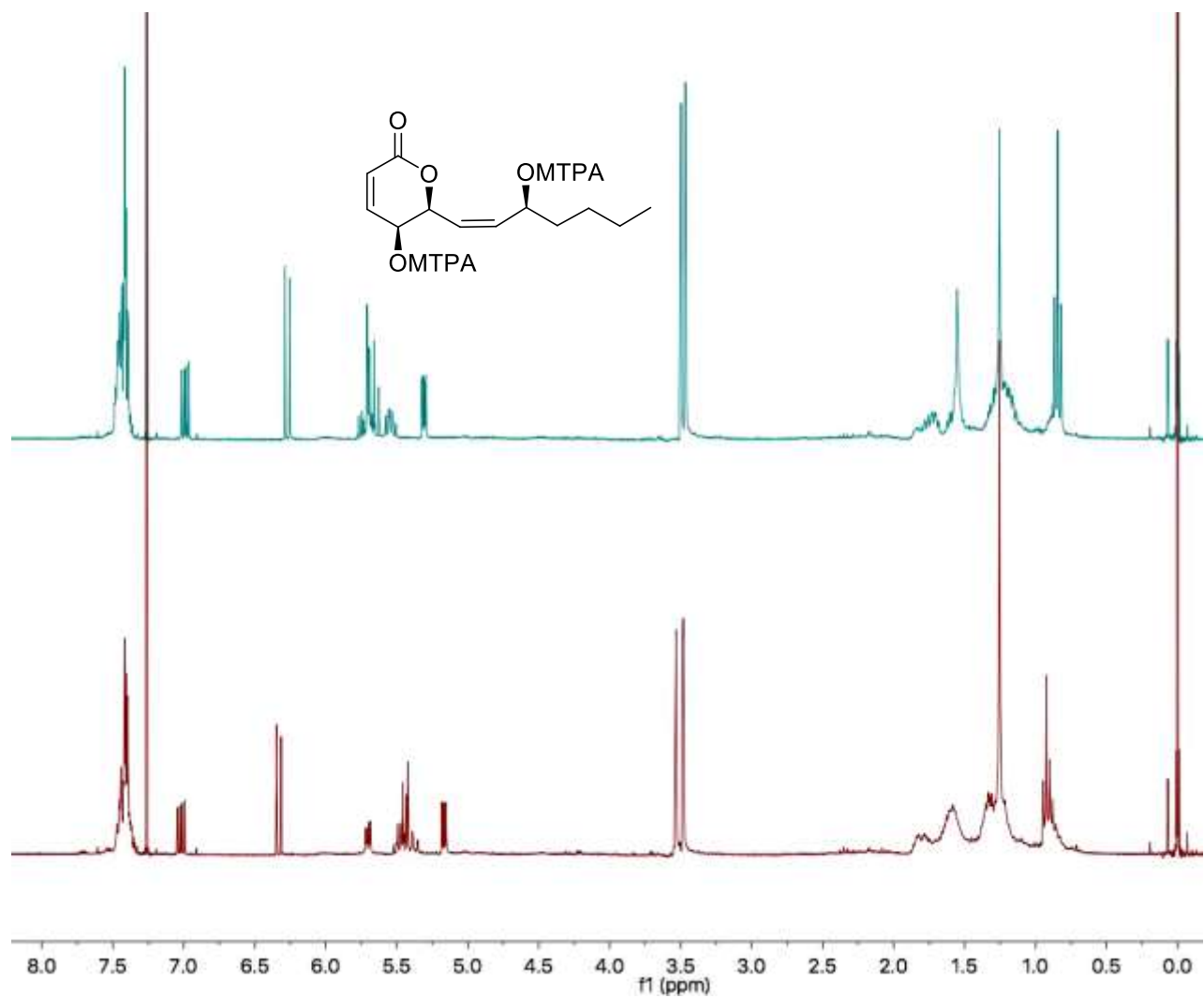




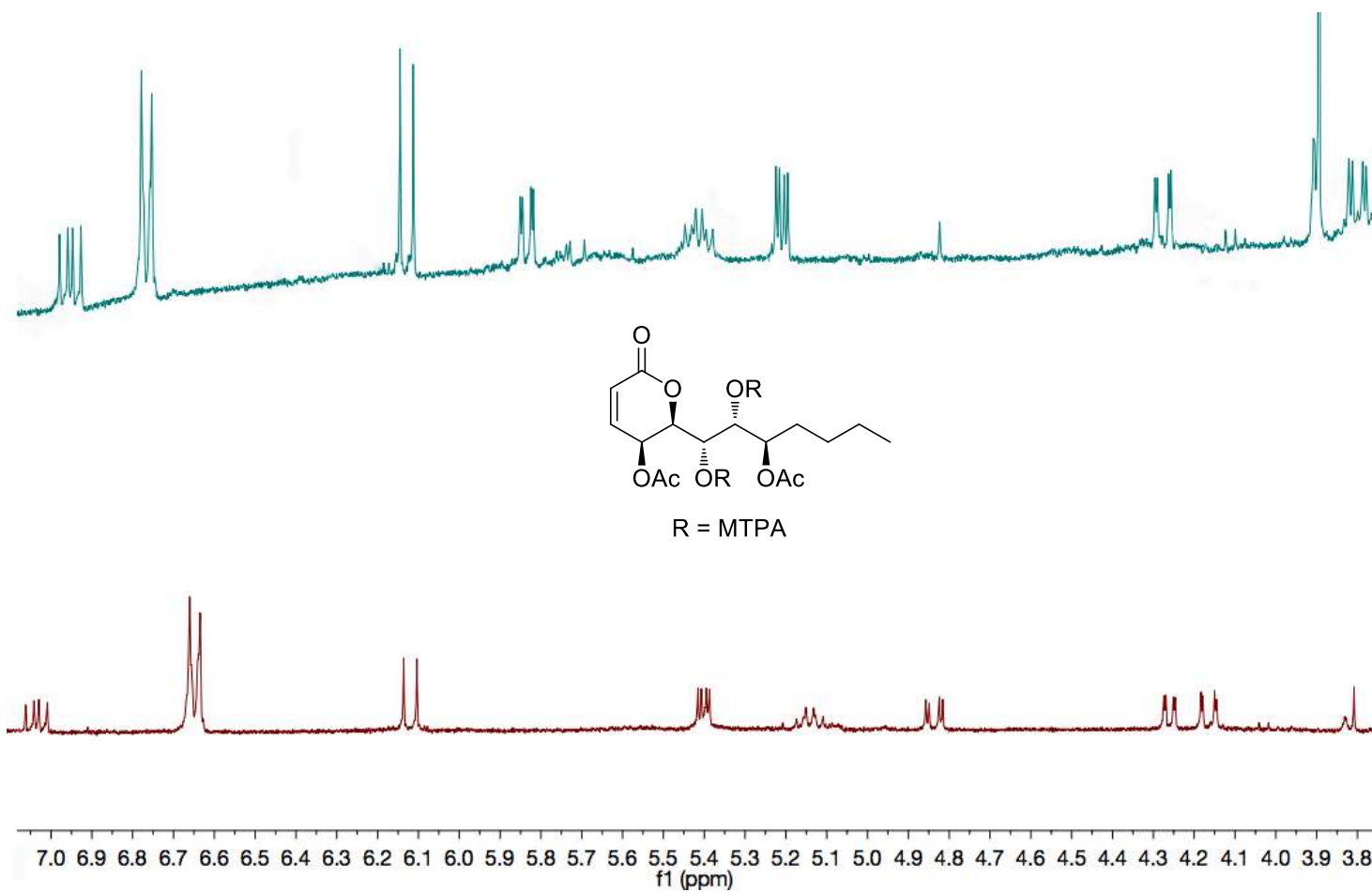
**Figure S33.** <sup>1</sup>H NMR spectra of derivate **14** in CDCl<sub>3</sub> (300 MHz).



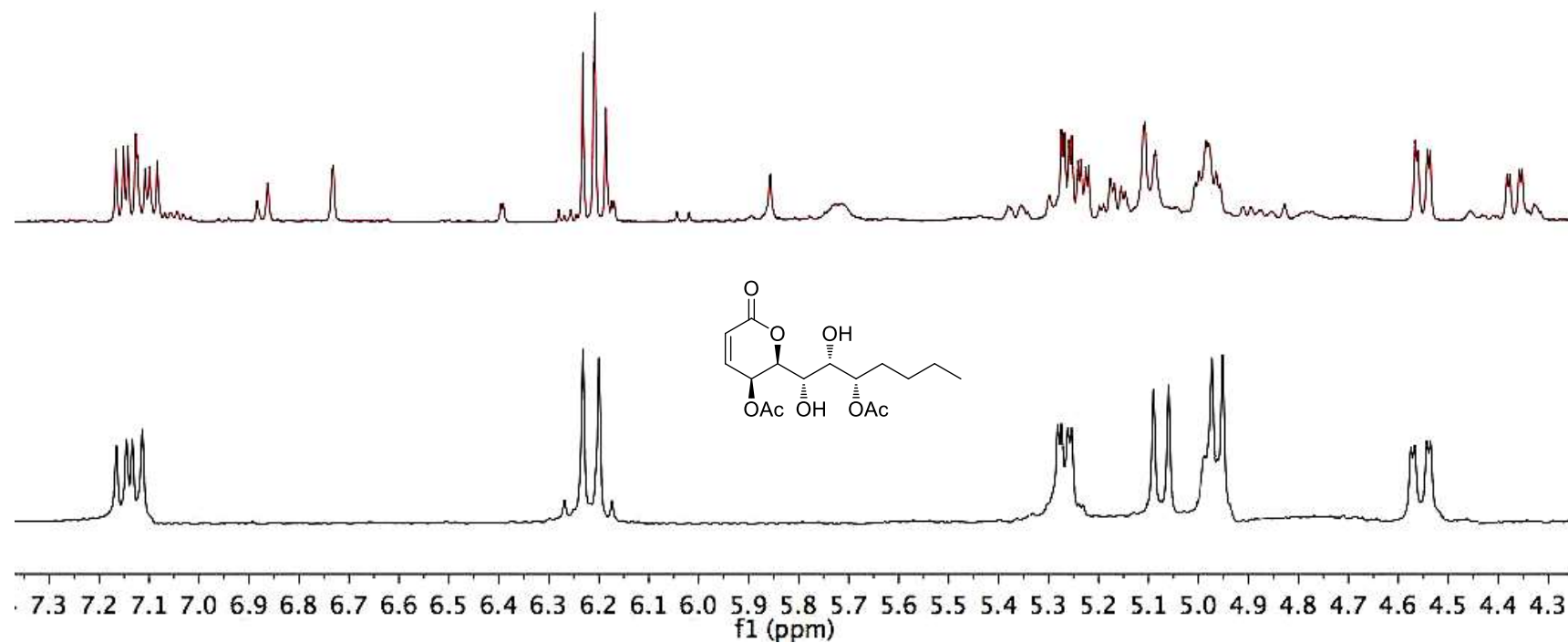
**Figure S34.** <sup>13</sup>C NMR spectra of derivate 14 in CDCl<sub>3</sub> (75 MHz).



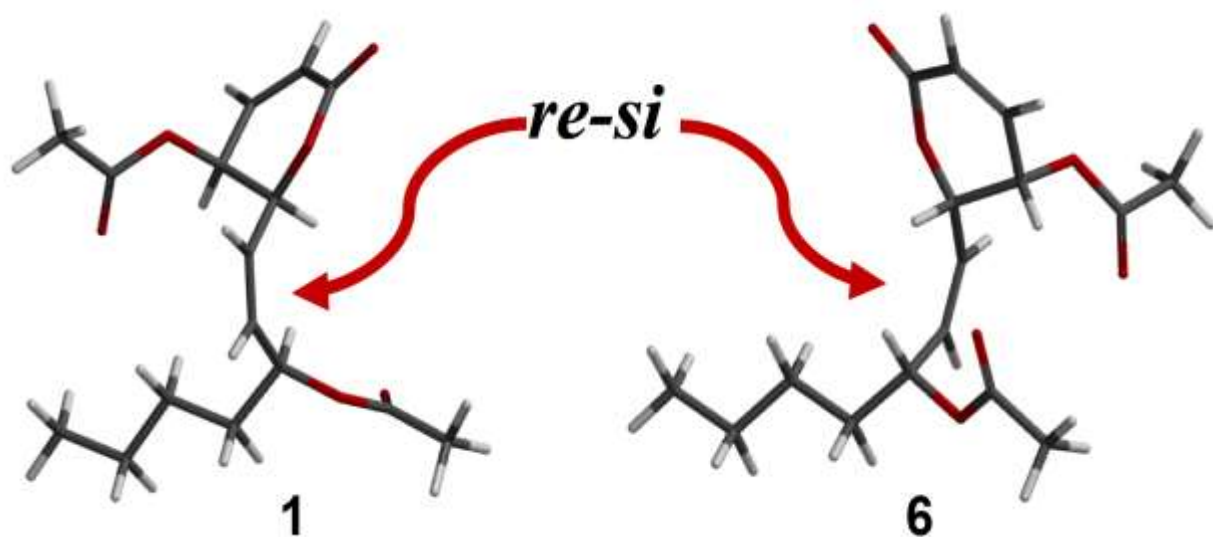
**Figure S35.** <sup>1</sup>H NMR spectra of *R*- (cyan) and *S*-MTPA (red) ester derivatives **11** of compound **4** in CDCl<sub>3</sub> (300 MHz).



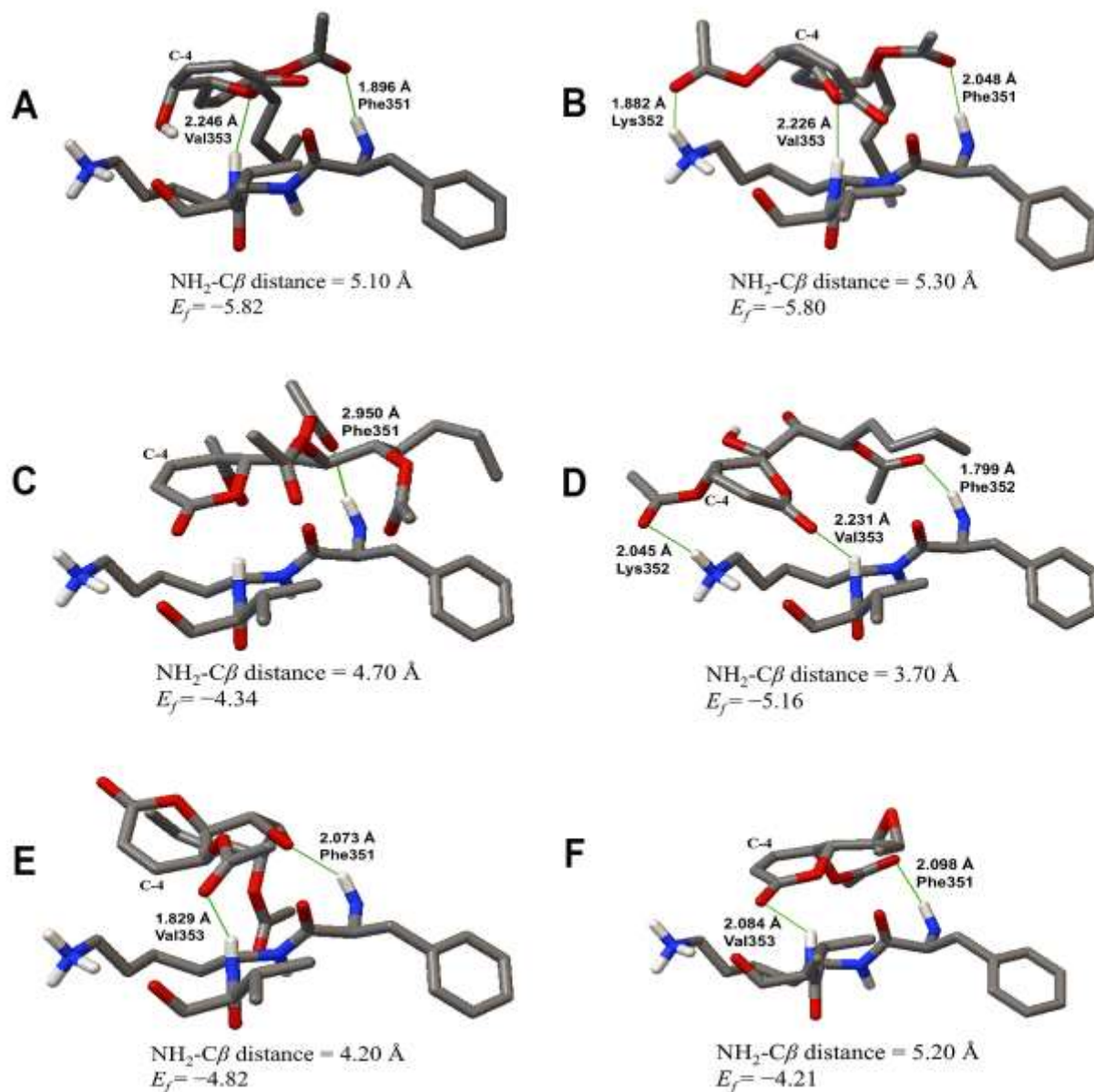
**Figure S36.**  $^1\text{H}$  NMR spectra of *S*- (cyan) and *R*-MTPA (red) ester derivatives (**16**) of compound **14** in  $\text{CDCl}_3$  (300 MHz). The preparation of these derivatives was performed in NMR tubes and  $^1\text{H}$  spectra were recorded directly without purification of reaction mixtures.



**Figure S37.** Comparison of the <sup>1</sup>H NMR spectra (300 MHz in DMSO) for the mixture of 6-heptenyl-5,6-dihydro-2*H*-pyran-2-ones from the analysed fraction of *H. monticola* (red) and monticolide B (**10**; black).



**Figure S38.** The most relevant conformer of pectinolides A (**1**) and K (**6**) modeled in gas phase. Arrows indicate the less hindered face of the side chain double bond for the interaction with epoxidation reagent (*m*CPBA).



**Figure S39.** Complexes between docked compounds (3, 6, 9, 10, 12 and 20) and  $\alpha$ -tubulin (A-F). The distance between the Lys352 amino group and  $\beta$  carbon of the  $\alpha,\beta$ -unsaturated lactone (NH<sub>2</sub>-C $\beta$ ), the docking energy ( $E_f$ ), and the hydrogen bond distances are indicated.

Coordinates for all computed conformers of epimers **3** and **5**

**Structure 3-2** in gas phase

**Structure 3-1** in gas phase

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	6	0	0.000000	0.000000	0.000000
2	6	0	0.000000	0.000000	1.340944
3	6	0	1.256053	0.000000	-0.782036
4	8	0	2.426051	-0.140197	-0.087512
5	8	0	1.300432	0.185669	-1.982145
6	6	0	1.278725	-0.083004	2.140749
7	6	0	2.409922	-0.669048	1.258331
8	1	0	-0.907479	0.098875	-0.588169
9	1	0	-0.926295	0.117811	1.899774
10	1	0	1.134803	-0.793104	2.963482
11	8	0	1.560595	1.154195	2.773048
12	1	0	1.936193	1.789312	2.129555
13	1	0	2.203149	-1.745667	1.170144
14	6	0	3.761507	-0.502906	1.899127
15	6	0	4.797411	0.280570	1.570797
16	1	0	3.870973	-1.119193	2.791342
17	1	0	5.677098	0.226722	2.213749
18	6	0	4.947675	1.244743	0.419835
19	8	0	5.305600	2.562881	0.979001
20	6	0	4.302459	3.364305	1.380807
21	8	0	3.116612	3.071539	1.319400
22	6	0	4.823996	4.672322	1.927254
23	1	0	4.019682	1.360537	-0.131105
24	1	0	5.272264	4.496469	2.910789
25	1	0	3.999760	5.377933	2.030728
26	1	0	5.601581	5.082253	1.278104
27	6	0	6.086757	0.851263	-0.523087
28	6	0	6.240822	1.783307	-1.733170
29	6	0	7.357043	1.341583	-2.691071
30	6	0	7.514804	2.273151	-3.899788
31	1	0	8.319254	1.933815	-4.561706
32	1	0	7.752580	3.296047	-3.584385
33	1	0	8.307973	1.290955	-2.143276
34	1	0	7.151981	0.321407	-3.041990
35	1	0	6.592853	2.315136	-4.491214
36	1	0	5.288918	1.823226	-2.279737
37	1	0	6.444304	2.803461	-1.385050
38	1	0	7.026072	0.806884	0.043815
39	1	0	5.876690	-0.168551	-0.867043

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	6	0	0.000000	0.000000	0.000000
2	6	0	0.000000	0.000000	1.340981
3	6	0	1.256317	0.000000	-0.781689
4	8	0	2.425701	-0.137189	-0.086054
5	8	0	1.301227	0.182508	-1.982343
6	6	0	1.278779	-0.082283	2.140866
7	6	0	2.409487	-0.668051	1.257650
8	1	0	-0.907527	0.098383	-0.588148
9	1	0	-0.926274	0.117667	1.899907
10	1	0	1.135891	-0.791614	2.964370
11	8	0	1.560733	1.156222	2.770509
12	1	0	1.928056	1.790516	2.121262
13	1	0	2.200530	-1.744413	1.168386
14	6	0	3.760949	-0.507080	1.899431
15	6	0	4.809406	0.257561	1.565922
16	1	0	3.860424	-1.114626	2.798976
17	1	0	5.684810	0.196846	2.214620
18	6	0	4.983720	1.218264	0.415010
19	8	0	5.309663	2.542255	0.984047
20	6	0	4.289139	3.332698	1.361179
21	8	0	3.108066	3.029170	1.267266
22	6	0	4.784427	4.643522	1.925379
23	1	0	4.073093	1.321284	-0.166966
24	1	0	5.586014	5.055220	1.307490
25	1	0	5.193283	4.469580	2.926336
26	1	0	3.954460	5.346564	1.995972
27	6	0	6.169058	0.868444	-0.489500
28	6	0	5.969543	-0.432830	-1.280666
29	6	0	7.137637	-0.729177	-2.232396
30	6	0	6.954675	-2.033730	-3.019313
31	1	0	6.044318	-2.004376	-3.629114
32	1	0	6.873687	-2.895178	-2.345841
33	1	0	8.072971	-0.777274	-1.658165
34	1	0	7.254046	0.106714	-2.935056
35	1	0	7.800486	-2.215743	-3.691620
36	1	0	5.845970	-1.272468	-0.585040
37	1	0	5.035749	-0.372461	-1.853938
38	1	0	6.311970	1.704597	-1.184946
39	1	0	7.080955	0.805976	0.118965



### Structure 3-3 in gas phase

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	6	0	0.000000	0.000000	0.000000
2	6	0	0.000000	0.000000	1.340879
3	6	0	1.256464	0.000000	-0.781128
4	8	0	2.425966	-0.147017	-0.088164
5	8	0	1.301031	0.190694	-1.980741
6	6	0	1.278731	-0.082354	2.140223
7	6	0	2.410012	-0.671046	1.259266
8	1	0	-0.907041	0.099943	-0.588603
9	1	0	-0.926208	0.118538	1.899719
10	1	0	1.134898	-0.790056	2.964961
11	8	0	1.561521	1.156748	2.768467
12	1	0	1.932470	1.790088	2.120328
13	1	0	2.203224	-1.747961	1.174413
14	6	0	3.760952	-0.502893	1.901094
15	6	0	4.803144	0.270588	1.568354
16	1	0	3.863763	-1.109191	2.800980
17	1	0	5.678658	0.218850	2.217338
18	6	0	4.967179	1.220383	0.407134
19	8	0	5.301258	2.550779	0.953953
20	6	0	4.286274	3.344645	1.338212
21	8	0	3.103768	3.040145	1.264551
22	6	0	4.787411	4.660279	1.885642
23	1	0	4.047263	1.318004	-0.158426
24	1	0	5.176638	4.499678	2.896721
25	1	0	3.963563	5.372575	1.931662
26	1	0	5.603324	5.053268	1.274631
27	6	0	6.139770	0.825555	-0.495303
28	6	0	6.339850	1.726529	-1.727876
29	6	0	5.218903	1.681439	-2.783579
30	6	0	5.043433	0.318496	-3.467915
31	1	0	5.982142	-0.018211	-3.925812
32	1	0	4.285585	0.375345	-4.255825
33	1	0	5.447029	2.436623	-3.546683
34	1	0	4.263028	1.985682	-2.340380
35	1	0	4.712742	-0.453198	-2.765577
36	1	0	6.478878	2.760426	-1.389656
37	1	0	7.284440	1.434654	-2.206331
38	1	0	7.056660	0.825591	0.107963
39	1	0	5.973054	-0.212019	-0.804263

### Structure 3-4 in gas phase

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	6	0	0.000000	0.000000	0.000000
2	6	0	0.000000	0.000000	1.340894
3	6	0	1.255913	0.000000	-0.782197
4	8	0	2.426202	-0.137586	-0.086520
5	8	0	1.300198	0.185573	-1.982109
6	6	0	1.277544	-0.090134	2.141480
7	6	0	2.409310	-0.672714	1.256830
8	1	0	-0.907347	0.100753	-0.588073
9	1	0	-0.925956	0.119964	1.899830
10	1	0	1.130713	-0.806536	2.958272
11	8	0	1.560236	1.141074	2.785091
12	1	0	1.945585	1.780714	2.152167
13	1	0	2.202261	-1.748904	1.164137
14	6	0	3.759371	-0.507966	1.900792
15	6	0	4.794229	0.280815	1.581499
16	1	0	3.866044	-1.126756	2.791681
17	1	0	5.663876	0.231761	2.235762
18	6	0	4.935066	1.258542	0.439619
19	8	0	5.329162	2.562497	1.009101
20	6	0	4.345793	3.368853	1.449222
21	8	0	3.155304	3.092376	1.409444
22	6	0	4.895665	4.658284	2.011740
23	1	0	3.990224	1.399975	-0.074294
24	1	0	4.091515	5.388838	2.100518
25	1	0	5.702087	5.046443	1.385288
26	1	0	5.310980	4.463577	3.006363
27	6	0	6.013495	0.886214	-0.584653
28	6	0	7.429163	0.655061	-0.036003
29	6	0	8.454894	0.397341	-1.150088
30	6	0	9.872829	0.149326	-0.619609
31	1	0	10.579181	-0.026913	-1.438368
32	1	0	9.903579	-0.726448	0.039457
33	1	0	8.466948	1.254834	-1.836127
34	1	0	8.132512	-0.465603	-1.748136
35	1	0	10.238086	1.008663	-0.044819
36	1	0	7.743337	1.527132	0.551222
37	1	0	7.429493	-0.201245	0.650733
38	1	0	5.659283	-0.014176	-1.101013
39	1	0	6.036612	1.685633	-1.336124

### Structure 3-5 in gas phase

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	6	0	0.000000	0.000000	0.000000
2	6	0	0.000000	0.000000	1.340935
3	6	0	1.256509	0.000000	-0.780664
4	8	0	2.426089	-0.138027	-0.085637
5	8	0	1.301920	0.180569	-1.981816
6	6	0	1.279703	-0.078937	2.139581
7	6	0	2.409068	-0.668564	1.257763
8	1	0	-0.907212	0.097111	-0.588814
9	1	0	-0.926320	0.116654	1.899917
10	1	0	1.137805	-0.783373	2.967464
11	8	0	1.563255	1.163563	2.760338
12	1	0	1.927333	1.791664	2.103019
13	1	0	2.197589	-1.744585	1.169107
14	6	0	3.759300	-0.511448	1.902343
15	6	0	4.820491	0.235962	1.569116
16	1	0	3.845241	-1.107173	2.811214
17	1	0	5.685869	0.171130	2.230715
18	6	0	5.028409	1.182259	0.411673
19	8	0	5.314829	2.519412	0.974703
20	6	0	4.274054	3.299286	1.314015
21	8	0	3.100027	2.979245	1.188891
22	6	0	4.734193	4.621395	1.881842
23	1	0	4.141525	1.267709	-0.207928
24	1	0	5.583720	5.015336	1.319431
25	1	0	5.060863	4.468633	2.916087
26	1	0	3.905103	5.329167	1.873551
27	6	0	6.271824	0.836861	-0.417629
28	6	0	6.152391	-0.452061	-1.249811
29	6	0	5.226748	-0.345017	-2.472365
30	6	0	5.194086	-1.635480	-3.301543
31	1	0	4.530613	-1.531700	-4.166658
32	1	0	4.828516	-2.480034	-2.705161
33	1	0	5.568284	0.484851	-3.106546
34	1	0	4.206911	-0.097680	-2.160633
35	1	0	6.191871	-1.899443	-3.673297
36	1	0	7.159673	-0.722375	-1.593417
37	1	0	5.821639	-1.279522	-0.608306
38	1	0	6.475811	1.685636	-1.081872
39	1	0	7.128587	0.761355	0.264080

### Structure 3-6 in gas phase

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	6	0	0.000000	0.000000	0.000000
2	6	0	0.000000	0.000000	1.341770
3	6	0	1.264324	0.000000	-0.781999
4	8	0	2.423812	-0.191964	-0.086873
5	8	0	1.304793	0.246331	-1.970501
6	6	0	1.298314	-0.095304	2.107616
7	6	0	2.348862	-0.803508	1.236371
8	1	0	-0.906304	0.102809	-0.589279
9	1	0	-0.922542	0.122265	1.905833
10	1	0	1.160397	-0.697834	3.010129
11	8	0	1.700908	1.191580	2.589718
12	1	0	1.766103	1.791798	1.827882
13	1	0	2.038336	-1.843571	1.097869
14	6	0	3.745069	-0.736407	1.793605
15	6	0	4.360739	-1.669084	2.530814
16	1	0	4.282988	0.178532	1.554157
17	1	0	5.383437	-1.471189	2.853633
18	6	0	3.806048	-2.992664	2.995131
19	8	0	4.524369	-4.065897	2.297436
20	6	0	4.002817	-4.490125	1.118667
21	8	0	2.958789	-4.076599	0.647292
22	6	0	4.891071	-5.526526	0.472420
23	1	0	2.748011	-3.092262	2.748000
24	1	0	5.266064	-6.238016	1.211984
25	1	0	5.755803	-5.024140	0.026038
26	1	0	4.336664	-6.042553	-0.311583
27	6	0	4.019187	-3.241362	4.491668
28	6	0	3.200866	-2.297713	5.384579
29	6	0	3.406049	-2.562848	6.883591
30	6	0	2.575587	-1.632775	7.777182
31	1	0	2.745832	-1.845000	8.838282
32	1	0	1.502762	-1.749402	7.583261
33	1	0	4.470586	-2.449966	7.128296
34	1	0	3.151142	-3.607610	7.106174
35	1	0	2.830656	-0.581118	7.602611
36	1	0	3.459317	-1.254874	5.161675
37	1	0	2.133004	-2.406882	5.145287
38	1	0	3.744207	-4.282044	4.701487
39	1	0	5.088079	-3.146175	4.721635

### Structure 3-7 in gas phase

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	6	0	0.000000	0.000000	0.000000
2	6	0	0.000000	0.000000	1.341983
3	6	0	1.263234	0.000000	-0.783266
4	8	0	2.426186	-0.190271	-0.089997
5	8	0	1.302406	0.235872	-1.973485
6	6	0	1.298346	-0.087383	2.108043
7	6	0	2.356764	-0.789149	1.239214
8	1	0	-0.906870	0.099336	-0.589049
9	1	0	-0.922879	0.118084	1.906229
10	1	0	1.164913	-0.691176	3.010394
11	8	0	1.692871	1.202058	2.587903
12	1	0	1.724888	1.810517	1.830524
13	1	0	2.037990	-1.828757	1.114282
14	6	0	3.745333	-0.709034	1.806396
15	6	0	4.470365	-1.715788	2.310138
16	1	0	4.175907	0.289902	1.800520
17	1	0	5.466632	-1.484280	2.687735
18	6	0	4.079564	-3.163352	2.444663
19	8	0	5.109493	-3.912360	1.721792
20	6	0	4.720510	-5.052251	1.093731
21	8	0	3.583654	-5.485990	1.114234
22	6	0	5.883833	-5.688399	0.369483
23	1	0	3.121437	-3.380477	1.970029
24	1	0	6.706189	-5.875393	1.066106
25	1	0	6.256266	-5.007580	-0.401907
26	1	0	5.560268	-6.623383	-0.087529
27	6	0	4.049472	-3.652187	3.901432
28	6	0	2.923750	-3.030260	4.740048
29	6	0	2.889553	-3.563824	6.180195
30	6	0	1.762137	-2.953008	7.022343
31	1	0	1.859743	-1.862960	7.087405
32	1	0	1.770447	-3.348574	8.043799
33	1	0	3.855287	-3.362415	6.662531
34	1	0	2.780230	-4.656044	6.159344
35	1	0	0.778805	-3.173019	6.590094
36	1	0	3.033874	-1.938415	4.762593
37	1	0	1.956841	-3.237328	4.259069
38	1	0	3.929059	-4.741198	3.882221
39	1	0	5.022871	-3.444445	4.363792

### Structure 3-8 in gas phase

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	6	0	0.000000	0.000000	0.000000
2	6	0	0.000000	0.000000	1.340952
3	6	0	1.255833	0.000000	-0.782368
4	8	0	2.426588	-0.136252	-0.087271
5	8	0	1.299451	0.183733	-1.982637
6	6	0	1.277828	-0.087579	2.141394
7	6	0	2.410719	-0.668278	1.257105
8	1	0	-0.907409	0.099710	-0.588136
9	1	0	-0.926170	0.118580	1.899843
10	1	0	1.132564	-0.803750	2.958614
11	8	0	1.558189	1.144564	2.784032
12	1	0	1.939385	1.785266	2.149423
13	1	0	2.207371	-1.745318	1.166523
14	6	0	3.759155	-0.496797	1.902857
15	6	0	4.790496	0.297733	1.586284
16	1	0	3.866457	-1.113831	2.794896
17	1	0	5.657606	0.254227	2.244192
18	6	0	4.928525	1.274581	0.443410
19	8	0	5.304359	2.585040	1.011011
20	6	0	4.309958	3.388057	1.431662
21	8	0	3.122284	3.099536	1.387918
22	6	0	4.843713	4.692808	1.974127
23	1	0	3.985304	1.404333	-0.076707
24	1	0	5.618314	5.098376	1.318829
25	1	0	5.298532	4.513962	2.954162
26	1	0	4.024470	5.403154	2.084984
27	6	0	6.017325	0.915070	-0.575241
28	6	0	7.427063	0.678852	-0.010288
29	6	0	8.490197	0.409097	-1.091492
30	6	0	8.816150	1.613710	-1.986584
31	1	0	7.953689	1.933568	-2.580610
32	1	0	9.622123	1.371468	-2.688001
33	1	0	8.167497	-0.435053	-1.715924
34	1	0	9.411801	0.081839	-0.593663
35	1	0	9.143879	2.471878	-1.387517
36	1	0	7.733483	1.545831	0.588966
37	1	0	7.404709	-0.180227	0.671305
38	1	0	5.672768	0.016298	-1.101489
39	1	0	6.035254	1.721906	-1.316606

### Structure 3-9 in gas phase

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	6	0	0.000000	0.000000	0.000000
2	6	0	0.000000	0.000000	1.340127
3	6	0	1.263828	0.000000	-0.778624
4	8	0	2.418611	-0.283677	-0.102362
5	8	0	1.320187	0.282130	-1.959148
6	6	0	1.306152	-0.079459	2.097446
7	6	0	2.313584	-0.859600	1.223013
8	1	0	-0.905441	0.105564	-0.589887
9	1	0	-0.921027	0.124620	1.905137
10	1	0	1.163975	-0.663840	3.020297
11	8	0	1.675540	1.256890	2.387757
12	1	0	2.498038	1.296853	2.919037
13	1	0	1.901316	-1.871590	1.108227
14	6	0	3.687642	-0.994561	1.829328
15	6	0	4.724563	-0.149616	1.763953
16	1	0	3.828228	-1.910978	2.400541
17	1	0	5.641082	-0.442790	2.274979
18	6	0	4.806143	1.180553	1.053647
19	8	0	5.639603	2.091046	1.859201
20	6	0	5.172518	2.508932	3.049638
21	8	0	4.105141	2.165251	3.536371
22	6	0	6.132572	3.470413	3.710164
23	1	0	3.817576	1.632090	0.961075
24	1	0	6.170988	4.399827	3.133200
25	1	0	7.142892	3.052913	3.725952
26	1	0	5.794347	3.685093	4.723650
27	6	0	5.466748	1.122366	-0.330025
28	6	0	6.861892	0.483172	-0.376330
29	6	0	7.484962	0.534163	-1.779627
30	6	0	8.871377	-0.119062	-1.846374
31	1	0	8.825733	-1.177529	-1.563855
32	1	0	9.576708	0.374567	-1.167181
33	1	0	7.558404	1.580354	-2.105592
34	1	0	6.812770	0.039655	-2.493203
35	1	0	9.289461	-0.063353	-2.857510
36	1	0	7.526914	0.991974	0.333258
37	1	0	6.800096	-0.564259	-0.053082
38	1	0	4.777690	0.577374	-0.982784
39	1	0	5.516964	2.150808	-0.709253

### Structure 3-10 in gas phase

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	6	0	0.000000	0.000000	0.000000
2	6	0	0.000000	0.000000	1.341873
3	6	0	1.263217	0.000000	-0.782979
4	8	0	2.425731	-0.192494	-0.089820
5	8	0	1.302918	0.238510	-1.972665
6	6	0	1.298393	-0.086814	2.107658
7	6	0	2.354977	-0.792904	1.239673
8	1	0	-0.906853	0.099241	-0.589039
9	1	0	-0.922839	0.117987	1.906144
10	1	0	1.163674	-0.687413	3.011988
11	8	0	1.695776	1.202868	2.584263
12	1	0	1.729326	1.809552	1.825529
13	1	0	2.033871	-1.831326	1.111896
14	6	0	3.744895	-0.714716	1.804644
15	6	0	4.489700	-1.729122	2.262932
16	1	0	4.162677	0.289428	1.829722
17	1	0	5.487654	-1.495019	2.634930
18	6	0	4.123828	-3.188659	2.336676
19	8	0	5.060295	-3.880348	1.446447
20	6	0	4.558521	-4.861721	0.651921
21	8	0	3.393009	-5.211953	0.653318
22	6	0	5.639811	-5.439914	-0.230688
23	1	0	3.119398	-3.381593	1.963703
24	1	0	5.998292	-4.671160	-0.922217
25	1	0	5.237829	-6.281854	-0.794043
26	1	0	6.492937	-5.761672	0.373097
27	6	0	4.292182	-3.782510	3.744214
28	6	0	3.337141	-3.214169	4.808110
29	6	0	1.860359	-3.597364	4.619923
30	6	0	0.961076	-3.065116	5.743436
31	1	0	-0.083892	-3.355882	5.589804
32	1	0	0.998956	-1.970601	5.800993
33	1	0	1.490777	-3.225296	3.655416
34	1	0	1.775388	-4.690577	4.568565
35	1	0	1.274285	-3.455496	6.718801
36	1	0	3.668865	-3.581129	5.787979
37	1	0	3.432849	-2.121185	4.849186
38	1	0	4.151248	-4.867314	3.666736
39	1	0	5.330689	-3.619962	4.058200

### Structure 3-11 in gas phase

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	6	0	0.000000	0.000000	0.000000
2	6	0	0.000000	0.000000	1.340913
3	6	0	1.256849	0.000000	-0.780303
4	8	0	2.425612	-0.142492	-0.085133
5	8	0	1.303245	0.183889	-1.980885
6	6	0	1.280430	-0.077874	2.138690
7	6	0	2.406992	-0.673846	1.257801
8	1	0	-0.907045	0.097598	-0.588995
9	1	0	-0.926221	0.116767	1.900015
10	1	0	1.138443	-0.777334	2.970721
11	8	0	1.568717	1.167919	2.750702
12	1	0	1.934506	1.788264	2.086971
13	1	0	2.189467	-1.748806	1.169406
14	6	0	3.758022	-0.524603	1.902502
15	6	0	4.828362	0.208471	1.566322
16	1	0	3.836583	-1.114659	2.815808
17	1	0	5.690886	0.139171	2.231235
18	6	0	5.049978	1.144731	0.403103
19	8	0	5.327292	2.488337	0.957118
20	6	0	4.282970	3.270214	1.280065
21	8	0	3.110334	2.948349	1.147107
22	6	0	4.737676	4.597749	1.839778
23	1	0	4.170658	1.222465	-0.228422
24	1	0	5.578662	4.996122	1.267543
25	1	0	5.076371	4.451442	2.871022
26	1	0	3.903282	5.299236	1.836240
27	6	0	6.306091	0.798323	-0.406374
28	6	0	6.217988	-0.514239	-1.206200
29	6	0	5.238783	-0.519303	-2.396170
30	6	0	5.582991	0.482827	-3.507670
31	1	0	5.506270	1.520967	-3.166204
32	1	0	4.895558	0.372024	-4.352883
33	1	0	4.214969	-0.343180	-2.050724
34	1	0	5.240091	-1.530524	-2.823229
35	1	0	6.602888	0.330121	-3.882590
36	1	0	7.225867	-0.740392	-1.579327
37	1	0	5.957595	-1.333904	-0.524635
38	1	0	6.511154	1.638983	-1.077973
39	1	0	7.155989	0.744722	0.286022

### Structure 3-12 in gas phase

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	6	0	0.000000	0.000000	0.000000
2	6	0	0.000000	0.000000	1.341895
3	6	0	1.264399	0.000000	-0.781903
4	8	0	2.423252	-0.194558	-0.086728
5	8	0	1.305509	0.248433	-1.969965
6	6	0	1.298935	-0.095681	2.107285
7	6	0	2.346313	-0.807939	1.235770
8	1	0	-0.906331	0.103432	-0.589163
9	1	0	-0.922373	0.122503	1.906111
10	1	0	1.160628	-0.695709	3.011465
11	8	0	1.704539	1.191541	2.585671
12	1	0	1.770892	1.789232	1.821960
13	1	0	2.030341	-1.846098	1.096325
14	6	0	3.743910	-0.749291	1.790041
15	6	0	4.359548	-1.687538	2.520347
16	1	0	4.285460	0.163758	1.551508
17	1	0	5.384908	-1.494143	2.837364
18	6	0	3.802667	-3.010788	2.983919
19	8	0	4.491730	-4.084817	2.257588
20	6	0	3.930248	-4.503786	1.095839
21	8	0	2.874004	-4.083745	0.658289
22	6	0	4.791036	-5.544788	0.420336
23	1	0	2.737659	-3.096337	2.763374
24	1	0	4.212338	-6.047984	-0.354369
25	1	0	5.174193	-6.266673	1.145553
26	1	0	5.651525	-5.049254	-0.041534
27	6	0	4.054406	-3.278551	4.470890
28	6	0	3.281113	-2.323120	5.393192
29	6	0	3.438895	-2.632842	6.892676
30	6	0	4.857886	-2.429226	7.442926
31	1	0	5.578805	-3.118232	6.990335
32	1	0	4.883901	-2.596472	8.525227
33	1	0	3.115368	-3.664395	7.086892
34	1	0	2.747925	-1.988169	7.450002
35	1	0	5.210743	-1.407669	7.257081
36	1	0	3.591203	-1.287867	5.202286
37	1	0	2.213151	-2.373798	5.138826
38	1	0	3.757543	-4.313734	4.680133
39	1	0	5.131910	-3.214539	4.661072

### Structure 3-13 in gas phase

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	6	0	0.000000	0.000000	0.000000
2	6	0	0.000000	0.000000	1.341815
3	6	0	1.264756	0.000000	-0.781498
4	8	0	2.423691	-0.192368	-0.085834
5	8	0	1.305957	0.246814	-1.969891
6	6	0	1.298272	-0.094577	2.107913
7	6	0	2.348032	-0.804647	1.237831
8	1	0	-0.906181	0.103100	-0.589386
9	1	0	-0.922668	0.121770	1.905746
10	1	0	1.159229	-0.695442	3.011399
11	8	0	1.701905	1.192849	2.588204
12	1	0	1.763239	1.792970	1.825986
13	1	0	2.037363	-1.844214	1.099006
14	6	0	3.744472	-0.735976	1.792661
15	6	0	4.391564	-1.690488	2.473567
16	1	0	4.260285	0.201856	1.596913
17	1	0	5.412859	-1.479688	2.792622
18	6	0	3.884352	-3.055412	2.871828
19	8	0	4.571873	-4.061857	2.052561
20	6	0	3.967721	-4.440983	0.898653
21	8	0	2.877707	-4.037412	0.534338
22	6	0	4.828102	-5.415509	0.129927
23	1	0	2.816044	-3.158134	2.682885
24	1	0	5.258631	-6.166823	0.796400
25	1	0	5.656340	-4.869891	-0.334317
26	1	0	4.232172	-5.889776	-0.649900
27	6	0	4.220037	-3.409099	4.325851
28	6	0	3.504565	-2.543237	5.377747
29	6	0	1.996858	-2.809694	5.512270
30	6	0	1.337328	-1.964851	6.610252
31	1	0	1.449471	-0.893144	6.408963
32	1	0	1.788383	-2.166231	7.588925
33	1	0	1.837759	-3.875452	5.724704
34	1	0	1.489552	-2.615202	4.558110
35	1	0	0.265914	-2.179573	6.688297
36	1	0	3.978395	-2.732955	6.349459
37	1	0	3.672833	-1.479977	5.162942
38	1	0	3.969962	-4.465386	4.482905
39	1	0	5.305980	-3.323177	4.454593

### Structure 3-14 in gas phase

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	6	0	0.000000	0.000000	0.000000
2	6	0	0.000000	0.000000	1.341999
3	6	0	1.263420	0.000000	-0.783008
4	8	0	2.426335	-0.191278	-0.090041
5	8	0	1.302364	0.236274	-1.973125
6	6	0	1.298691	-0.085676	2.107443
7	6	0	2.357428	-0.788750	1.239154
8	1	0	-0.906720	0.099468	-0.589205
9	1	0	-0.922896	0.118158	1.906201
10	1	0	1.165661	-0.687962	3.011124
11	8	0	1.692673	1.203861	2.585978
12	1	0	1.724345	1.812196	1.828511
13	1	0	2.035471	-1.828578	1.115783
14	6	0	3.744285	-0.714562	1.810155
15	6	0	4.435867	-1.719615	2.362324
16	1	0	4.196496	0.273896	1.774945
17	1	0	5.429829	-1.502040	2.749433
18	6	0	3.986137	-3.146976	2.539462
19	8	0	5.161915	-3.966154	2.247441
20	6	0	4.945796	-5.181918	1.680574
21	8	0	3.842218	-5.629666	1.432591
22	6	0	6.254749	-5.879569	1.392274
23	1	0	3.215924	-3.416625	1.814034
24	1	0	6.886690	-5.893426	2.284500
25	1	0	6.796984	-5.332583	0.614502
26	1	0	6.057604	-6.896371	1.053053
27	6	0	3.458417	-3.473875	3.948754
28	6	0	4.432163	-3.199678	5.103758
29	6	0	3.860044	-3.613453	6.467756
30	6	0	4.822727	-3.343454	7.631303
31	1	0	4.386506	-3.650749	8.588060
32	1	0	5.068482	-2.277577	7.705217
33	1	0	3.604981	-4.681425	6.445444
34	1	0	2.916822	-3.078725	6.643856
35	1	0	5.763488	-3.891787	7.503487
36	1	0	5.371457	-3.738227	4.925404
37	1	0	4.686593	-2.132239	5.130913
38	1	0	2.539555	-2.890313	4.095780
39	1	0	3.158095	-4.528266	3.951368

### Structure 3-1 in CHCl<sub>3</sub> solution

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	6	0	0.000000	0.000000	0.000000
2	6	0	0.000000	0.000000	1.341328
3	6	0	1.257326	0.000000	-0.774550
4	8	0	2.423720	-0.149828	-0.088039
5	8	0	1.306410	0.193465	-1.979241
6	6	0	1.279694	-0.082219	2.138638
7	6	0	2.405704	-0.680955	1.263601
8	1	0	-0.909056	0.094773	-0.585985
9	1	0	-0.927771	0.110216	1.898397
10	1	0	1.134450	-0.778782	2.970747
11	8	0	1.570431	1.170765	2.748629
12	1	0	1.976064	1.781013	2.098429
13	1	0	2.187421	-1.753141	1.172987
14	6	0	3.759326	-0.528483	1.902865
15	6	0	4.796173	0.260894	1.589997
16	1	0	3.869721	-1.166696	2.778918
17	1	0	5.676979	0.189376	2.229172
18	6	0	4.949129	1.244696	0.456163
19	8	0	5.326185	2.548518	1.036727
20	6	0	4.342327	3.372682	1.433949
21	8	0	3.147718	3.105168	1.361315
22	6	0	4.889286	4.666403	1.984444
23	1	0	4.019516	1.383218	-0.086992
24	1	0	5.387147	4.469800	2.939409
25	1	0	4.074685	5.373056	2.140994
26	1	0	5.633486	5.088645	1.304627
27	6	0	6.078428	0.855640	-0.500906
28	6	0	6.240168	1.809754	-1.692697
29	6	0	7.345632	1.370174	-2.664039
30	6	0	7.509791	2.321627	-3.856409
31	1	0	8.307268	1.983872	-4.527694
32	1	0	7.761603	3.335403	-3.522809
33	1	0	8.298027	1.297759	-2.121623
34	1	0	7.124622	0.359459	-3.032002
35	1	0	6.585523	2.385288	-4.442603
36	1	0	5.286746	1.874503	-2.234443
37	1	0	6.460550	2.819935	-1.326485
38	1	0	7.018993	0.786610	0.060821
39	1	0	5.853940	-0.154094	-0.864779

### Structure 3-2 in CHCl<sub>3</sub> solution

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	6	0	0.000000	0.000000	0.000000
2	6	0	0.000000	0.000000	1.341430
3	6	0	1.257777	0.000000	-0.774283
4	8	0	2.423169	-0.152898	-0.087087
5	8	0	1.307170	0.195534	-1.978638
6	6	0	1.280440	-0.082198	2.137812
7	6	0	2.402402	-0.686941	1.261764
8	1	0	-0.908955	0.095625	-0.585981
9	1	0	-0.927513	0.111189	1.898693
10	1	0	1.135356	-0.773840	2.973911
11	8	0	1.576209	1.173681	2.739552
12	1	0	1.973440	1.778453	2.078911
13	1	0	2.175653	-1.757694	1.169992
14	6	0	3.755605	-0.549281	1.904409
15	6	0	4.817370	0.204295	1.586298
16	1	0	3.844090	-1.172870	2.793638
17	1	0	5.687930	0.118315	2.238161
18	6	0	5.017791	1.171345	0.445327
19	8	0	5.346457	2.490499	1.027306
20	6	0	4.335907	3.304593	1.372949
21	8	0	3.149193	3.021561	1.248127
22	6	0	4.841539	4.608219	1.939849
23	1	0	4.119112	1.287508	-0.152767
24	1	0	5.631910	5.022567	1.309349
25	1	0	5.269475	4.425951	2.931003
26	1	0	4.016687	5.314785	2.028950
27	6	0	6.219453	0.818081	-0.436795
28	6	0	6.032142	-0.478463	-1.238088
29	6	0	7.233183	-0.790581	-2.142679
30	6	0	7.060600	-2.088918	-2.942212
31	1	0	6.178680	-2.039972	-3.591658
32	1	0	6.934119	-2.950496	-2.275848
33	1	0	8.141786	-0.857818	-1.529265
34	1	0	7.392541	0.046192	-2.835575
35	1	0	7.931953	-2.284008	-3.577338
36	1	0	5.868613	-1.318099	-0.550913
37	1	0	5.124739	-0.401457	-1.850915
38	1	0	6.382879	1.655600	-1.125757
39	1	0	7.115824	0.744849	0.192628

### Structure 3-3 in CHCl<sub>3</sub> solution

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	6	0	0.000000	0.000000	0.000000
2	6	0	0.000000	0.000000	1.342215
3	6	0	1.261132	0.000000	-0.777824
4	8	0	2.423350	-0.190539	-0.095471
5	8	0	1.305563	0.230595	-1.975441
6	6	0	1.294289	-0.082056	2.113496
7	6	0	2.367910	-0.766738	1.250790
8	1	0	-0.909245	0.095126	-0.585574
9	1	0	-0.924653	0.111009	1.903912
10	1	0	1.158927	-0.701475	3.004308
11	8	0	1.667178	1.206795	2.616681
12	1	0	1.677541	1.838289	1.877089
13	1	0	2.071614	-1.813052	1.137282
14	6	0	3.756938	-0.643985	1.808474
15	6	0	4.513283	-1.626313	2.315556
16	1	0	4.160705	0.366102	1.794725
17	1	0	5.502542	-1.361840	2.689517
18	6	0	4.162712	-3.082627	2.466707
19	8	0	5.207750	-3.808623	1.733846
20	6	0	4.859274	-4.963615	1.119266
21	8	0	3.733052	-5.434431	1.142904
22	6	0	6.041946	-5.575986	0.408646
23	1	0	3.206123	-3.328982	2.004910
24	1	0	6.837042	-5.793023	1.128035
25	1	0	6.444452	-4.870260	-0.323578
26	1	0	5.735185	-6.494600	-0.090973
27	6	0	4.171160	-3.558720	3.927455
28	6	0	3.046608	-2.954840	4.780766
29	6	0	3.054126	-3.476300	6.225651
30	6	0	1.931890	-2.880517	7.085428
31	1	0	2.010225	-1.788212	7.138924
32	1	0	1.969266	-3.267483	8.109714
33	1	0	4.025164	-3.250262	6.685812
34	1	0	2.966054	-4.570622	6.216388
35	1	0	0.944941	-3.123370	6.674095
36	1	0	3.133105	-1.860965	4.792413
37	1	0	2.075733	-3.186486	4.320621
38	1	0	4.077364	-4.650611	3.922289
39	1	0	5.147249	-3.322021	4.369063

### Structure 3-4 in CHCl<sub>3</sub> solution

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	6	0	0.000000	0.000000	0.000000
2	6	0	0.000000	0.000000	1.342217
3	6	0	1.262504	0.000000	-0.776005
4	8	0	2.421484	-0.195753	-0.091993
5	8	0	1.308910	0.241563	-1.971721
6	6	0	1.294860	-0.091510	2.112399
7	6	0	2.358891	-0.785888	1.247475
8	1	0	-0.908592	0.099571	-0.585838
9	1	0	-0.924095	0.116192	1.903902
10	1	0	1.155399	-0.706860	3.005297
11	8	0	1.680590	1.195285	2.612627
12	1	0	1.726811	1.816152	1.865487
13	1	0	2.063529	-1.830700	1.119516
14	6	0	3.753211	-0.687565	1.800871
15	6	0	4.413170	-1.636944	2.476691
16	1	0	4.246888	0.265907	1.624376
17	1	0	5.424972	-1.411623	2.814837
18	6	0	3.921303	-3.011484	2.855435
19	8	0	4.726517	-4.002000	2.125596
20	6	0	4.286801	-4.385161	0.903793
21	8	0	3.244721	-3.993466	0.402098
22	6	0	5.254022	-5.341674	0.250187
23	1	0	2.879213	-3.160846	2.570942
24	1	0	5.602272	-6.092138	0.963721
25	1	0	6.128676	-4.781681	-0.096954
26	1	0	4.775922	-5.820952	-0.604068
27	6	0	4.108289	-3.329684	4.342094
28	6	0	3.222600	-2.476580	5.261728
29	6	0	3.392496	-2.830128	6.746700
30	6	0	2.502596	-1.987672	7.669694
31	1	0	2.648476	-2.262271	8.720239
32	1	0	1.441053	-2.127807	7.433392
33	1	0	4.444367	-2.696640	7.031968
34	1	0	3.167440	-3.894728	6.894156
35	1	0	2.726471	-0.919081	7.570115
36	1	0	3.448407	-1.412848	5.115010
37	1	0	2.168740	-2.610398	4.979163
38	1	0	3.876450	-4.391496	4.487569
39	1	0	5.164677	-3.195695	4.606823



Coordinates for all computed conformers of epimers **3** and **5**

**Structure 3-6** in CHCl<sub>3</sub> solution

**Structure 3-5** in CHCl<sub>3</sub> solution

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	6	0	0.000000	0.000000	0.000000
2	6	0	0.000000	0.000000	1.341314
3	6	0	1.257141	0.000000	-0.774800
4	8	0	2.423552	-0.149565	-0.087847
5	8	0	1.305941	0.194754	-1.979229
6	6	0	1.278647	-0.089363	2.139263
7	6	0	2.404526	-0.685733	1.261948
8	1	0	-0.908933	0.097169	-0.585777
9	1	0	-0.927473	0.112821	1.898325
10	1	0	1.130610	-0.791938	2.965795
11	8	0	1.570686	1.157673	2.760705
12	1	0	1.984945	1.772950	2.120960
13	1	0	2.185191	-1.757371	1.167172
14	6	0	3.756899	-0.535473	1.903972
15	6	0	4.793261	0.258014	1.599589
16	1	0	3.864408	-1.176021	2.778763
17	1	0	5.664014	0.190580	2.250290
18	6	0	4.937445	1.253638	0.473828
19	8	0	5.348634	2.544240	1.062312
20	6	0	4.382836	3.369758	1.499440
21	8	0	3.184076	3.116818	1.447043
22	6	0	4.953284	4.642143	2.075108
23	1	0	3.991842	1.415803	-0.032727
24	1	0	4.165854	5.390582	2.162856
25	1	0	5.772486	5.017719	1.458087
26	1	0	5.355585	4.430624	3.071525
27	6	0	6.006502	0.887115	-0.562933
28	6	0	7.422544	0.629911	-0.026735
29	6	0	8.435664	0.372252	-1.152308
30	6	0	9.853954	0.099103	-0.635014
31	1	0	10.551550	-0.076990	-1.461441
32	1	0	9.876517	-0.784707	0.013654
33	1	0	8.454083	1.238010	-1.827635
34	1	0	8.097104	-0.479764	-1.756957
35	1	0	10.234046	0.947313	-0.053249
36	1	0	7.754126	1.490239	0.568113
37	1	0	7.416143	-0.234546	0.649266
38	1	0	5.641043	-0.001706	-1.091445
39	1	0	6.033932	1.698374	-1.301357

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	6	0	0.000000	0.000000	0.000000
2	6	0	0.000000	0.000000	1.342201
3	6	0	1.261484	0.000000	-0.777408
4	8	0	2.423627	-0.191783	-0.095398
5	8	0	1.306027	0.231609	-1.974842
6	6	0	1.294234	-0.081830	2.113416
7	6	0	2.368956	-0.766300	1.251038
8	1	0	-0.909090	0.095156	-0.585755
9	1	0	-0.924597	0.111237	1.903921
10	1	0	1.158252	-0.701830	3.003593
11	8	0	1.666149	1.205933	2.619184
12	1	0	1.672795	1.840300	1.882218
13	1	0	2.071506	-1.813317	1.139495
14	6	0	3.756470	-0.646779	1.812543
15	6	0	4.483036	-1.624071	2.370897
16	1	0	4.180616	0.353766	1.765593
17	1	0	5.471262	-1.367401	2.748579
18	6	0	4.081260	-3.062651	2.569892
19	8	0	5.267405	-3.848358	2.214827
20	6	0	5.073728	-5.058998	1.640299
21	8	0	3.973564	-5.536777	1.413734
22	6	0	6.391582	-5.719953	1.315504
23	1	0	3.283023	-3.353342	1.885286
24	1	0	7.006323	-5.798116	2.216594
25	1	0	6.942573	-5.110218	0.593230
26	1	0	6.212946	-6.711178	0.899459
27	6	0	3.642501	-3.405279	4.004952
28	6	0	4.663528	-3.094437	5.109112
29	6	0	4.175185	-3.532046	6.497837
30	6	0	5.180636	-3.221785	7.614445
31	1	0	4.802967	-3.546169	8.590477
32	1	0	5.384937	-2.146356	7.677056
33	1	0	3.965093	-4.609884	6.485330
34	1	0	3.220266	-3.036640	6.719142
35	1	0	6.135834	-3.731368	7.440756
36	1	0	5.613037	-3.596261	4.883991
37	1	0	4.876591	-2.017969	5.127819
38	1	0	2.711318	-2.857421	4.198737
39	1	0	3.383921	-4.470648	4.024429

### Structure 3-7 in CHCl<sub>3</sub> solution

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	6	0	0.000000	0.000000	0.000000
2	6	0	0.000000	0.000000	1.342163
3	6	0	1.262768	0.000000	-0.775975
4	8	0	2.421374	-0.198932	-0.092754
5	8	0	1.309113	0.243957	-1.971215
6	6	0	1.294799	-0.091199	2.112464
7	6	0	2.358269	-0.787504	1.248132
8	1	0	-0.908484	0.099997	-0.585949
9	1	0	-0.924205	0.115298	1.903848
10	1	0	1.153540	-0.706326	3.005230
11	8	0	1.681115	1.194790	2.614439
12	1	0	1.712239	1.821464	1.871482
13	1	0	2.062847	-1.831883	1.120778
14	6	0	3.753189	-0.688813	1.798566
15	6	0	4.444238	-1.655787	2.416835
16	1	0	4.225895	0.282175	1.664632
17	1	0	5.454921	-1.419600	2.750773
18	6	0	4.000364	-3.064361	2.728544
19	8	0	4.776984	-3.984363	1.883068
20	6	0	4.254060	-4.325136	0.681904
21	8	0	3.162766	-3.949553	0.282626
22	6	0	5.197417	-5.213003	-0.092362
23	1	0	2.948059	-3.219503	2.494597
24	1	0	5.627559	-5.982073	0.553443
25	1	0	6.021383	-4.604685	-0.479629
26	1	0	4.668447	-5.669767	-0.928782
27	6	0	4.307817	-3.477031	4.173109
28	6	0	3.519195	-2.704021	5.244639
29	6	0	2.019244	-3.033605	5.306815
30	6	0	1.295502	-2.290566	6.437614
31	1	0	1.371611	-1.204156	6.311011
32	1	0	1.726882	-2.541189	7.413931
33	1	0	1.895113	-4.116287	5.442203
34	1	0	1.534905	-2.790658	4.352192
35	1	0	0.231446	-2.549851	6.466969
36	1	0	3.965773	-2.936377	6.219659
37	1	0	3.653622	-1.624026	5.101228
38	1	0	4.103393	-4.550361	4.267044
39	1	0	5.383135	-3.344975	4.343932

### Structure 3-8 in CHCl<sub>3</sub> solution

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	6	0	0.000000	0.000000	0.000000
2	6	0	0.000000	0.000000	1.341344
3	6	0	1.258370	0.000000	-0.773450
4	8	0	2.423369	-0.157582	-0.086121
5	8	0	1.308011	0.198590	-1.977194
6	6	0	1.281484	-0.084780	2.135832
7	6	0	2.397896	-0.698040	1.259410
8	1	0	-0.908395	0.096806	-0.586623
9	1	0	-0.927144	0.112455	1.898916
10	1	0	1.134659	-0.771390	2.975783
11	8	0	1.586481	1.173125	2.728303
12	1	0	1.986477	1.767880	2.060215
13	1	0	2.160764	-1.766178	1.163114
14	6	0	3.750389	-0.576458	1.906119
15	6	0	4.829574	0.153191	1.589827
16	1	0	3.820900	-1.191363	2.803104
17	1	0	5.689954	0.056189	2.253595
18	6	0	5.066200	1.107541	0.445048
19	8	0	5.373852	2.434579	1.023577
20	6	0	4.353378	3.248951	1.336560
21	8	0	3.170801	2.962718	1.182877
22	6	0	4.840460	4.557016	1.909660
23	1	0	4.187535	1.217961	-0.182309
24	1	0	5.682858	4.945037	1.332544
25	1	0	5.188033	4.389029	2.934416
26	1	0	4.023413	5.278157	1.924323
27	6	0	6.312415	0.748222	-0.375011
28	6	0	6.182345	-0.531793	-1.218861
29	6	0	5.261359	-0.401628	-2.442350
30	6	0	5.210508	-1.684182	-3.283262
31	1	0	4.554293	-1.562386	-4.152069
32	1	0	4.829250	-2.528200	-2.695871
33	1	0	5.615568	0.429046	-3.068059
34	1	0	4.245842	-0.140948	-2.125921
35	1	0	6.206263	-1.959665	-3.651819
36	1	0	7.187533	-0.808138	-1.562669
37	1	0	5.840880	-1.361739	-0.586319
38	1	0	6.536823	1.598209	-1.030936
39	1	0	7.159988	0.651206	0.314851

Structure 3-9 in CHCl<sub>3</sub> solution

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	6	0	0.000000	0.000000	0.000000
2	6	0	0.000000	0.000000	1.342208
3	6	0	1.262467	0.000000	-0.776130
4	8	0	2.421457	-0.196347	-0.093070
5	8	0	1.308253	0.241688	-1.971921
6	6	0	1.295333	-0.088457	2.111869
7	6	0	2.359802	-0.783616	1.248185
8	1	0	-0.908603	0.098877	-0.585924
9	1	0	-0.924071	0.115282	1.904145
10	1	0	1.157143	-0.702041	3.006201
11	8	0	1.679069	1.200217	2.609045
12	1	0	1.724445	1.819377	1.860414
13	1	0	2.064691	-1.828435	1.121859
14	6	0	3.754211	-0.680299	1.799649
15	6	0	4.433313	-1.633835	2.450422
16	1	0	4.234022	0.283426	1.641225
17	1	0	5.443797	-1.398337	2.785644
18	6	0	3.969801	-3.025173	2.803482
19	8	0	4.770982	-3.984178	2.028122
20	6	0	4.301804	-4.350947	0.812271
21	8	0	3.237160	-3.971001	0.350517
22	6	0	5.267781	-5.273131	0.109280
23	1	0	2.923576	-3.182777	2.541070
24	1	0	4.774863	-5.740465	-0.743177
25	1	0	5.648928	-6.033936	0.794488
26	1	0	6.122292	-4.688660	-0.247472
27	6	0	4.198855	-3.379313	4.275758
28	6	0	3.335642	-2.544280	5.234664
29	6	0	3.444802	-2.974476	6.708253
30	6	0	4.828565	-2.757171	7.337911
31	1	0	5.600137	-3.368427	6.857742
32	1	0	4.818024	-3.020976	8.401262
33	1	0	3.163552	-4.032276	6.798909
34	1	0	2.701190	-2.410912	7.285386
35	1	0	5.137265	-1.707740	7.259029
36	1	0	3.602215	-1.483277	5.147204
37	1	0	2.284539	-2.623179	4.925000
38	1	0	3.964735	-4.443398	4.402866
39	1	0	5.263224	-3.256944	4.505868

Structure 3-10 in CHCl<sub>3</sub> solution

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	6	0	0.000000	0.000000	0.000000
2	6	0	0.000000	0.000000	1.342136
3	6	0	1.262834	0.000000	-0.775830
4	8	0	2.421514	-0.197474	-0.092327
5	8	0	1.308908	0.242683	-1.971360
6	6	0	1.295082	-0.089016	2.112254
7	6	0	2.359833	-0.785369	1.250063
8	1	0	-0.908432	0.099142	-0.586198
9	1	0	-0.924134	0.114925	1.903989
10	1	0	1.154153	-0.701396	3.006875
11	8	0	1.680364	1.199402	2.609386
12	1	0	1.718552	1.820171	1.861739
13	1	0	2.067200	-1.830345	1.123045
14	6	0	3.753856	-0.676145	1.800259
15	6	0	4.479248	-1.652228	2.362483
16	1	0	4.197086	0.314102	1.715519
17	1	0	5.485027	-1.401443	2.700904
18	6	0	4.085963	-3.090853	2.596269
19	8	0	4.854908	-3.929532	1.663011
20	6	0	4.294539	-4.213093	0.463898
21	8	0	3.174695	-3.855435	0.133183
22	6	0	5.235972	-5.013697	-0.402343
23	1	0	3.029980	-3.260899	2.391392
24	1	0	5.709956	-5.812615	0.172795
25	1	0	6.028586	-4.354330	-0.770999
26	1	0	4.691947	-5.426882	-1.251616
27	6	0	4.460391	-3.590021	3.996644
28	6	0	3.706121	-2.900147	5.147948
29	6	0	2.191734	-3.170986	5.228257
30	6	0	1.816538	-4.641782	5.460839
31	1	0	2.113592	-5.281078	4.622504
32	1	0	0.733968	-4.752370	5.587415
33	1	0	1.690820	-2.808601	4.321198
34	1	0	1.786775	-2.567641	6.050145
35	1	0	2.299152	-5.032985	6.364596
36	1	0	4.167245	-3.227747	6.088503
37	1	0	3.871785	-1.817105	5.092075
38	1	0	4.291675	-4.671815	4.024232
39	1	0	5.538094	-3.440805	4.135101

### Structure 3-11 in CHCl<sub>3</sub> solution

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	6	0	0.000000	0.000000	0.000000
2	6	0	0.000000	0.000000	1.340722
3	6	0	1.264983	0.000000	-0.771629
4	8	0	2.415632	-0.287873	-0.103791
5	8	0	1.325155	0.287130	-1.957059
6	6	0	1.306805	-0.076690	2.096606
7	6	0	2.312485	-0.861846	1.229627
8	1	0	-0.907239	0.098274	-0.588037
9	1	0	-0.923052	0.112645	1.904213
10	1	0	1.166012	-0.649715	3.024322
11	8	0	1.683036	1.265778	2.375680
12	1	0	2.528473	1.303229	2.871165
13	1	0	1.898107	-1.871154	1.114284
14	6	0	3.684149	-1.000650	1.839409
15	6	0	4.736207	-0.174184	1.769631
16	1	0	3.805072	-1.909222	2.426634
17	1	0	5.641865	-0.477962	2.293196
18	6	0	4.851614	1.142500	1.039652
19	8	0	5.683169	2.054314	1.845029
20	6	0	5.200631	2.513403	3.012046
21	8	0	4.108806	2.206639	3.476395
22	6	0	6.165894	3.464738	3.674894
23	1	0	3.873552	1.609440	0.917410
24	1	0	6.240570	4.379397	3.078458
25	1	0	7.164086	3.022277	3.725372
26	1	0	5.810879	3.711637	4.675057
27	6	0	5.540582	1.050920	-0.328607
28	6	0	6.930355	0.398012	-0.335580
29	6	0	7.579146	0.416187	-1.727867
30	6	0	8.961229	-0.249219	-1.755166
31	1	0	8.900847	-1.301042	-1.451251
32	1	0	9.657239	0.253748	-1.073164
33	1	0	7.667298	1.455057	-2.072792
34	1	0	6.916420	-0.088446	-2.443410
35	1	0	9.397922	-0.217589	-2.759578
36	1	0	7.586878	0.915380	0.375380
37	1	0	6.853559	-0.641754	0.007755
38	1	0	4.861517	0.496933	-0.984679
39	1	0	5.606779	2.070385	-0.728676

### Structure 3-12 in CHCl<sub>3</sub> solution

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	6	0	0.000000	0.000000	0.000000
2	6	0	0.000000	0.000000	1.342149
3	6	0	1.262498	0.000000	-0.776081
4	8	0	2.421322	-0.200796	-0.093985
5	8	0	1.308769	0.244631	-1.971242
6	6	0	1.295437	-0.088319	2.111675
7	6	0	2.360308	-0.784018	1.248453
8	1	0	-0.908479	0.099075	-0.586086
9	1	0	-0.924091	0.115108	1.903995
10	1	0	1.155998	-0.702045	3.006168
11	8	0	1.680234	1.199456	2.609985
12	1	0	1.720631	1.821485	1.863456
13	1	0	2.065815	-1.829728	1.125404
14	6	0	3.755955	-0.680087	1.797995
15	6	0	4.419865	-1.621086	2.481700
16	1	0	4.249676	0.270508	1.606631
17	1	0	5.434207	-1.392280	2.809113
18	6	0	3.921656	-2.983506	2.893047
19	8	0	4.723113	-4.000343	2.198628
20	6	0	4.291860	-4.414663	0.984199
21	8	0	3.259836	-4.025788	0.460083
22	6	0	5.253731	-5.402849	0.371120
23	1	0	2.882134	-3.131125	2.602541
24	1	0	5.557384	-6.154228	1.104098
25	1	0	6.154948	-4.871873	0.047579
26	1	0	4.789945	-5.879895	-0.492176
27	6	0	4.107745	-3.227177	4.394603
28	6	0	3.633754	-4.602293	4.898122
29	6	0	2.129991	-4.899936	4.752184
30	6	0	1.211897	-3.960640	5.547784
31	1	0	1.475257	-3.959719	6.612407
32	1	0	0.165482	-4.274363	5.464437
33	1	0	1.958225	-5.929928	5.088803
34	1	0	1.841587	-4.884332	3.693411
35	1	0	1.270701	-2.925421	5.192892
36	1	0	4.203653	-5.383009	4.381367
37	1	0	3.904947	-4.678635	5.959295
38	1	0	5.171359	-3.105996	4.633766
39	1	0	3.582635	-2.423039	4.922660

### Structure 3-13 in CHCl<sub>3</sub> solution

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	6	0	0.000000	0.000000	0.000000
2	6	0	0.000000	0.000000	1.341412
3	6	0	1.257173	0.000000	-0.774870
4	8	0	2.423638	-0.148762	-0.087724
5	8	0	1.306072	0.193247	-1.979559
6	6	0	1.278939	-0.087867	2.139535
7	6	0	2.404440	-0.684190	1.262089
8	1	0	-0.908962	0.096388	-0.585831
9	1	0	-0.927724	0.111668	1.898237
10	1	0	1.131311	-0.789567	2.966957
11	8	0	1.570222	1.160124	2.759309
12	1	0	1.988537	1.772948	2.119677
13	1	0	2.185254	-1.755879	1.167924
14	6	0	3.756317	-0.533736	1.905322
15	6	0	4.792996	0.260393	1.603488
16	1	0	3.862558	-1.174820	2.779820
17	1	0	5.662034	0.192679	2.256424
18	6	0	4.937798	1.256239	0.478160
19	8	0	5.337475	2.550691	1.066651
20	6	0	4.365113	3.377502	1.486328
21	8	0	3.167631	3.118456	1.430517
22	6	0	4.927121	4.661716	2.043791
23	1	0	3.993822	1.411863	-0.033597
24	1	0	5.717667	5.051748	1.398612
25	1	0	5.367768	4.461317	3.025995
26	1	0	4.128235	5.394749	2.154193
27	6	0	6.014720	0.899044	-0.554407
28	6	0	7.424632	0.632071	-0.003372
29	6	0	8.474122	0.361195	-1.097443
30	6	0	8.812616	1.574028	-1.976832
31	1	0	7.950254	1.917091	-2.558128
32	1	0	9.608799	1.328590	-2.688461
33	1	0	8.131784	-0.467794	-1.731581
34	1	0	9.393877	0.011909	-0.611563
35	1	0	9.159562	2.416846	-1.366785
36	1	0	7.750872	1.485000	0.605426
37	1	0	7.393678	-0.235929	0.666077
38	1	0	5.655539	0.013237	-1.092768
39	1	0	6.038593	1.717482	-1.282652

### Structure 3-14 in CHCl<sub>3</sub> solution

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	6	0	0.000000	0.000000	0.000000
2	6	0	0.000000	0.000000	1.342119
3	6	0	1.261315	0.000000	-0.777261
4	8	0	2.423360	-0.193054	-0.095217
5	8	0	1.306378	0.232874	-1.974414
6	6	0	1.295102	-0.078991	2.112189
7	6	0	2.366162	-0.770543	1.251575
8	1	0	-0.909139	0.094794	-0.585733
9	1	0	-0.924529	0.110802	1.903992
10	1	0	1.159676	-0.690569	3.008266
11	8	0	1.670991	1.213293	2.604175
12	1	0	1.680498	1.838102	1.858907
13	1	0	2.065118	-1.815097	1.136108
14	6	0	3.755500	-0.652186	1.809142
15	6	0	4.543575	-1.646474	2.239443
16	1	0	4.135484	0.366100	1.858056
17	1	0	5.531252	-1.378376	2.615339
18	6	0	4.242675	-3.122007	2.286059
19	8	0	5.232221	-3.745459	1.396737
20	6	0	4.841325	-4.822118	0.674646
21	8	0	3.723323	-5.309581	0.728829
22	6	0	5.964228	-5.322202	-0.201669
23	1	0	3.255864	-3.356447	1.890389
24	1	0	6.253496	-4.542598	-0.912613
25	1	0	5.639958	-6.211297	-0.742028
26	1	0	6.842471	-5.554796	0.407117
27	6	0	4.416310	-3.724033	3.689869
28	6	0	3.372937	-3.263486	4.723021
29	6	0	1.964160	-3.842833	4.515757
30	6	0	0.975735	-3.397200	5.601582
31	1	0	-0.019089	-3.824391	5.433932
32	1	0	0.872261	-2.305620	5.621537
33	1	0	1.572753	-3.553924	3.532003
34	1	0	2.025843	-4.938792	4.504612
35	1	0	1.311717	-3.714658	6.595807
36	1	0	3.729249	-3.563987	5.716454
37	1	0	3.323504	-2.166767	4.740341
38	1	0	4.377362	-4.815380	3.594484
39	1	0	5.423097	-3.471160	4.043677

### Structure 3-15 in CHCl<sub>3</sub> solution

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	6	0	0.000000	0.000000	0.000000
2	6	0	0.000000	0.000000	1.341423
3	6	0	1.257517	0.000000	-0.774685
4	8	0	2.424007	-0.148296	-0.087052
5	8	0	1.305499	0.192669	-1.979365
6	6	0	1.279692	-0.087446	2.138197
7	6	0	2.401782	-0.689334	1.259954
8	1	0	-0.908815	0.096122	-0.586103
9	1	0	-0.927417	0.112379	1.898677
10	1	0	1.132575	-0.784726	2.969423
11	8	0	1.576589	1.163048	2.749830
12	1	0	1.978771	1.773804	2.097854
13	1	0	2.173906	-1.758960	1.161755
14	6	0	3.755779	-0.555785	1.901960
15	6	0	4.804544	0.222499	1.600829
16	1	0	3.856615	-1.202491	2.773058
17	1	0	5.679497	0.133163	2.245913
18	6	0	4.981560	1.218687	0.480965
19	8	0	5.338664	2.517041	1.087384
20	6	0	4.344021	3.337035	1.464413
21	8	0	3.151740	3.076535	1.340986
22	6	0	4.870965	4.612964	2.072735
23	1	0	4.063544	1.358351	-0.079650
24	1	0	5.178717	4.410477	3.104186
25	1	0	4.084157	5.367321	2.081677
26	1	0	5.745254	4.976103	1.528448
27	6	0	6.148112	0.841486	-0.437668
28	6	0	6.426907	1.834943	-1.581037
29	6	0	5.308115	1.995397	-2.626847
30	6	0	5.007719	0.726829	-3.437872
31	1	0	5.913399	0.351344	-3.930139
32	1	0	4.263257	0.928781	-4.215392
33	1	0	5.606133	2.795311	-3.316601
34	1	0	4.386798	2.346024	-2.145496
35	1	0	4.608073	-0.076524	-2.810775
36	1	0	6.657061	2.815302	-1.147730
37	1	0	7.341222	1.505637	-2.092350
38	1	0	7.052860	0.734847	0.173960
39	1	0	5.929586	-0.153972	-0.839563

### Structure 3-16 in CHCl<sub>3</sub> solution

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	6	0	0.000000	0.000000	0.000000
2	6	0	0.000000	0.000000	1.342380
3	6	0	1.261079	0.000000	-0.777937
4	8	0	2.422923	-0.183008	-0.095710
5	8	0	1.303148	0.225272	-1.977393
6	6	0	1.294001	-0.081806	2.114064
7	6	0	2.368880	-0.762805	1.251930
8	1	0	-0.909145	0.095745	-0.585729
9	1	0	-0.925257	0.112193	1.903057
10	1	0	1.164171	-0.704900	3.002171
11	8	0	1.661393	1.207933	2.620468
12	1	0	1.690886	1.835812	1.878496
13	1	0	2.082622	-1.809716	1.141806
14	6	0	3.758699	-0.629525	1.807939
15	6	0	4.510110	-1.585456	2.370593
16	1	0	4.173739	0.374088	1.742585
17	1	0	5.500463	-1.291127	2.713544
18	6	0	4.204789	-3.049921	2.586910
19	8	0	2.785228	-3.204316	2.917607
20	6	0	2.446898	-4.199931	3.775209
21	8	0	3.252591	-4.959939	4.285344
22	6	0	0.955754	-4.231024	4.009271
23	1	0	4.775567	-3.402719	3.449087
24	1	0	0.429988	-4.368016	3.059923
25	1	0	0.624161	-3.280704	4.437868
26	1	0	0.708737	-5.046297	4.688872
27	6	0	4.535932	-3.934694	1.371881
28	6	0	6.022356	-3.917200	0.984035
29	6	0	6.338579	-4.872161	-0.176507
30	6	0	7.817900	-4.854320	-0.583208
31	1	0	8.127499	-3.854252	-0.908755
32	1	0	8.010536	-5.547633	-1.409411
33	1	0	5.718440	-4.605459	-1.042391
34	1	0	6.049156	-5.892825	0.106507
35	1	0	8.463225	-5.146105	0.253820
36	1	0	6.321283	-2.899383	0.703903
37	1	0	6.631936	-4.193644	1.855396
38	1	0	4.235998	-4.960223	1.615965
39	1	0	3.925313	-3.607412	0.521820

### Structure 5-1 in gas phase

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	8	0	0.000000	0.000000	0.000000
2	6	0	0.000000	0.000000	1.468694
3	6	0	1.429273	0.000000	2.033767
4	6	0	2.242166	1.068692	1.346596
5	6	0	1.920617	1.488428	0.112597
6	6	0	0.811399	0.874551	-0.653712
7	8	0	0.640046	1.066731	-1.847668
8	8	0	2.100874	-1.265712	1.962374
9	6	0	-0.802712	-1.195344	1.893061
10	6	0	-1.926522	-1.189083	2.622566
11	6	0	-2.685365	0.003486	3.147943
12	8	0	-2.617878	-0.009843	4.617264
13	6	0	-4.169533	-0.054438	2.778934
14	6	0	-4.971689	1.175489	3.226148
15	6	0	-6.453961	1.096681	2.830644
16	6	0	-7.259711	2.323171	3.278102
17	6	0	-1.541661	0.560678	5.202963
18	8	0	-0.642460	1.111389	4.585378
19	6	0	-1.597049	0.418349	6.704551
20	1	0	-0.466867	0.932302	1.790904
21	1	0	1.341559	0.219482	3.100230
22	1	0	3.123756	1.449809	1.856874
23	1	0	2.506073	2.227563	-0.425625
24	1	0	2.315065	-1.449632	1.031774
25	1	0	-0.393280	-2.153614	1.580186
26	1	0	-2.372553	-2.151368	2.875421
27	1	0	-2.250088	0.943570	2.808368
28	1	0	-4.228803	-0.159091	1.688628
29	1	0	-4.605423	-0.966413	3.206050
30	1	0	-4.892328	1.287959	4.314220
31	1	0	-4.527263	2.078709	2.785593
32	1	0	-6.534125	0.984487	1.741233
33	1	0	-6.896354	0.190656	3.265668
34	1	0	-8.311328	2.237207	2.982914
35	1	0	-7.227628	2.442347	4.367578
36	1	0	-6.862599	3.242629	2.831961
37	1	0	-2.579256	0.712269	7.083185
38	1	0	-1.439319	-0.630876	6.974334
39	1	0	-0.817994	1.029078	7.160500

### Structure 5-2 in gas phase

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	8	0	0.000000	0.000000	0.000000
2	6	0	0.000000	0.000000	1.465237
3	6	0	1.417457	0.000000	2.044044
4	6	0	2.244122	1.057860	1.351115
5	6	0	1.947947	1.451899	0.104014
6	6	0	0.846898	0.827731	-0.664211
7	8	0	0.701040	0.986736	-1.867079
8	8	0	2.009752	-1.299403	1.874521
9	6	0	-0.807086	-1.197430	1.881356
10	6	0	-1.894490	-1.201668	2.663602
11	6	0	-2.596959	-0.021304	3.285361
12	8	0	-2.508625	-0.145702	4.748842
13	6	0	-4.087893	0.008569	2.940423
14	6	0	-4.831952	1.229477	3.499076
15	6	0	-6.319988	1.247829	3.118414
16	6	0	-7.067278	2.463883	3.681051
17	6	0	-1.404820	0.339183	5.358341
18	8	0	-0.492871	0.901801	4.770598
19	6	0	-1.446555	0.085918	6.845902
20	1	0	-0.469694	0.932255	1.784457
21	1	0	1.314674	0.236760	3.108534
22	1	0	3.111200	1.461519	1.870541
23	1	0	2.541948	2.181293	-0.438125
24	1	0	2.813009	-1.340692	2.418911
25	1	0	-0.433252	-2.145132	1.501330
26	1	0	-2.353351	-2.164792	2.888804
27	1	0	-2.127882	0.923384	3.009176
28	1	0	-4.167480	-0.005854	1.846558
29	1	0	-4.554505	-0.916724	3.301421
30	1	0	-4.736901	1.246852	4.591549
31	1	0	-4.352947	2.146856	3.129555
32	1	0	-6.415813	1.234023	2.024598
33	1	0	-6.797142	0.327089	3.479585
34	1	0	-7.019972	2.485928	4.776254
35	1	0	-6.634409	3.400964	3.311313
36	1	0	-8.124323	2.449016	3.393214
37	1	0	-1.321628	-0.985378	7.033927
38	1	0	-0.641666	0.634320	7.335126
39	1	0	-2.413394	0.382634	7.260155

### Structure 5-3 in gas phase

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	8	0	0.000000	0.000000	0.000000
2	6	0	0.000000	0.000000	1.468522
3	6	0	1.428624	0.000000	2.034409
4	6	0	2.243776	1.065874	1.345541
5	6	0	1.921591	1.487242	0.112212
6	6	0	0.810524	0.875533	-0.653273
7	8	0	0.638025	1.069602	-1.846730
8	8	0	2.099117	-1.266794	1.968386
9	6	0	-0.801895	-1.196302	1.892048
10	6	0	-1.911240	-1.194349	2.643388
11	6	0	-2.647796	-0.007995	3.213834
12	8	0	-2.507505	-0.034540	4.679503
13	6	0	-4.154081	-0.053547	2.944281
14	6	0	-4.510837	0.086099	1.456975
15	6	0	-6.026552	0.077524	1.209223
16	6	0	-6.392537	0.216078	-0.274237
17	6	0	-1.409700	0.540139	5.218372
18	8	0	-0.547077	1.107467	4.564461
19	6	0	-1.386137	0.376744	6.718699
20	1	0	-0.468588	0.931009	1.792047
21	1	0	3.126869	1.444569	1.855043
22	1	0	2.508024	2.225166	-0.426587
23	1	0	2.309663	-1.457900	1.038380
24	1	0	-0.403535	-2.152370	1.558599
25	1	0	-2.357566	-2.158353	2.890142
26	1	0	-2.232237	0.936146	2.860748
27	1	0	-4.559779	-0.992485	3.341790
28	1	0	-4.619665	0.759632	3.513919
29	1	0	-4.085865	1.020360	1.064890
30	1	0	-4.046062	-0.725830	0.883839
31	1	0	-6.452438	-0.854093	1.605050
32	1	0	-6.491900	0.893239	1.778335
33	1	0	-7.478686	0.206116	-0.417932
34	1	0	-6.009391	1.154959	-0.691089
35	1	0	-5.969983	-0.605044	-0.865085
36	1	0	-0.641164	1.045853	7.149378
37	1	0	-2.370929	0.575806	7.147681
38	1	0	-1.121239	-0.657754	6.960908
39	1	0	1.338888	0.222870	3.099731

### Structure 5-4 in gas phase

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	8	0	0.000000	0.000000	0.000000
2	6	0	0.000000	0.000000	1.467936
3	6	0	1.428099	0.000000	2.036843
4	6	0	2.246467	1.061110	1.344855
5	6	0	1.926438	1.480870	0.110406
6	6	0	0.814230	0.871319	-0.654764
7	8	0	0.642791	1.063331	-1.848681
8	8	0	2.095826	-1.268553	1.981014
9	6	0	-0.803261	-1.196568	1.889369
10	6	0	-1.890701	-1.202184	2.671898
11	6	0	-2.601828	-0.020996	3.282852
12	8	0	-2.465683	-0.101638	4.745521
13	6	0	-4.104059	-0.044805	2.984910
14	6	0	-4.905388	1.132281	3.566581
15	6	0	-4.573185	2.506077	2.962700
16	6	0	-5.457604	3.627244	3.524587
17	6	0	-1.357216	0.431330	5.305584
18	8	0	-0.485499	1.009695	4.673666
19	6	0	-1.333414	0.205017	6.797572
20	1	0	-0.467857	0.932651	1.788925
21	1	0	1.335085	0.228657	3.100766
22	1	0	3.130395	1.438671	1.853780
23	1	0	2.515442	2.216230	-0.429088
24	1	0	2.313901	-1.465378	1.054035
25	1	0	-0.423800	-2.148651	1.524083
26	1	0	-2.337636	-2.167646	2.910630
27	1	0	-2.158709	0.921100	2.964563
28	1	0	-4.216859	-0.067475	1.893832
29	1	0	-4.515411	-0.989331	3.361586
30	1	0	-5.970409	0.924784	3.400612
31	1	0	-4.767645	1.165105	4.654341
32	1	0	-3.520952	2.756654	3.147444
33	1	0	-4.691450	2.459866	1.871812
34	1	0	-5.337702	3.719170	4.610641
35	1	0	-5.204896	4.595259	3.078140
36	1	0	-6.517909	3.433261	3.323521
37	1	0	-2.313965	0.400830	7.237667
38	1	0	-1.083896	-0.842693	6.995318
39	1	0	-0.577059	0.843668	7.253817



### Structure 5-5 in gas phase

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	8	0	0.000000	0.000000	0.000000
2	6	0	0.000000	0.000000	1.468500
3	6	0	1.428972	0.000000	2.034286
4	6	0	2.242619	1.067996	1.346686
5	6	0	1.921045	1.488418	0.112817
6	6	0	0.811325	0.874957	-0.653501
7	8	0	0.639551	1.067693	-1.847250
8	8	0	2.100169	-1.265982	1.964732
9	6	0	-0.802197	-1.195402	1.894222
10	6	0	-1.915333	-1.193905	2.640604
11	6	0	-2.652198	0.001606	3.191622
12	8	0	-2.597957	-0.050192	4.661273
13	6	0	-4.136349	0.059940	2.807452
14	6	0	-5.004751	-1.134760	3.229885
15	6	0	-6.487001	-0.928240	2.883118
16	6	0	-7.371140	-2.113033	3.293369
17	6	0	-1.500901	0.459710	5.264484
18	8	0	-0.577692	0.988581	4.663706
19	6	0	-1.566182	0.280118	6.761651
20	1	0	-0.466344	0.933096	1.789577
21	1	0	1.339884	0.219697	3.100571
22	1	0	3.124735	1.448022	1.856870
23	1	0	2.506807	2.227183	-0.425571
24	1	0	2.314925	-1.451941	1.034767
25	1	0	-0.398362	-2.151980	1.568874
26	1	0	-2.348911	-2.159519	2.894845
27	1	0	-2.176236	0.932445	2.884523
28	1	0	-4.546737	0.979910	3.242558
29	1	0	-4.180459	0.184348	1.718176
30	1	0	-4.652479	-2.050977	2.739810
31	1	0	-4.904465	-1.298211	4.309806
32	1	0	-6.850084	-0.015317	3.373885
33	1	0	-6.586299	-0.755426	1.803143
34	1	0	-8.420837	-1.933585	3.035607
35	1	0	-7.057634	-3.035307	2.789973
36	1	0	-7.318910	-2.290790	4.374098
37	1	0	-2.543811	0.582506	7.145041
38	1	0	-1.428883	-0.778787	7.003544
39	1	0	-0.776659	0.862598	7.236293

### Structure 5-6 in gas phase

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	8	0	0.000000	0.000000	0.000000
2	6	0	0.000000	0.000000	1.468508
3	6	0	1.428259	0.000000	2.035390
4	6	0	2.245170	1.064016	1.345376
5	6	0	1.925808	1.482088	0.110203
6	6	0	0.814360	0.870587	-0.655018
7	8	0	0.643299	1.061431	-1.849239
8	8	0	2.098091	-1.267324	1.971804
9	6	0	-0.802521	-1.197128	1.889485
10	6	0	-1.915611	-1.198786	2.635091
11	6	0	-2.661473	-0.013193	3.193803
12	8	0	-2.575370	-0.058573	4.661823
13	6	0	-4.150571	-0.055071	2.843347
14	6	0	-4.931054	1.181051	3.316127
15	6	0	-6.444429	1.106077	3.047978
16	6	0	-6.832940	1.094342	1.562188
17	6	0	-1.479709	0.475796	5.244951
18	8	0	-0.580340	1.026575	4.627693
19	6	0	-1.510508	0.290529	6.742531
20	1	0	-0.467871	0.932386	1.789821
21	1	0	1.338553	0.224400	3.100521
22	1	0	3.127750	1.443216	1.855401
23	1	0	2.514115	2.217771	-0.429656
24	1	0	2.316115	-1.456899	1.043192
25	1	0	-0.401476	-2.152026	1.556115
26	1	0	-2.360976	-2.163853	2.878347
27	1	0	-2.224121	0.930920	2.868109
28	1	0	-4.219777	-0.157166	1.754657
29	1	0	-4.589283	-0.964803	3.273585
30	1	0	-4.770384	1.311323	4.392538
31	1	0	-4.520750	2.076372	2.828524
32	1	0	-6.854373	0.214310	3.541019
33	1	0	-6.922176	1.967271	3.531833
34	1	0	-6.430680	1.972735	1.042952
35	1	0	-6.459847	0.203477	1.045721
36	1	0	-7.922061	1.108124	1.443377
37	1	0	-0.746658	0.915111	7.205630
38	1	0	-2.496850	0.534784	7.144123
39	1	0	-1.307358	-0.759393	6.977933

### Structure 5-7 in gas phase

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	8	0	0.000000	0.000000	0.000000
2	6	0	0.000000	0.000000	1.465514
3	6	0	1.417884	0.000000	2.042466
4	6	0	2.241406	1.061923	1.351611
5	6	0	1.943805	1.456950	0.105211
6	6	0	0.844600	0.829998	-0.663586
7	8	0	0.699259	0.989035	-1.866534
8	8	0	2.012180	-1.298132	1.869280
9	6	0	-0.805776	-1.197246	1.884044
10	6	0	-1.914994	-1.194897	2.635388
11	6	0	-2.645692	-0.010003	3.215732
12	8	0	-2.528300	-0.063702	4.683168
13	6	0	-4.148416	-0.033245	2.923858
14	6	0	-4.483322	0.144003	1.435418
15	6	0	-5.995380	0.149125	1.166796
16	6	0	-6.340355	0.326990	-0.317550
17	6	0	-1.434593	0.490165	5.250143
18	8	0	-0.554234	1.059284	4.621621
19	6	0	-1.441053	0.303210	6.748152
20	1	0	-0.469433	0.930717	1.788737
21	1	0	1.316279	0.234119	3.107569
22	1	0	3.107114	1.467499	1.871857
23	1	0	2.535168	2.189133	-0.436027
24	1	0	2.827853	-1.331113	2.395615
25	1	0	-0.412037	-2.149413	1.536691
26	1	0	-2.369270	-2.158116	2.870685
27	1	0	-2.213985	0.935465	2.886438
28	1	0	-4.569081	-0.976778	3.294105
29	1	0	-4.613854	0.771520	3.505574
30	1	0	-4.048626	1.085400	1.072046
31	1	0	-4.014412	-0.656030	0.849178
32	1	0	-6.430714	-0.790354	1.532687
33	1	0	-6.465078	0.952161	1.750236
34	1	0	-7.424433	0.323608	-0.476608
35	1	0	-5.949332	1.275237	-0.704877
36	1	0	-5.911455	-0.479780	-0.923400
37	1	0	-1.231160	-0.746019	6.980182
38	1	0	-0.673551	0.931326	7.200351
39	1	0	-2.422372	0.543464	7.164328

### Structure 5-8 in gas phase

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	8	0	0.000000	0.000000	0.000000
2	6	0	0.000000	0.000000	1.465556
3	6	0	1.417874	0.000000	2.042475
4	6	0	2.241373	1.062025	1.351707
5	6	0	1.943844	1.456958	0.105282
6	6	0	0.844727	0.829828	-0.663615
7	8	0	0.699539	0.988615	-1.866589
8	8	0	2.012259	-1.298063	1.869143
9	6	0	-0.805803	-1.197321	1.883890
10	6	0	-1.915203	-1.195216	2.634957
11	6	0	-2.646053	-0.010456	3.215358
12	8	0	-2.528984	-0.064488	4.682842
13	6	0	-4.148703	-0.033603	2.923105
14	6	0	-4.483150	0.144073	1.434625
15	6	0	-5.995106	0.149428	1.165502
16	6	0	-6.339571	0.327863	-0.318884
17	6	0	-1.435403	0.489287	5.250050
18	8	0	-0.555162	1.058821	4.621722
19	6	0	-1.441195	0.301179	6.747941
20	1	0	-0.469451	0.930733	1.788708
21	1	0	1.316304	0.233975	3.107605
22	1	0	3.106992	1.467674	1.872027
23	1	0	2.535124	2.189128	-0.436076
24	1	0	2.827648	-1.331208	2.395905
25	1	0	-0.411879	-2.149381	1.536428
26	1	0	-2.369428	-2.158527	2.869948
27	1	0	-2.214200	0.935075	2.886433
28	1	0	-4.569488	-0.977235	3.292966
29	1	0	-4.614285	0.771013	3.504902
30	1	0	-4.048225	1.085518	1.071642
31	1	0	-4.014135	-0.655856	0.848322
32	1	0	-6.430655	-0.790142	1.530907
33	1	0	-6.464928	0.952295	1.749080
34	1	0	-7.423597	0.324587	-0.478302
35	1	0	-5.948384	1.276239	-0.705733
36	1	0	-5.910507	-0.478702	-0.924896
37	1	0	-0.680268	0.936557	7.201146
38	1	0	-2.425104	0.530478	7.164017
39	1	0	-1.219968	-0.746022	6.978779

### Structure 5-9 in gas phase

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	8	0	0.000000	0.000000	0.000000
2	6	0	0.000000	0.000000	1.468416
3	6	0	1.429338	0.000000	2.032903
4	6	0	2.241210	1.070431	1.346811
5	6	0	1.919520	1.490422	0.112893
6	6	0	0.811530	0.874387	-0.653670
7	8	0	0.641197	1.065086	-1.847996
8	8	0	2.101344	-1.265411	1.958759
9	6	0	-0.803628	-1.195611	1.891413
10	6	0	-1.906644	-1.194432	2.651927
11	6	0	-2.634942	-0.006253	3.228191
12	8	0	-2.543497	-0.070298	4.695105
13	6	0	-4.125984	-0.021784	2.883454
14	6	0	-4.886949	1.216750	3.381327
15	6	0	-6.367271	1.254550	2.961925
16	6	0	-7.238310	0.155840	3.588785
17	6	0	-1.439773	0.446268	5.279260
18	8	0	-0.537306	0.994415	4.664162
19	6	0	-1.464769	0.243213	6.774604
20	1	0	-0.467257	0.932869	1.789324
21	1	0	1.341413	0.217144	3.099674
22	1	0	3.122060	1.452263	1.857814
23	1	0	2.503990	2.230261	-0.425417
24	1	0	2.311346	-1.450545	1.027392
25	1	0	-0.412731	-2.150875	1.547074
26	1	0	-2.355039	-2.157748	2.896388
27	1	0	-2.185637	0.935679	2.912745
28	1	0	-4.204311	-0.087062	1.790913
29	1	0	-4.568404	-0.940122	3.286202
30	1	0	-4.818266	1.272643	4.474655
31	1	0	-4.389205	2.114997	2.992170
32	1	0	-6.777758	2.233098	3.240995
33	1	0	-6.436003	1.196796	1.867254
34	1	0	-7.183196	0.186545	4.683746
35	1	0	-8.288968	0.282040	3.304899
36	1	0	-6.931739	-0.845613	3.268536
37	1	0	-1.243446	-0.806211	6.995841
38	1	0	-0.708811	0.873182	7.243495
39	1	0	-2.453563	0.466477	7.181980

### Structure 5-10 in gas phase

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	8	0	0.000000	0.000000	0.000000
2	6	0	0.000000	0.000000	1.468310
3	6	0	1.428652	0.000000	2.036161
4	6	0	2.249140	1.058249	1.341970
5	6	0	1.930414	1.475945	0.106543
6	6	0	0.815497	0.868524	-0.656488
7	8	0	0.643260	1.059713	-1.850405
8	8	0	2.095463	-1.269144	1.981842
9	6	0	-0.801095	-1.197600	1.889788
10	6	0	-1.905646	-1.202758	2.648140
11	6	0	-2.643645	-0.025535	3.235931
12	8	0	-2.488350	-0.066560	4.699904
13	6	0	-4.155460	-0.093382	2.991906
14	6	0	-4.575791	0.016092	1.515828
15	6	0	-4.324438	1.388011	0.870101
16	6	0	-4.865414	1.474816	-0.563183
17	6	0	-1.390103	0.510824	5.235152
18	8	0	-0.539838	1.095258	4.580109
19	6	0	-1.348486	0.325511	6.732519
20	1	0	-0.468611	0.930900	1.792300
21	1	0	1.337537	0.230975	3.099638
22	1	0	3.134255	1.434191	1.850049
23	1	0	2.521827	2.207696	-0.435277
24	1	0	2.309033	-1.468169	1.054352
25	1	0	-0.404340	-2.151530	1.548446
26	1	0	-2.347067	-2.170371	2.889391
27	1	0	-2.236054	0.924193	2.891936
28	1	0	-4.527258	-1.037337	3.408939
29	1	0	-4.624068	0.712527	3.569652
30	1	0	-4.075846	-0.762904	0.926082
31	1	0	-5.649417	-0.205085	1.461327
32	1	0	-4.793033	2.167461	1.486074
33	1	0	-3.250241	1.610329	0.857298
34	1	0	-4.393212	0.726391	-1.210012
35	1	0	-5.948004	1.302345	-0.588763
36	1	0	-4.673832	2.460705	-1.000772
37	1	0	-2.329072	0.514045	7.175741
38	1	0	-1.076695	-0.711419	6.956129
39	1	0	-0.601346	0.991335	7.164500

### Structure 5-11 in gas phase

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	8	0	0.000000	0.000000	0.000000
2	6	0	0.000000	0.000000	1.458468
3	6	0	1.418927	0.000000	2.073602
4	6	0	2.328536	0.918946	1.304339
5	6	0	2.045827	1.308998	0.053812
6	6	0	0.879803	0.776488	-0.681960
7	8	0	0.710555	0.950534	-1.879587
8	8	0	2.033298	-1.283996	2.140003
9	6	0	-0.833669	-1.203078	1.838818
10	6	0	-1.425207	-1.461385	3.010592
11	6	0	-1.416460	-0.602558	4.250048
12	8	0	-1.136786	-1.449316	5.420870
13	6	0	-2.749896	0.099007	4.543131
14	6	0	-3.978766	-0.814169	4.660473
15	6	0	-5.255001	-0.036455	5.015813
16	6	0	-6.493174	-0.935377	5.126764
17	6	0	0.114715	-1.911796	5.593478
18	8	0	1.046706	-1.662460	4.838540
19	6	0	0.221873	-2.776552	6.824265
20	1	0	-0.485964	0.933466	1.766022
21	1	0	1.312819	0.401014	3.088803
22	1	0	3.248875	1.230883	1.792983
23	1	0	2.701740	1.958250	-0.517865
24	1	0	1.741764	-1.679082	2.984812
25	1	0	-0.936277	-1.930981	1.037219
26	1	0	-1.982529	-2.392004	3.102204
27	1	0	-0.626737	0.149777	4.203767
28	1	0	-2.623104	0.672304	5.470028
29	1	0	-2.908097	0.830687	3.741199
30	1	0	-4.138144	-1.346212	3.714362
31	1	0	-3.796765	-1.579746	5.424707
32	1	0	-5.103771	0.495047	5.964899
33	1	0	-5.432136	0.736595	4.256158
34	1	0	-6.695007	-1.451305	4.180654
35	1	0	-6.359152	-1.700759	5.900342
36	1	0	-7.384537	-0.353039	5.385027
37	1	0	-0.239674	-2.282185	7.682570
38	1	0	-0.317347	-3.713921	6.653857
39	1	0	1.269403	-2.994809	7.029985

### Structure 5-12 in gas phase

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	8	0	0.000000	0.000000	0.000000
2	6	0	0.000000	0.000000	1.468295
3	6	0	1.428715	0.000000	2.035277
4	6	0	2.245344	1.063600	1.344514
5	6	0	1.925625	1.482117	0.109570
6	6	0	0.813732	0.871315	-0.655258
7	8	0	0.641708	1.062872	-1.849152
8	8	0	2.097600	-1.267625	1.972980
9	6	0	-0.803202	-1.196154	1.889883
10	6	0	-1.912369	-1.196104	2.641284
11	6	0	-2.653474	-0.010098	3.206364
12	8	0	-2.562705	-0.059807	4.673580
13	6	0	-4.143997	-0.059944	2.860266
14	6	0	-4.982636	1.113610	3.399083
15	6	0	-4.616092	2.512111	2.868212
16	6	0	-4.780673	2.681787	1.350772
17	6	0	-1.465040	0.474202	5.253692
18	8	0	-0.572890	1.035065	4.634850
19	6	0	-1.481467	0.271411	6.749139
20	1	0	-0.467329	0.932190	1.790961
21	1	0	1.338838	0.225182	3.100294
22	1	0	3.128272	1.442547	1.854092
23	1	0	2.513864	2.218089	-0.429984
24	1	0	2.309588	-1.461099	1.043855
25	1	0	-0.406726	-2.151597	1.552617
26	1	0	-2.358767	-2.160456	2.885717
27	1	0	-2.210843	0.930860	2.882360
28	1	0	-4.220121	-0.115922	1.768600
29	1	0	-4.556333	-1.000812	3.244926
30	1	0	-6.032868	0.909093	3.152988
31	1	0	-4.921720	1.119715	4.493619
32	1	0	-5.256049	3.242771	3.378548
33	1	0	-3.588612	2.769250	3.156121
34	1	0	-4.101970	2.032603	0.787096
35	1	0	-5.803947	2.443330	1.036357
36	1	0	-4.571480	3.713706	1.048069
37	1	0	-0.740518	0.920142	7.216394
38	1	0	-2.474515	0.468650	7.159407
39	1	0	-1.232169	-0.772001	6.969086

### Structure 5-13 in gas phase

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	8	0	0.000000	0.000000	0.000000
2	6	0	0.000000	0.000000	1.472538
3	6	0	1.429753	0.000000	2.030708
4	6	0	2.239953	1.072600	1.345904
5	6	0	1.915407	1.495183	0.113829
6	6	0	0.804611	0.882343	-0.651522
7	8	0	0.628246	1.081669	-1.843656
8	8	0	2.104522	-1.263906	1.953591
9	6	0	-0.807695	-1.184555	1.924640
10	6	0	-2.117748	-1.178419	2.208434
11	6	0	-3.069940	-0.017669	2.071169
12	8	0	-3.646091	0.278071	3.391168
13	6	0	-4.246513	-0.283441	1.121662
14	6	0	-5.140703	-1.483703	1.472984
15	6	0	-6.412583	-1.575213	0.610271
16	6	0	-6.155693	-1.841500	-0.880247
17	6	0	-2.946221	1.097920	4.208059
18	8	0	-1.884775	1.619728	3.902709
19	6	0	-3.645235	1.272796	5.534608
20	1	0	-0.469158	0.933217	1.794516
21	1	0	1.355636	0.212857	3.100530
22	1	0	3.122718	1.452083	1.855139
23	1	0	2.499295	2.236269	-0.423343
24	1	0	2.304108	-1.451680	1.020360
25	1	0	-0.252562	-2.113226	2.036735
26	1	0	-2.564950	-2.105690	2.562909
27	1	0	-2.547859	0.877948	1.735631
28	1	0	-4.854977	0.629814	1.098649
29	1	0	-3.820541	-0.400915	0.119027
30	1	0	-4.575273	-2.418182	1.366763
31	1	0	-5.435794	-1.413445	2.526436
32	1	0	-7.042375	-2.379379	1.011123
33	1	0	-6.992855	-0.649331	0.722409
34	1	0	-5.607754	-1.021367	-1.356254
35	1	0	-5.570111	-2.758133	-1.021235
36	1	0	-7.099388	-1.963015	-1.423597
37	1	0	-3.610013	0.330380	6.090406
38	1	0	-3.148163	2.052104	6.112029
39	1	0	-4.697397	1.527136	5.383315

### Structure 5-14 in gas phase

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	8	0	0.000000	0.000000	0.000000
2	6	0	0.000000	0.000000	1.468717
3	6	0	1.429275	0.000000	2.033691
4	6	0	2.243080	1.067756	1.345857
5	6	0	1.921869	1.487406	0.111719
6	6	0	0.812433	0.872928	-0.654347
7	8	0	0.642520	1.063367	-1.848713
8	8	0	2.100641	-1.266033	1.965658
9	6	0	-0.800958	-1.196308	1.893890
10	6	0	-1.943257	-1.190532	2.594269
11	6	0	-2.726724	-0.001253	3.091079
12	8	0	-2.653976	0.024525	4.561434
13	6	0	-4.221038	-0.097396	2.763620
14	6	0	-4.549406	-0.078956	1.259198
15	6	0	-4.206156	1.219016	0.504016
16	6	0	-4.958973	2.463081	0.997389
17	6	0	-1.591434	0.637331	5.129286
18	8	0	-0.706902	1.193393	4.495472
19	6	0	-1.641341	0.534315	6.634350
20	1	0	-0.467268	0.931455	1.792677
21	1	0	1.341942	0.221403	3.099817
22	1	0	3.124816	1.448200	1.856347
23	1	0	2.507887	2.225589	-0.427205
24	1	0	2.313421	-1.454451	1.035561
25	1	0	-0.373979	-2.155241	1.607650
26	1	0	-2.384690	-2.154503	2.849784
27	1	0	-2.309263	0.937662	2.729818
28	1	0	-4.609613	-1.024108	3.203295
29	1	0	-4.729474	0.726302	3.276266
30	1	0	-4.042258	-0.918591	0.768331
31	1	0	-5.625023	-0.270791	1.154385
32	1	0	-3.125761	1.405403	0.541859
33	1	0	-4.438994	1.060711	-0.556073
34	1	0	-4.693996	2.725707	2.027509
35	1	0	-4.728805	3.331420	0.370284
36	1	0	-6.044064	2.306745	0.963855
37	1	0	-0.882657	1.182720	7.072403
38	1	0	-2.632517	0.805064	7.006629
39	1	0	-1.447987	-0.501410	6.931617

### Structure 5-15 in gas phase

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	8	0	0.000000	0.000000	0.000000
2	6	0	0.000000	0.000000	1.465546
3	6	0	1.417833	0.000000	2.043173
4	6	0	2.242290	1.060427	1.351526
5	6	0	1.946593	1.453579	0.104119
6	6	0	0.847741	0.826200	-0.664759
7	8	0	0.704207	0.982321	-1.868228
8	8	0	2.009714	-1.299212	1.871599
9	6	0	-0.806135	-1.197040	1.883754
10	6	0	-1.920152	-1.194063	2.627865
11	6	0	-2.661701	-0.006366	3.188391
12	8	0	-2.601872	-0.068424	4.657148
13	6	0	-4.145470	-0.039598	2.811998
14	6	0	-4.984104	1.137871	3.342208
15	6	0	-4.595364	2.536216	2.826973
16	6	0	-4.732967	2.717234	1.308109
17	6	0	-1.514784	0.454110	5.265785
18	8	0	-0.603187	1.011286	4.672195
19	6	0	-1.572154	0.246688	6.759857
20	1	0	-0.468325	0.931647	1.788092
21	1	0	1.316982	0.235421	3.108471
22	1	0	3.107414	1.466539	1.872379
23	1	0	2.539050	2.184807	-0.437230
24	1	0	2.838940	-1.324961	2.376933
25	1	0	-0.408567	-2.149798	1.542511
26	1	0	-2.373772	-2.156902	2.865189
27	1	0	-2.204524	0.933563	2.882142
28	1	0	-4.199732	-0.087101	1.718677
29	1	0	-4.574077	-0.979363	3.181220
30	1	0	-6.031198	0.944279	3.074796
31	1	0	-4.944487	1.136812	4.437778
32	1	0	-5.236693	3.269813	3.331386
33	1	0	-3.570359	2.781382	3.133589
34	1	0	-4.508887	3.749001	1.015705
35	1	0	-4.051422	2.065144	0.751293
36	1	0	-5.753169	2.490793	0.975357
37	1	0	-2.559534	0.506108	7.149461
38	1	0	-1.396414	-0.810862	6.982436
39	1	0	-0.803464	0.848149	7.245053

### Structure 5-16 in gas phase

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	8	0	0.000000	0.000000	0.000000
2	6	0	0.000000	0.000000	1.467983
3	6	0	1.428674	0.000000	2.034592
4	6	0	2.242677	1.068250	1.347596
5	6	0	1.921666	1.487845	0.113299
6	6	0	0.813387	0.872534	-0.653622
7	8	0	0.644555	1.062179	-1.848339
8	8	0	2.100035	-1.265922	1.965842
9	6	0	-0.799837	-1.197782	1.892561
10	6	0	-1.891439	-1.206617	2.670016
11	6	0	-2.606004	-0.018468	3.263865
12	8	0	-2.502144	-0.093124	4.730033
13	6	0	-4.102509	0.054956	2.932200
14	6	0	-4.956180	-1.152135	3.353704
15	6	0	-6.458199	-0.975221	3.060507
16	6	0	-7.155123	0.102148	3.904444
17	6	0	-1.399095	0.432521	5.308028
18	8	0	-0.503923	0.987521	4.688350
19	6	0	-1.418481	0.234678	6.804208
20	1	0	-0.466840	0.932979	1.789073
21	1	0	1.337423	0.219859	3.100577
22	1	0	3.124048	1.449172	1.858403
23	1	0	2.507505	2.226190	-0.425609
24	1	0	2.319632	-1.450669	1.036680
25	1	0	-0.409194	-2.149663	1.538721
26	1	0	-2.320490	-2.175707	2.918113
27	1	0	-2.135178	0.914136	2.955405
28	1	0	-4.484524	0.968614	3.401147
29	1	0	-4.184143	0.202768	1.847736
30	1	0	-4.608583	-2.048699	2.827218
31	1	0	-4.818126	-1.344546	4.424897
32	1	0	-6.596074	-0.752420	1.993840
33	1	0	-6.956400	-1.936711	3.236551
34	1	0	-8.229640	0.128178	3.691821
35	1	0	-7.032676	-0.097373	4.975920
36	1	0	-6.759445	1.103758	3.705559
37	1	0	-0.620602	0.818974	7.262309
38	1	0	-2.387034	0.524257	7.219352
39	1	0	-1.265636	-0.825660	7.029729

### Structure 5-17 in gas phase

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	8	0	0.000000	0.000000	0.000000
2	6	0	0.000000	0.000000	1.461014
3	6	0	1.419772	0.000000	2.058003
4	6	0	2.278980	1.006710	1.341703
5	6	0	1.981535	1.407591	0.097585
6	6	0	0.858507	0.816149	-0.664181
7	8	0	0.706553	0.986856	-1.864353
8	8	0	2.092398	-1.264808	1.968389
9	6	0	-0.798965	-1.207803	1.868821
10	6	0	-1.781019	-1.266629	2.778311
11	6	0	-2.360631	-0.128547	3.581550
12	8	0	-2.263467	-0.464818	5.009452
13	6	0	-3.843698	0.151076	3.298202
14	6	0	-4.807562	-1.025236	3.519065
15	6	0	-6.283307	-0.672001	3.255644
16	6	0	-6.894183	0.325626	4.251021
17	6	0	-1.097907	-0.201998	5.641072
18	8	0	-0.129888	0.309476	5.098666
19	6	0	-1.153354	-0.626327	7.088447
20	1	0	-0.479799	0.929998	1.777474
21	1	0	1.307036	0.292789	3.107653
22	1	0	3.169327	1.369204	1.850246
23	1	0	2.595952	2.114561	-0.451260
24	1	0	1.774607	-1.824688	2.696390
25	1	0	-0.507924	-2.124416	1.358819
26	1	0	-2.228014	-2.239955	2.973212
27	1	0	-1.793219	0.789155	3.427845
28	1	0	-4.132166	1.000471	3.927508
29	1	0	-3.912424	0.493517	2.257904
30	1	0	-4.530645	-1.853139	2.855829
31	1	0	-4.702905	-1.397255	4.545752
32	1	0	-6.386476	-0.281223	2.234314
33	1	0	-6.867144	-1.600404	3.285269
34	1	0	-6.410434	1.307030	4.203066
35	1	0	-7.959602	0.477728	4.045422
36	1	0	-6.803315	-0.040265	5.280990
37	1	0	-1.213348	-1.717730	7.146564
38	1	0	-0.257684	-0.284004	7.606396
39	1	0	-2.046563	-0.221804	7.571481

### Structure 5-18 in gas phase

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	8	0	0.000000	0.000000	0.000000
2	6	0	0.000000	0.000000	1.458242
3	6	0	1.419105	0.000000	2.072819
4	6	0	2.327492	0.920765	1.304314
5	6	0	2.042360	1.314495	0.055425
6	6	0	0.876773	0.781146	-0.680728
7	8	0	0.706005	0.957633	-1.877780
8	8	0	2.034851	-1.283425	2.137860
9	6	0	-0.834327	-1.202083	1.840088
10	6	0	-1.426986	-1.455775	3.012362
11	6	0	-1.414097	-0.592958	4.249083
12	8	0	-1.143828	-1.438518	5.422647
13	6	0	-2.738246	0.127901	4.538151
14	6	0	-3.981164	-0.769367	4.646115
15	6	0	-5.279146	0.008314	4.930083
16	6	0	-5.346941	0.663674	6.317483
17	6	0	0.105470	-1.906851	5.597272
18	8	0	1.037375	-1.667499	4.839184
19	6	0	0.210382	-2.756779	6.838478
20	1	0	-0.485346	0.933908	1.765704
21	1	0	1.312505	0.400057	3.088222
22	1	0	3.248099	1.232574	1.792541
23	1	0	2.696525	1.966568	-0.515050
24	1	0	1.746026	-1.679718	2.982877
25	1	0	-0.936712	-1.932331	1.040597
26	1	0	-1.984350	-2.385949	3.107256
27	1	0	-0.615765	0.150138	4.201443
28	1	0	-2.597737	0.701705	5.461067
29	1	0	-2.883386	0.859000	3.732722
30	1	0	-4.108934	-1.322184	3.707961
31	1	0	-3.827592	-1.518260	5.433108
32	1	0	-5.419051	0.773961	4.155053
33	1	0	-6.122909	-0.685226	4.827078
34	1	0	-4.577864	1.432064	6.450503
35	1	0	-6.318695	1.145132	6.473474
36	1	0	-5.213840	-0.081207	7.111427
37	1	0	1.247987	-3.048582	6.997512
38	1	0	-0.164159	-2.207278	7.706219
39	1	0	-0.409607	-3.651039	6.722724

### Structure 5-19 in gas phase

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	8	0	0.000000	0.000000	0.000000
2	6	0	0.000000	0.000000	1.468941
3	6	0	1.429124	0.000000	2.033042
4	6	0	2.242536	1.068592	1.345581
5	6	0	1.921374	1.487912	0.111270
6	6	0	0.812781	0.872259	-0.654771
7	8	0	0.642854	1.061618	-1.849406
8	8	0	2.100516	-1.266047	1.961883
9	6	0	-0.800330	-1.197855	1.890942
10	6	0	-1.925000	-1.200437	2.619720
11	6	0	-2.670783	-0.016358	3.180170
12	8	0	-2.530683	-0.050121	4.647864
13	6	0	-4.183458	-0.031390	2.925999
14	6	0	-4.607646	0.184069	1.458784
15	6	0	-4.599404	-1.068582	0.567489
16	6	0	-5.102024	-0.782619	-0.853846
17	6	0	-1.436649	0.526784	5.191758
18	8	0	-0.577651	1.105821	4.543320
19	6	0	-1.414363	0.352460	6.690895
20	1	0	-0.467723	0.931479	1.792629
21	1	0	1.341069	0.219637	3.099194
22	1	0	3.123708	1.449965	1.856384
23	1	0	2.506950	2.226424	-0.427687
24	1	0	2.306814	-1.455081	1.030480
25	1	0	-0.390851	-2.153083	1.568909
26	1	0	-2.367640	-2.166218	2.864109
27	1	0	-2.249069	0.926996	2.832910
28	1	0	-4.606349	-0.968615	3.309121
29	1	0	-4.603158	0.773507	3.539893
30	1	0	-5.626987	0.590177	1.464848
31	1	0	-3.980378	0.963177	1.003929
32	1	0	-5.232363	-1.838315	1.029643
33	1	0	-3.589648	-1.488835	0.514842
34	1	0	-6.124710	-0.386525	-0.841759
35	1	0	-5.104026	-1.692668	-1.463976
36	1	0	-4.465833	-0.046147	-1.358541
37	1	0	-1.193281	-0.693322	6.927878
38	1	0	-0.642999	0.989663	7.123258
39	1	0	-2.389652	0.590162	7.122547

### Structure 5-20 in gas phase

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	8	0	0.000000	0.000000	0.000000
2	6	0	0.000000	0.000000	1.468883
3	6	0	1.429140	0.000000	2.032960
4	6	0	2.242452	1.068692	1.345545
5	6	0	1.921247	1.488091	0.111272
6	6	0	0.812713	0.872418	-0.654785
7	8	0	0.642654	1.061843	-1.849384
8	8	0	2.100548	-1.266024	1.961632
9	6	0	-0.800277	-1.197897	1.890896
10	6	0	-1.924623	-1.200610	2.620181
11	6	0	-2.670127	-0.016632	3.181220
12	8	0	-2.529550	-0.050811	4.648846
13	6	0	-4.182904	-0.031493	2.927570
14	6	0	-4.607630	0.184460	1.460581
15	6	0	-4.599951	-1.067933	0.568907
16	6	0	-5.103125	-0.781471	-0.852127
17	6	0	-1.435128	0.525606	5.192494
18	8	0	-0.576523	1.105124	4.543942
19	6	0	-1.411005	0.349213	6.691338
20	1	0	-0.467730	0.931464	1.792634
21	1	0	1.341166	0.219563	3.099132
22	1	0	3.123599	1.450140	1.856341
23	1	0	2.506721	2.226712	-0.427653
24	1	0	2.307103	-1.454792	1.030233
25	1	0	-0.391001	-2.153059	1.568402
26	1	0	-2.367195	-2.166434	2.864512
27	1	0	-2.248465	0.926774	2.834054
28	1	0	-4.605709	-0.968809	3.310563
29	1	0	-4.602312	0.773244	3.541874
30	1	0	-5.626912	0.590711	1.467176
31	1	0	-3.980438	0.963614	1.005704
32	1	0	-3.590287	-1.488335	0.515719
33	1	0	-5.232837	-1.837701	1.031104
34	1	0	-6.125752	-0.385240	-0.839475
35	1	0	-4.467053	-0.044917	-1.356853
36	1	0	-5.105509	-1.691323	-1.462543
37	1	0	-2.389877	0.570081	7.123597
38	1	0	-1.172583	-0.693388	6.925810
39	1	0	-0.649512	0.997277	7.125134



## Structure 5-21 in gas phase

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	8	0	0.000000	0.000000	0.000000
2	6	0	0.000000	0.000000	1.462008
3	6	0	1.421000	0.000000	2.056000
4	6	0	2.275102	1.012767	1.341817
5	6	0	1.977580	1.412483	0.097419
6	6	0	0.857720	0.816145	-0.665076
7	8	0	0.707330	0.983674	-1.865897
8	8	0	2.097760	-1.262520	1.957733
9	6	0	-0.801331	-1.205297	1.867552
10	6	0	-1.841355	-1.248153	2.711165
11	6	0	-2.503840	-0.105664	3.439165
12	8	0	-2.352233	-0.326612	4.886663
13	6	0	-4.017947	-0.050484	3.200539
14	6	0	-4.429301	0.251123	1.747999
15	6	0	-4.059439	1.646605	1.210505
16	6	0	-4.717247	2.814610	1.959734
17	6	0	-1.213840	0.099243	5.476723
18	8	0	-0.313236	0.674207	4.883758
19	6	0	-1.203580	-0.234771	6.948677
20	1	0	-0.477657	0.929404	1.782077
21	1	0	1.308983	0.289907	3.106204
22	1	0	3.162725	1.379741	1.851863
23	1	0	2.589633	2.122180	-0.450595
24	1	0	1.801874	-1.821488	2.695350
25	1	0	-0.467475	-2.135168	1.410388
26	1	0	-2.293705	-2.220987	2.906786
27	1	0	-2.035769	0.850145	3.206857
28	1	0	-4.447406	-1.013804	3.501705
29	1	0	-4.435024	0.700651	3.880033
30	1	0	-4.000783	-0.510306	1.085144
31	1	0	-5.518359	0.131018	1.683274
32	1	0	-2.970277	1.780119	1.210621
33	1	0	-4.359008	1.688437	0.156230
34	1	0	-5.808979	2.710774	1.970443
35	1	0	-4.380257	2.881241	3.000062
36	1	0	-4.478812	3.769383	1.478328
37	1	0	-1.115787	-1.318680	7.074488
38	1	0	-0.357796	0.255136	7.430723
39	1	0	-2.139627	0.076226	7.419418

## Structure 5-1 in CHCl<sub>3</sub> solution

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	8	0	0.000000	0.000000	0.000000
2	6	0	0.000000	0.000000	1.463330
3	6	0	1.431351	0.000000	2.024179
4	6	0	2.226332	1.093402	1.353552
5	6	0	1.893376	1.525890	0.127227
6	6	0	0.789328	0.906108	-0.650200
7	8	0	0.614624	1.117440	-1.834130
8	8	0	2.110943	-1.257254	1.908624
9	6	0	-0.794283	-1.200883	1.889676
10	6	0	-1.920750	-1.204248	2.614173
11	6	0	-2.692774	-0.017395	3.132105
12	8	0	-2.613893	-0.004649	4.600282
13	6	0	-4.179383	-0.099976	2.778123
14	6	0	-4.995476	1.123927	3.216593
15	6	0	-6.480001	1.020715	2.835324
16	6	0	-7.298863	2.241402	3.274423
17	6	0	-1.519807	0.561971	5.159686
18	8	0	-0.625961	1.094471	4.523981
19	6	0	-1.551676	0.436644	6.664967
20	1	0	-0.468959	0.928001	1.796539
21	1	0	1.351518	0.188844	3.097054
22	1	0	3.104318	1.478759	1.867899
23	1	0	2.462588	2.281954	-0.405457
24	1	0	2.305047	-1.410104	0.968582
25	1	0	-0.372550	-2.155431	1.582182
26	1	0	-2.358477	-2.169933	2.869572
27	1	0	-2.272816	0.923358	2.774023
28	1	0	-4.247793	-0.222713	1.690087
29	1	0	-4.598559	-1.011316	3.223456
30	1	0	-4.906987	1.250863	4.302301
31	1	0	-4.567814	2.028468	2.761834
32	1	0	-6.568763	0.893187	1.748217
33	1	0	-6.906471	0.114039	3.284893
34	1	0	-8.351647	2.137607	2.990009
35	1	0	-7.259522	2.375642	4.361827
36	1	0	-6.919424	3.160928	2.813597
37	1	0	-2.532214	0.719132	7.056640
38	1	0	-1.373661	-0.607079	6.944094
39	1	0	-0.773005	1.063614	7.099336

Structure 5-2 in CHCl<sub>3</sub> solution

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	8	0	0.000000	0.000000	0.000000
2	6	0	0.000000	0.000000	1.463332
3	6	0	1.430953	0.000000	2.024172
4	6	0	2.226364	1.092626	1.352843
5	6	0	1.892041	1.527018	0.127556
6	6	0	0.786728	0.909000	-0.649345
7	8	0	0.609404	1.123315	-1.832336
8	8	0	2.110220	-1.257632	1.910202
9	6	0	-0.794046	-1.201170	1.889415
10	6	0	-1.913796	-1.204872	2.624349
11	6	0	-2.672406	-0.020873	3.168999
12	8	0	-2.550573	-0.018132	4.635240
13	6	0	-4.174205	-0.088001	2.879726
14	6	0	-4.510696	0.035050	1.386197
15	6	0	-6.021576	-0.002618	1.112733
16	6	0	-6.364910	0.122251	-0.377268
17	6	0	-1.445918	0.553056	5.167520
18	8	0	-0.574642	1.098468	4.511278
19	6	0	-1.431645	0.413648	6.671882
20	1	0	-0.470328	0.926954	1.797299
21	1	0	3.105181	1.476937	1.866531
22	1	0	2.461071	2.283372	-0.404923
23	1	0	2.302039	-1.413316	0.970140
24	1	0	-0.377723	-2.155197	1.572784
25	1	0	-2.352816	-2.170848	2.877658
26	1	0	-2.262811	0.921788	2.803906
27	1	0	-4.573172	-1.028738	3.280408
28	1	0	-4.659574	0.721617	3.438149
29	1	0	-4.096271	0.974070	0.993721
30	1	0	-4.019552	-0.769702	0.825320
31	1	0	-6.437699	-0.939763	1.506356
32	1	0	-6.512428	0.806454	1.670166
33	1	0	-7.447875	0.091554	-0.539613
34	1	0	-5.992277	1.065651	-0.792945
35	1	0	-5.917349	-0.692833	-0.957576
36	1	0	-0.681246	1.083038	7.092836
37	1	0	-2.416859	0.628324	7.092825
38	1	0	-1.178089	-0.619262	6.932905
39	1	0	1.350520	0.190298	3.096595

Structure 5-3 in CHCl<sub>3</sub> solution

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	8	0	0.000000	0.000000	0.000000
2	6	0	0.000000	0.000000	1.462975
3	6	0	1.431656	0.000000	2.023501
4	6	0	2.226460	1.093283	1.352447
5	6	0	1.892235	1.527150	0.126958
6	6	0	0.788110	0.907466	-0.650152
7	8	0	0.612451	1.119245	-1.833810
8	8	0	2.110243	-1.257557	1.907773
9	6	0	-0.791949	-1.202765	1.889385
10	6	0	-1.899043	-1.213707	2.643056
11	6	0	-2.652589	-0.033060	3.200907
12	8	0	-2.532766	-0.042903	4.666707
13	6	0	-4.149877	-0.116855	2.889542
14	6	0	-4.996571	1.056425	3.411208
15	6	0	-4.698339	2.415014	2.757241
16	6	0	-5.633817	3.526988	3.250191
17	6	0	-1.424055	0.515351	5.204548
18	8	0	-0.551183	1.064614	4.553714
19	6	0	-1.405789	0.355537	6.706813
20	1	0	-0.469901	0.927888	1.795771
21	1	0	1.351489	0.189351	3.096136
22	1	0	3.104810	1.478386	1.866353
23	1	0	2.460775	2.283816	-0.405592
24	1	0	2.297814	-1.414061	0.966963
25	1	0	-0.382406	-2.154306	1.557030
26	1	0	-2.332884	-2.182232	2.894478
27	1	0	-2.234962	0.907902	2.845414
28	1	0	-4.249417	-0.192306	1.799391
29	1	0	-4.534501	-1.056858	3.304390
30	1	0	-6.052321	0.809165	3.239266
31	1	0	-4.876831	1.136038	4.498596
32	1	0	-3.660044	2.710245	2.954884
33	1	0	-4.787829	2.320295	1.666646
34	1	0	-5.545394	3.668627	4.333816
35	1	0	-5.402929	4.483853	2.769685
36	1	0	-6.681735	3.289191	3.032369
37	1	0	-2.389066	0.565719	7.134557
38	1	0	-1.152591	-0.681070	6.953153
39	1	0	-0.652813	1.017952	7.134117

### Structure 5-4 in CHCl<sub>3</sub> solution

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	8	0	0.000000	0.000000	0.000000
2	6	0	0.000000	0.000000	1.462874
3	6	0	1.430497	0.000000	2.025536
4	6	0	2.228687	1.089906	1.352843
5	6	0	1.897497	1.520880	0.125468
6	6	0	0.791715	0.903173	-0.651112
7	8	0	0.617447	1.113771	-1.835237
8	8	0	2.108870	-1.258657	1.916008
9	6	0	-0.793489	-1.202776	1.886744
10	6	0	-1.902488	-1.215264	2.637558
11	6	0	-2.654812	-0.036342	3.200789
12	8	0	-2.536440	-0.056966	4.666545
13	6	0	-4.150951	-0.104516	2.885911
14	6	0	-4.939663	1.125968	3.359242
15	6	0	-6.458189	1.023656	3.131805
16	6	0	-6.884605	0.974346	1.657357
17	6	0	-1.423606	0.487841	5.209531
18	8	0	-0.544616	1.032164	4.563127
19	6	0	-1.411654	0.320723	6.711029
20	1	0	-0.470275	0.928056	1.795117
21	1	0	1.348858	0.192688	3.097373
22	1	0	3.107224	1.474099	1.867137
23	1	0	2.468796	2.274505	-0.408461
24	1	0	2.311300	-1.413179	0.978018
25	1	0	-0.384798	-2.153449	1.550842
26	1	0	-2.338496	-2.184190	2.883492
27	1	0	-2.238585	0.909627	2.852080
28	1	0	-4.244615	-0.225936	1.800947
29	1	0	-4.565246	-1.013524	3.341658
30	1	0	-4.752285	1.275478	4.428775
31	1	0	-4.556914	2.020435	2.847700
32	1	0	-6.842186	0.137040	3.654358
33	1	0	-6.936697	1.887404	3.610362
34	1	0	-6.508966	1.846048	1.108019
35	1	0	-6.513305	0.077648	1.149947
36	1	0	-7.976265	0.970934	1.566071
37	1	0	-0.637427	0.955575	7.142047
38	1	0	-2.387828	0.563984	7.137850
39	1	0	-1.196283	-0.725066	6.954322

### Structure 5-5 in CHCl<sub>3</sub> solution

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	8	0	0.000000	0.000000	0.000000
2	6	0	0.000000	0.000000	1.463769
3	6	0	1.431026	0.000000	2.024515
4	6	0	2.227697	1.091499	1.352492
5	6	0	1.895674	1.523082	0.125578
6	6	0	0.789384	0.905982	-0.650464
7	8	0	0.612036	1.119251	-1.833672
8	8	0	2.110299	-1.257723	1.911153
9	6	0	-0.793234	-1.200747	1.892033
10	6	0	-1.925448	-1.201669	2.607699
11	6	0	-2.705021	-0.016047	3.117783
12	8	0	-2.607934	0.016409	4.585767
13	6	0	-4.204219	-0.119211	2.816704
14	6	0	-4.561609	-0.119714	1.320026
15	6	0	-4.244710	1.186363	0.574348
16	6	0	-4.738833	1.172789	-0.878080
17	6	0	-1.513896	0.600798	5.125484
18	8	0	-0.631356	1.133429	4.473736
19	6	0	-1.527745	0.494774	6.632633
20	1	0	-0.469355	0.927287	1.797899
21	1	0	1.350862	0.190652	3.096954
22	1	0	3.106346	1.475911	1.866366
23	1	0	2.466567	2.276990	-0.408363
24	1	0	2.302134	-1.413477	0.971086
25	1	0	-0.364068	-2.156392	1.598326
26	1	0	-2.360872	-2.167523	2.867682
27	1	0	-2.299249	0.923827	2.745444
28	1	0	-4.584173	-1.035894	3.284694
29	1	0	-4.704984	0.718262	3.317892
30	1	0	-4.059385	-0.955401	0.816533
31	1	0	-5.637905	-0.319351	1.237297
32	1	0	-4.702314	2.029490	1.110176
33	1	0	-3.163039	1.369040	0.575801
34	1	0	-4.270242	0.361827	-1.446792
35	1	0	-5.825206	1.031436	-0.926320
36	1	0	-4.501056	2.112946	-1.386952
37	1	0	-2.515522	0.739945	7.030602
38	1	0	-1.301711	-0.536860	6.922171
39	1	0	-0.771399	1.158657	7.051565

Structure 5-6 in CHCl<sub>3</sub> solution

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	8	0	0.000000	0.000000	0.000000
2	6	0	0.000000	0.000000	1.462911
3	6	0	1.431266	0.000000	2.023720
4	6	0	2.225895	1.093906	1.353189
5	6	0	1.892620	1.526743	0.126997
6	6	0	0.788419	0.906845	-0.650174
7	8	0	0.612943	1.118563	-1.833901
8	8	0	2.110787	-1.257309	1.907726
9	6	0	-0.795533	-1.200848	1.887851
10	6	0	-1.904055	-1.207946	2.639460
11	6	0	-2.648082	-0.023820	3.202794
12	8	0	-2.540877	-0.052523	4.669088
13	6	0	-4.142401	-0.070850	2.875740
14	6	0	-4.920458	1.161265	3.362373
15	6	0	-6.403079	1.173269	2.949670
16	6	0	-7.253763	0.063048	3.583997
17	6	0	-1.425781	0.478417	5.221424
18	8	0	-0.536648	1.015510	4.582878
19	6	0	-1.424248	0.304287	6.722131
20	1	0	-0.469301	0.928637	1.794815
21	1	0	1.351006	0.188158	3.096531
22	1	0	3.103750	1.479401	1.867658
23	1	0	2.461337	2.283152	-0.405735
24	1	0	2.305814	-1.410457	0.967922
25	1	0	-0.390554	-2.153027	1.551694
26	1	0	-2.344593	-2.174259	2.887359
27	1	0	-2.217942	0.918905	2.862285
28	1	0	-4.232259	-0.158331	1.785435
29	1	0	-4.563869	-0.989100	3.301035
30	1	0	-4.846147	1.229778	4.454534
31	1	0	-4.438437	2.063331	2.961714
32	1	0	-6.828389	2.146205	3.226191
33	1	0	-6.476409	1.110873	1.855516
34	1	0	-7.193145	0.095625	4.678561
35	1	0	-8.307889	0.172455	3.306791
36	1	0	-6.935288	-0.934599	3.263594
37	1	0	-1.192419	-0.739105	6.960897
38	1	0	-0.663189	0.948512	7.162746
39	1	0	-2.407440	0.528713	7.142770

Structure 5-7 in CHCl<sub>3</sub> solution

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	8	0	0.000000	0.000000	0.000000
2	6	0	0.000000	0.000000	1.463105
3	6	0	1.431508	0.000000	2.023754
4	6	0	2.225437	1.094858	1.354095
5	6	0	1.891586	1.528218	0.128256
6	6	0	0.788168	0.907552	-0.649552
7	8	0	0.613245	1.119454	-1.833319
8	8	0	2.111845	-1.256591	1.905892
9	6	0	-0.793291	-1.200698	1.891970
10	6	0	-1.916296	-1.207254	2.622567
11	6	0	-2.677478	-0.015413	3.146500
12	8	0	-2.619111	-0.021267	4.616355
13	6	0	-4.163919	0.001033	2.766821
14	6	0	-5.005457	-1.196098	3.234179
15	6	0	-6.494081	-1.033172	2.891032
16	6	0	-7.350320	-2.221860	3.346229
17	6	0	-1.515699	0.509036	5.193386
18	8	0	-0.601433	1.024492	4.573033
19	6	0	-1.565668	0.367486	6.696747
20	1	0	-0.468220	0.928909	1.795054
21	1	0	1.351497	0.186794	3.096983
22	1	0	3.103261	1.480434	1.868545
23	1	0	2.459738	2.285381	-0.403992
24	1	0	2.306631	-1.407561	0.965666
25	1	0	-0.370445	-2.154493	1.583436
26	1	0	-2.340205	-2.175458	2.883764
27	1	0	-2.220991	0.915846	2.811041
28	1	0	-4.592817	0.925715	3.173695
29	1	0	-4.215235	0.087859	1.674061
30	1	0	-4.637033	-2.120752	2.772305
31	1	0	-4.893094	-1.321150	4.317928
32	1	0	-6.873881	-0.112065	3.353233
33	1	0	-6.604579	-0.897838	1.806740
34	1	0	-8.405148	-2.073452	3.090451
35	1	0	-7.021610	-3.153839	2.871412
36	1	0	-7.287943	-2.363662	4.431630
37	1	0	-2.547986	0.652886	7.081457
38	1	0	-1.397620	-0.680737	6.965301
39	1	0	-0.786360	0.982715	7.146589

Structure 5-8 in CHCl<sub>3</sub> solution

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	8	0	0.000000	0.000000	0.000000
2	6	0	0.000000	0.000000	1.457964
3	6	0	1.414342	0.000000	2.047881
4	6	0	2.244738	1.056533	1.357805
5	6	0	1.954691	1.446419	0.109028
6	6	0	0.851486	0.826203	-0.668356
7	8	0	0.714972	0.994278	-1.864665
8	8	0	1.995501	-1.305326	1.884078
9	6	0	-0.800739	-1.202774	1.874174
10	6	0	-1.903494	-1.212892	2.633753
11	6	0	-2.635983	-0.034080	3.221665
12	8	0	-2.546655	-0.103458	4.688761
13	6	0	-4.127495	-0.053726	2.878813
14	6	0	-4.904500	1.165353	3.394868
15	6	0	-6.394362	1.126793	3.022622
16	6	0	-7.174144	2.342323	3.540188
17	6	0	-1.438283	0.404875	5.272382
18	8	0	-0.533011	0.950928	4.664323
19	6	0	-1.468912	0.198027	6.769104
20	1	0	-0.471225	0.928749	1.787628
21	1	0	1.303931	0.238589	3.112124
22	1	0	3.106387	1.467339	1.883009
23	1	0	2.547435	2.176489	-0.434055
24	1	0	2.858689	-1.314250	2.327183
25	1	0	-0.404957	-2.147577	1.509942
26	1	0	-2.354590	-2.179206	2.862257
27	1	0	-2.191116	0.912792	2.912934
28	1	0	-4.208320	-0.112067	1.786365
29	1	0	-4.568987	-0.977022	3.275299
30	1	0	-4.803852	1.226774	4.485222
31	1	0	-4.454435	2.082271	2.988997
32	1	0	-6.495533	1.065614	1.930874
33	1	0	-6.843254	0.207795	3.422638
34	1	0	-7.122692	2.410984	4.633208
35	1	0	-6.771538	3.276215	3.130717
36	1	0	-8.231627	2.285645	3.259918
37	1	0	-1.327361	-0.864909	6.990614
38	1	0	-0.668117	0.773639	7.233421
39	1	0	-2.437765	0.492741	7.180501

Structure 5-9 in CHCl<sub>3</sub> solution

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	8	0	0.000000	0.000000	0.000000
2	6	0	0.000000	0.000000	1.450361
3	6	0	1.415459	0.000000	2.080417
4	6	0	2.332276	0.909618	1.308659
5	6	0	2.049482	1.306772	0.061066
6	6	0	0.875638	0.792799	-0.681926
7	8	0	0.701911	0.992412	-1.868248
8	8	0	2.024995	-1.281301	2.165560
9	6	0	-0.830248	-1.205330	1.830949
10	6	0	-1.472070	-1.438232	2.981146
11	6	0	-1.526908	-0.542001	4.192268
12	8	0	-1.264394	-1.342703	5.399071
13	6	0	-2.884484	0.136094	4.422542
14	6	0	-4.094084	-0.803289	4.534060
15	6	0	-5.399137	-0.049171	4.830648
16	6	0	-6.617397	-0.975770	4.933070
17	6	0	-0.002100	-1.758359	5.621233
18	8	0	0.945183	-1.489626	4.897633
19	6	0	0.089858	-2.603694	6.868893
20	1	0	-0.490309	0.931181	1.763544
21	1	0	1.298333	0.411309	3.091584
22	1	0	3.260204	1.203734	1.795015
23	1	0	2.710038	1.949938	-0.512570
24	1	0	1.745209	-1.662390	3.018399
25	1	0	-0.882600	-1.954798	1.044669
26	1	0	-2.021341	-2.373316	3.078551
27	1	0	-0.751280	0.225538	4.144164
28	1	0	-2.801518	0.742303	5.333711
29	1	0	-3.036841	0.836746	3.591779
30	1	0	-4.212865	-1.366620	3.600154
31	1	0	-3.913108	-1.540997	5.325453
32	1	0	-5.288901	0.513525	5.767449
33	1	0	-5.574064	0.697662	4.044627
34	1	0	-6.780002	-1.523487	3.997498
35	1	0	-6.487878	-1.715529	5.731817
36	1	0	-7.529982	-0.409743	5.149106
37	1	0	-0.467639	-2.146486	7.689953
38	1	0	-0.357263	-3.583789	6.672050
39	1	0	1.136328	-2.736036	7.143185

### Structure 5-10 in CHCl<sub>3</sub> solution

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	8	0	0.000000	0.000000	0.000000
2	6	0	0.000000	0.000000	1.468799
3	6	0	1.429702	0.000000	2.021880
4	6	0	2.230491	1.086723	1.346494
5	6	0	1.892888	1.525393	0.123972
6	6	0	0.777197	0.918475	-0.647115
7	8	0	0.586539	1.147041	-1.825491
8	8	0	2.106203	-1.259959	1.920071
9	6	0	-0.810668	-1.181588	1.932446
10	6	0	-2.148967	-1.234198	1.948528
11	6	0	-3.086937	-0.163887	1.452296
12	8	0	-3.939915	0.271623	2.567418
13	6	0	-4.023141	-0.621428	0.325781
14	6	0	-4.930422	-1.819566	0.648585
15	6	0	-5.989446	-2.098581	-0.433444
16	6	0	-5.417617	-2.528697	-1.792262
17	6	0	-3.434469	1.215778	3.396798
18	8	0	-2.341149	1.735391	3.256707
19	6	0	-4.402475	1.529855	4.514200
20	1	0	-0.478037	0.929375	1.795369
21	1	0	1.363903	0.193635	3.096759
22	1	0	3.117219	1.460810	1.853931
23	1	0	2.465227	2.278342	-0.409735
24	1	0	2.241899	-1.453470	0.977016
25	1	0	-0.241725	-2.040688	2.281058
26	1	0	-2.625851	-2.132407	2.337928
27	1	0	-2.528983	0.706638	1.107998
28	1	0	-4.644289	0.241327	0.051732
29	1	0	-3.387785	-0.838090	-0.539946
30	1	0	-4.322981	-2.723248	0.787755
31	1	0	-5.440780	-1.634427	1.601066
32	1	0	-6.659737	-2.885411	-0.064778
33	1	0	-6.614855	-1.205187	-0.565615
34	1	0	-4.813376	-1.740526	-2.253512
35	1	0	-4.781800	-3.416485	-1.689790
36	1	0	-6.221504	-2.776193	-2.494253
37	1	0	-4.476463	0.667683	5.184914
38	1	0	-4.045098	2.394597	5.073240
39	1	0	-5.401823	1.721763	4.114771

### Structure 5-11 in CHCl<sub>3</sub> solution

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	8	0	0.000000	0.000000	0.000000
2	6	0	0.000000	0.000000	1.458185
3	6	0	1.414558	0.000000	2.046670
4	6	0	2.241707	1.060786	1.358981
5	6	0	1.950484	1.451657	0.110796
6	6	0	0.849602	0.828421	-0.667593
7	8	0	0.713744	0.996329	-1.864028
8	8	0	1.997641	-1.303871	1.878204
9	6	0	-0.800836	-1.202199	1.875469
10	6	0	-1.911799	-1.206982	2.623361
11	6	0	-2.649202	-0.025772	3.201320
12	8	0	-2.535460	-0.070242	4.668720
13	6	0	-4.151004	-0.053893	2.905305
14	6	0	-4.480859	0.128362	1.416281
15	6	0	-5.991227	0.122470	1.138302
16	6	0	-6.328990	0.308594	-0.346617
17	6	0	-1.430691	0.472026	5.227253
18	8	0	-0.546542	1.028692	4.597577
19	6	0	-1.433510	0.287204	6.727256
20	1	0	-0.471456	0.927515	1.790222
21	1	0	1.304966	0.235265	3.111634
22	1	0	3.101396	1.474187	1.885348
23	1	0	2.540470	2.184884	-0.431027
24	1	0	2.867201	-1.308637	2.308782
25	1	0	-0.398624	-2.149344	1.524375
26	1	0	-2.363525	-2.172132	2.856913
27	1	0	-2.219342	0.919875	2.868823
28	1	0	-4.568776	-1.000672	3.271175
29	1	0	-4.623300	0.744336	3.490873
30	1	0	-4.052167	1.075247	1.059495
31	1	0	-3.999489	-0.662142	0.827571
32	1	0	-6.421250	-0.823223	1.494856
33	1	0	-6.472498	0.916339	1.725244
34	1	0	-7.411834	0.297512	-0.512550
35	1	0	-5.943793	1.262530	-0.725226
36	1	0	-5.889798	-0.489126	-0.956657
37	1	0	-1.221754	-0.761578	6.960539
38	1	0	-0.664104	0.917095	7.174070
39	1	0	-2.414153	0.525900	7.146285

Structure 5-12 in CHCl<sub>3</sub> solution

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	8	0	0.000000	0.000000	0.000000
2	6	0	0.000000	0.000000	1.458198
3	6	0	1.414551	0.000000	2.046671
4	6	0	2.241743	1.060719	1.358915
5	6	0	1.950446	1.451714	0.110785
6	6	0	0.849405	0.828686	-0.667546
7	8	0	0.713277	0.996905	-1.863903
8	8	0	1.997627	-1.303882	1.878347
9	6	0	-0.800877	-1.202199	1.875406
10	6	0	-1.912272	-1.206932	2.622660
11	6	0	-2.649933	-0.025653	3.200173
12	8	0	-2.536320	-0.069591	4.667581
13	6	0	-4.151695	-0.054124	2.904064
14	6	0	-4.481451	0.127230	1.414909
15	6	0	-5.991794	0.121094	1.136801
16	6	0	-6.329418	0.306576	-0.348233
17	6	0	-1.431696	0.472927	5.226108
18	8	0	-0.547498	1.029512	4.596418
19	6	0	-1.434749	0.288509	6.726163
20	1	0	-0.471444	0.927496	1.790293
21	1	0	1.304964	0.235386	3.111614
22	1	0	3.101534	1.473998	1.885216
23	1	0	2.540469	2.184920	-0.431022
24	1	0	2.867090	-1.308690	2.309116
25	1	0	-0.398409	-2.149388	1.524727
26	1	0	-2.364048	-2.172090	2.856090
27	1	0	-2.220207	0.919939	2.867350
28	1	0	-4.569356	-1.000755	3.270454
29	1	0	-4.624157	0.744366	3.489145
30	1	0	-4.052751	1.073907	1.057586
31	1	0	-3.999997	-0.663606	0.826712
32	1	0	-6.421783	-0.824471	1.493731
33	1	0	-6.473181	0.915188	1.723347
34	1	0	-7.412226	0.294817	-0.514346
35	1	0	-5.944698	1.260619	-0.727049
36	1	0	-5.889661	-0.491070	-0.957966
37	1	0	-0.664929	0.917980	7.172850
38	1	0	-2.415260	0.528055	7.145033
39	1	0	-1.223851	-0.760368	6.959780

Structure 5-13 in CHCl<sub>3</sub> solution

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	8	0	0.000000	0.000000	0.000000
2	6	0	0.000000	0.000000	1.464011
3	6	0	1.430244	0.000000	2.025416
4	6	0	2.227241	1.091400	1.353734
5	6	0	1.895512	1.523141	0.126721
6	6	0	0.789486	0.905948	-0.650054
7	8	0	0.612877	1.119353	-1.833381
8	8	0	2.110048	-1.257624	1.913331
9	6	0	-0.794669	-1.200977	1.888901
10	6	0	-1.937312	-1.204528	2.588327
11	6	0	-2.709383	-0.018619	3.107154
12	8	0	-2.604830	-0.015278	4.576928
13	6	0	-4.214922	-0.053767	2.815521
14	6	0	-4.604191	0.139589	1.335531
15	6	0	-4.540439	-1.117818	0.452964
16	6	0	-5.008596	-0.852339	-0.983870
17	6	0	-1.506494	0.554545	5.123298
18	8	0	-0.627178	1.101287	4.478931
19	6	0	-1.511937	0.414391	6.627702
20	1	0	-0.469005	0.927844	1.797084
21	1	0	1.348674	0.191108	3.097688
22	1	0	3.105772	1.475678	1.867914
23	1	0	2.466553	2.277308	-0.406699
24	1	0	2.309085	-1.410851	0.974362
25	1	0	-0.363811	-2.155769	1.594773
26	1	0	-2.376520	-2.170297	2.840008
27	1	0	-2.288084	0.921290	2.748564
28	1	0	-4.637197	-0.990770	3.200512
29	1	0	-4.659712	0.752177	3.410557
30	1	0	-5.632632	0.521896	1.309879
31	1	0	-3.983875	0.930403	0.891127
32	1	0	-3.519621	-1.512369	0.431052
33	1	0	-5.167551	-1.900207	0.902427
34	1	0	-6.038741	-0.476432	-1.004989
35	1	0	-4.372000	-0.108985	-1.477068
36	1	0	-4.975499	-1.766712	-1.586159
37	1	0	-2.495610	0.657561	7.036946
38	1	0	-1.291794	-0.625053	6.892694
39	1	0	-0.748593	1.063594	7.056797

Structure 5-14 in CHCl<sub>3</sub> solution

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	8	0	0.000000	0.000000	0.000000
2	6	0	0.000000	0.000000	1.462973
3	6	0	1.431100	0.000000	2.024458
4	6	0	2.226220	1.093139	1.353511
5	6	0	1.893329	1.525814	0.127214
6	6	0	0.789195	0.906377	-0.650261
7	8	0	0.614132	1.117963	-1.834031
8	8	0	2.110380	-1.257468	1.910174
9	6	0	-0.795486	-1.200203	1.888924
10	6	0	-1.912628	-1.203883	2.627728
11	6	0	-2.671758	-0.017653	3.166911
12	8	0	-2.580521	-0.024448	4.634328
13	6	0	-4.161569	-0.094575	2.823641
14	6	0	-5.014326	1.081032	3.335112
15	6	0	-4.655180	2.472615	2.781156
16	6	0	-4.796465	2.610262	1.258216
17	6	0	-1.474627	0.521606	5.190470
18	8	0	-0.585726	1.061515	4.553786
19	6	0	-1.481867	0.359387	6.692521
20	1	0	-0.468775	0.928186	1.796375
21	1	0	1.350565	0.189743	3.097090
22	1	0	3.104223	1.478476	1.867850
23	1	0	2.462677	2.281904	-0.405317
24	1	0	2.305233	-1.411556	0.970454
25	1	0	-0.382829	-2.154189	1.567625
26	1	0	-2.352112	-2.169522	2.880534
27	1	0	-2.242358	0.920659	2.817453
28	1	0	-4.237671	-0.178382	1.733623
29	1	0	-4.562209	-1.030583	3.232405
30	1	0	-6.061497	0.863680	3.086134
31	1	0	-4.960462	1.106702	4.429684
32	1	0	-5.310660	3.206536	3.266644
33	1	0	-3.635628	2.747517	3.080897
34	1	0	-4.100065	1.960806	0.716978
35	1	0	-5.810736	2.352193	0.930551
36	1	0	-4.596354	3.638427	0.937938
37	1	0	-0.736581	1.021167	7.134088
38	1	0	-2.472368	0.567463	7.104160
39	1	0	-1.231338	-0.677545	6.940507

Structure 5-15 in CHCl<sub>3</sub> solution

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	8	0	0.000000	0.000000	0.000000
2	6	0	0.000000	0.000000	1.463979
3	6	0	1.430917	0.000000	2.024651
4	6	0	2.227056	1.092394	1.353570
5	6	0	1.895567	1.523398	0.126319
6	6	0	0.790183	0.905128	-0.650506
7	8	0	0.614426	1.117468	-1.834114
8	8	0	2.110723	-1.257329	1.911163
9	6	0	-0.793933	-1.200066	1.892980
10	6	0	-1.948859	-1.195510	2.571307
11	6	0	-2.751807	-0.004595	3.029844
12	8	0	-2.709691	0.056446	4.499229
13	6	0	-4.237461	-0.117444	2.672199
14	6	0	-4.529908	-0.139800	1.160251
15	6	0	-4.149838	1.129643	0.374905
16	6	0	-4.873819	2.404406	0.831094
17	6	0	-1.638805	0.657490	5.067168
18	8	0	-0.733925	1.179360	4.437855
19	6	0	-1.711940	0.586491	6.574690
20	1	0	-0.468986	0.927321	1.798327
21	1	0	1.351254	0.189810	3.097545
22	1	0	3.105102	1.477419	1.868013
23	1	0	2.466044	2.277971	-0.407113
24	1	0	2.302957	-1.412354	0.971078
25	1	0	-0.348770	-2.157576	1.630845
26	1	0	-2.386752	-2.158736	2.836709
27	1	0	-2.333717	0.929258	2.655310
28	1	0	-4.631886	-1.034004	3.128287
29	1	0	-4.762211	0.715516	3.152639
30	1	0	-4.021540	-0.999257	0.706600
31	1	0	-5.605420	-0.321780	1.035287
32	1	0	-3.064876	1.287127	0.412089
33	1	0	-4.378726	0.950016	-0.682449
34	1	0	-4.611070	2.687164	1.856719
35	1	0	-4.616322	3.250698	0.185118
36	1	0	-5.962612	2.277253	0.792576
37	1	0	-0.953949	1.239406	7.007489
38	1	0	-2.706834	0.869729	6.927585
39	1	0	-1.529130	-0.443894	6.896881



Structure 5-16 in CHCl<sub>3</sub> solution

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	8	0	0.000000	0.000000	0.000000
2	6	0	0.000000	0.000000	1.462672
3	6	0	1.431313	0.000000	2.023484
4	6	0	2.224985	1.095447	1.354061
5	6	0	1.890895	1.529038	0.128329
6	6	0	0.787800	0.908004	-0.649552
7	8	0	0.612907	1.119375	-1.833390
8	8	0	2.112043	-1.256206	1.904809
9	6	0	-0.791626	-1.202460	1.890691
10	6	0	-1.894093	-1.216940	2.651907
11	6	0	-2.633225	-0.030577	3.217669
12	8	0	-2.526593	-0.057697	4.684676
13	6	0	-4.131762	0.003216	2.888479
14	6	0	-4.960098	-1.206613	3.350812
15	6	0	-6.467225	-1.068020	3.063389
16	6	0	-7.180318	0.020186	3.879219
17	6	0	-1.417086	0.487341	5.235367
18	8	0	-0.528796	1.023040	4.594451
19	6	0	-1.425001	0.336387	6.738594
20	1	0	-0.468251	0.928825	1.795049
21	1	0	1.350560	0.186554	3.096564
22	1	0	3.102611	1.481237	1.868671
23	1	0	2.459050	2.286068	-0.404113
24	1	0	2.302860	-1.408488	0.963968
25	1	0	-0.382467	-2.152872	1.554414
26	1	0	-2.314300	-2.188077	2.907723
27	1	0	-2.182005	0.902692	2.881316
28	1	0	-4.532090	0.922202	3.331476
29	1	0	-4.219590	0.115608	1.800043
30	1	0	-4.598530	-2.111321	2.847901
31	1	0	-4.809195	-1.364136	4.425890
32	1	0	-6.617286	-0.880907	1.991488
33	1	0	-6.945355	-2.033363	3.271310
34	1	0	-8.256625	0.017505	3.675197
35	1	0	-7.045984	-0.142338	4.955416
36	1	0	-6.808505	1.023522	3.646169
37	1	0	-0.624620	0.938164	7.169100
38	1	0	-2.391625	0.635431	7.152115
39	1	0	-1.267111	-0.715672	6.997531

Structure 5-17 in CHCl<sub>3</sub> solution

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	8	0	0.000000	0.000000	0.000000
2	6	0	0.000000	0.000000	1.469579
3	6	0	1.430501	0.000000	2.022808
4	6	0	2.231272	1.085451	1.345521
5	6	0	1.896722	1.519738	0.120571
6	6	0	0.781784	0.911411	-0.650017
7	8	0	0.593084	1.134314	-1.830093
8	8	0	2.108184	-1.259796	1.922707
9	6	0	-0.807552	-1.187816	1.916997
10	6	0	-2.139908	-1.205909	2.056083
11	6	0	-3.094072	-0.071240	1.787512
12	8	0	-3.732813	0.290285	3.063776
13	6	0	-4.248501	-0.409198	0.834496
14	6	0	-3.837883	-0.606017	-0.640189
15	6	0	-3.351370	-2.015057	-1.014699
16	6	0	-2.974060	-2.129229	-2.497499
17	6	0	-3.067102	1.151705	3.868685
18	8	0	-2.002722	1.672684	3.583126
19	6	0	-3.814861	1.372065	5.163388
20	1	0	-0.475354	0.928007	1.799944
21	1	0	1.362978	0.195534	3.096963
22	1	0	3.116466	1.462224	1.853679
23	1	0	2.470194	2.271037	-0.414225
24	1	0	2.270386	-1.441411	0.981571
25	1	0	-0.240903	-2.092650	2.125914
26	1	0	-2.613925	-2.127970	2.394416
27	1	0	-2.566856	0.809810	1.420604
28	1	0	-4.782027	-1.293413	1.205920
29	1	0	-4.952337	0.428241	0.903541
30	1	0	-4.707934	-0.367570	-1.265213
31	1	0	-3.066321	0.127161	-0.909150
32	1	0	-4.141860	-2.741072	-0.778214
33	1	0	-2.485312	-2.286851	-0.402848
34	1	0	-3.823955	-1.882787	-3.145800
35	1	0	-2.650225	-3.145793	-2.747352
36	1	0	-2.154469	-1.446431	-2.746975
37	1	0	-3.748937	0.467648	5.777126
38	1	0	-3.369396	2.207501	5.703538
39	1	0	-4.873812	1.562312	4.971101

Structure 5-18 in CHCl<sub>3</sub> solution

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	8	0	0.000000	0.000000	0.000000
2	6	0	0.000000	0.000000	1.450308
3	6	0	1.415349	0.000000	2.078160
4	6	0	2.328655	0.915292	1.308622
5	6	0	2.043467	1.315829	0.062515
6	6	0	0.871444	0.798323	-0.681036
7	8	0	0.696115	0.999233	-1.866902
8	8	0	2.027708	-1.280639	2.156203
9	6	0	-0.836906	-1.201334	1.830346
10	6	0	-1.480315	-1.432340	2.980227
11	6	0	-1.539870	-0.545057	4.196298
12	8	0	-1.244340	-1.348539	5.393592
13	6	0	-2.939448	0.039241	4.422083
14	6	0	-3.081517	0.944020	5.659686
15	6	0	-2.253183	2.242200	5.648385
16	6	0	-2.622372	3.225870	4.528298
17	6	0	0.029771	-1.727314	5.611538
18	8	0	0.969159	-1.419928	4.892877
19	6	0	0.147416	-2.586771	6.847395
20	1	0	-0.488187	0.932423	1.763677
21	1	0	1.298135	0.405272	3.091247
22	1	0	3.255777	1.211276	1.795409
23	1	0	2.700983	1.963406	-0.509643
24	1	0	1.762275	-1.658298	3.014838
25	1	0	-0.901147	-1.946103	1.040476
26	1	0	-2.049088	-2.357749	3.073024
27	1	0	-0.791791	0.248040	4.144825
28	1	0	-3.211851	0.584613	3.511890
29	1	0	-3.647973	-0.794057	4.501861
30	1	0	-4.143013	1.206510	5.759136
31	1	0	-2.826619	0.362805	6.553018
32	1	0	-2.393377	2.739662	6.616092
33	1	0	-1.181910	2.007649	5.592981
34	1	0	-3.685538	3.490631	4.570596
35	1	0	-2.046349	4.153392	4.615350
36	1	0	-2.426662	2.814530	3.531778
37	1	0	-0.441487	-2.171281	7.668591
38	1	0	-0.248210	-3.584277	6.628849
39	1	0	1.195849	-2.673185	7.132564

Structure 5-19 in CHCl<sub>3</sub> solution

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	8	0	0.000000	0.000000	0.000000
2	6	0	0.000000	0.000000	1.450323
3	6	0	1.415320	0.000000	2.078177
4	6	0	2.328637	0.915324	1.308688
5	6	0	2.043520	1.315767	0.062539
6	6	0	0.871540	0.798209	-0.681047
7	8	0	0.696317	0.998999	-1.866949
8	8	0	2.027698	-1.280659	2.156124
9	6	0	-0.836923	-1.201329	1.830335
10	6	0	-1.480372	-1.432335	2.980191
11	6	0	-1.539976	-0.545035	4.196252
12	8	0	-1.244457	-1.348451	5.393569
13	6	0	-2.939587	0.039218	4.421972
14	6	0	-3.081800	0.943889	5.659629
15	6	0	-2.253358	2.242000	5.648638
16	6	0	-2.622222	3.225816	4.528579
17	6	0	0.029641	-1.727265	5.611506
18	8	0	0.969020	-1.419870	4.892836
19	6	0	0.147250	-2.586781	6.847323
20	1	0	-0.488200	0.932426	1.763671
21	1	0	1.298101	0.405166	3.091301
22	1	0	3.255709	1.211363	1.795538
23	1	0	2.701051	1.963316	-0.509638
24	1	0	1.762406	-1.658306	3.014808
25	1	0	-0.901138	-1.946090	1.040453
26	1	0	-2.049164	-2.357735	3.072962
27	1	0	-0.791931	0.248095	4.144763
28	1	0	-3.211952	0.584633	3.511793
29	1	0	-3.648087	-0.794115	4.501645
30	1	0	-4.143294	1.206453	5.758909
31	1	0	-2.827127	0.362567	6.552959
32	1	0	-2.393718	2.739376	6.616368
33	1	0	-1.182095	2.007358	5.593446
34	1	0	-2.045747	4.153067	4.615527
35	1	0	-2.426852	2.814348	3.532043
36	1	0	-3.685257	3.491076	4.571021
37	1	0	1.195713	-2.673610	7.132248
38	1	0	-0.441281	-2.171046	7.668668
39	1	0	-0.248858	-3.584118	6.628884

## Structure 5-20 in CHCl<sub>3</sub> solution

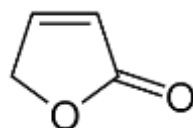
Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	8	0	0.000000	0.000000	0.000000
2	6	0	0.000000	0.000000	1.463691
3	6	0	1.431680	0.000000	2.023326
4	6	0	2.225241	1.094766	1.353087
5	6	0	1.890711	1.528663	0.127739
6	6	0	0.786608	0.908805	-0.649415
7	8	0	0.610105	1.122189	-1.832728
8	8	0	2.111543	-1.256965	1.906378
9	6	0	-0.795334	-1.199640	1.891324
10	6	0	-1.927930	-1.198767	2.606255
11	6	0	-2.706273	-0.008893	3.111288
12	8	0	-2.624422	0.008388	4.580220
13	6	0	-4.189299	-0.107259	2.736895
14	6	0	-5.017645	1.182443	2.896897
15	6	0	-5.282147	1.688495	4.327062
16	6	0	-6.063409	0.709439	5.214137
17	6	0	-1.522143	0.563513	5.135464
18	8	0	-0.631662	1.098609	4.496999
19	6	0	-1.538410	0.421309	6.639396
20	1	0	-0.469090	0.927822	1.797047
21	1	0	1.352688	0.187852	3.096347
22	1	0	3.103373	1.480223	1.867088
23	1	0	2.458555	2.286121	-0.404417
24	1	0	2.301517	-1.411225	0.965701
25	1	0	-0.370373	-2.156038	1.594130
26	1	0	-2.367802	-2.162899	2.864242
27	1	0	-2.285576	0.929632	2.747556
28	1	0	-4.221265	-0.399212	1.680175
29	1	0	-4.638703	-0.936947	3.295232
30	1	0	-4.531310	1.982138	2.321896
31	1	0	-5.985985	1.010949	2.407862
32	1	0	-4.336781	1.947871	4.815730
33	1	0	-5.848796	2.625229	4.247172
34	1	0	-5.496958	-0.207962	5.403243
35	1	0	-6.291938	1.160467	6.186280
36	1	0	-7.016396	0.426483	4.750311
37	1	0	-2.525433	0.659546	7.043305
38	1	0	-1.315624	-0.617942	6.903328
39	1	0	-0.779672	1.071566	7.075070

## CAPÍTULO II

### Aislamiento y elucidación estructural de 2(5*H*)-furanonas y sustancias aromáticas.

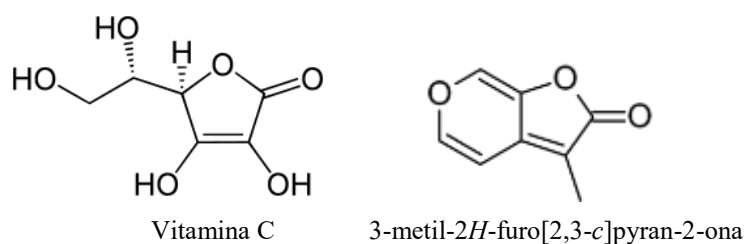
#### 6.1. Introducción

Otros compuestos aislados del género *Hyptis*, tales como las 2(5*H*)-furanonas, coloquialmente conocidos como butenólidas, están relacionados con las 5,6-dihidro-2*H*-piran-2-onas. Las butenólidas (Figura 1) son parte de la familia de las lactonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas con un cadena heterocíclica de cuatro carbonos comúnmente producidas por hongos, bacterias, corales y plantas.<sup>1</sup> En el contexto de los productos naturales, el nombre butenólida se emplea habitualmente y, por lo tanto, los esqueletos de estos compuesto se numeran como derivados del ácido 4-hidroxibutenoico y no como furano. Las butenólidas se pueden convertir en furanos mediante la reducción parcial de la lactona y luego la deshidratación.<sup>2</sup>



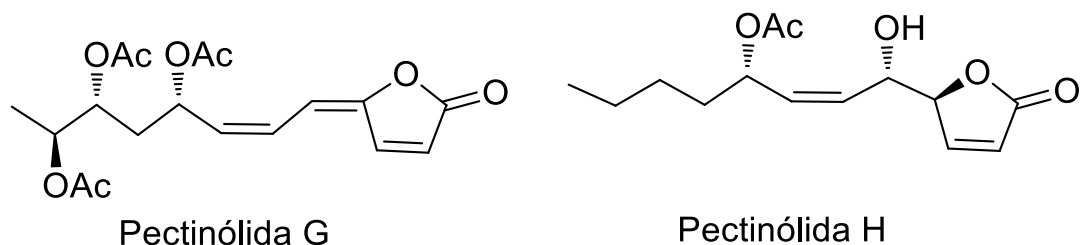
**Figura 1.** La bútenólida más simple, 2-furanona.

La butenólida más común y de importancia bioquímica es el ácido ascórbico (vitamina C) o las karrakinas como la, 3-metil-2*H*-furo[2,3-*c*]pyran-2-ona (Figura 2), que desencadenan la germinación de semillas en plantas pirófitas cuya reproducción depende del fuego de los incendios naturales por causa del calor o tormentas y de los provocados.<sup>3</sup>



**Figura 2.** Butenólidas de original natural.

De la especie *H. pectinata* se han aislado dos furanonas (Figura 3) denominadas como la pectinólida G de una colecta de Barbados<sup>4</sup> y la pectinólida H, relacionada con la pectinólida B, la cual presenta actividad antimicrobiana contra cepas de *S. aureus*.<sup>5</sup>

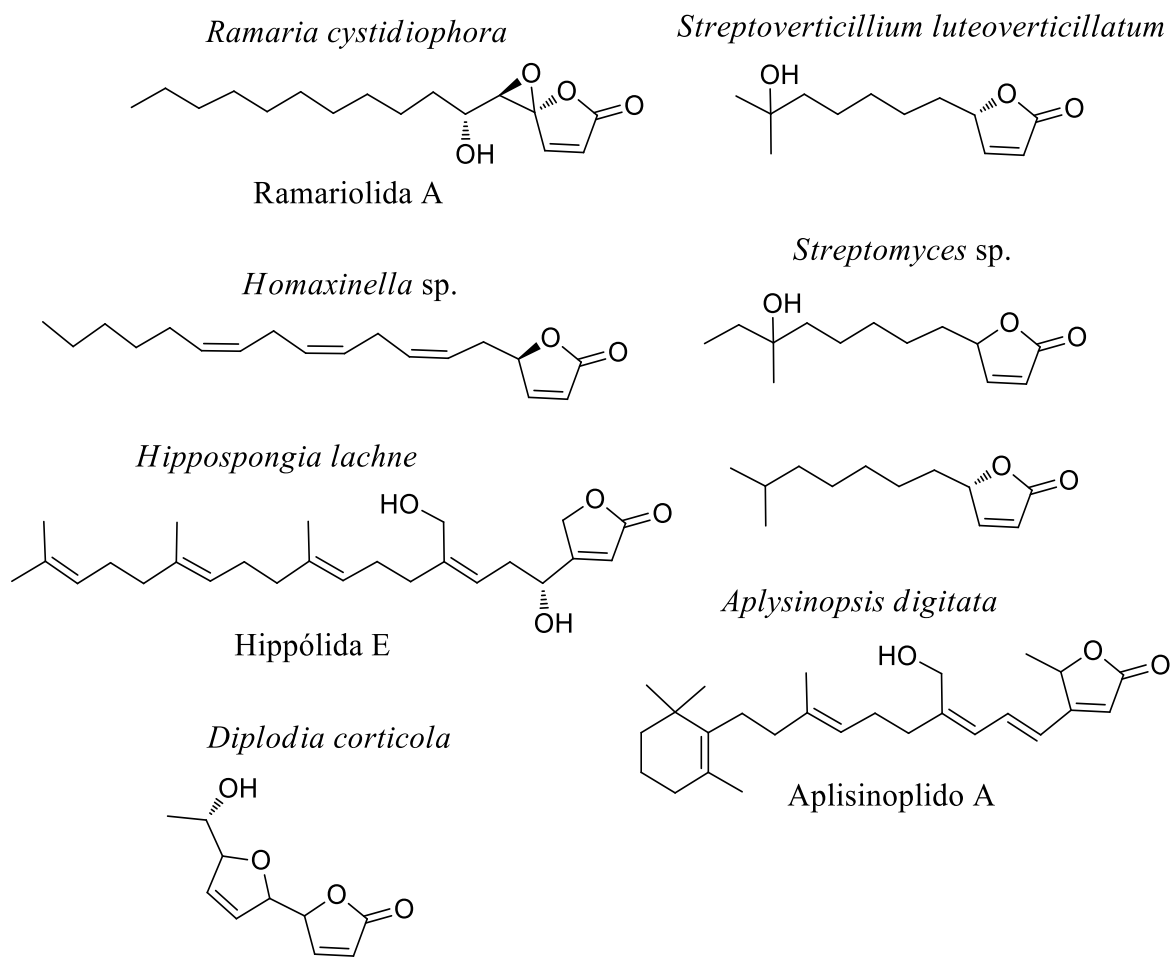


**Figura 3.** 2(5*H*)-furanonas aisladas de especies del género *Hyptis*.

Este tipo de compuestos también se encontraron en varios organismos de origen marino (Figura 4). De cepas de *Streptomyces* sp. obtenidas de sedimentos del fondo marino y esponjas del Mediterráneo, se han aislado butenólidas con actividad antifouling o antiincrustante, la cual evita o ralentiza el crecimiento de percebes, algas y organismos marinos que se adhieren al casco de las embarcaciones marinas, contra la larva de *Balanus amphitrite*<sup>6</sup> y actividad moderada contra *Trypanosoma brucei*<sup>7</sup>, además se ha demostrado que inducen la activación de los factores de transcripción PPAR $\alpha$  y PPAR $\gamma$  (los peroxisomas proliferadores activados del receptor) los cuales modulan la expresión de muchos genes involucrados en el metabolismo de los lípidos y la glucosa.<sup>8</sup> Se describió la actividad antimicrobiana contra *Mycobacterium smegmatis* y *M. tuberculosis* de butenólidas aisladas de hongos del coral *Ramaria cystidiphora*.<sup>9,10</sup>

La actividad citotóxica *in vitro* contra líneas celulares humanas y murinas de las butenólidas aisladas de la esponja marina *Homaxinella* sp.<sup>11</sup> y la bacteria *Streptoverticillium luteoverticillatum*<sup>12</sup> se han demostrado. De *Diplodia corticola* se obtuvo la diplofuranilona C cuya estructura consiste en dos butenólidas unidas.<sup>13</sup> De la esponja marina *Hippospongia lachne* se obtuvo la hipólida E que presentó actividad antiinflamatoria débil para PKC $\alpha$  y PKC $\gamma$  y las (6*Z*)- y (6*E*)- neomanólidas, dos 2*H*-furanonas sustituidas en C-3 y C-4 derivadas de la manólida aislada de *Luffariella variabilis*, un potente antiinflamatorio que inhibe

selectivamente la fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>).<sup>14</sup> Otra esponja marina de la cual se han obtenido este tipo de compuestos es *Aplysinopsis digitata* cuyas 2*H*-furanonas presentaron actividad citotóxica contra células mürinas de leucemia P388.<sup>15</sup>



**Figura 4.** 2(5*H*)-furanonas de origen natural.

## 6.2. Desarrollo experimental

### 6.2.1. Determinación de constantes espectroscópicas

Los espectros de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  RMN se registraron a una frecuencia de 400 MHz en  $^1\text{H}$  y 100 MHz en  $^{13}\text{C}$ , utilizando  $\text{CDCl}_3$  y  $\text{CD}_3\text{OD}$  como disolvente en ambos casos en un equipo Varian VNMRS-400. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se expresaron en partes por millón (ppm), utilizando como referencia interna la señal del tetrametilsilano (TMS). Todas las asignaciones de RMN fueron confirmadas por experimentos 2D (COSY, HSQC, HMBC). La rotación óptica se obtuvo con un polarímetro modelo Perkin-Elmer 341, utilizándose metanol como disolvente. Para el análisis de MS se empleó la técnica por electrospray en un equipo Agilent Technologies acoplado a un cromatógrafo de líquidos, el cual constaba de una bomba binaria de la serie 1260 modelo G1312B9 acoplada con un espectrómetro de masas tipo triple cuadrupolo modelo Agilent 6410.

### 6.2.2. Material vegetal

Se utilizaron dos colectas de *Hyptis pectinata* obtenidas del municipio Emiliano Zapata, estado de Veracruz, durante el 6 de diciembre del 2010 y el 22 de octubre del 2009. Un ejemplar de estas colectas se depositó en el herbario del Instituto de Ecología en Xalapa con los números de voucher XAL0001406 (C-1) y XAL0000286 (C-2). La planta *H. monticola* fue recolectada en el Valle de Videiras, Petrópolis, Río de Janeiro, Brasil, en octubre del 2013 y un ejemplar de esta colecta se depositó en el herbario del Instituto de Biología de la Universidade Federal do Rio de Janeiro bajo el número de voucher RFA39927.

### 6.2.3. Extracción del material vegetal

***Hyptis pectinata*:** El material vegetal utilizado (2.77 kg para C-1 y 2.79 kg para C-2) se dejó secar mediante exposición al aire libre a temperatura ambiente y se pulverizó para después proceder a su extracción a través de una maceración con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . El extracto se sometió a la eliminación de triterpenos a través de la precipitación utilizando metanol; para ello, el

extracto se disolvió en metanol agregando 50 mL por cada gramo de extracto y se dejó 12 horas a 0°C; posteriormente, se filtró y concentró hasta la mitad del volumen. Se repitió el proceso, esta vez concentrando el extracto a sequedad.

***Hyptis monticola*:** Las hojas de la planta (1.05 kg) se secaron y pulverizaron para someterse a un proceso de maceración con la mezcla EtOH:H<sub>2</sub>O (7:3). El extracto resultante se sometió a particiones líquido-líquido con disolventes de polaridad creciente: hexano, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, acetato de etilo y *n*-butanol.

#### **6.2.4. Técnicas cromatográficas**

##### **6.2.4.1. Cromatografía en columna abierta**

Para el fraccionamiento primario del extracto de *H. pectinata* se utilizó la cromatografía en columna abierta utilizando columnas de vidrio de diversas dimensiones empacadas con gel de sílice 60 (con tamaño de partícula de 0.063-0.200mm). Los extractos se adsorbieron en gel de sílice con una relación 1:1 y la fase móvil constó de una serie de mezclas de disolventes con el fin de modificar la polaridad, que inició con *n*-hexano y se aumentó gradualmente la polaridad hasta finalizar con metanol.

##### **6.2.5.2. Cromatografía en capa fina (CCF)**

Se utilizaron cromatoplasmas de aluminio cubiertas con gel de sílice 60F<sub>254</sub> marca Merk. Para detectar los constituyentes presentes en las placas se utilizó una lámpara de UV a 254 nm y 356 nm y como agente cromógeno se usó sulfato cérico (12 g de sulfato cérico, 22.5 mL de ácido sulfúrico y 350 g de hielo) y calentamiento para su revelado.

##### **6.2.5.3. Cromatografía en contracorriente (HSCCC)**

Se utilizó un equipo HTPrep<sup>TM</sup> Quattro CCC equipado con una bomba JASCO PU-2089s Plus y un colector de fracciones Merck L7650 (HTPrep). El sistema de solventes fue *n*-hexano-acetato de etilo-MeOH-H<sub>2</sub>O (0.8:1:0.8:1). Las dos fases se separaron y se



desgasificaron por sonicación durante 5 minutos. Luego, la columna CCC se llenó primero con la fase estacionaria (fase inferior acuosa) y, después de ajustar la rotación, se bombeó la fase móvil (fase superior orgánica). Las muestras se disolvieron en volúmenes iguales de fase y se inyectaron después de que se alcanzó el equilibrio hidrodinámico dentro de la columna. La retención de la fase estacionaria ( $S_f$ ) antes de la inyección fue del 84.2%.

#### 6.2.5.4. Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)

Se realizó con un equipo marca Waters que contaba con una bomba modelo 600E, un detector de UV de arreglo de diodos modelo 2996 y una válvula de recirculación de muestra y disolvente. El equipo estuvo adaptado a un equipo de cómputo que contaba con el programa Empower 2 (Waters) para el control del cromatógrafo y procesamiento de los datos. Se utilizaron disolventes grado analítico y las siguientes columnas de fase reversa y normal para el análisis, la separación y la purificación de las muestras:

**Cuadro 1. Columnas utilizadas en el equipo de CLAR**

Tipo de columna	Tamaño de partícula/ dimensiones
<b>Fase reversa</b>	
μBondapak NH <sub>2</sub>	10 μm, 3.9 x 300 mm
μBondapak NH <sub>2</sub>	10 μm, 7.8 x 300 mm
Waters Symmetry C18	5 μm, 4.6 x 250 mm
Waters Symmetry C18	7 μm, 19 x 150 mm
<b>Fase normal</b>	
μPorasil sílica analítica	10 μm, 3.9 x 300 mm

Para el escalamiento del método analítico a nivel semipreparativo y preparativo, se utilizó la siguiente fórmula:

$$F_p = F_a (l_p/l_a)(d_p^2/d_a^2)$$

$F_p$ =Flujo columna preparativa/semipreparativa;  $F_a$ =Flujo columna analítica

$l_p$ =Longitud de columna preparativa;  $l_a$ =longitud columna analítica

$d_p$ =Diámetro columna preparativa;  $d_a$ =Diámetro columna analítica

### 6.2.6. Fraccionamiento primario

Para el fraccionamiento primario de los extractos de *H. pectinata*, la muestra se adsorbió en gel de sílice en una relación 1:1 y se aplicó a una columna abierta de gel de sílice en una proporción 1:20 con base en el peso del material vegetal. La elución se comenzó con *n*-hexano y la polaridad se incrementó utilizando los siguientes disolventes: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, acetona y metanol. Los eluatos colectados se analizaron mediante CCF para determinar su similitud cromatográfica y proceder a la reunión de fracciones (Cuadro 2). De la fracción A15, se obtuvieron 100 mg del ácido rosmarínico (**10**).

*Ácido rosmarínico (10)*: sólido café; p.f. 171-173 °C; RO (*c* 0.21 g/mL, MeOH) [ $\alpha$ ]<sub>589</sub> +46.7, [ $\alpha$ ]<sub>578</sub> +49.5, [ $\alpha$ ]<sub>546</sub> +58.1; ESI modo negativo *m/z* 359 [C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>O<sub>8</sub> - H]<sup>-</sup>; <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  7.49 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H, H-3), 6.23 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H, H-4), 7.01 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H-6), 6.75 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H-9), 6.90 (dd, *J* = 8.3, 2.1 Hz, 1H, H-10), 5.07 (dd, *J* = 9.8, 3.3 Hz, 1H, H-1'), 3.08 (dd, *J* = 14.3, 3.3 Hz, 1H, H-2'), 2.91 (dd, *J* = 14.3, 9.8 Hz, 1H, H-2'), 6.65 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H-4'), 6.61 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H-7'), 6.75 (d, *J* = 8.2, 2.1 Hz, 1H, H-8'); <sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  169.0 (C-2), 146.6 (C-3), 115.6 (C-4), 127.9 (C-5), 115.1 (C-6), 146.8 (C-7), 149.4 (C-8), 116.4 (C-9), 122.9 (C-10), 77.6 (C-1'), 38.8 (C-2'), 131.1 (C-3'), 116.2 (C-4'), 145.9 (C-5'), 144.8 (C-6'), 121.7 (C-7'), 117.5 (C-8'), 177.5 (COOH).

Para la separación de los constituyentes de *H. monticola* se utilizó la cromatografía en contracorriente donde se analizaron once diferentes sistemas de disolventes (hexano:acetato de etilo:MeOH:H<sub>2</sub>O) y se seleccionó la proporción 0.8:1:0.8:1. Un total de 65 fracciones se colectaron (3 mL) durante la rotación de la columna, posteriormente 30 fracciones de la fase móvil se colectaran con la bomba apagada.

**Cuadro 2. Fraccionamiento primario de *H. pectinata***

	C-1		C-2
Sistema de elución	Fracciones colectadas	Sistema de elución	Fracciones colectadas
Hexano	1-4 (A1)	Hexano	1 (B1)
	5-10 (A2)	Hexano:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (8:2)	2-4 (B2)
	11-12 (A3)	Hexano:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (7:3)	5-7 (B3)
Hexano:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (7:3)	13-14 (A3)	Hexano:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (6:4)	8-14 (B4)
	15-17 (A4)		
	18-20 (A5)		
Hexano: CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (5:5)	21-22 (A5)	Hexano:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (3:7)	15 (B5)
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	23-28 (A6)		
	29-30 (A7)	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	16 (B6)
	31-32 (A8)		
	33-40 (A9)		
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :Acetona (9:1)	41-43 (A9)	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :Acetona (9:1)	17-19 (B7)
	44-46 (A10)	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :Acetona (8:2)	20-21 (B8)
	47 (A11)	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :Acetona (7:3)	22 (B9)
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :Acetona (7:3)	48(A11)	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :Acetona (5:5)	23-25 (B10)
Acetona	49-52 (A12)	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :Acetona (4:6)	26-29 (B11)
	56-59 (A13)	Acetona	30-35 (B12)
	60-61 (A14)		
Acetona:Metanol (7:3)	61-64 (A14)	Acetona:Metanol (7:3)	36 (B13)
		Acetona:Metanol (5:5)	37 (B14)
		Acetona:Metanol (3:7)	39 (B15)
Metanol	65 (A15)	Metanol	40-42 (B16)
			43-44 (B17)
			45-57 (B18)

### 6.2.7. Fraccionamiento secundario

Del fraccionamiento primario del extracto de *H. pectinata* se seleccionaron las fracciones A9, A12 y B8 para un segundo fraccionamiento en columna abierta. Dichas fracciones se adsorbieron en gel de sílice y se aplicaron en una columna abierta de la misma manera en que se realizó el fraccionamiento primario (Cuadro 3). La elución comenzó con *n*-hexano y la polaridad se incrementó utilizando acetato de etilo y metanol. Los eluatos colectados se

analizaron mediante CCF. A través de este procedimiento se obtuvieron la pectinólidas O (7.1 mg, **4**) y P (4.7 mg, **5**) de las fracciones D7 y E5, respectivamente.

*Pectinólida O (4)*: aceite amarillo; ORD (*c* 0.11 g/mL, MeOH)  $[\alpha]_{589} -8.2$ ,  $[\alpha]_{578} -8.2$ ,  $[\alpha]_{546} -10.9$ ,  $[\alpha]_{436} -14.5$ ; ESI modo positivo  $m/z$  311  $[\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_6 + \text{H}]^+$ ;  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.18 (dd,  $J = 5.8, 2.0$  Hz, 1H, H-3), 7.42 (dd,  $J = 5.8, 1.6$  Hz, 1H, H-4), 5.14 (ddd,  $J = 4.3, 2.0, 1.6$  Hz, 1H, H-5), 6.01 (dd,  $J = 8.9, 4.3$  Hz, 1H, H-1'), 5.62 (dd,  $J = 8.9, 11.0$  Hz, 1H, H-2'), 5.50 (dd,  $J = 11.0, 8.4$  Hz, 1H, H-3'), 5.46 (ddd,  $J = 8.4, 7.4, 5.9$  Hz, 1H, H-4'), 1.62 (m, 2H, H-5'), 1.31 (m, 2H, H-6'), 1.31 (m, 2H, H-7'), 0.90 (t,  $J = 6.9$  Hz, 3H, H-8'), 2.02 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 2.05 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ );  $^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  172.0 (C-2), 123.5 (C-3), 152.4 (C-4), 83.1 (C-5), 68.4 (C-1'), 135.0 (C-2'), 125.2 (C-3'), 70.2 (C-4'), 34.2 (C-5'), 27.4 (C-6'), 22.5 (C-7'), 14.0 (C-8'), 170.4 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 169.6 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 21.2 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 20.9 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ).

*Pectinólida P (5)*: aceite amarillo; ORD (*c* 0.48 g/mL, MeOH)  $[\alpha]_{589} +0.2$ ,  $[\alpha]_{578} 0$ ,  $[\alpha]_{546} +0.2$ ,  $[\alpha]_{436} +0.8$ ; ESI modo positivo  $m/z$  227  $[\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{O}_4 + \text{H}]^+$ ;  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.20 (dd,  $J = 5.8, 2.0$  Hz, 1H, H-3), 7.46 (dd,  $J = 5.8, 1.5$  Hz, 1H, H-4), 5.07 (ddd,  $J = 5.4, 2.0, 1.5$  Hz, 1H, H-5), 4.73 (dd,  $J = 7.1, 5.4$  Hz, 1H, H-1'), 5.72 (ddd,  $J = 11.4, 7.1, 1.2$  Hz, 1H, H-2'), 5.50 (dd,  $J = 11.4, 8.1, 1.2$  Hz, 1H, H-3'), 4.51 (ddd,  $J = 8.1, 5.3, 5.2$  Hz, 1H, H-4'), 1.57 (m, 2H, H-5'), 1.25 (m, 2H, H-6'), 1.25 (m, 2H, H-7'), 0.90 (t,  $J = 6.9$  Hz, 3H, H-8');  $^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  172.5 (C-2), 117.0 (C-3), 138.2 (C-4), 85.2 (C-5), 68.3 (C-1'), 123.1 (C-2'), 127.4 (C-3'), 68.1 (C-4'), 37.0 (C-5'), 27.4 (C-6'), 23.4 (C-7'), 14.0 (C-8').

**Cuadro 3. Fraccionamiento secundario de las fracciones A9, A12 y B8.**

A9		A12		B8	
Sistema de elución	Fracciones colectadas	Sistema de elución	Fracciones colectadas	Sistema de elución	Fracciones colectadas
Hexano	1 (D1)	Hexano:	1-3 (E1)	Hexano	1-4 (F1)
		AcOEt	4-8 (E2)	Hexano:	5 (F2)
		(7:3)	9 (E3)	AcOEt (9:1)	
Hexano:	2-3 (D1)	Hexano:	10-18 (E3)	Hexano:	6-11 (F3)
AcOEt	4 (D2)	AcOEt	19-20 (E4)	AcOEt (8:2)	
(7:3)	5-6 (D3)	(6:4)		Hexano:	12-14 (F4)
	7 (D4)			AcOEt (7:3)	
Hexano:	8 (D5)	Hexano:	21-25 (E4)	Hexano:	15-19 (F5)
AcOEt	9 (D6)	AcOEt	26-30 (E5)	AcOEt	
(6:4)	10 (D7)	(5.5:4.5)		(65:35)	
Hexano:	11 (D8)	Hexano:	31-33 (E5)	Hexano:	20-24 (F6)
AcOEt	12 (D9)	AcOEt	34-49 (E6)	AcOEt (6:4)	
(5:5)	13-14 (D10)	(5:5)	50 (E7)	Hexano:	25-35 (F7)
	15 (D11)			AcOEt	
				(55:45)	
AcOEt	16-25 (D11)	AcOEt	51-53 (E7)	Hexano:	36-38 (F8)
				AcOEt (5:5)	
Metanol	26-30 (D12)	Metanol	54 (E7)	Hexano:	39-45 (F9)
				AcOEt	
				(45:55)	
				Hexano:	46-57 (F10)
				AcOEt (4:6)	
				Hexano:	58-59 (F11)
				AcOEt (3:7)	
				AcOEt	60-66 (F12)
				Metanol	67 (F13)

### 6.2.8. Análisis y purificación mediante cromatografía de líquidos

Para llevar a cabo la purificación de las fracciones 19-25, 35-38, 39-51 y 85-87 de *H. monticola* se determinaron las condiciones analíticas más adecuadas utilizando la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) en fase reversa y fase normal (cuadro 4). En el caso de las fracciones 19-25, 39-51 y 85-87 se determinó que el sistema que permitía una resolución adecuada correspondía a una fase estacionaria amino y en una fase móvil de CH<sub>3</sub>CN:agua (8:2) para las fracciones 19-25 y 39-51, y acetonitrilo (CH<sub>3</sub>CN) para la fracción 85-87 utilizando un flujo de 1.42 mL/min y una longitud de 320 nm para el registro del cromatograma. Para la separación, se inyectaron de 20 mg a 30 mg de muestra en 500 µL de

vehículo (CH<sub>3</sub>CN). En el caso de la fracción 35-38, se seleccionó una fase estacionaria de gel de sílice y una fase móvil de *n*-hexano:acetato de etilo (1:1) utilizando un flujo de 0.3 mL/min y una longitud de 320 nm para el registro del cromatograma. Se inyectaron 5 mg de muestra por 20 µL de vehículo (acetato de etilo). La fracción 85-87 se purificó a través de la técnica de reciclaje durante tres ciclos (Figura 5) y se obtuvieron 2.8 mg de muestra de un aceite amarillo pálido (4.1 mg) con un *t<sub>r</sub>* 13.64 min, la montecólida C (**1**). De la fracción 39-51, se obtuvieron cinco picos diferentes (Figura 6); se seleccionaron el pico 2 correspondiente al flavonoide aromadetrina (**6**) (dihydrokaempferol, sólido amarillo, 22.5 mg) con un *t<sub>r</sub>* 10.68 min y el pico 3 correspondiente al flavonoide 2,3-dihidrogosipetina (**9**) (sólido amarillo, 3.1 mg) con un *t<sub>r</sub>* 14.67 min; de la fracción 19-25 se obtuvieron tres picos (Figura 7) y se seleccionó el pico 2 correspondiente al flavonoide cartamidina (**7**) (sólido amarillo, 16.9 mg) con un *t<sub>r</sub>* 13.90 min y el pico 3, correspondiente al flavonoide 3-acetoxi-aromadetrina (**8**) (sólido amarillo, 2.2 mg) con *t<sub>r</sub>* 15.41 min. Para la fracción 35-38 se obtuvieron cinco picos (Figura 8) de los cuales se seleccionó el pico 4 con un *t<sub>r</sub>* 24.01 min que corresponde a la montecólida D (**2**) (aceite amarillo, 5.8 mg de muestra).

Para las fracciones A9 y F4 de *H. pectinata* se determinaron las condiciones analíticas óptimas utilizando la CLAR en fase reversa (cuadro 4). Para purificar la fracción A9 se seleccionó una fase móvil de CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O (7:3) utilizando una columna C<sub>18</sub>, un flujo de 6.14 mL/min y una longitud de 254 nm para el registro del cromatograma, se inyectaron 25 mg de muestra por 500 µL de vehículo (metanol); se obtuvieron seis picos (Figura 9) los cuales se cortaron y colectaron por separado, se seleccionaron el pico 4 (*t<sub>r</sub>* 22.20 min) que corresponde a la salvigenina (**11**) (sólido amarillo, 43.2 mg de muestra) y el pico 6 (*t<sub>r</sub>* 31.40 min) que corresponde a la 5-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavona (**12**) (sólido amarillo pálido, 26.5 mg de muestra). En el caso de la fracción F4, se usó una fase móvil de CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O (7:3) utilizando una columna C<sub>18</sub> utilizando un flujo de 3.07 mL/min y una longitud de 254 nm para el registro del cromatograma, se inyectaron 25 mg de muestra por 500 µL de vehículo (metanol). Se obtuvieron dos picos (Figura 10) y se seleccionó el pico 2 (*t<sub>r</sub>* 25.87 min), el cual se purificó por la técnica de reciclaje durante nueve ciclos (Figura 11) y se obtuvo la pectinólida N (**3**) (aceite amarillo, 29 mg de muestra).

**Cuadro 4. Condiciones utilizadas en CLAR para *H. monticola* e *H. pectinata***

Fase normal

Fase estacionaria:  $\mu$ Porasil (10  $\mu$ m 3.9 x 300 mm)

Fase móvil: Hexano:Acetato de etilo (5:5)

Flujo: 0.3 mL/min

Longitud de onda: 320 nm

volumen de inyección: 20 y 10  $\mu$ L

Cantidad de muestra: 1-5 mg

Fase reversa

Fase estacionaria:  $\mu$ Bondapack NH<sub>2</sub>

-nivel analítico: 10  $\mu$ m 3.9 x 300 mm

-nivel preparativo: 10  $\mu$ m 7.8 x 300 mm

Fase móvil: CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O (4:1) y CH<sub>3</sub>CN.

Flujo: 0.3 mL/min (analítico) y 1.42

(preparativo).

Longitud de onda: 320 nm

volumen de inyección: 20  $\mu$  (analítico) y 500  $\mu$ L (preparativo)

Cantidad de muestra: 1 mg (analítico) y 20-30 mg (preparativo)

Fase estacionaria: Waters Symmetry C18

-nivel analítico: 5  $\mu$ m 4.6 x 250 mm

-nivel preparativo: 7  $\mu$ m 19 x 300 mm y 19 x 150 mm

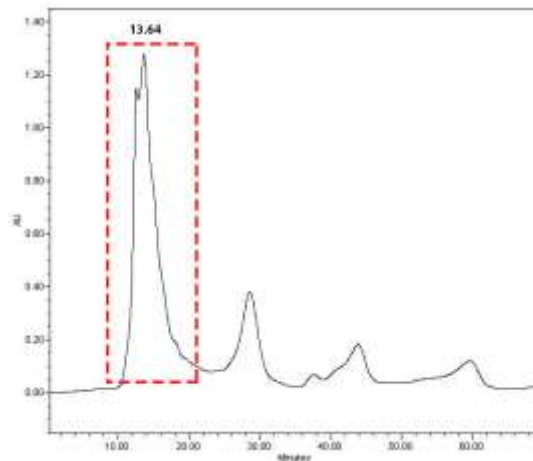
Fase móvil: CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O (7:3)

Flujo: 0.3 mL/min (analítico) y 6.14 y 3.07 mL/min (preparativo).

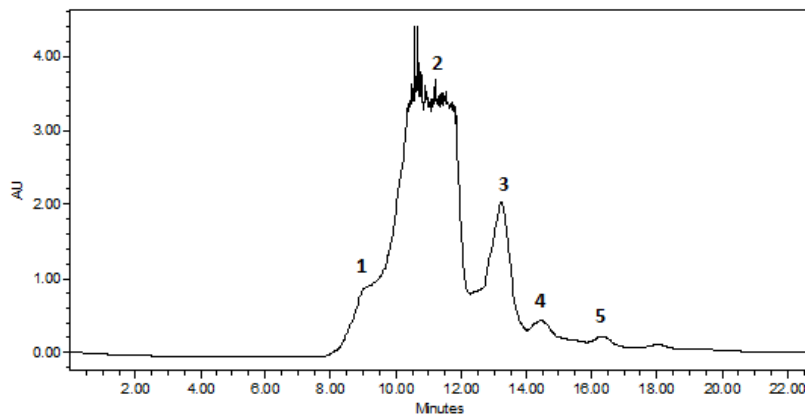
Longitud de onda: 254 nm

volumen de inyección: 20  $\mu$  (analítico) y 500  $\mu$ L (preparativo)

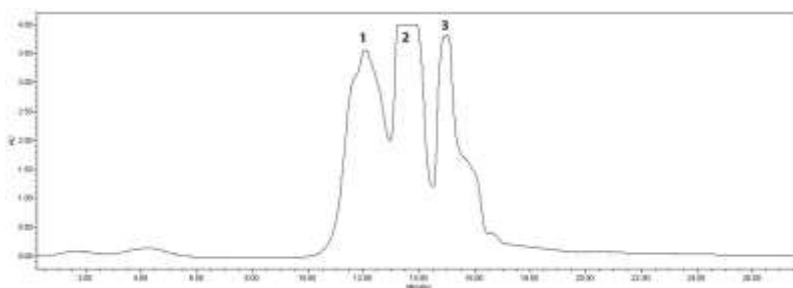
Cantidad de muestra: 1 mg (analítico) y 25 mg (preparativo)



**Figura 5.** Purificación de la fracción 85-87 a través de la técnica de reciclaje. Condiciones cromatográficas: columna de fase reversa amino; detector de arreglo de diodos (320 nm); fase móvil: CH<sub>3</sub>CN, flujo 1.42 mL/min.

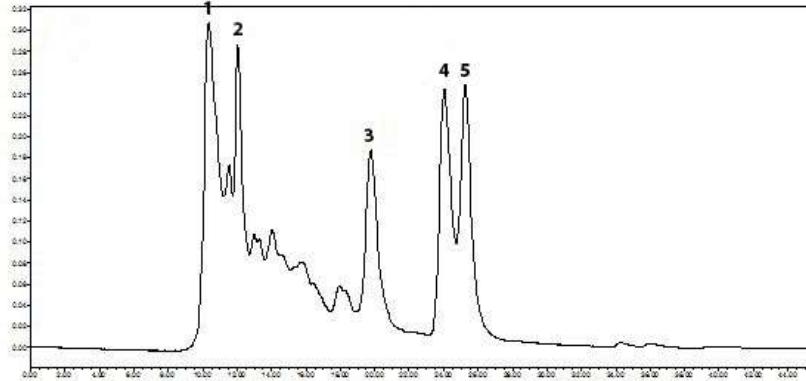


**Figura 6.** CLAR a nivel preparativo de la fracción 39-51. Condiciones cromatográficas: columna de fase reversa amino; detector de arreglo de diodos (320 nm); fase móvil: CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O (4:1), flujo 1.42 mL/min.

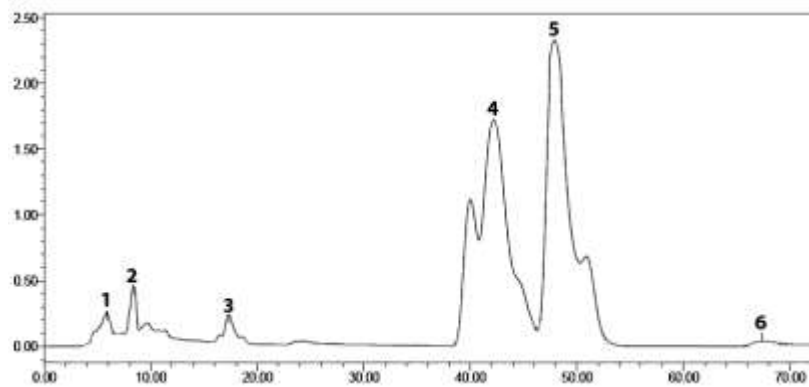


**Figura 7.** CLAR a nivel preparativo de la fracción 19-25. Condiciones cromatográficas: columna de fase reversa amino; detector de arreglo de diodos (320 nm); fase móvil: CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O (4:1), flujo 1.42 mL/min.

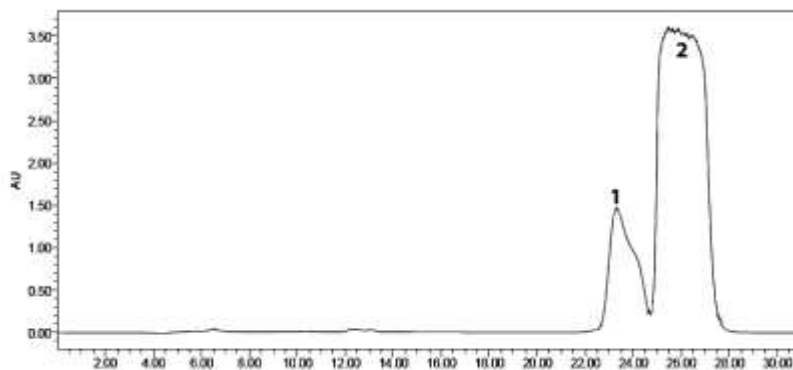




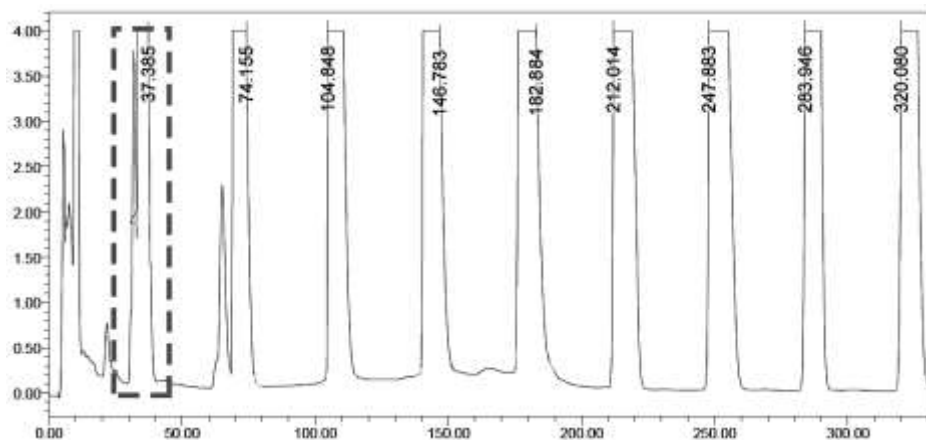
**Figura 8.** CLAR a nivel analítico de la fracción 35-38. Condiciones cromatográficas: columna de fase normal de gel de sílice; detector de arreglo de diodos (320 nm); fase móvil: *n*-hexano:acetato de etilo (1:1), flujo 0.3 mL/min.



**Figura 9.** CLAR a nivel analítico de la fracción A9. Condiciones cromatográficas: columna de fase reversa C<sub>18</sub>; detector de arreglo de diodos (254 nm); fase móvil: CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O (7:3), flujo 6.14 mL/min.



**Figura 10.** CLAR a nivel analítico de la fracción F4. Condiciones cromatográficas: columna de fase reversa C<sub>18</sub>; detector de arreglo de diodos (254 nm); fase móvil: CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O (7:3), flujo 3.07 mL/min.



**Figura 11.** Purificación del pico 2 de la fracción F4 a través de la técnica de reciclaje. Condiciones cromatográficas: columna de fase reversa C<sub>18</sub>; detector de arreglo de diodos (254); fase móvil: fase móvil: CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O (7:3), flujo 3.07 mL/min.

*Montecólida C (1)*: aceite amarillo; ORD (*c* 0.11 g/mL, MeOH)  $[\alpha]_{589} +15.0$ ,  $[\alpha]_{578} +15.8$ ,  $[\alpha]_{546} +19.2$ ,  $[\alpha]_{436} +41.7$ ; ESI modo positivo  $m/z$  325 [C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>O<sub>7</sub> + Na]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  6.10 (d,  $J = 9.6$  Hz, 1H, H-3), 7.14 (dd,  $J = 9.6, 6.0$  Hz, 1H, H-4), 4.36 (dd,  $J = 6.0, 2.5$  Hz, 1H, H-5), 4.41 (dd,  $J = 9.5, 2.5$  Hz, 1H, H-6), 4.05 (dd,  $J = 9.5, 1.2$  Hz, 1H, H-1'), 3.89 (dd,  $J = 7.6, 1.2$  Hz, 1H, H-2'), 5.18 (ddd,  $J = 8.7, 7.6, 3.6$  Hz, 1H, H-3'), 1.67 (m, 2H, H-4'), 1.35 (m, 2H, H-5'), 1.35 (m, 2H, H-6'), 0.93 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H, H-7'), 2.11 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO); <sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  173.0 (C-2), 123.1 (C-3), 147.1 (C-4), 60.1 (C-5), 80.2 (C-6), 70.1 (C-1'), 72.1 (C-2'), 74.4 (C-3'), 34.0 (C-4'), 28.8 (C-5'), 23.9 (C-6'), 14.3 (C-7'), 172.3 (CH<sub>3</sub>CO), 21.2 (CH<sub>3</sub>CO).

*Montecólida D (2)*: aceite amarillo; ORD (*c* 0.29 g/mL, MeOH)  $[\alpha]_{589} -51.4$ ,  $[\alpha]_{578} -54.1$ ,  $[\alpha]_{546} -61.7$ ,  $[\alpha]_{436} -110.0$ ; ESI modo positivo  $m/z$  387 [C<sub>18</sub>H<sub>26</sub>O<sub>9</sub> + H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  6.11 (dd,  $J = 5.7, 2.1$  Hz, 1H, H-3), 7.37 (dd,  $J = 5.7, 1.7$  Hz, 1H, H-4), 5.56 (ddd,  $J = 2.1, 1.7, 1.7$  Hz, 1H, H-5), 4.90 (dd,  $J = 9.9, 1.7$  Hz, 1H, H-1'), 4.25 (dd,  $J = 9.9, 1.5$  Hz, 1H, H-2'), 5.06 (dd,  $J = 7.5, 1.5$  Hz, 1H, H-3'), 5.27 (ddd,  $J = 8.5, 7.5, 4.4$  Hz, 1H, H-4'),

1.63 (m, 2H, H-5'), 1.32 (m, 2H, H-6'), 1.32 (m, 2H, H-7'), 0.91 (t,  $J = 6.8$  Hz, 3H, H-8'), 2.05 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO), 2.05 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO), 1.97 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO); <sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  172.6 (C-2), 122.5 (C-3), 153.4 (C-4), 81.1 (C-5), 69.2 (C-1'), 69.1 (C-2'), 72.5 (C-3'), 72.8 (C-4'), 30.7 (C-5'), 27.2 (C-6'), 22.5 (C-7'), 14.0 (C-8'), 170.9 (CH<sub>3</sub>CO), 170.3 (CH<sub>3</sub>CO), 170.1 (CH<sub>3</sub>CO), 21.0 (CH<sub>3</sub>CO), 20.7 (CH<sub>3</sub>CO), 20.6 (CH<sub>3</sub>CO).

*Pectinólida N (3)*: aceite amarillo; ORD ( $c$  3.17 g/mL, MeOH) [ $\alpha$ ]<sub>589</sub> -4.3, [ $\alpha$ ]<sub>578</sub> -4.4, [ $\alpha$ ]<sub>546</sub> -4.6; ESI modo positivo  $m/z$  273 [C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>O<sub>4</sub>+ Na]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  6.23 (d,  $J = 5.3$  Hz, 1H, H-3), 7.43 (d,  $J = 5.3$  Hz, 1H, H-4), 6.26 (d,  $J = 12.0$  Hz, 1H, H-1'), 6.64 (dd,  $J = 12.0, 9.9$  Hz, 1H, H-2'), 5.65 (m, 1H, H-3'), 5.65 (m, 1H, H-4'), 1.68 (m, 2H, H-5'), 1.30 (m, 2H, H-6'), 1.30 (m, 2H, H-7'), 0.89 (t,  $J = 6.7$  Hz, 3H, H-8'), 2.05 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO); <sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  170.6 (C-2), 119.9 (C-3), 143.5 (C-4), 150.1 (C-5), 109.1 (C-1'), 123.9 (C-2'), 135.0 (C-3'), 70.0 (C-4'), 34.2 (C-5'), 27.1 (C-6'), 22.4 (C-7'), 14.0 (C-8'), 169.3 (CH<sub>3</sub>CO).

*Dihidrokaempferol (6)*: sólido amarillo; p.f. 247-249 °C; ORD ( $c$  0.13 g/mL, MeOH) [ $\alpha$ ]<sub>589</sub> +16.2, [ $\alpha$ ]<sub>578</sub> +16.9, [ $\alpha$ ]<sub>546</sub> +20.0; ESI modo negativo  $m/z$  287 [C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>- H]<sup>-</sup>; <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  4.96 (d,  $J = 11.6$  Hz, 1H, H-2), 4.52 (d,  $J = 11.6$  Hz, 1H, H-3), 5.91 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H, H-6), 5.86 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H, H-8), 7.34 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H, H-2'/H-6'), 6.82 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2 H, H-3'/H-5'); <sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  85.0 (C-2), 73.6 (C-3), 198.4 (C-4), 165.3 (C-5), 97.4 (C-6), 169.0 (C-7), 96.4 (C-8), 164.5 (C-9), 101.8 (C-10), 129.3 (C-1'), 130.4 (C-2'), 116.1 (C-3'), 159.2 (C-4'), 116.1 (C-5'), 130.4 (C-6').

*Cartamidina (7)*: sólido amarillo; p.f. 179-181 °C; ORD ( $c$  0.05 g/mL, MeOH) [ $\alpha$ ]<sub>589</sub> -6.0, [ $\alpha$ ]<sub>578</sub> -8.0, [ $\alpha$ ]<sub>546</sub> -8.0; ESI modo negativo  $m/z$  287 [C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>- H]<sup>-</sup>; <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  5.33 (dd,  $J = 12.9, 3.3$  Hz, 1H, H-2), 3.11 (dd,  $J = 17.4, 12.9$  Hz, 1H, H-3), 2.69

(2d,  $J = 17.4, 3.3$  Hz, 1H, H-3), 5.89 (s, 1H, H-8), 7.31 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H, H-2'/H-6'), 6.82 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H, H-3'/H-5');  $^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  80.4 (C-2), 44.0 (C-3), 197.7 (C-4), 168.7 (C-5), 168.6 (C-6), 164.9 (C-7), 96.2 (C-8), 165.4 (C-9), 103.3 (C-10), 131.1 (C-1'), 129.0 (C-2'), 116.3 (C-3'), 159.0 (C-4'), 116.3 (C-5'), 129.0 (C-6').

*3-Acetoxi-aromadendrina (8)*: sólido amarillo; ESI modo negativo  $m/z$  329 [ $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_7 - \text{H}$ ] $^-$ ; ESI modo positivo  $m/z$  353 [ $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_7 + \text{Na}$ ] $^+$ ;  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  5.29 (d,  $J = 11.7$  Hz, 1H, H-2), 5.82 (d,  $J = 11.7$  Hz, 1H, H-3), 5.95 (s, 1H, H-6), 5.95 (s, 1H, H-8), 7.33 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H, H-2'/H-6'), 6.83 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H, H-3'/H-5'), 1.98 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ );  $^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  82.4 (C-2), 73.9 (C-3), 192.9 (C-4), 165.5 (C-5), 97.1 (C-6), 164.2 (C-7), 98.0 (C-8), 165.9 (C-9), 101.7 (C-10), 127.9 (C-1'), 130.1 (C-2'), 116.3 (C-3'), 159.6 (C-4'), 116.3 (C-5'), 130.1 (C-6'), 170.9 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 20.2 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ).

*2,3-Dihidrogosipetina (9)*: sólido amarillo; p.f. 298-299 °C; ESI modo negativo  $m/z$  319 [ $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_8 - \text{H}$ ] $^-$ ;  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  5.74 (d,  $J = 11.7$  Hz, 1H, H-2), 5.19 (d,  $J = 11.7$  Hz, 1H, H-3), 5.88 (s, 1H, H-6), 6.89 (d,  $J = 1.9$  Hz, 1H, H-2'), 6.77 (m, 1H, H-3'), 6.77 (m, H-5');  $^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  73.8 (C-2), 82.3 (C-3), 193.1 (C-4), 169.6 (C-5), 96.7 (C-6), 164.0 (C-7), 165.4 (C-8), 171.1 (C-9), 102.0 (C-10), 128.4 (C-1'), 115.5 (C-2'), 146.5 (C-3'), 147.9 (C-4'), 116.2 (C-5'), 120.8 (C-6').

*Salvigenina (II)*: sólido amarillo; p.f. 188-190 °C; EM-IE  $m/z$  328 [ $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_6$ ];  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  12.78 (s, 1H, OH), 7.87 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H, H-2'/H-6'), 7.04 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H, H-3'/H-5'), 6.60 (s, 1H, H-8), 6.56 (s, 1H, H-3), 3.98 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.93 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.90 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ).

*5-Hidroxi-7,4'-dimetoxiflavona (12)*: sólido amarillo pálido; p.f. 166-168 °C; EM-IE  $m/z$  298 [C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>O<sub>5</sub>]; <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 12.81 (s, 1H, OH), 7.86 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H, H-2'/H-6'), 7.03 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H, H-3'/H-5'), 6.58 (s, 1H, H-8), 6.37 (d,  $J = 2.5$ , 1H, H-6), 6.48 (d,  $J = 2.5$ , 1H, H-3), 3.89 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.88 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>).

### 6.2.9. Hidrólisis de la montecólida A (14) y pectinólida I (15)

La montecólida A (14; 10 mg) se disolvió en 2 mL de una mezcla de MeOH/H<sub>2</sub>O (70%), la cual contenía 0.6 mL de una solución 0.1 M de KOH. La mezcla se dejó en agitación a temperatura ambiente durante tres horas y pasado ese tiempo, la reacción se aciduló con HCl 1N y se realizó una partición, por triplicado, con 4 mL de acetato de etilo. La fase orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y concentró a presión reducida. Se registró el espectro de <sup>1</sup>H RMN del crudo de reacción. Se utilizó el mismo procedimiento para el compuesto 15.

### 6.2.10. Reacción de acetilación de los compuestos 1 y 4

5 mg de cada compuesto por separado se disolvieron en 0.5 mL de piridina anhidra y 0.5 de anhídrido acético (Ac<sub>2</sub>O). La mezcla de reacción se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente. El curso de reacción se monitoreó mediante CCF hasta la desaparición de la muestra. Posteriormente, se adicionaron 5 mL de agua destilada y se realizaron tres extracciones sucesivas con 10 mL de acetato de etilo cada una. Las fases orgánicas se reunieron y se trataron con 10 mL de HCl 1N, seguido de su neutralización con una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub>. La fase orgánica se lavó en dos ocasiones con 5 mL de agua destilada y se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. El crudo de reacción se concentró a presión reducida y se registró el espectro de <sup>1</sup>H RMN de la mezcla de reacción.

### 6.2.11 Ensayo de citotoxicidad

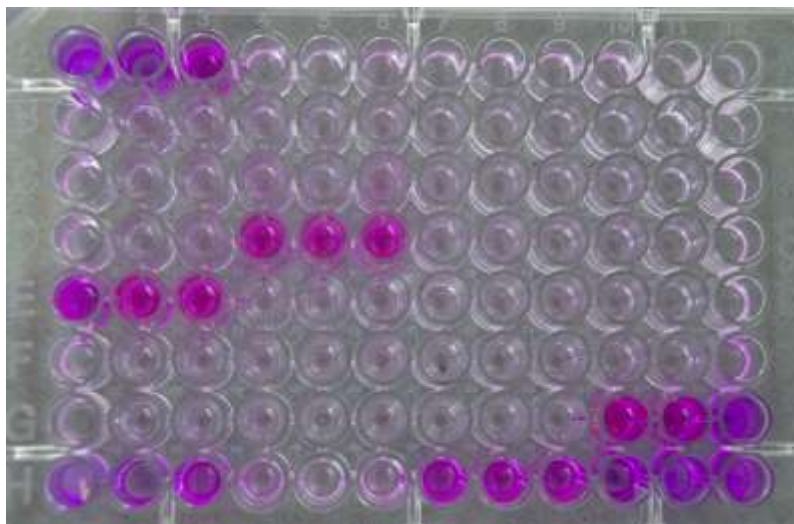
Para este bioensayo (Figura 12) se utilizaron tres líneas celulares: HCT-15 (carcinoma de colon), MCF-7 (carcinoma de mama) y HeLa (carcinoma de cérvix). Estas líneas se cultivaron en medio de suero bovino fetal a 37 °C bajo atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% en el aire y

100% de humedad relativa. La preparación del ensayo consistió en permitir el crecimiento celular hasta el 60-70% de confluencia. El medio se cambió para incubar las líneas durante 24 horas adicionales. Posteriormente, las células se lavaron con 5 mL de PBS y se agregó 0.3 mL de tripsina para su separación de la caja de crecimiento; se incubó por 5 min y se comprobó su dispersión a través de observación por microscopio. Se agregaron 5 mL de medio y con una cámara de Neubauer se llevó a cabo el conteo celular y se calculó el volumen necesario para tener una suspensión de  $10^4$  células. De esta suspensión se tomaron 190  $\mu$ L y se agregaron en las 96 cavidades de 250  $\mu$ L de las microplacas de plástico con 10  $\mu$ L de las diferentes concentraciones de las muestras a analizar y los controles, cada una por triplicado. Para las células que servirían como blanco, al tiempo inicial, se incubaron los 190  $\mu$ L por 30 minutos en las condiciones de crecimiento anteriormente descritas.

La microplaca se incubó por 72 horas y, concluido el tiempo, las células se fijaron con 100  $\mu$ L de ácido tricloroacético (TCA) y se colocaron a 4 °C por 30 minutos. Pasado el tiempo, se decantó el TCA y se lavó por cuatro ocasiones con agua fría, se secaron al aire libre para después teñir cada pozo con 100  $\mu$ L de sulforodamida B (SRB) al 0.4% en ácido acético al 1% por 30 minutos. Se lavó el exceso de colorante con ácido acético al 1% y después se llevó a cabo un segundo secado. La SRB se solubilizó con 200  $\mu$ L de Tris base 10 mM (pH 10) y se agitó por 5 minutos. La densidad celular se determinó utilizando un lector para ELISA a 564 nm. Como control positivo se utilizó una disolución de 4 mg/mL de vinblastina y se realizaron 5 diluciones (2  $\mu$ g/mL-0.32  $\mu$ g/mL) utilizando DMSO al 10%. Para las fracciones analizadas y los productos naturales de prueba se prepararon disoluciones en una concentración de 4 mg/mL y a partir de esta se hicieron 4 diluciones (20  $\mu$ g/mL-0.16  $\mu$ g/mL). Los valores obtenidos en las diferentes concentraciones de prueba se promediaron y se determinó el porcentaje de crecimiento con la siguiente fórmula:

$$\%Crecimiento = \frac{D.O_{\cdot}células+muestra - D.O_{\cdot}células tiempo inicial}{D.O_{\cdot}células+DMSO 10\% - D.O_{\cdot}células tiempo inicial} \times 100$$

El porcentaje de crecimiento se graficó junto con sus respectivas concentraciones utilizando el programa Table Curve 2D v5.01. Se consideraron activas las fracciones con una  $IC_{50} \leq 20 \mu\text{g/mL}$  y los compuestos puros con una  $IC_{50} \leq 4 \mu\text{g/mL}$ .

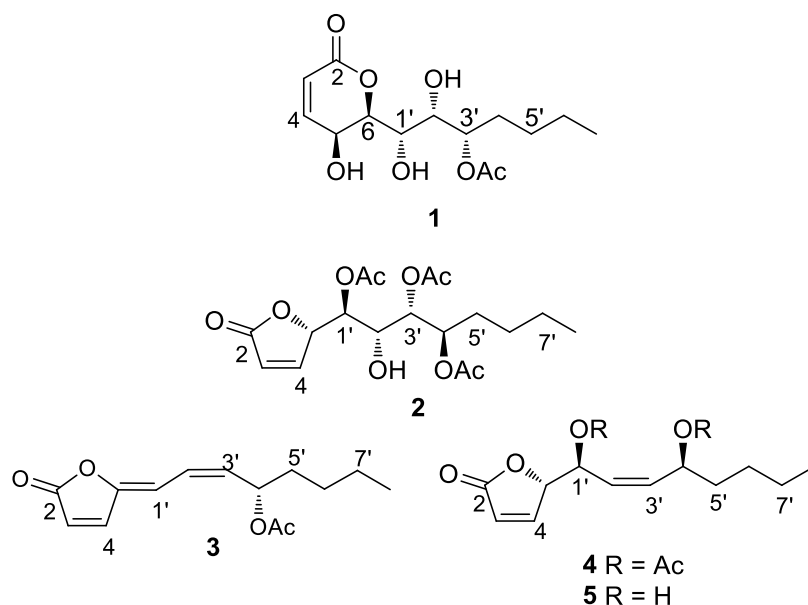


**Figura 12.** Ensayo de citotoxicidad con el método de la SRB en la línea celular MCF-7 (carcinoma de mama). La figura muestra la toxicidad producida por diferentes controles positivos ( $IC_{50} \mu\text{g/mL}$ ): vinblastina, 0.047; adriamicina, 0.644; colchicina, 0.016; camptotecina,  $>0.00064$ ; elipticina, 0.359.<sup>16</sup>

## 6.3. Resultados y discusión

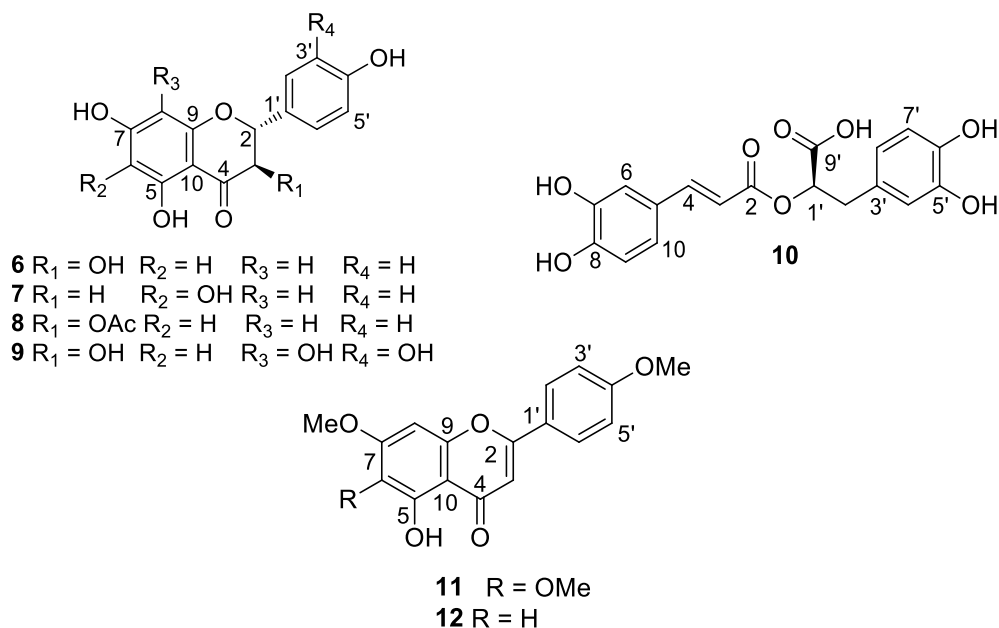
### 6.3.1. Estudio fitoquímico

A partir del extracto hidroetanólico de *H. monticola*, se obtuvo un nuevo compuesto (Figura 13) que se identificó como la 6*S*-[1'*S*,2'*R*,3'*S*-trihidroxi-1'-heptenil]-5*S*-acetiloxi-5,6-dihidro-piran-2-ona denominada como la montecólida C (**1**), junto con un nuevo compuesto con esqueleto de butenólida que se identificó como la 5*S*-[1'*S*,3'*S*,4'*R*-diacetiloxi-,2'*S*-hidroxi-octenil]-5*H*-furan-2-ona y se denominó como la montecólida D (**2**); también, se aislaron los flavonoides dihidrokaempferol (**6**), un diastereoisómero de éste, la cartamidina (**7**); el derivado acetilado del dihidrokaempferol, la 3-acetoxi-aromadendrina (**8**) y la 2,3-dihidrogosipetina (**9**) (Figura 14). Del extracto diclorometanoico de *H. pectinata*, se obtuvieron tres nuevas butenólidas identificadas como la 5*Z*-[(2'*Z*)-4'*S*-acetiloxi-octenil]-5*H*-furan-2-ona, la 5*S*-[(2'*Z*)-1'4'-diacetiloxi-octenil]-5*H*-furan-2-ona y la 5*S*-[(2'*Z*)-1'4'-hidroxi-octenil]-5*H*-furan-2-ona, que se denominaron como pectinólidas N (**3**), O (**4**) y P (**5**), respectivamente; además, se identificaron tres sustancias aromáticas: el ácido rosmarínico (**10**), un fenilpropanoide abundante en la familia de las labiadas,<sup>17</sup> y dos compuestos de tipo flavonoide: la salvigenina (**11**) y la 5-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavona (**12**).



**Figura 13.** Pirona adicional y furanonas a aisladas de la especie estudiadas.





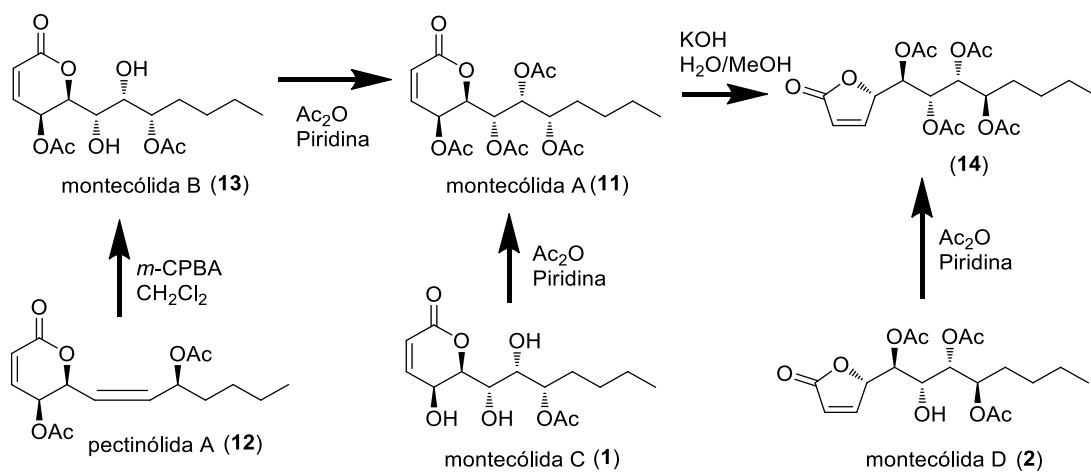
**Figura 14.** Sustancias aromáticas aisladas de las plantas analizadas.

### 6.3.2. Elucidación estructural de las lactonas 1-5

A partir del pico purificado mediante la técnica de reciclaje de la fracción de 85-87 de *H. monticola*, se obtuvo un compuesto novedoso con un esqueleto de 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona que se denominó como la montecólida C (**1**). Su fórmula molecular se determinó mediante el ion correspondiente a la molécula cationizada de  $m/z$  325 [ $C_{14}H_{22}O_7 + Na$ ]<sup>+</sup> y que fue registrado en electrospray en modo positivo. En el espectro de <sup>1</sup>H RMN (Figura S1) se observa el mismo sistema ABX para el núcleo de la  $\delta$ -lactona- $\alpha,\beta$ -insaturada presente en las montecólidas A y B descritas anteriormente (véase Capítulo I). Las señales de los protones vinílicos del doble enlace conjugado al carbonilo de la pirona se observan con un doblete para H-3 ( $\delta$  6.10,  $J$  = 9.6 Hz) y un doblete de dobletes para H-4 ( $\delta$  7.14,  $J$  = 9.6, 6.0 Hz), el desplazamiento de H-4 es característico para un metino  $\beta$  enlazado a un cromóforo de carbonilo  $\alpha,\beta$ -insaturado.<sup>1,2</sup> El desplazamiento para H-5 se encuentra en  $\delta_H$  4.36 debido a que en esta posición está unido a un grupo hidroxilo; la constante de acoplamiento (<sup>3</sup> $J_{H,H}$ ) entre H-5 y H-6 es de 2.5 Hz lo que indica la posición ecuatorial para H-5 y la posición axial de H-6, dejando una configuración pseudoecuatorial para la cadena lateral unida a C-6. Al igual que H-5, los

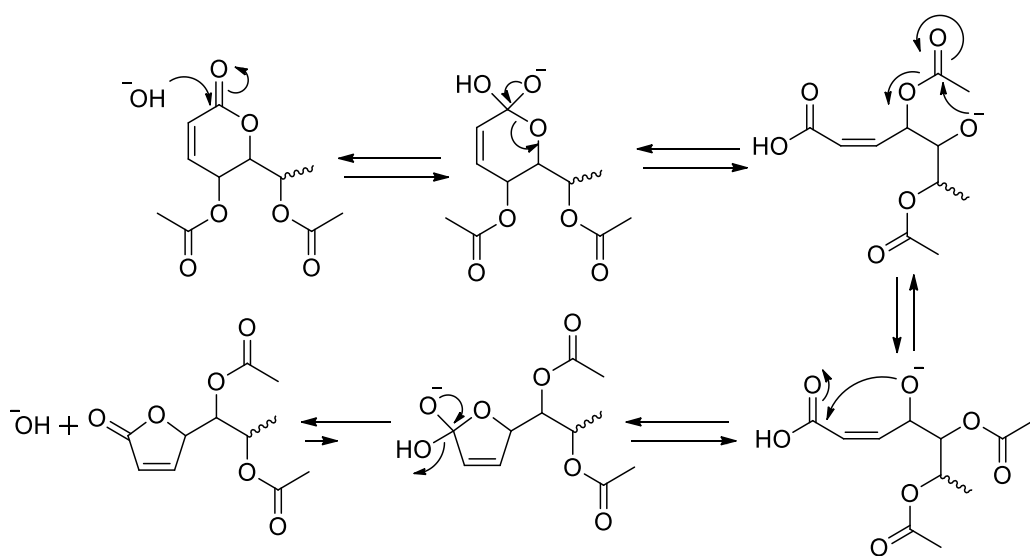
protones unidos a las posiciones C-1' ( $\delta_H$  4.05) y C-2' ( $\delta_H$  3.89) se encuentran unidos a un grupo hidroxilo y que provoca que su desplazamiento químico se localice a campos más altos que cuando se encuentran sustituidos por grupos acetoxilo, como es el caso de la posición C-3' ( $\delta_H$  5.18) que presenta una multiplicidad de doblete de dobletes debido a su acoplamiento con H-2' y el metileno de la posición C-4' y, por lo tanto, en este carbono se encuentra el único grupo acetoxilo sustituyente ( $\delta_H$  2.11) presente en la molécula. A través del espectro bidimensional HMBC, se corroboró la correlación entre el carbonilo del grupo acetoxilo sustituyente ( $\delta_C$  172.28) y H-3'.

El espectro de  $^{13}C$  RMN (Figura S2) puso de manifiesto las cinco señales correspondientes a carbonos base de oxígeno que presenta la molécula posicionados entre 60 y 80 ppm, además de los dos carbonos vinílicos correspondientes a C-3 y C-4 ( $\delta_C$  123.12 y 147.09) y el carbonilo correspondiente a la lactona ( $\delta_C$  172.97); además se observan tres metilenos a campo alto correspondientes a la cadena de heptenilo y al grupo  $CH_3$  ( $\delta_C$  21.16) del radical acetoxilo. Todas las asignaciones se corroboraron a través de los espectros bidimensionales COSY, HSQC (Figura S3 y S4). Para determinar la configuración absoluta de todos los centros quirales del compuesto **1**, se recurrió a la correlación química mediante la derivatización por peracetilación (Figura 15). El análisis del espectro de  $^1H$  RMN permitió concluir que este derivado correspondía a la montecólida A (**11**) cuya configuración absoluta se determinó en su totalidad mediante correlación química con la pectinólida A<sup>18</sup> (**12**) (véase Capítulo 1). Por lo tanto, se determinó que la configuración absoluta para los centros quirales de la montecólida C (**1**) son 5'S, 6'S, 1'S, 2'R y 3'S.



**Figura 15.** Correlaciones químicas entre la pectinólida A y las montecólidas.

Del espectro de  $^1\text{H}$  RMN (Figura S5) del pico 4 (detectado a 320 nm) de la fracción 38-35 de *H. monticola*, se identificaron un par de señales doblete de dobletes ( $\delta_{\text{H}}$  7.37 y 6.11) que pertenecen a los protones vinílicos H-3 y H-4 ( $J_{3,4} = 5.7$ ) de una 2(5*H*)-furanona y cuya fórmula molecular corresponde a  $\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{O}_9$  y se determinó a través del catión de  $m/z$  409 [ $\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{O}_9 + \text{Na}$ ] $^+$  registrado en electrospray en modo positivo. Se observan cinco carbonos bases de oxígeno en el espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (Figura S6), uno perteneciente a la posición C-5 ( $\delta$  81.12) y el resto a posiciones sustituidas en la cadena de octilo unida al anillo. Se determinó la presencia de tres grupos acetoxilo a través de los tres singuletes ( $\delta_{\text{H}}$  2.05, 2.05 y 1.97) observados en el espectro de RMN protónica junto con sus señales correspondientes a sus respectivos carbonilos ( $\delta_{\text{C}}$  170.93, 170.32 y 170.13) en el espectro de RMN C-13, estas tres unidades se encuentran unidas a las posiciones C-1', C-3' y C-5' lo cual se determinó a partir del espectro bidimensional HMBC, además de quedar en evidencia a partir del desplazamiento químico de estas señales ( $\delta_{\text{H}}$  4.90-5.56). La posición C-2' se encuentra sustituida por un grupo hidroxilo. Al igual que con la montecólida C (**1**), para determinar por completo la configuración absoluta de la molécula se realizó una correlación química con la montecólida A (**11**) a través de la hidrólisis de ésta y la acetilación de la montecólida D (**2**) para generar el mismo producto en ambas reacciones, la butenólida **14** (Figura 15). Estos resultados permitieron determinar que la configuración absoluta de la montecólida D (**2**) corresponde a 5*S*, 1'*S*, 2'*S*, 3'*R*, 4'*S*.



**Figura 16.** Mecanismo para la apertura de la  $\delta$ -lactona y formación de la 2(5*H*)-furanona.

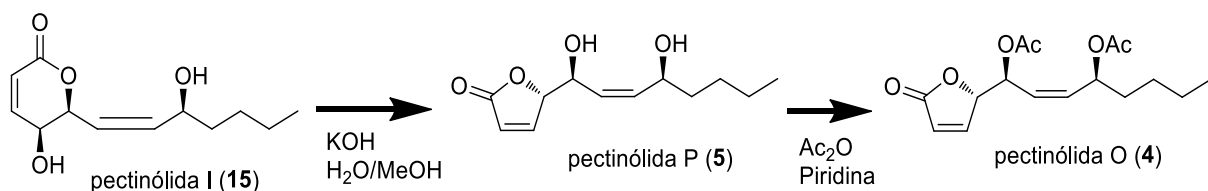
El mecanismo de reacción (Figura 16) para entender esta correlación química involucra la apertura de la  $\delta$ -lactona- $\alpha,\beta$ -insaturada por acción de la base ( $^-\text{OH}$ ) con la concomitante transesterificación del residuo de acetato de la posición C-5 -correspondiente al anillo de  $\delta$ -lactona original- al grupo hidroxilo resultante de la apertura de la lactona (posición C-6 de la  $\delta$ -lactona) y la relactonización a un ciclo de cinco miembros por ataque del hidroxilo alílico (C-5) que corresponde al producto cinético desplazando el equilibrio hacia la 2(5H)-furanona.<sup>19</sup>

La nueva pectinólida N (**3**) se obtuvo de las fracciones menos polares del fraccionamiento secundario de *H. pectinata*.<sup>20</sup> La fórmula  $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_4$  se determinó a partir del catión de  $m/z$  273 obtenido por electrospray ( $[\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_4+\text{Na}]^+$ ) y la estructura se determinó a partir del análisis de los espectros de  $^1\text{H}$  RMN y  $^{13}\text{C}$  RMN (Cuadro 5 y 6, Figura S9 y S10). En el espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (Figura S10) se observa dos señales de carbonilo ( $\delta_{\text{C}}$  169.32 y 170.65), seis señales para protones vinílicos (110-150 ppm), una señal base de oxígeno ( $\delta_{\text{C}}$  70.05) y cinco señales para protones alifáticos (14-35 ppm). Al comparar las señales de este espectro con las descritas para la pectinólida G<sup>4</sup> (Figura 4), se encontró que las señales correspondientes a las posiciones C-2' a C-4' eran similares, lo que llevó a proponer la estructura de este compuesto como una 2(5H)-furanona.

A través del espectro de  $^1\text{H}$  RMN (Figura S9) se observa una señal correspondiente a un grupo O-acetilo ( $\delta_{\text{H}}$  5.65), el cual correspondía con una de las señales de carbonilo ( $\delta_{\text{C}}$  169.32) y la señal base de oxígeno observada ( $\delta_{\text{C}}$  70.05) en el espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN; además, se observan las señales correspondientes a la doble ligadura del anillo adyacente al carbonilo (6.23 ppm y 7.43 ppm) los cuales se muestran como dobletes ( $J = 5.3$  Hz), al igual que el protón en la posición C-1' ( $\delta_{\text{H}}$  6.26,  $J = 12.0$  Hz). El protón de la posición C-2' ( $\delta_{\text{H}}$  6.64) se presenta como un doblete de dobletes. Los protones oleofínicos de la cadena lateral C-2' y C3' presentan una constante de acoplamiento de 9.9 Hz que estableció la geometría para este doble enlace como Z, en el caso del doble enlace entre C-5 y C-1 se corroboró la geometría Z a través de la correlación entre H-1' y H-4 observada en el espectro bidimensional NOESY. La comparación de este espectro también mostró cierta similitud con el espectro de  $^1\text{H}$  RMN de la pectinólida G. Las señales correspondientes a los protones alifáticos de la cadena lateral (H-5' a H-8') muestran el mismo patrón que las señales para estos protones en las 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas. El resumen de los desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento

se incluyen en el Cuadro 5 y 6. Para la determinación de la configuración absoluta de la posición C-4', se consideró que debe ser la misma configuración *S* de la pectinólida A, compuesto que se encuentra de forma mayoritaria en estas plantas, la cual debe ser precursor biosintético de esta furanona.

De las fracciones secundarias D7 y E5, se obtuvieron dos nuevas 2(5*H*)-furanonas: la pectinólida O (**4**) y su derivado desacetilado, la pectinólida P (**5**), cuyas fórmulas moleculares C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>O<sub>6</sub> y C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>O<sub>4</sub>, respectivamente, se determinaron a partir de cationes de *m/z* 333 [C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>O<sub>6</sub>+Na]<sup>+</sup> y *m/z* 249 [C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>O<sub>4</sub>+Na]<sup>+</sup> obtenidos por electrospray. Al igual que para la montecólida D (**2**), en el espectro de <sup>1</sup>H RMN (Figura S11 y S13) se observa el par de doblete de dobletes correspondiente a los protones vinílicos H-3 y H-4 con una *J* = 11.0 Hz para ambos compuestos y que corresponde a un doble enlace *cis* que se encuentra ubicado en la cadena unida a la posición C-5 de la furanona. Así, las cuatro señales en el espectro de <sup>13</sup>C RMN (Figura S12 y S14) ubicadas entre 152.53 y 116.96 ppm corroboran la presencia de dos dobles enlaces. La presencia de tres carbonos base de oxígeno corresponden a las posiciones C-5 de anillo y a las posiciones C-1' y C-4' de la cadena de octilo. La ausencia de señales correspondientes a grupos acetoxilos en el espectro de <sup>1</sup>H RMN, en δ 2.02 y 2.05 para la pectinólida O (**4**), junto con la diferencia en la masa (CH<sub>2</sub>CO × 2 = 84 uma) entre ambos compuestos confirmó que la pectinólida P (**5**) está sustituida en C-1' y C-3' por grupos hidroxilos. Para determinar la configuración absoluta de los centros quirales de ambas pectinólidas P (**5**) y O (**4**) se utilizó la correlación química con la pectinólida I (**15**) (Figura 17) cuya configuración se determinó mediante el efecto cotton positivo en la curva ECD ( $\Delta\epsilon_{389} +1.32$ ) para la posición C-6 (*S*), con la constante de acoplamiento entre (H-5 y H-6  $J_{5ec,6} = 2.5$ ) para la posición C-5 (*S*) y a través de la derivatización con ésteres de mosher y la comparación de las constantes de acoplamiento teóricas con las experimentales a través de cálculos DFT para la posición C-3' (véase Capítulo I). A partir de la hidrólisis alcalina de la pectinólida I (**15**) se obtuvo la pectinólida P (**5**) cuya acetilación total permitió la formación de la pectinólida O (**4**). Por lo tanto, la asignación de la configuración absoluta para ambos compuestos es: 5*S*, 1'*S*, 4'*S*. En el Cuadro 5 y 6 se presentan los valores de desplazamiento químico y las constantes de acoplamiento para los compuestos inéditos en la literatura de *Hyptis*, una 5,6-dihidro-piran-2-ona (**1**) y cuatro 2(5*H*)-furanona (**2-5**).



**Figura 17.** Correlación química entre la pectinólida I (15) y las 2(5*H*)-furanonas.

**Cuadro 5.** Valores de <sup>1</sup>H RMN para los productos naturales 1-5 (400 MHz en CDCl<sub>3</sub> y CD<sub>3</sub>OD<sup>a</sup>, δ en ppm, *J* en Hz)

	1 <sup>a</sup>	2	3	4	5
<b>Posición</b>					
<b>3</b>	6.10 d (9.6)	6.11 dd (5.7, 2.1)	6.23 d (5.3)	6.18 dd (5.8, 2.0)	6.20 dd (5.8, 2.0)
<b>4</b>	7.14 dd (9.6, 6.0)	7.37 dd (5.7, 1.7)	7.43 d (5.3)	7.42 dd (5.8, 1.6)	7.46 dd (5.8, 1.5)
<b>5</b>	4.36 dd (6.0, 2.5)	5.56 ddd (2.1, 1.7, 1.7)	-	5.14 ddd (4.3, 2.0, 1.6)	5.07 ddd (5.4, 2.0, 1.5)
<b>6</b>	4.41 dd (9.5, 2.5)	-	-	-	-
<b>1'</b>	4.05 dd (9.5, 1.2)	4.90 dd (9.9, 1.7)	6.26 d (12.0)	6.01 dd (8.9, 4.3)	4.73 dd (7.1, 5.4)
<b>2'</b>	3.89 dd (7.6, 1.2)	4.25 dd (9.9, 1.5)	6.64 dd (12.0, 9.9)	5.62 dd (8.9, 11.0)	5.72 ddd (11.4, 7.1, 1.2)
<b>3'</b>	5.18 ddd (8.7, 7.6, 3.6)	5.06 dd (7.5, 1.5)	5.65 m	5.50 dd (11.0, 8.4)	5.50 ddd (11.4, 8.1, 1.2)
<b>4'</b>	1.67 m	5.27 ddd (8.5, 7.5, 4.4)	5.65 m	5.46 ddd (8.4, 7.4, 5.9)	4.51 ddd (8.1, 5.3, 5.2)
<b>5'</b>	1.35 m	1.63 m	1.68 m	1.62 m	1.57 m
<b>6'</b>	1.35 m	1.32 m	1.30 m	1.31 m	1.25 m
<b>7'</b>	0.93 t (7.1)	1.32 m	1.30 m	1.31 m	1.25 m
<b>8'</b>	-	0.91 t (6.8)	0.89 t (6.7)	0.90 t (6.9)	0.90 t (6.9)
<b>CH<sub>3</sub>CO-</b>	2.11 s	2.05 s	2.05 s	2.02 s	-
<b>CH<sub>3</sub>CO-</b>	-	2.05 s	-	2.05 s	-
<b>CH<sub>3</sub>CO-</b>	-	1.97 s	-	-	-

El potencial citotóxico de las 2(5*H*)-furanonas aisladas como productos naturales se determinó sobre tres líneas celulares: HCT-116 (carcinoma de colon), MCF-7 (carcinoma de mama) y HeLa (carcinoma de cérvix). De los resultados obtenidos (cuadro 7) se observa que sólo los compuestos **2** y **4** presentaron actividad citotóxica débil para la línea celular de HeLa y de HCT-116, a diferencia de las 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas, cuya alta actividad citotóxica asociada al anillo  $\delta$ -lactona- $\alpha,\beta$ -insaturada ha sido demostrada en diversas ocasiones (véase Capítulo 1).<sup>21,22</sup>

**Cuadro 6. Valores de  $^{13}\text{C}$  RMN para los productos naturales 1-5 (100 MHz en  $\text{CDCl}_3$  y  $\text{CD}_3\text{OD}^a$ ,  $\delta$  en ppm)**

	1 <sup>a</sup>	2	3	4	5
Posición					
2	172.97	172.58	170.65	172.04	172.54
3	123.12	122.46	119.91	123.53	116.96
4	147.09	153.38	143.50	152.37	138.25
5	60.09	81.12	150.11	83.06	85.17
6	80.23	-	-	-	-
1'	70.14	69.24	109.11	68.36	68.28
2'	72.07	69.13	123.86	135.01	123.09
3'	74.44	72.53	135.05	125.25	127.48
4'	34.04	72.85	70.05	70.21	68.09
5'	28.85	30.67	34.17	34.25	37.00
6'	23.88	27.22	27.14	27.36	27.37
7'	14.34	22.53	22.44	22.53	23.39
8'	-	14.03	13.94	13.95	13.98
$\text{CH}_3\text{CO-}$	172.28	170.93	169.32	170.35	-
$\text{CH}_3\text{CO-}$	-	170.32	-	169.64	-
$\text{CH}_3\text{CO-}$	-	170.13	-	-	-
$\text{CH}_3\text{CO-}$	-	-	-	-	-
$\text{CH}_3\text{CO-}$	21.16	21.03	21.23	21.18	-
$\text{CH}_3\text{CO-}$	-	20.69	-	20.89	-
$\text{CH}_3\text{CO-}$	-	20.62	-	-	-

**Cuadro 7. Citotoxicidad de las 2(5H)-furanonas aisladas de *H. pectinata* e *H. monticola***

Compuesto	IC <sub>50</sub> (μg/mL)		
	MCF-7	HeLa	HCT-116
2	15.96	13.10	19.79
3	24.90	21.25	1.87
4	10.39	2.04	4.76
5	22.98	22.66	>25
Colchicina	0.0041	0.0045	0.08

MCF-7 = carcinoma de mama; HeLa = carcinoma de cérvix, HCT-116 = carcinoma de colon.

### 6.3.3. Elucidación estructural de las sustancias aromáticas

Del pico 2 de las fracciones 39-51 y 19-25 de *H. monticola* obtenidas por CLAR se obtuvieron dos compuestos con estructura flavonoide que fueron identificados como el dihidrokaempferol (6) y la cartamidina (7), compuesto previamente descritos en la literatura. El dihidrokaempferol (6) se aisló originalmente de la madera de *Pinus sibirica*<sup>23</sup> y también

ha sido descrito en los frutos de *Faidherbia albida*<sup>24</sup> y en la madera de *Pseudotsuga menziesii*<sup>25</sup>; la cartamidina (**7**) se ha identificado en especies del género *Carthamus*<sup>26</sup> y en las raíces de *Enkleia siamensis*.<sup>27</sup> La estructura de este compuesto se asignó a través de <sup>1</sup>H RMN y <sup>13</sup>C RMN (Figuras S15-S18), los espectros bidimensionales COSY, HSQC y HMBC, junto con los espectros de masas registrados mediante electrospray en modo negativo.

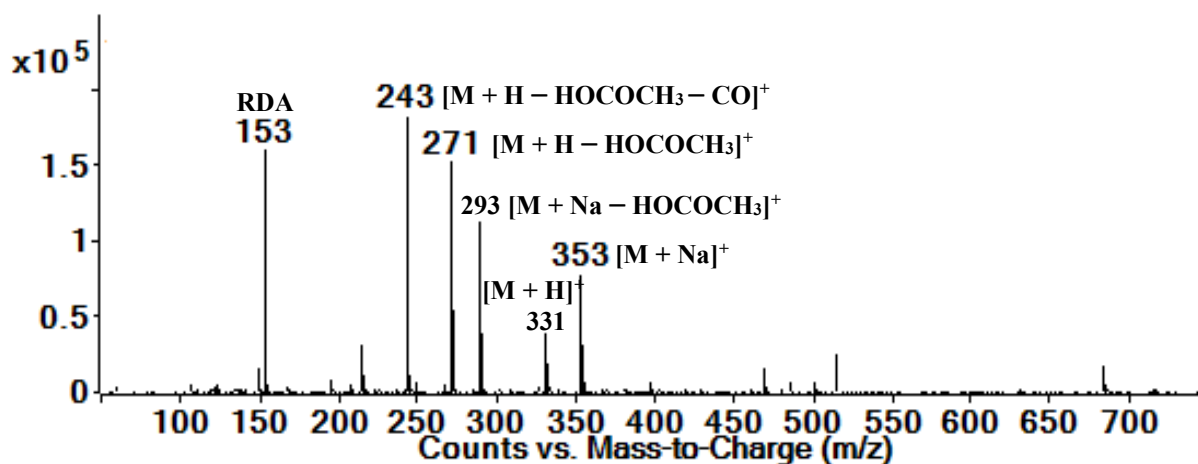
Para el caso del dihidrokaempferol (**6**), su fórmula molecular se determinó como C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> a través del ion correspondiente a la molécula desprotonada de *m/z* 287 [M – H]<sup>-</sup> registrado en electrospray en modo negativo. En el espectro de <sup>1</sup>H RMN se observa un sistema A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> indicativo de una sustitución *para* del anillo aromático B, encontrándose dos dobletes entre 6.82 ppm (H-3' y H-5') y 7.34 ppm (H-2' y H-6') con una constante de acoplamiento de 8.6 Hz, correspondiente a una sustitución *orto*. Se observan dos carbonos base de oxígeno en las posiciones C-2 y C-3 cuyos desplazamientos químicos en <sup>13</sup>C RMN se encuentran en δ<sub>C</sub> 84.96 y δ<sub>C</sub> 73.62, respectivamente. Se observan dos protones en δ<sub>H</sub> 5.86 y δ<sub>H</sub> 5.91 con una constante de acoplamiento de 2.1 Hz relacionada con una sustitución *meta* en las posiciones C-6 y C-8. Todas las asignaciones en los anillos aromáticos se corroboraron a través del espectro HMBC.

La cartamidina (**7**), un isómero del dihidrokaempferol, se identificó a través de los espectros de <sup>1</sup>H RMN y <sup>13</sup>C RMN (Figura S17 y S18). Se observa que el grupo hidroxilo de la posición C-3 presente en el dihidrokaempferol ahora se encuentra en la posición C-6 (δ<sub>C</sub> 168.62) del anillo aromático; la posición C-3 presenta un carbono alifático (δ<sub>C</sub> 44.00) con dos protones (δ<sub>H</sub> 3.11 y 2.69) con una constante de acoplamiento geminal de 17.4 Hz y constantes de 12.9 Hz y 3.1 Hz que se acoplan con el protón de la posición C-2 que corresponde a una base de oxígeno cuyo desplazamiento en <sup>13</sup>C RMN es de δ<sub>C</sub> 80.45; el único protón (H-8) presente en el anillo A del flavonoide tiene un desplazamiento de δ<sub>H</sub> 5.89, el anillo B de la molécula muestra el mismo sistema A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> que el dihidrokaempferol (**6**).

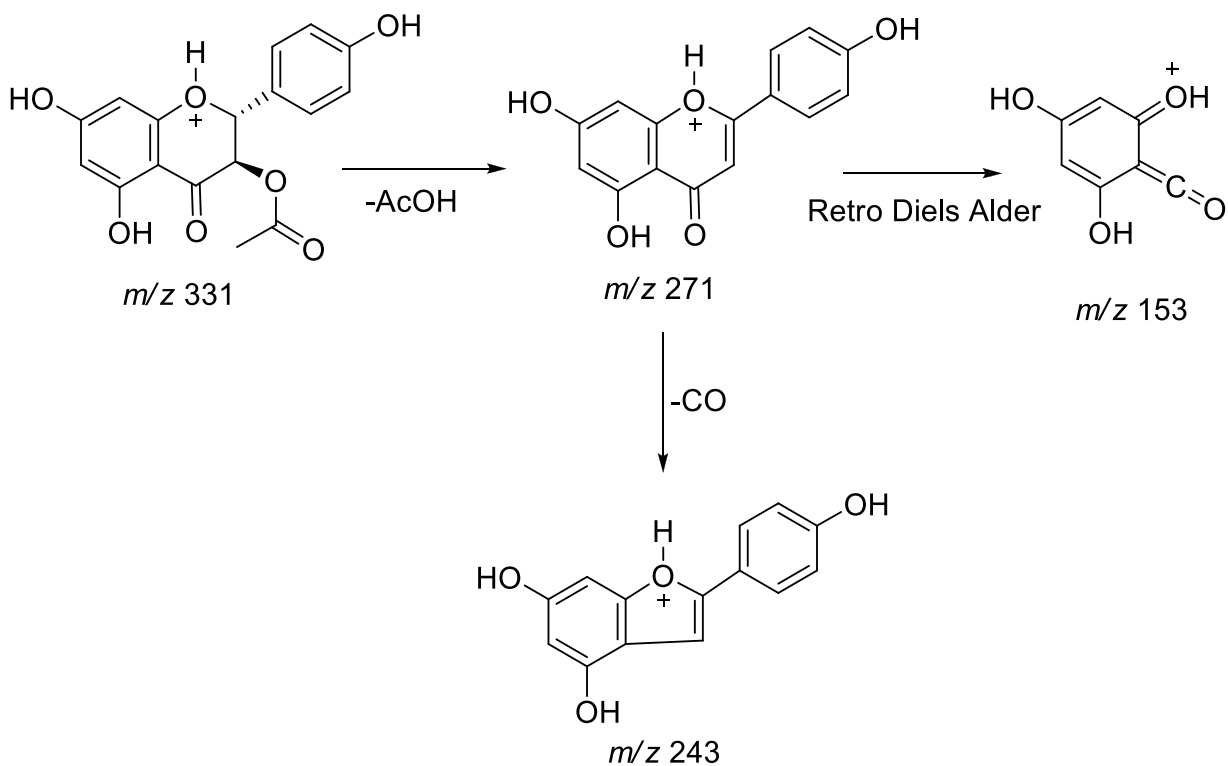
Del pico 3 de la fracción 19-25 de *H. monticola* obtenido por CLAR se aisló el derivado acetilado en la posición C-3 del dihidrokaempferol (**6**), denominado como la 3-acetoxi-aromadendrina (**8**), este flavanolol trihidroxilado se aisló previamente del extracto lipofílico de las hojas de *Siparuna andina* y mostró una moderada actividad antiplasmódica *in vitro*.<sup>28</sup>



Su fórmula molecular se determinó como  $C_{17}H_{14}O_7$  a través del ion correspondiente de  $m/z$  353  $[M + Na]^+$  registrado en electrospray en modo positivo (Figura 18); además en el espectro de masas, se observa el pico correspondiente a la molécula protonada ( $m/z$  331  $[M + H]^+$ ), así como la eliminación subsecuente de una molécula de ácido acético ( $m/z$  271) y la pérdida de una molécula de CO ( $m/z$  243). El pico de  $m/z$  153 es el resultado de la fragmentación de la molécula desacetilada protonada a través de una reacción tipo retro diels alder (RDA) (Figura 19), característica de los flavonoides.<sup>29</sup> A partir de este pico se puede corroborar la sustitución en el anillo A del flavanolol, que al igual que el dihidrokaempferol (**6**), presenta dos hidroxilos en posición *meta*. La estructura se asignó a través del análisis espectroscópico en la RMN  $^1H$  y  $^{13}C$  (Figuras S19-S20) y los espectros bidimensionales HSQC y HMBC. En el espectro de  $^1H$  RMN se observa un sistema  $A_2B_2$  para el anillo B, los protones H-2 ( $\delta_H$  5.29) y H-3 ( $\delta_H$  5.82) presentan una constante de acoplamiento de 11.7 Hz que indica que los protones se encuentran en posición *cis*, además se observa un singulete en  $\delta_H$  1.98 perteneciente al  $CH_3$  del grupo acetoxilo ( $\delta_C$  170.89) unido a la posición C-3 ( $\delta_C$  73.90); los H-6 y H-8 del anillo A se observan como un singulete ( $\delta_H$  5.95) que integra para dos protones.



**Figura 18.** Espectro de masas mediante (+)-ESI de la 3-acetoxi-aromadendrina (**8**).



**Figura 19.** Fragmentación en (+)-electrospray de la 3-acetoxi-aromadendrina (**8**).

A partir del pico 3 de la fracción 39-51, se obtuvo el flavanolol 2,3-dihidrogosipetina (**9**), cuya fórmula molecular se determinó como  $C_{15}H_{12}O_8$  a través del ion correspondiente a la molécula desprotonada de  $m/z$  319  $[M - H]^-$  registrado en electrospray en modo negativo. Este flavanolol se aisló anteriormente a través de la hidroxilación de la taxifolina usando la proteína taxifolin 8-monooxigenasa de *Pseudomonas* sp. en la presencia de NADH y NADPH.<sup>30</sup> El derivado metoxilado en las posiciones C-7 y C-8 se aisló de la planta *Erica cinerea*.<sup>31</sup> La asignación de la estructura se obtuvo mediante el análisis espectroscópico en la RMN  $^1H$  y  $^{13}C$  (Figura S21 y S22), junto con los espectros bidimensionales COSY, HSQC y HMBC para asignar correctamente los desplazamientos químicos. Para el anillo B se observan dos señales: un doblete para el protón H-2' ( $\delta_H$  6.89) con una  $J = 1.9$  Hz que indica un acoplamiento en *meta* y una señal con multiplicidad compleja para los protones H-5' y H-6' ( $\delta_H$  6.77). Dos carbonos base de oxígeno ( $\delta_C$  73.82 y 82.26) observados en el espectro de  $^{13}C$  RMN corresponde a las posiciones C-2 y C-3 sustituida con un grupo hidroxilo. Para el anillo A se observa únicamente una señal para el protón H-6, el cual en el espectro de HMBC

presentó una correlación con todos los carbonos del anillo a excepción de C-9 ( $\delta_C$  171.11) que se encuentra en posición *para* respecto a C-6 y que se identificó a partir de su correlación con H-2 por HMBC, esto permitió descartar que el protón se encontrara en la posición C-8.

De la fracción A5 obtenida del fraccionamiento primario de un extracto *H. pectinata* eluida con metanol por columna abierta se identificó al ácido rosmarínico (**10**), un éster entre el ácido cafeico y el ácido 3,4-dihidroxifenilactico, se aisló originalmente de la planta *Rosmarinus officinalis*; sin embargo, se ha encontrado en plantas de las familias Boraginaceae y Lamiaceae, en particular en la subfamilia Nepetoideae,<sup>32</sup> dentro del género *Hyptis*, se aisló de una colecta brasileña de *H. pectinata*.<sup>33</sup> La asignación de la estructura de este compuesto se obtuvo por  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  RMN (Figura S23 y S24) junto con los espectros bidimensionales COSY, HSQC y HMBC para asignar correctamente las correlaciones entre los átomos de la molécula; ambos anillos aromáticos presentes en la estructura cuentan con tres protones, uno de ellos con una constante acoplamiento de 8.2 Hz (H-9 y H-7') correspondiente a un acoplamiento en posición *orto*, otro con una constante de acoplamiento de 2.1 Hz (H-6 y H-4') que corresponde a un acoplamiento en posición *meta* y, finalmente, un protón que cuenta con constantes para acoplamientos *orto* y *meta* (H-10 y H-1'), la correlación entre los protones de los anillos aromáticos se confirmó a través del espectro COSY. En 6.23 ppm y 7.49 ppm se observan dos protones con una constante de acoplamiento de 15.9 Hz que indica que se trata de un doble enlace *trans* unido a uno de los anillos aromáticos y al carbonilo ( $\delta_C$  169.04), lo cual se confirmó por el espectro HMBC. Esta parte corresponde al ácido cafeico. Unido al segundo anillo aromático se encuentran dos carbonos alifáticos, uno de ellos en  $\delta_C$  38.76 posee dos protones con una constante geminal ( $J = 17.1$  Hz) en  $\delta_H$  2.91 y 3.08. El carbono vecinal se encuentra unido al oxígeno del carbonilo ( $\delta_C$  77.56) y las constantes de acoplamiento de sus protones (9.7 Hz y 3.3 Hz) corresponden a los protones en  $\delta_H$  2.91 y 3.08, respectivamente. El espectro de masas obtenido por electrospray en modo negativo confirma la estructura a través del anión de la molécula desprotonada de  $m/z$  359 [ $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_6 - \text{H}$ ]<sup>-</sup>. En los Cuadros 8 y 9 se resumen los desplazamientos y constantes de acoplamiento de los compuestos obtenidos.

Del pico 4 de la fracción A9 del extracto de *H. pectinata* se obtuvo la salvigenina<sup>20</sup> (5-hidroxi-4',6,7 trimetoxiflavona) (**11**), flavonoide ampliamente distribuido en la familia *Lamiaceae*<sup>34</sup>

y aislado originalmente de *Salvia officinalis*.<sup>35</sup> Su fórmula molecular se determinó como C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>O<sub>6</sub> a partir del ion radical obtenido por impacto electrónico con una *m/z* 328. En el espectro de <sup>1</sup>H-RMN se encontró un singulete en δ<sub>C</sub> 12.78 correspondiente a un OH en C-5 cuyo desplazamiento a campo bajo se debe a que se encuentra quelatado con el oxígeno del carbonilo en C-4, el singulete en δ<sub>H</sub> 6.60 corresponde al protón en la posición 8; los tres singuletes presentes entre δ<sub>H</sub> 3.90-3.98 corresponden a los grupos metoxilo presentes en la molécula en las posiciones C-7, C-6 y C-4' y la señal en δ<sub>H</sub> 6.56 pertenece al protón vinílico H-3; se encuentran dos dobletes en δ 7.04 (H-3'/H-5') y δ<sub>H</sub> 7.86 (H-2'/H-6') que integran para dos protones cada uno y con una constante de acoplamiento de 8.0 Hz. Estas señales son indicativas de un sistema A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> donde las sustituciones se encuentran en posición *para*. En el caso de la 5-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavona (**11**), otra flavona aislada de la familia Lamiaceae<sup>36</sup>, su ion radical observado por impacto electrónico con una *m/z* 298 corresponde a la fórmula molecular C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>O<sub>5</sub>. La diferencia entre este flavonoide y la salvigenina es de 30 unidades de masa, correspondiente a un grupo metoxilo. A través del espectro de <sup>1</sup>H-RMN se corrobora la presencia de solo dos grupos metoxilo (δ<sub>H</sub> 3.90 y 3.88), además se observa el mismo sistema A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> para las posiciones H-2'/H-6' y H-3'/H-5' junto con un singulete en δ<sub>H</sub> 6.48 perteneciente a H-3 y el singulete para el grupo hidroxilo en C-5. En el caso de este compuesto, se presentan dos dobletes (δ<sub>H</sub> 6.37 y 6.58) con una constante de acoplamiento *meta* (2.5 Hz) para los protones H-6 y H-8.

**Cuadro 8. Valores de <sup>1</sup>H RMN para los productos naturales 6-10 (400 MHz CD<sub>3</sub>OD, δ en ppm, J en Hz).**

Posición	6	7	8	9	10
2	4.96 d (11.6)	5.33 dd (12.9, 3.3)	5.29 d (11.7)	5.74 d (11.7)	-
3	4.52 d (11.6)	3.11 dd (17.4, 12.9) 2.69 dd (17.4, 3.3)	5.82 d (11.7)	5.19 d (11.7)	7.49 d (15.9)
4	-	-	-	-	6.23 d (15.9)
5	-	-	-	-	-
6	5.91 d (2.1)	-	5.95 s	5.88 s	7.01 d (2.1)
7	-	-	-	-	-
8	5.86 d (2.1)	5.89 s	5.95 s	-	-
9	-	-	-	-	6.75 d (8.2)
10	-	-	-	-	6.90 dd (8.2, 2.1)
1'	-	-	-	-	5.07 dd (9.8, 3.3)
2'	7.34 d (8.6)	7.31 d (8.3)	7.33 d (8.6)	6.89 d (1.9)	3.08 dd (14.3, 3.3) 2.91 dd (14.3, 9.8)
3'	6.82 d (8.6)	6.82 d (8.3)	6.83 d (8.6)	-	-
4'	-	-	-	-	6.65 d (2.1)
5'	6.82 d (8.6)	6.82 d (8.3)	6.83 d (8.6)	6.77 m	-
6'	7.34 d (8.6)	7.31 d (8.3)	7.33 d (8.6)	6.77 m	-
7'	-	-	-	-	6.61 dd (8.2)
8'	-	-	-	-	6.75 dd (8.2, 2.1)
CH <sub>3</sub> CO	-	-	1.98	-	-

**Cuadro 9. Valores de <sup>13</sup>C RMN para los productos naturales 6-10 (100 MHz en CD<sub>3</sub>OD, δ en ppm, J en Hz)**

Posición	6	7	8	9	10
2	84.96	80.45	82.37	73.82	169.04
3	73.62	44.00	73.90	82.26	146.65
4	198.45	197.75	192.89	193.09	115.59
5	165.32	168.66	165.49	169.59	127.95
6	97.36	168.62	97.06	96.73	115.06
7	168.97	164.86	164.21	164.02	146.77
8	96.34	96.25	98.05	165.38	149.38
9	164.54	165.41	165.86	171.11	116.43
10	101.77	103.28	101.68	102.01	122.91
1'	129.29	131.11	127.90	128.37	77.56
2'	130.37	129.03	130.13	115.53	38.76
3'	116.12	116.33	116.30	146.46	131.08
4'	159.22	158.99	159.58	147.95	116.16
5'	116.12	116.33	116.30	116.20	145.95
6'	130.37	129.03	130.13	120.78	144.81
7'	-	-	-	-	121.72
8'	-	-	-	-	117.46
CH <sub>3</sub> CO	-	-	20.22	-	-
CH <sub>3</sub> CO	-	-	170.89	-	-
COOH	-	-	-	-	177.53

La importancia de los flavonoides y los conjugados del ácido cafeico, como el ácido rosmarínico (**10**), confiere una importancia farmacológica a las especies de *Hyptis* utilizadas en la medicina tradicional, como desinfectantes y calmantes de las irritaciones de las mucosas estomacales. Esta consideración se fundamenta principalmente por la actividad antibacteriana demostrada por algunos flavonoides.<sup>37</sup> Sin embargo, la actividad antioxidante de los flavonoides y sus metabolitos –ácidos fenólicos- ha recibido la mayor atención por parte de la investigación farmacognóstica, debido a su capacidad para reducir la formación de radicales libres y a neutralizar a los radicales libres *in vivo*. Esta propiedad se evidenció experimentalmente por el aumento de la capacidad antioxidante del plasma a través de la regulación del estrés oxidativo posprandial<sup>38</sup> y la preservación de los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas de eritrocitos.<sup>39</sup>

El metabolismo de los flavonoides de las dos especies del género *Hyptis* analizadas (*H. pectinata* y *H. monticola*) se caracteriza por la oxidación de las posiciones C-8 y C-3 del núcleo básico, rasgo que comparte con otras especies incluidas en el género y algunos quimiotipos de *Mentha*, *Thymus* y *Plectranthus*, *inter alia*.<sup>40,41</sup> Para la actividad antimicrobiana se requiere de al menos un grupo hidroxilo en el anillo A de los flavonoides (especialmente en C-7); la hidroxilación de las posiciones C-5 y C-6 también contribuyen al incremento de la actividad.<sup>42</sup>

## 6.4. Referencias

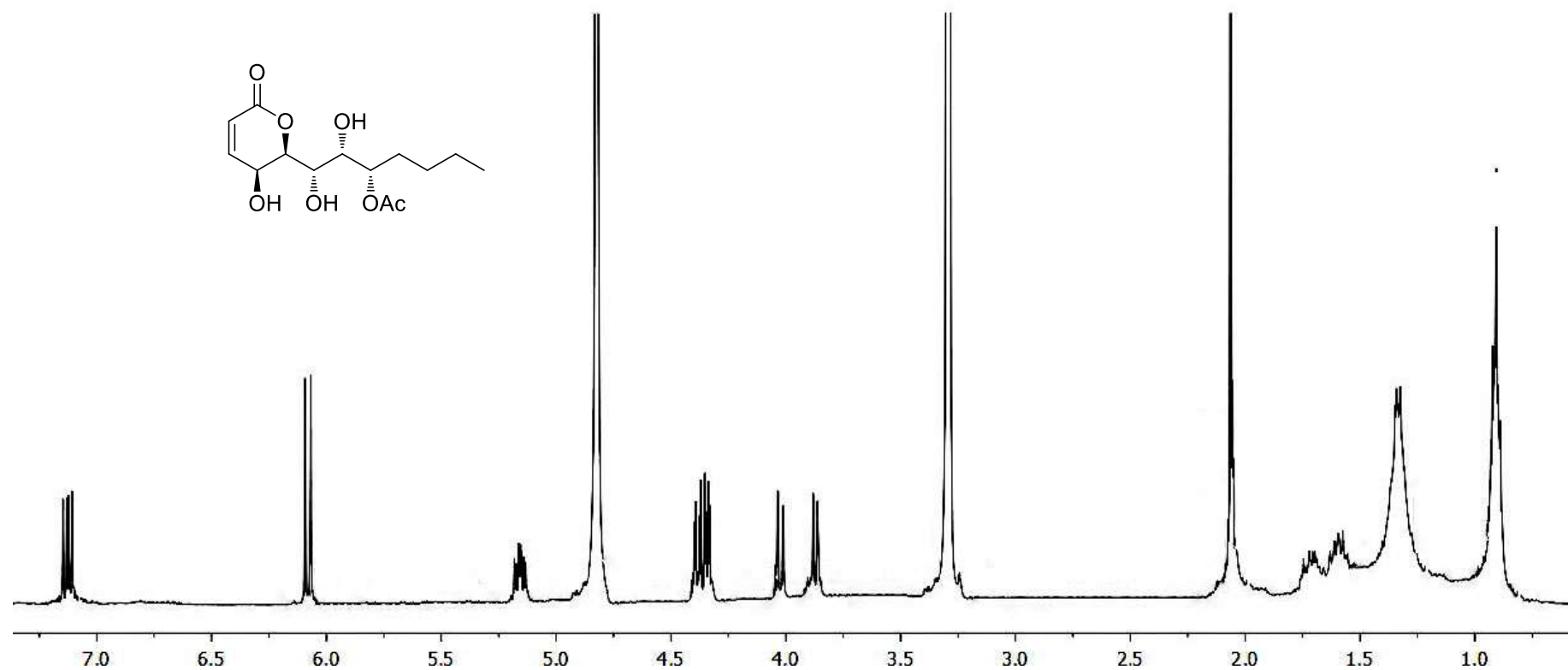
1. Karuppiah V, Sun W, Li Z. Natural Products of Actinobacteria Derived from Marine Organisms. *Stud Nat Prod Chem.* 2016;48:417-446. doi:10.1016/B978-0-444-63602-7.00013-8
2. Joule JA, Mills K. *Heterocyclic Chemistry*. 5th ed. Ware: Wiley; 2010. doi:978 92 4 150215 3
3. Flematti GR, Ghisalberti EL, Dixon KW, Trengove RD. A compound from smoke that promotes seed germination. *Science (80- )*. 2004;305(5686):977. doi:10.1126/science.1099944
4. Boalino DM, Connolly JD, McLean S, Reynolds WF, Tinto WF.  $\alpha$ -Pyrones and a 2(5H)-furanone from *Hyptis pectinata*. *Phytochemistry*. 2003;64(7):1303-1307. doi:10.1016/j.phytochem.2003.08.017
5. Fragoso-Serrano M, Gibbons S, Pereda-Miranda R. Anti-staphylococcal and cytotoxic compounds from *Hyptis pectinata*. *Planta Med.* 2005;71(3):278-280. doi:10.1055/s-2005-837831
6. Xu Y, He H, Schulz S, et al. Potent antifouling compounds produced by marine *Streptomyces*. *Bioresour Technol.* 2010;101(4):1331-1336. doi:10.1016/j.biortech.2009.09.046
7. Pimentel-Elardo SM, Kozytska S, Bugni TS, Ireland CM, Moll H, Hentschel U. Anti-parasitic compounds from *Streptomyces* sp. strains isolated from Mediterranean sponges. *Mar Drugs.* 2010;8(2):373-380. doi:10.3390/md8020373
8. Igarashi Y, Ikeda M, Miyanaga S, Kasai H, Shizuri Y, Matsuura N. Two butenolides with PPAR $\alpha$  agonistic activity from a marine-derived *Streptomyces*. *J Antibiot (Tokyo)*. 2015;68(5):345-347. doi:10.1038/ja.2014.151
9. Centko RM, Ramón-García S, Taylor T, et al. Ramariolides A-D, antimycobacterial butenolides isolated from the mushroom *Ramaria cystidiophora*. *J Nat Prod.* 2012;75(12):2178-2182. doi:10.1021/np3006277
10. Lehmann J, Richers J, Pöthig A, Sieber SA. Synthesis of ramariolide natural products and discovery of their targets in mycobacteria. *Chem Commun.* 2017;53(1):107-110. doi:10.1039/C6CC08365J
11. Mansoor TA, Hong J, Lee CO, et al. New Cytotoxic Metabolites from a Marine Sponge *Homaxinella* sp. *J Nat Prod.* 2004;67(4):721-724. doi:10.1021/np030358j
12. Li DH, Zhu TJ, Liu HB, Fang YC, Gu QQ, Zhu WM. Four butenolides are novel cytotoxic compounds isolated from the marine-derived bacterium, *Streptoverticillium luteoverticillatum* 11014. *Arch Pharm Res.* 2006;29(8):624-626. doi:10.1007/BF02968245
13. Masi M, Maddau L, Linaldeddu BT, et al. Bioactive Secondary Metabolites Produced by the Oak Pathogen *Diplodia corticola*. *J Agric Food Chem.* 2016;64(1):217-225. doi:10.1021/acs.jafc.5b05170
14. Piao SJ, Zhang HJ, Lu HY, et al. Hippolides A-H, acyclic manoalide derivatives from the marine sponge *Hippospongia lachne*. *J Nat Prod.* 2011;74(5):1248-1254. doi:10.1021/np200227s
15. Ueoka R, Nakao Y, Fujii S, Van Soest RWM, Matsunaga S. Aplysinoplides A-C, cytotoxic sesterterpenes from the marine sponge *Aplysinopsis digitata*. *J Nat Prod.* 2008;71(6):1089-1091.
16. 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. *J Nat Prod.*

- 2012;75(1):93-97. doi:10.1021/np200864m
17. Petersen M, Simmonds MSJ. Rosmarinic acid. *Phytochemistry*. 2003;62(2):121-125. doi:10.1016/S0031-9422(02)00513-7
  18. Pereda-Miranda R, Hernández L, Villavicencio MJ, et al. Structure and stereochemistry of pectinolides a-C, novel antimicrobial and cytotoxic 5, 6-dihydro- $\alpha$ -pyrones from *Hyptis pectinata*. *J Nat Prod*. 1993;56(4):583-593. doi:10.1021/np50094a019
  19. Eliel EL, Doyle MP. *Basic Organic Stereochemistry*. 1st ed. Wiley-Interscience; 2001.
  20. Flores Suárez DL. Aislamiento mediante cromatografía de lípidos de los constituyentes de la especie *Hyptis pectinata*. 2016.
  21. Bates D, Eastman A. Microtubule destabilising agents: far more than just antimetabolic anticancer drugs. *Br J Clin Pharmacol*. 2017;83(2):255-268. doi:10.1111/bcp.13126
  22. Steinmetz MO, Prota AE. Microtubule-Targeting Agents: Strategies To Hijack the Cytoskeleton. *Trends Cell Biol*. 2018;28(10):776-792. doi:10.1016/j.tcb.2018.05.001
  23. Lutskii, V.I., Gromova, A.S., Tyukavkina NA. Aromadendrin, apigenin and kaemperol from the wood of *Pinus sibirica*. *Chem Nat Compd*. 1971;7(2):197. doi:10.1360/zd-2013-43-6-1064
  24. Mohammed MM, Ali AA, Desoky EK, Gobrael LG. Compounds isolation and antioxidant activity of *Faidherbia albida* fruit extract. 2018:35-40.
  25. Mbakidi-Ngouaby H, Pinault E, Gloaguen V, et al. Profiling and seasonal variation of chemical constituents from *Pseudotsuga menziesii* wood. *Ind Crops Prod*. 2018;117(February):34-49. doi:10.1016/j.indcrop.2018.02.069
  26. Compounds N. Anthocyanins of carthamus species. *Chem Nat Compd*. 1998;34(4):557-558.
  27. Rajachan OA, Kanokmedhakul S, Nasomjai P, Kanokmedhakul K. Chemical constituents and biological activities from roots of *Enkleia siamensis*. *Nat Prod Res*. 2014;28(4):268-270. doi:10.1080/14786419.2013.838241
  28. Petersen M, Simmonds MSJ. Rosmarinic acid. *Phytochemistry*. 2003;62(2):121-125. doi:10.1016/S0031-9422(02)00513-7
  29. Demarque DP, Crotti AEM, Vessecchi R, Lopes JLC, Lopes NP. Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: An important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. *Nat Prod Rep*. 2016;33(3):432-455. doi:10.1039/c5np00073d
  30. Jenett-Siems K, Siems K, Jakupovic J, et al. Sipandinolide: A butenolide including a novel type of carbon skeleton from *Siparuna andina*. *Planta Med*. 2000;66(4):384-385. doi:10.1055/s-2000-14898
  31. Jeffrey M, Knight M EC. The Bacterial Degradation of Flavonoids. *Biochem J*. 1972;130:373-381.
  32. Bennini B, Chulia AJ, Kaouadji M, Delage C. (2R,3R)-Dihydroflavonol aglycone and glycosides from *Erica cinerea*. *Phytochemistry*. 1993;33(5):1233-1236. doi:10.1016/0031-9422(93)85055-V
  33. Falcao RA, Do Nascimento PLA, De Souza SA, et al. Antileishmanial phenylpropanoids from the leaves of *Hyptis pectinata* (L.) poit. *Evidence-based Complement Altern Med*. 2013;2013. doi:10.1155/2013/460613

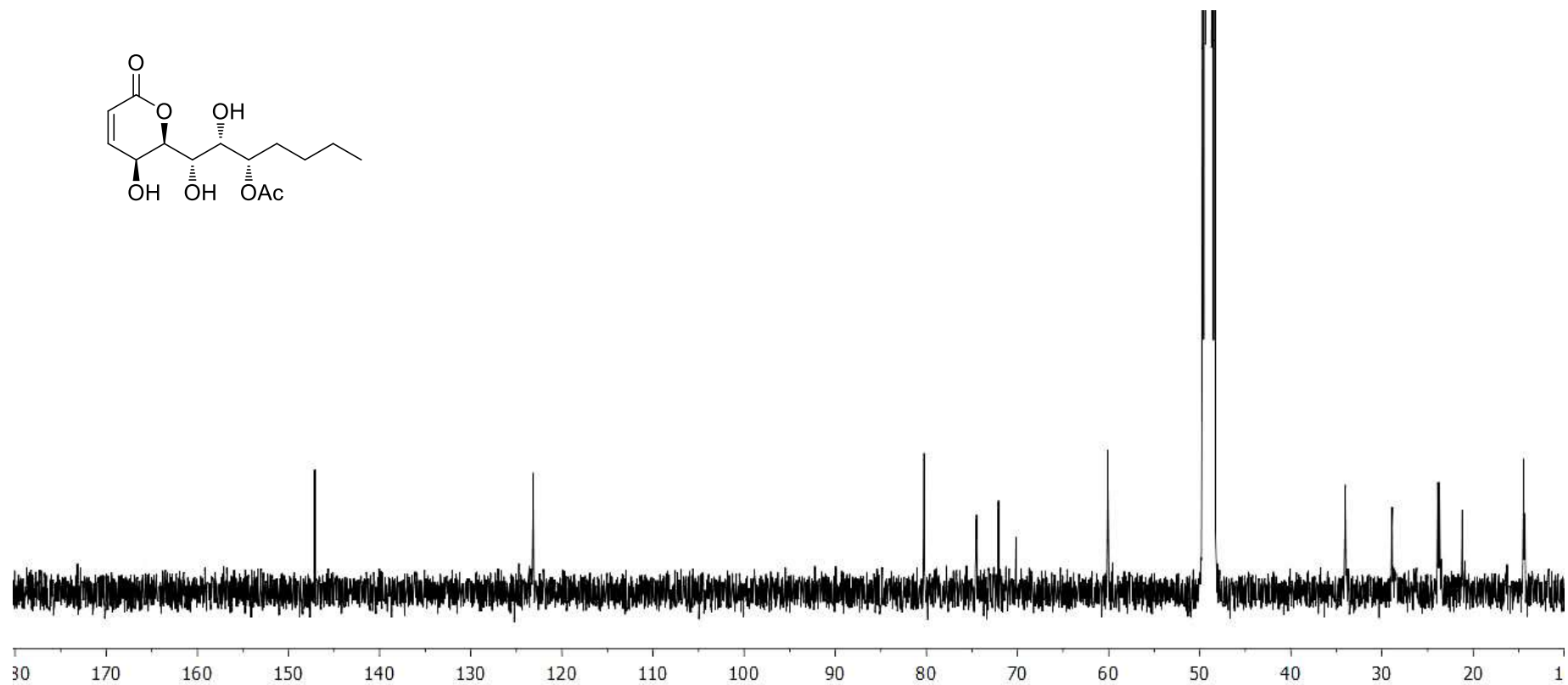


34. Tomás-Barberán FA, Wollenweber E. Flavonoid aglycones from the leaf surfaces of some Labiatae species. *Plant Syst Evol.* 1990;173(3-4):109-118. doi:10.1007/BF00940856
35. Mansourabadi AH, Sadeghi HM, Razavi N. Anti-inflammatory and Analgesic Properties of Salvigenin , *Salvia officinalis* Flavonoid Extracted. 2015;1(3):31-41.
36. Taylor P, Habibi Z, Cheraghi Z, Ghasemi S, Yousefi M. New highly hydroxylated triterpene from *Salvia atropatana* Bunge. *Natural Product Research* 2013:37-41.
37. Cushnie TPT, Lamb AJ. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents.* 2011;38(2):99-107. doi:10.1016/j.ijantimicag.2011.02.014
38. Selby-Pham J, Selby-Pham SN, Wise K, Bennett LE. Understanding health-related properties of bushmint (*Hyptis*) by pharmacokinetic modelling of intestinal absorption. *Phytochemistry letters.* 2018 Aug 31;26:16-9.
39. Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod.* 2000;63(7):1035-1042. doi:10.1021/np9904509
40. Milevskaya V V., Prasad S, Temerdashev ZA. Extraction and chromatographic determination of phenolic compounds from medicinal herbs in the Lamiaceae and Hypericaceae families: A review. *Microchem J.* 2019;145:1036-1049. doi:10.1016/j.microc.2018.11.041
41. Peter SR, Peru KM, Fahlman B, McMartin DW, Headley J V. The application of HPLC ESI MS in the investigation of the flavonoids and flavonoid glycosides of a Caribbean Lamiaceae plant with potential for bioaccumulation. *J Environ Sci Heal - Part B Pestic Food Contam Agric Wastes.* 2015;50(11):819-826. doi:10.1080/03601234.2015.1058103
42. Farhadi F, Khameneh B, Iranshahi M, Iranshahy M. Antibacterial activity of flavonoids and their structure–activity relationship: An update review. *Phyther Res.* 2019;33(1):13-40. doi:10.1002/ptr.6208

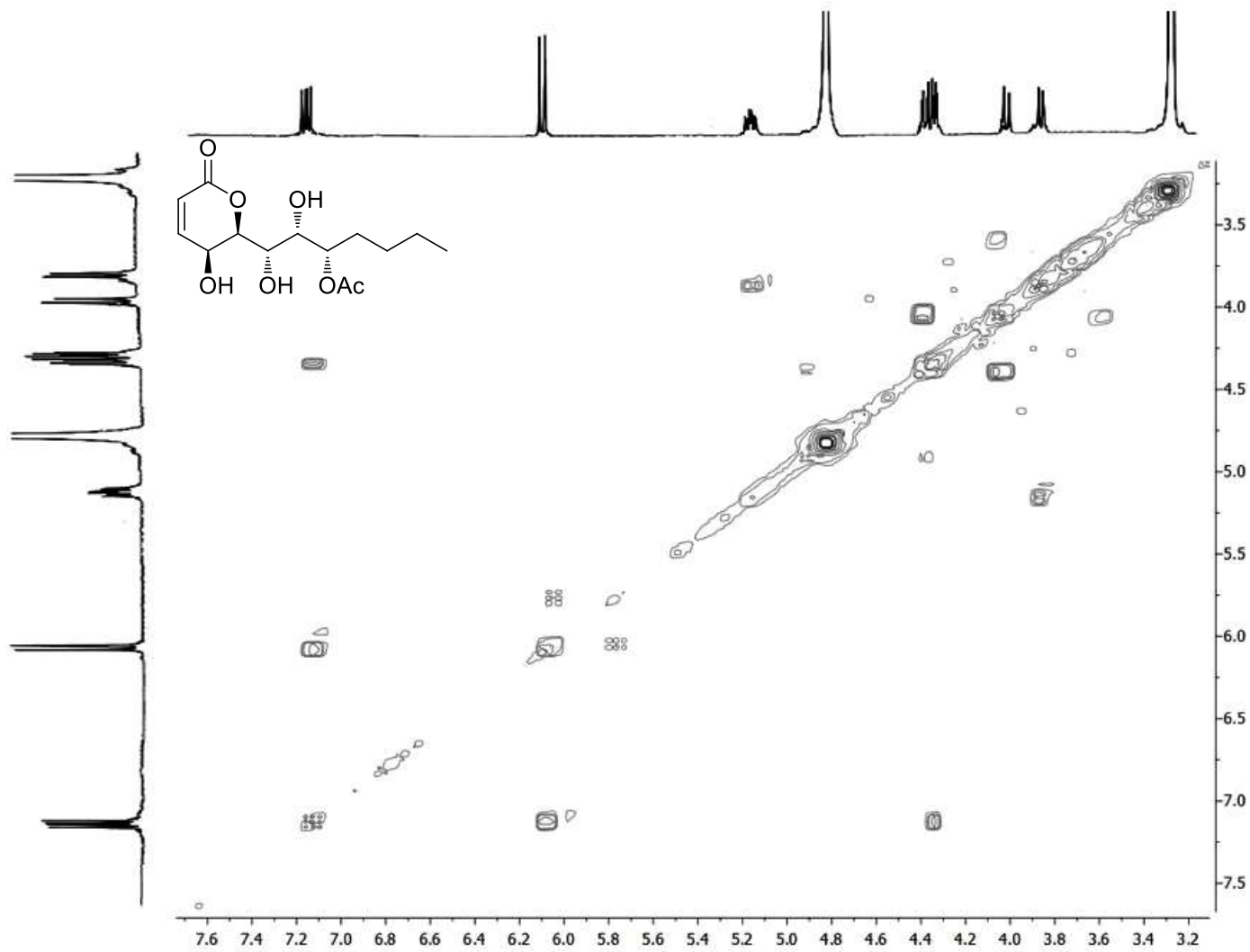
## 6.4. Información suplementaria



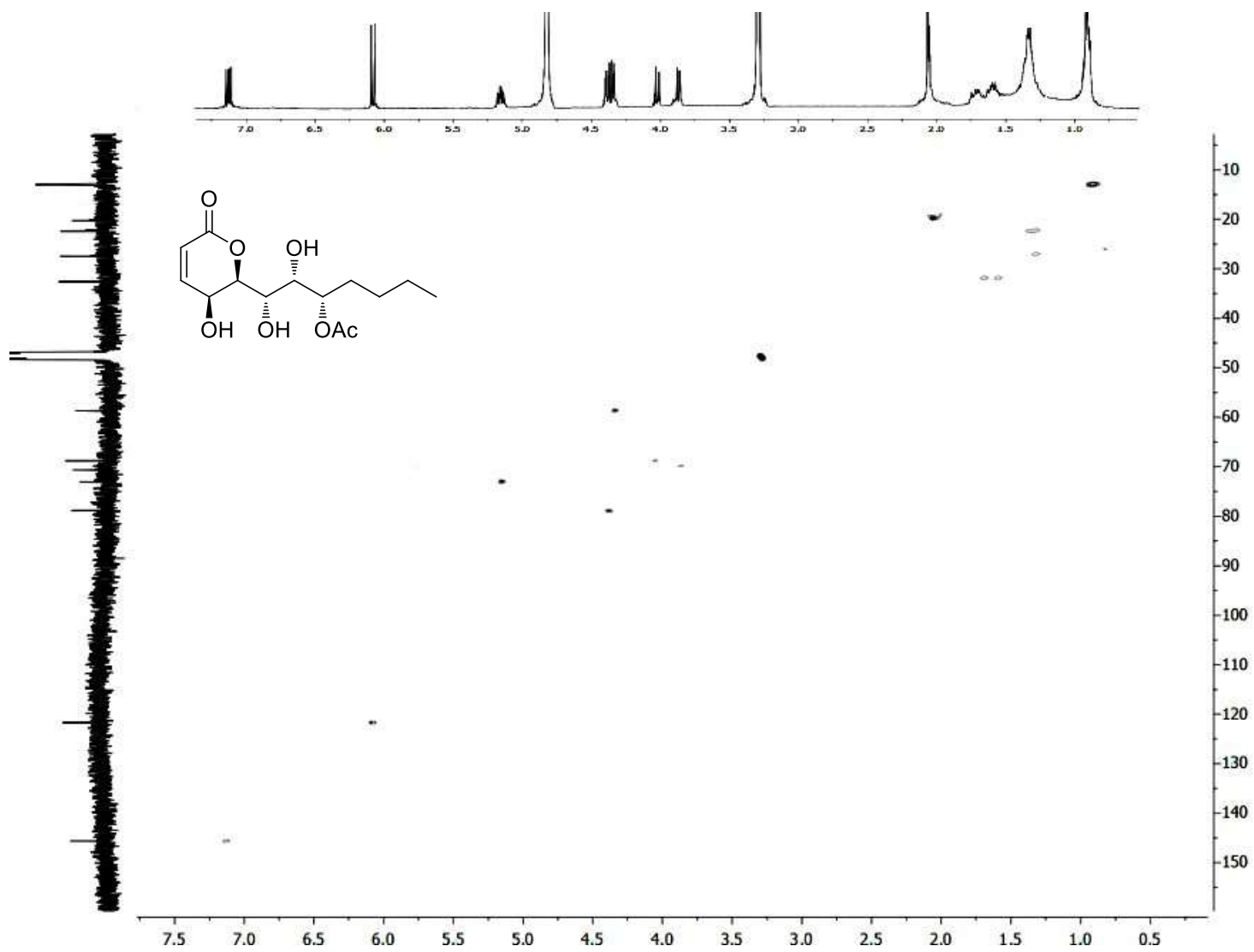
**Figura S1.** Espectro de  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz) de la montecólida C (1) en  $\text{CD}_3\text{OD}$ .



**Figura S2.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz) de la montecólida C (1) en  $\text{CD}_3\text{OD}$ .



**Figura S3.** Espectro bidimensional <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY de la montecólida C (**1**) en CD<sub>3</sub>OD.



**Figura S4.** Espectro bidimensional  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC de la montecólida C (1) en  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

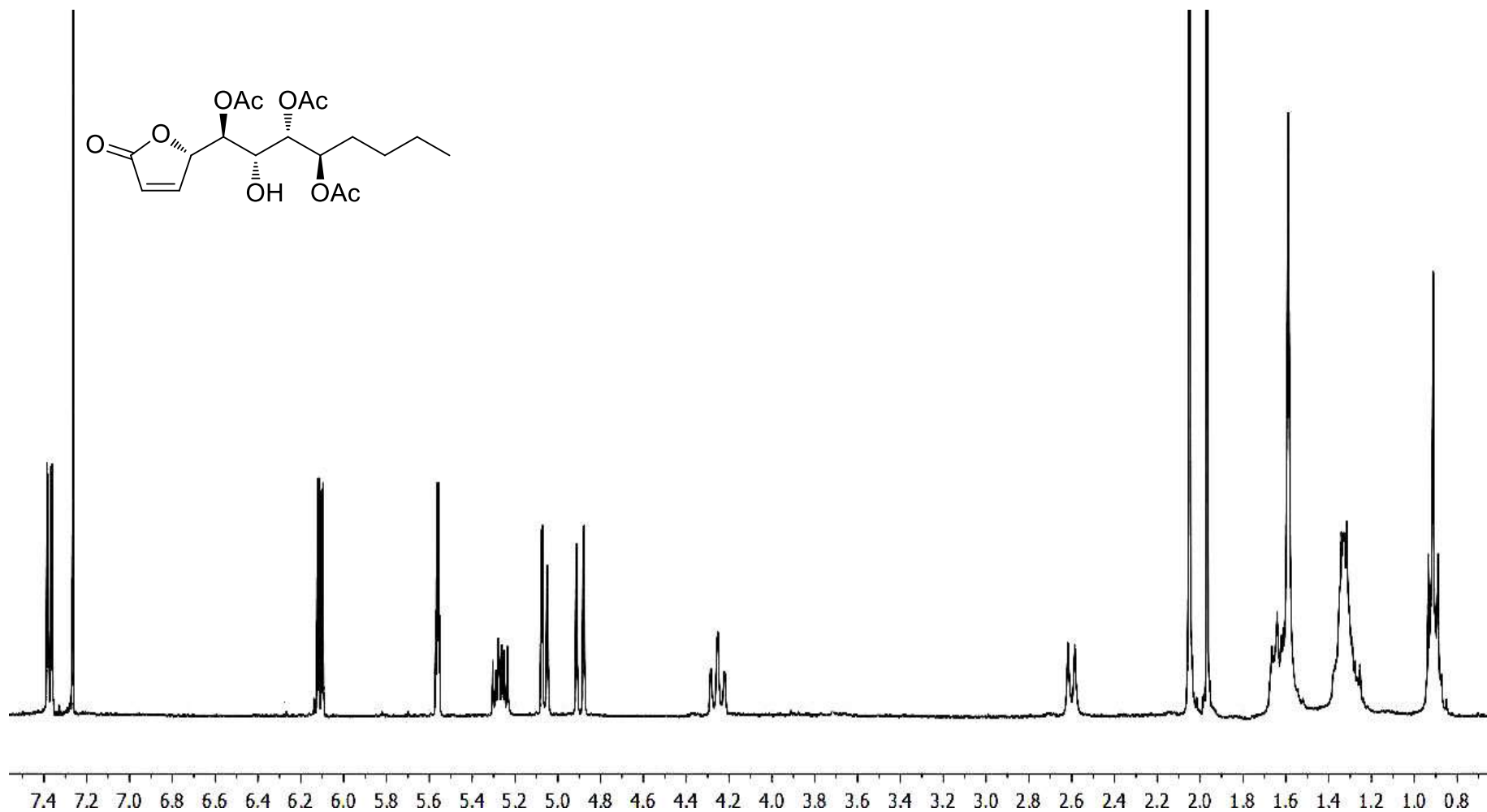


Figura S5. Espectro de <sup>1</sup>H RMN (400 MHz) de la montecólida D (2) en CDCl<sub>3</sub>.

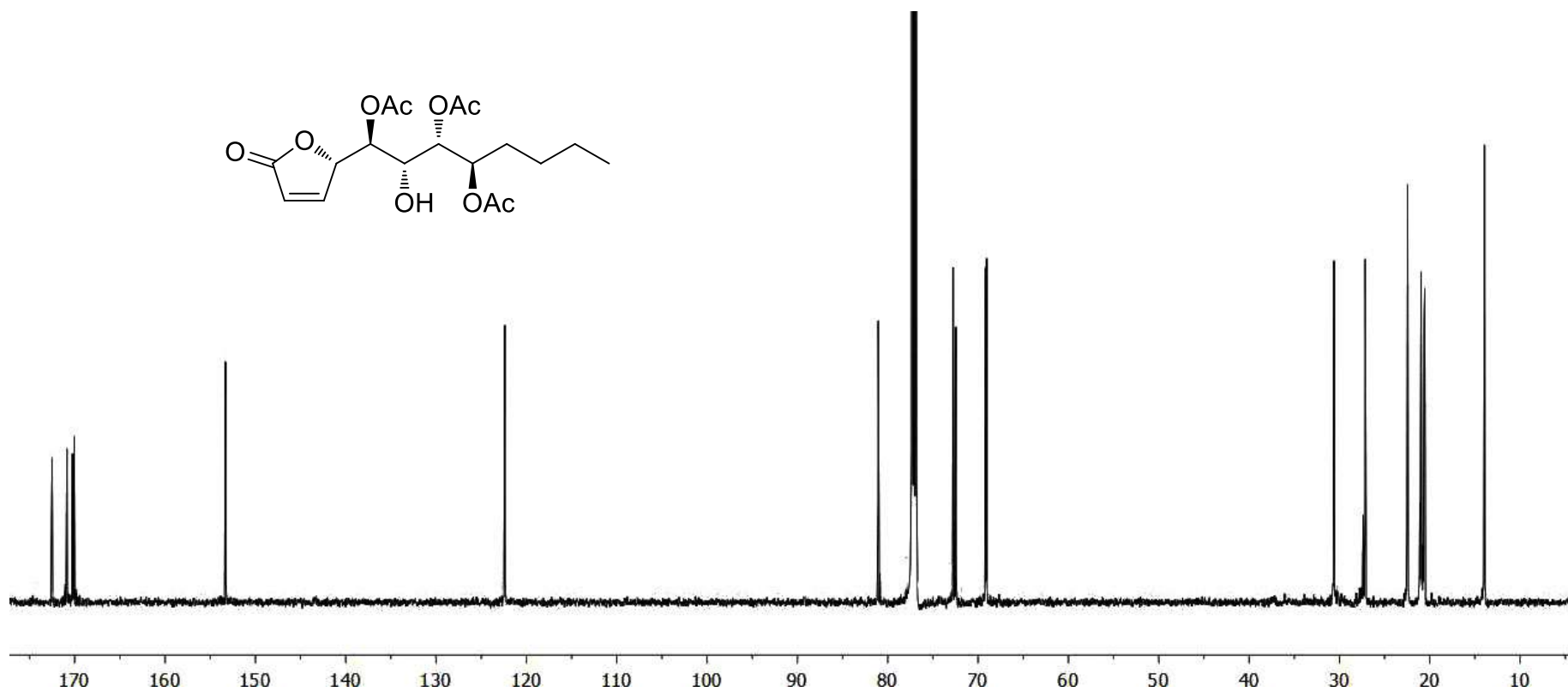
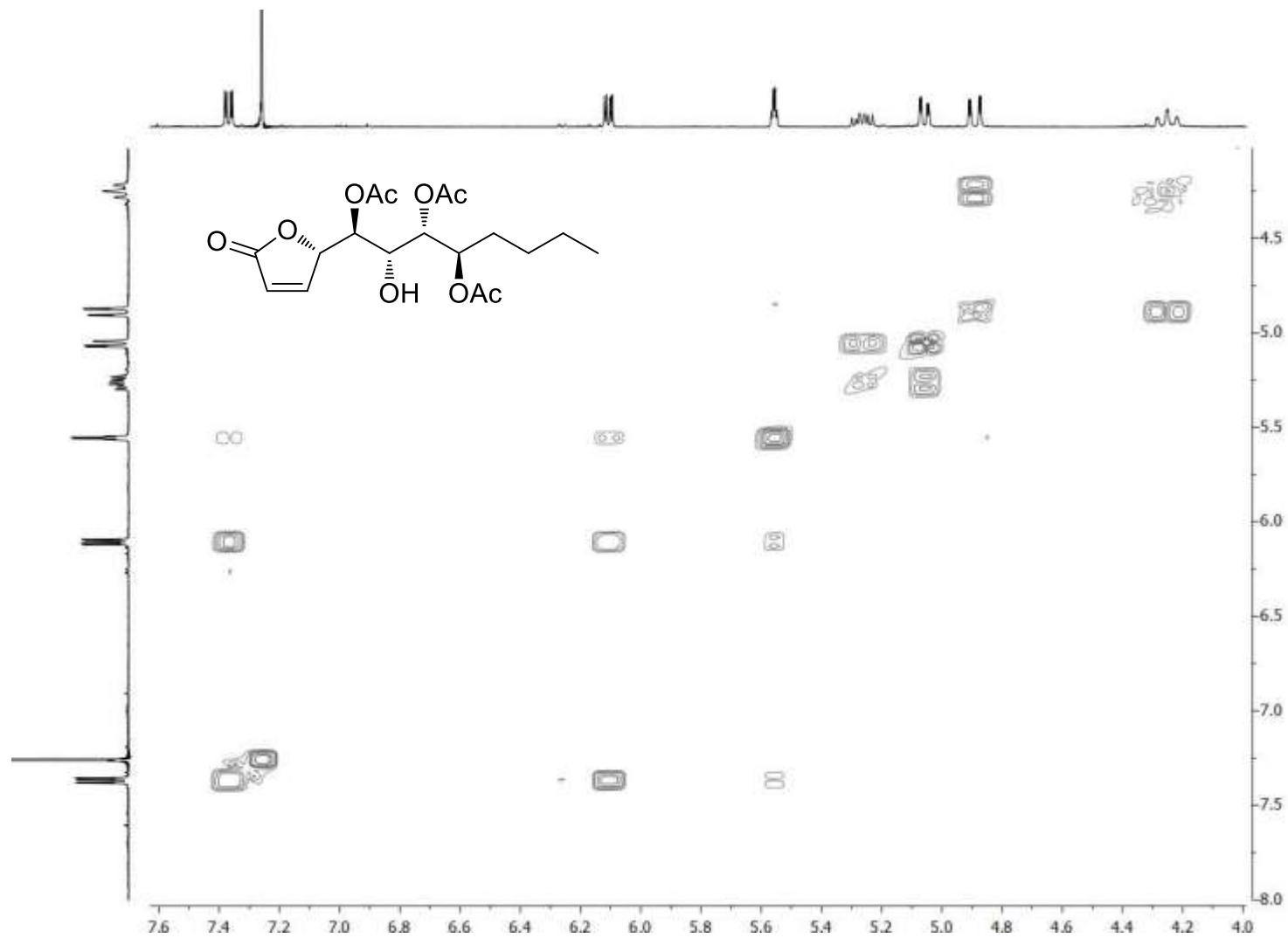
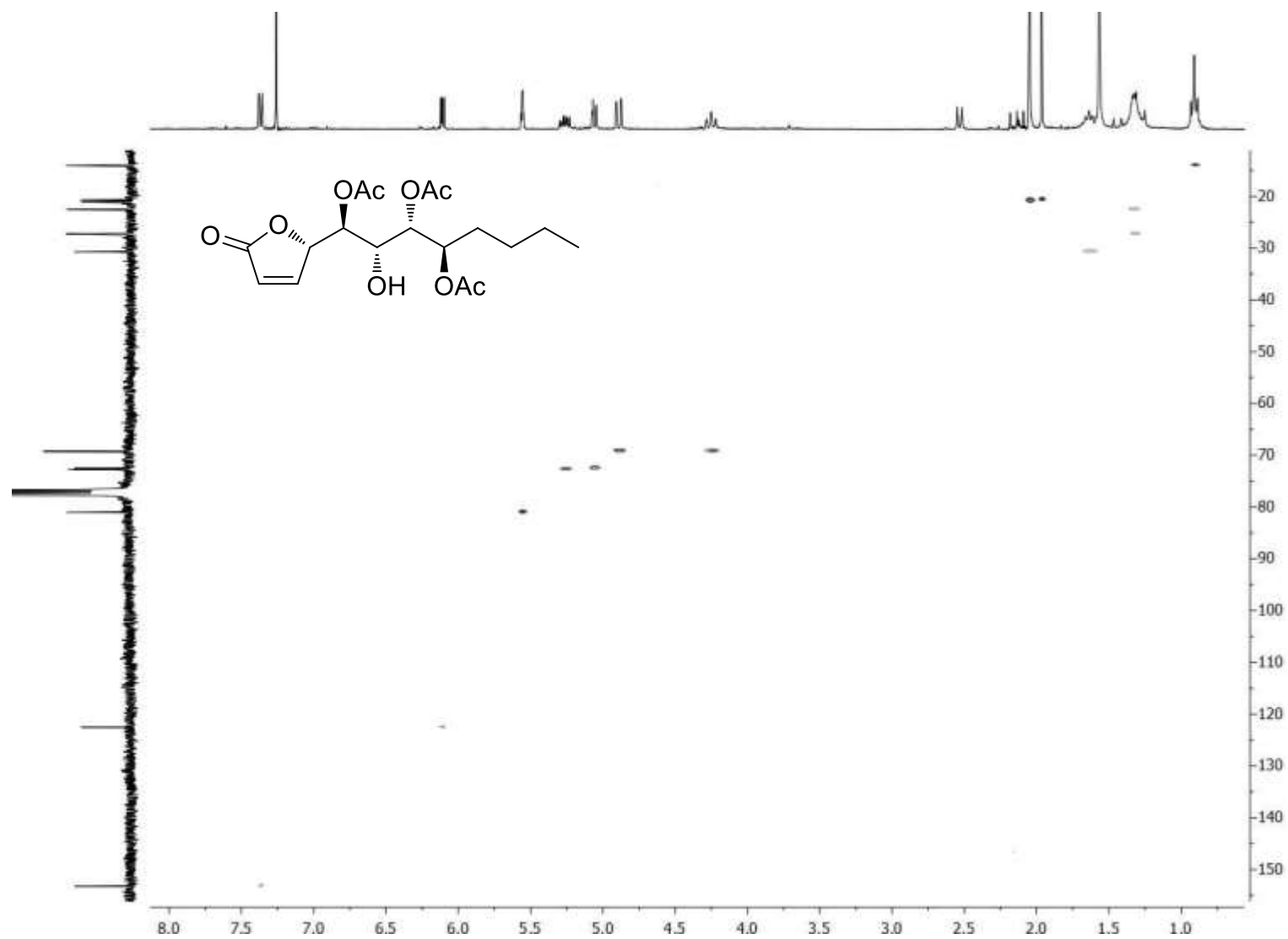


Figura S6. Espectro de <sup>13</sup>C RMN (100 MHz) de la montecólida D (2) en CDCl<sub>3</sub>.

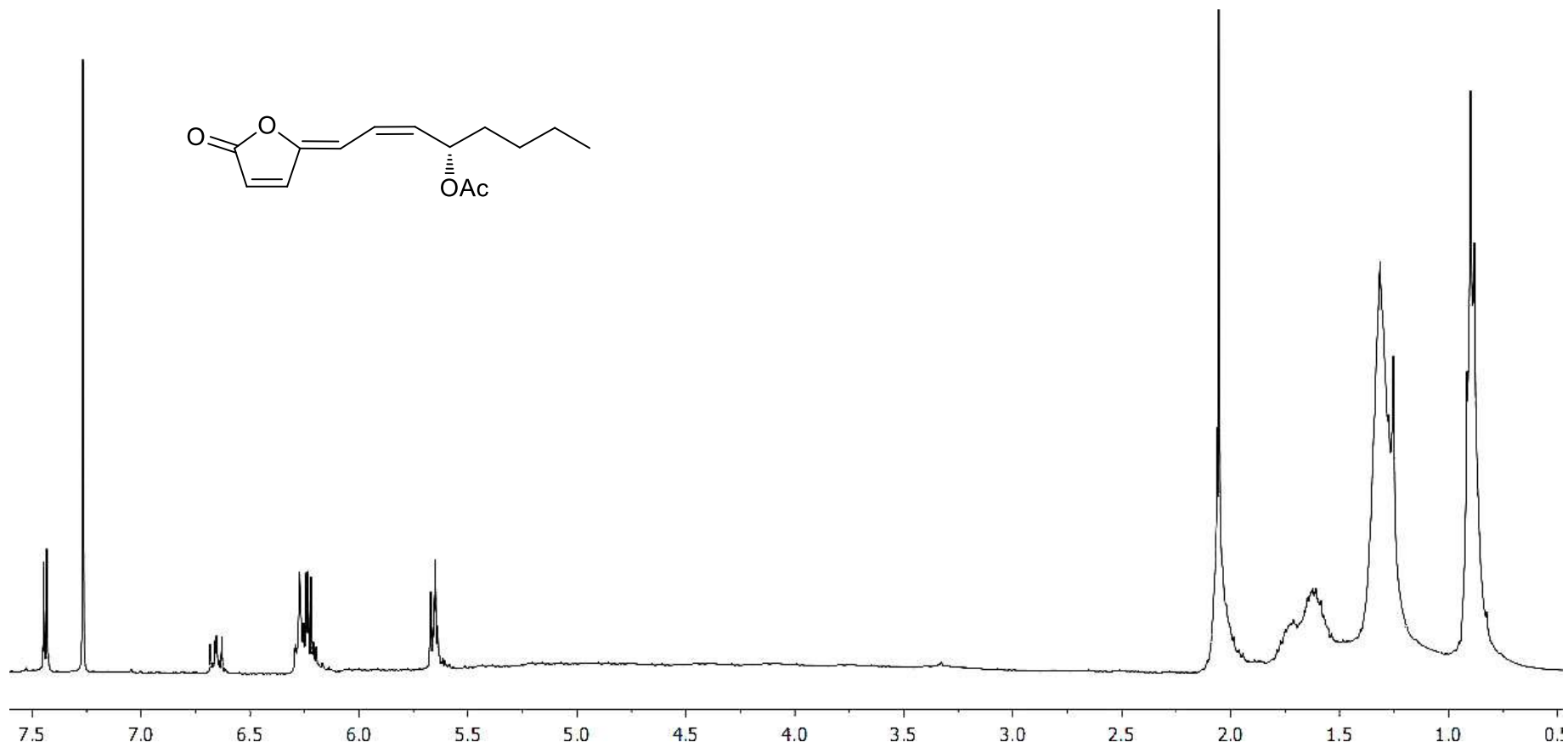


**Figura S7.** Espectro bidimensional <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY de la montecólida D (**2**) en CDCl<sub>3</sub>.

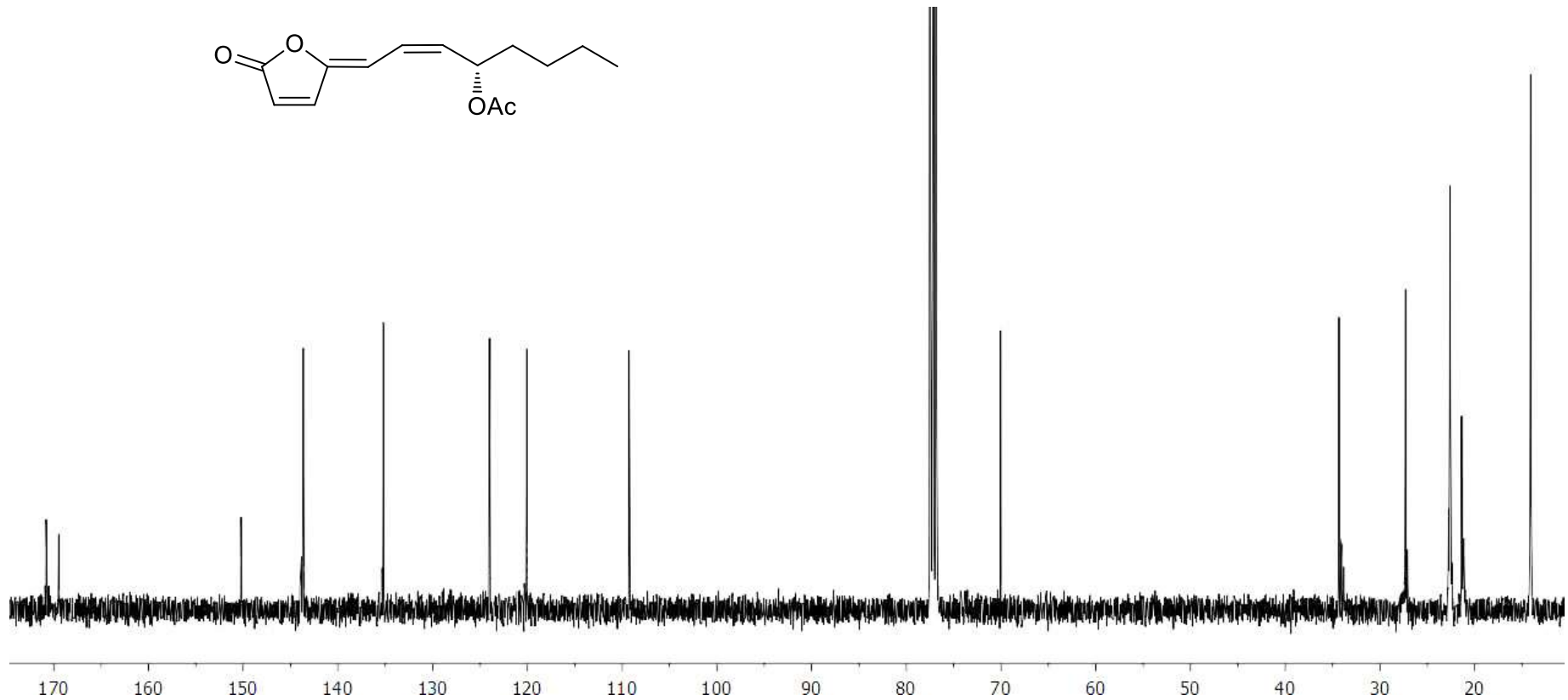
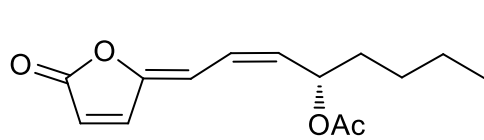




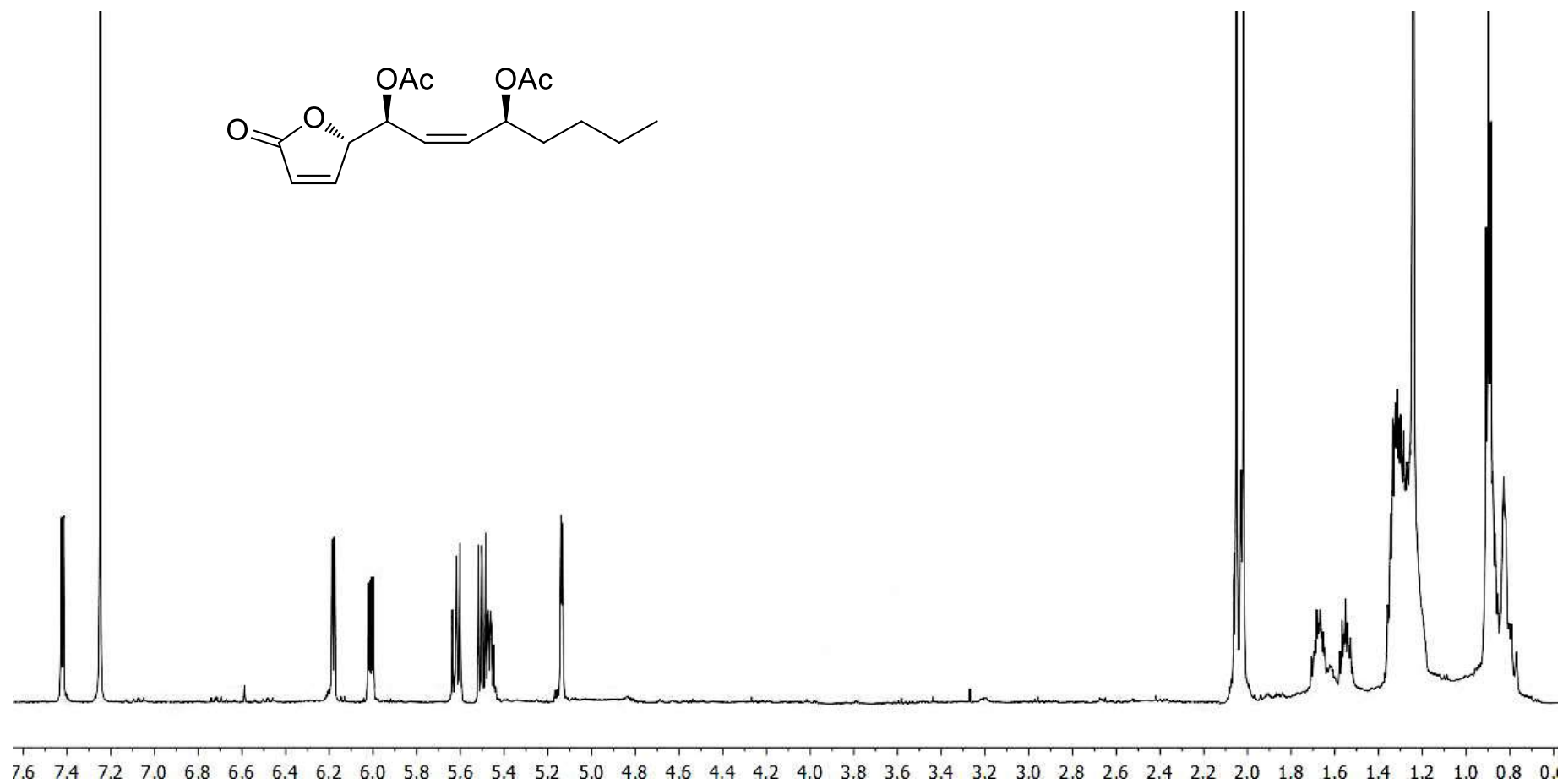
**Figura S8.** Espectro bidimensional  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC de la montecólida D (**2**) en  $\text{CDCl}_3$ .



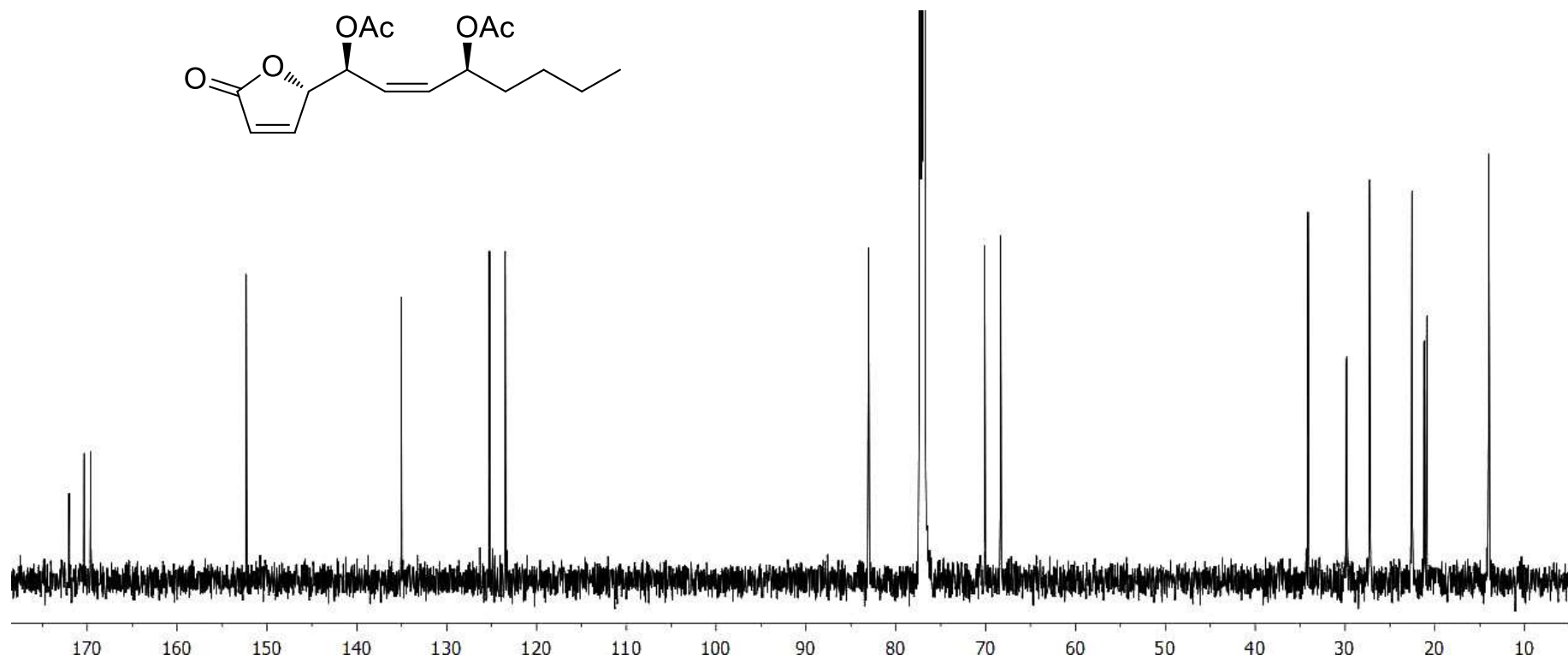
**Figura S9.** Espectro de <sup>1</sup>H RMN (400 MHz) de la pectinólida N (**3**) en CDCl<sub>3</sub>.



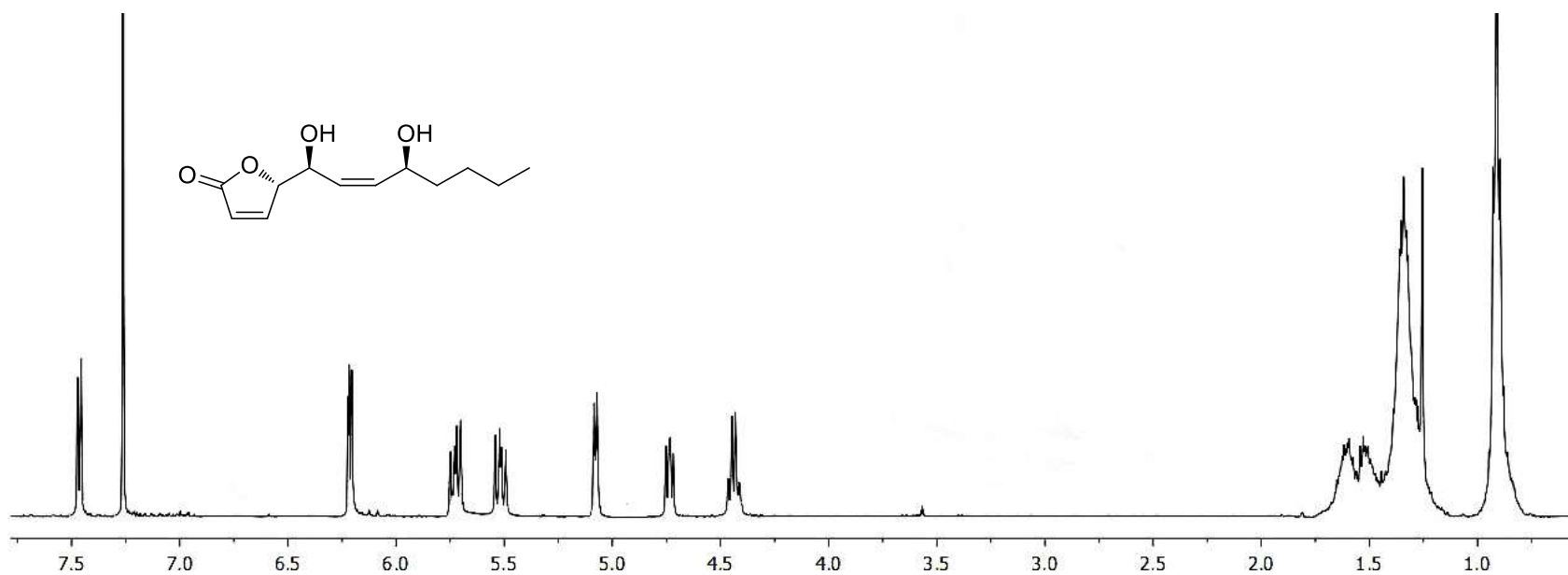
**Figura S10.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz) de la pectinólida N (**3**) en  $\text{CDCl}_3$ .



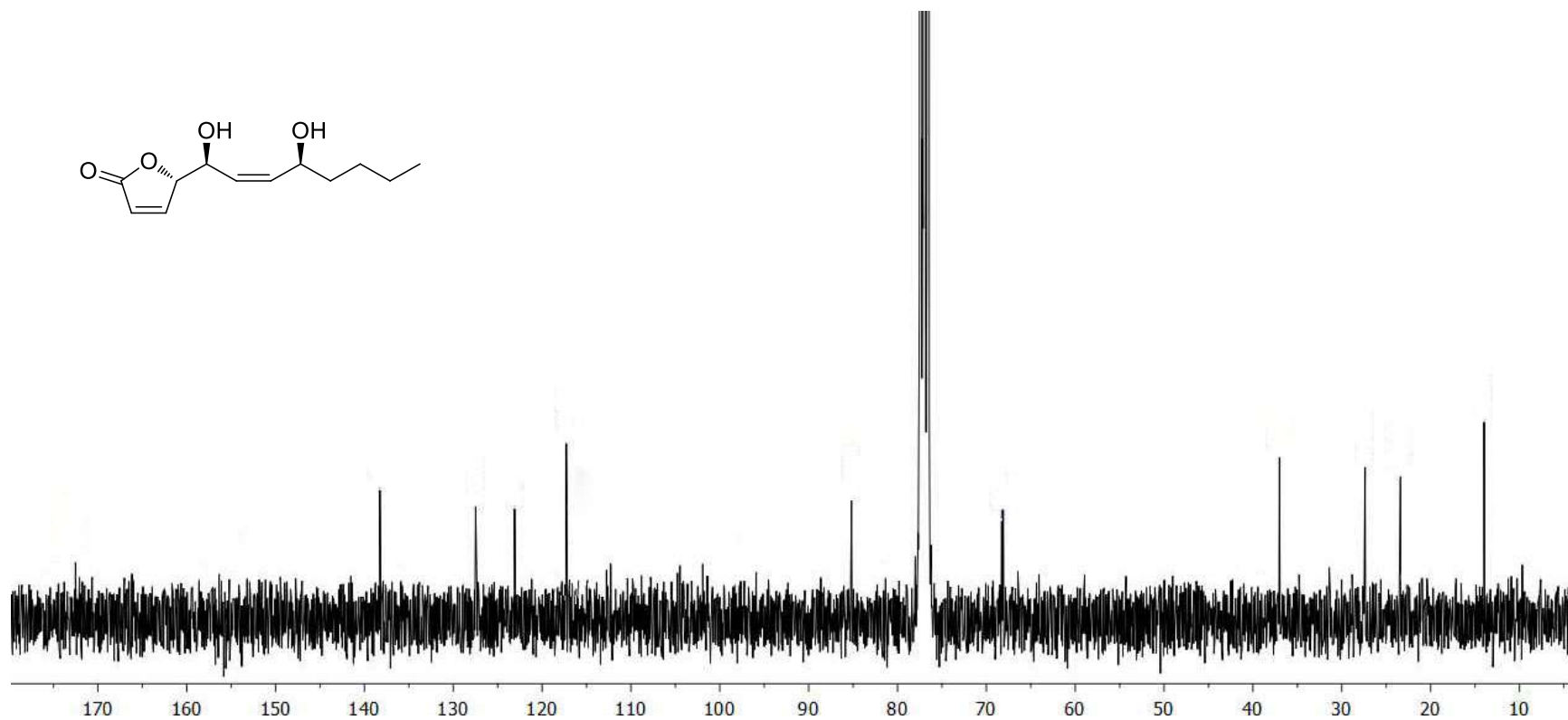
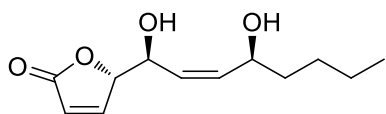
**Figura S11.** Espectro de  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz) de la pectinólida O (4) en  $\text{CDCl}_3$ .



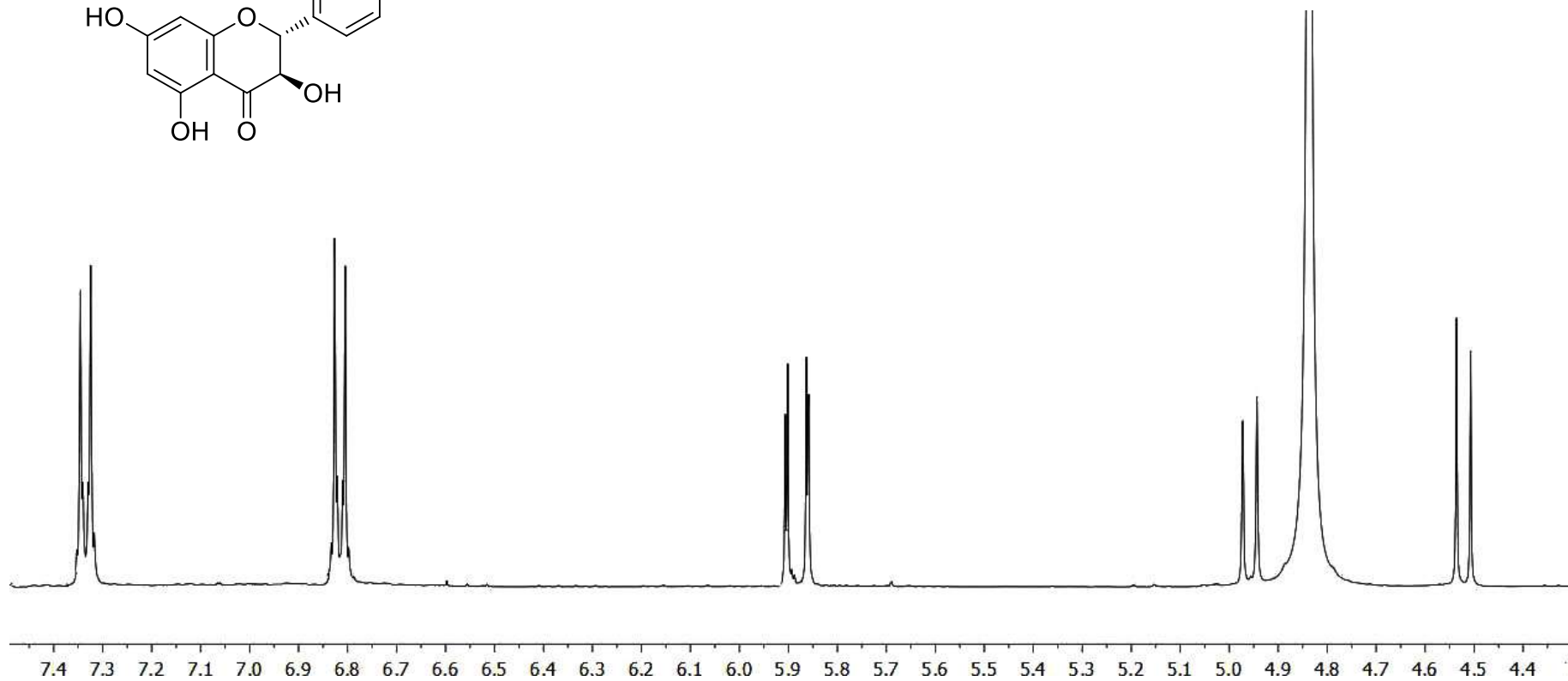
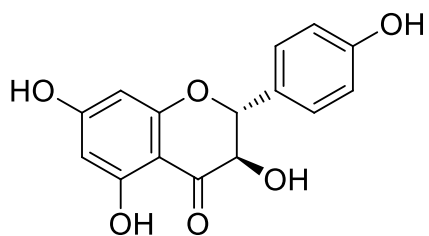
**Figura S12.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz) de la pectinólida O (4) en  $\text{CDCl}_3$ .



**Figura S13.** Espectro de <sup>1</sup>H RMN (400 MHz) de la pectinólida P (5) en CDCl<sub>3</sub>.

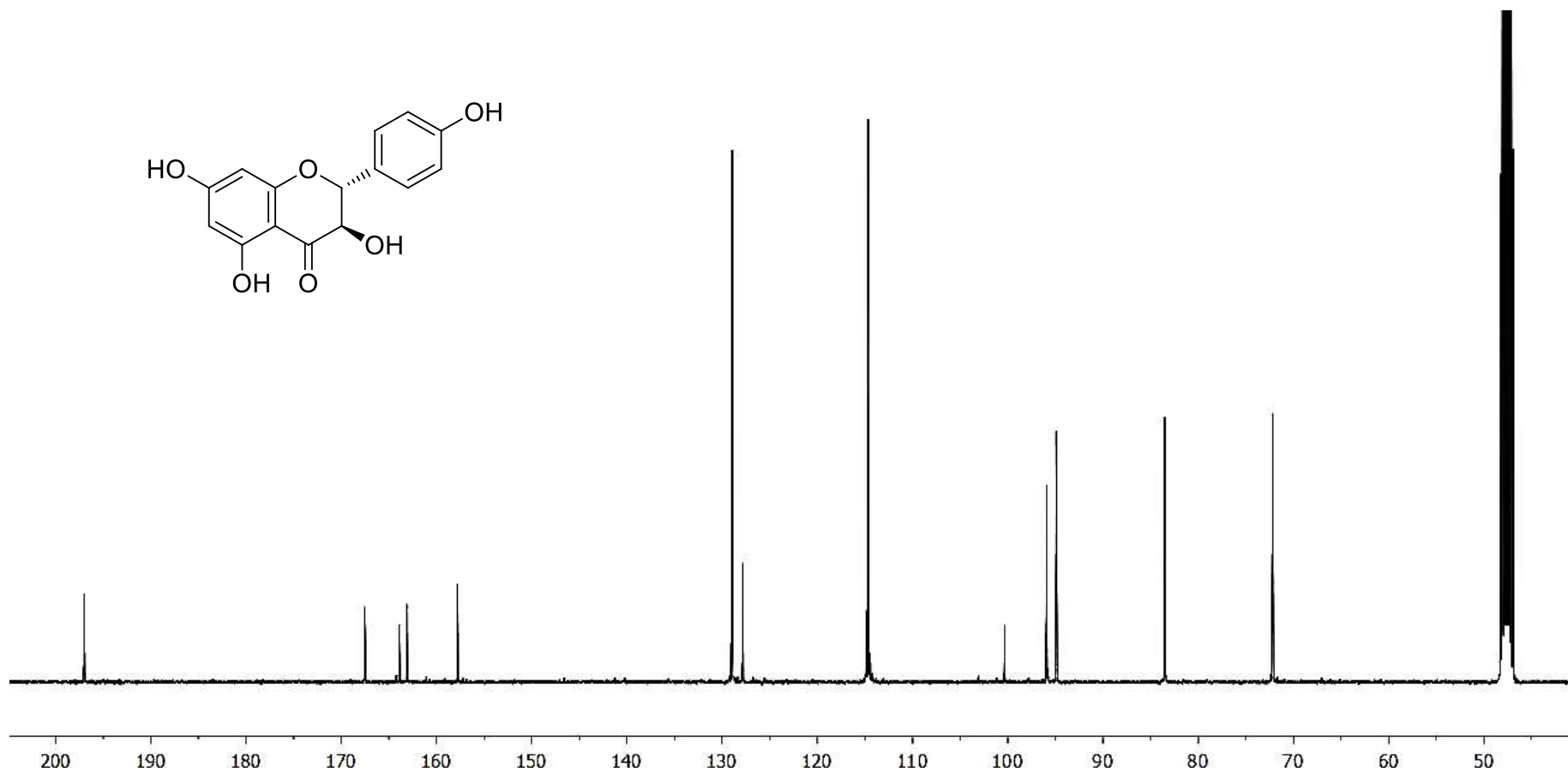


**Figura S14.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz) de la pectinólida P (5) en  $\text{CDCl}_3$ .

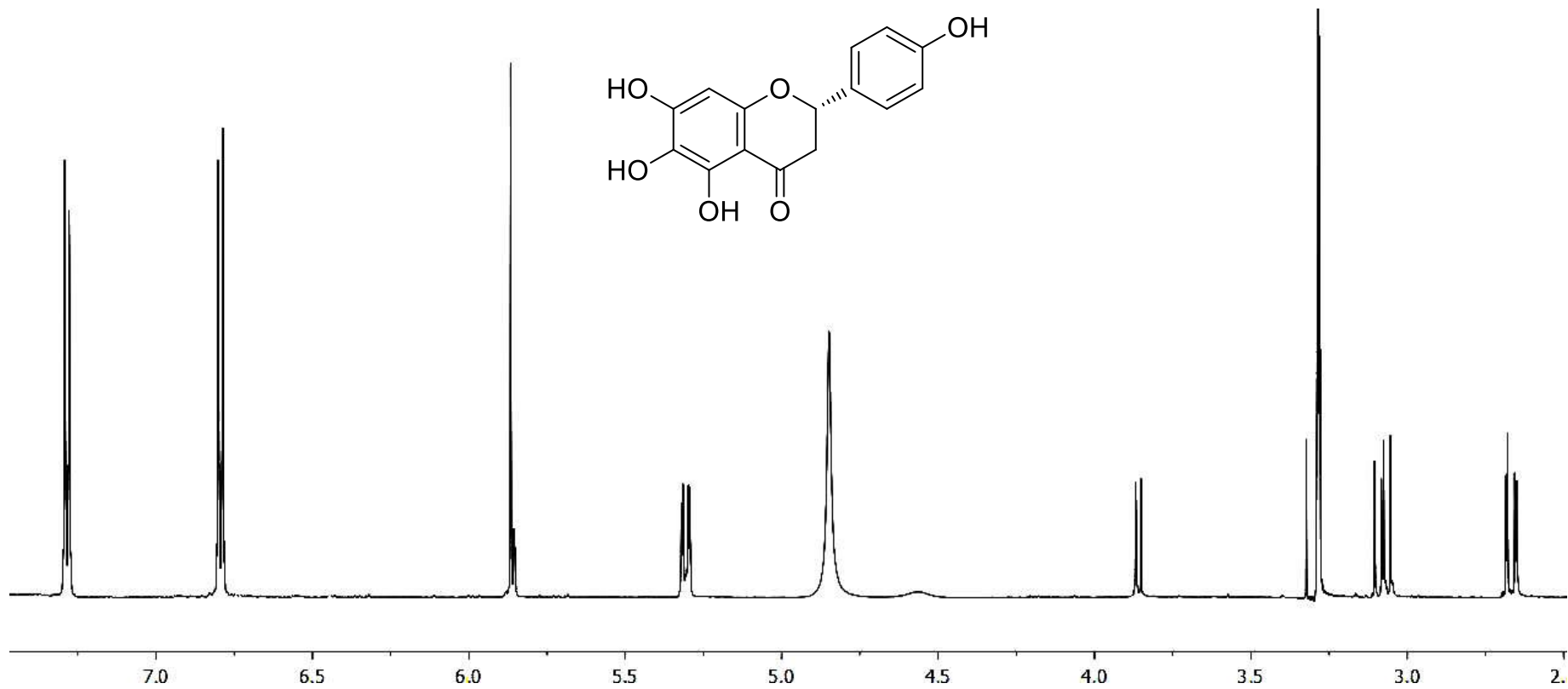


**Figura S15.** Espectro de <sup>1</sup>H RMN (400 MHz) del dihidrokaempferol (6) en CD<sub>3</sub>OD.

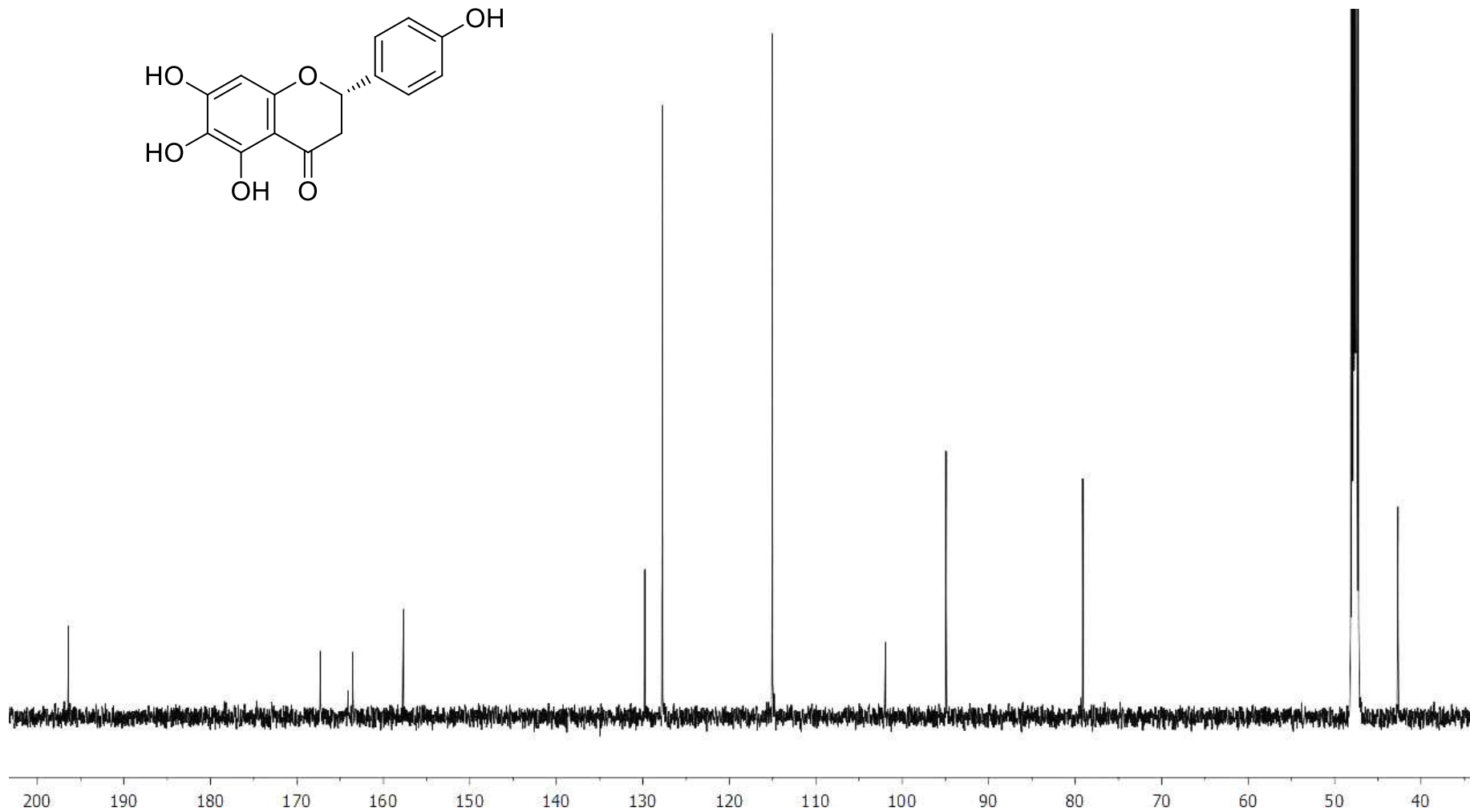
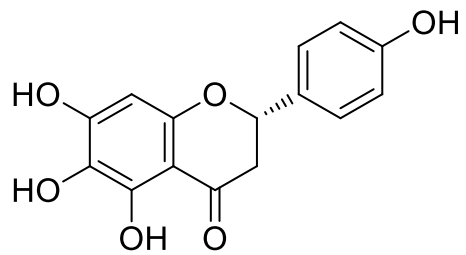




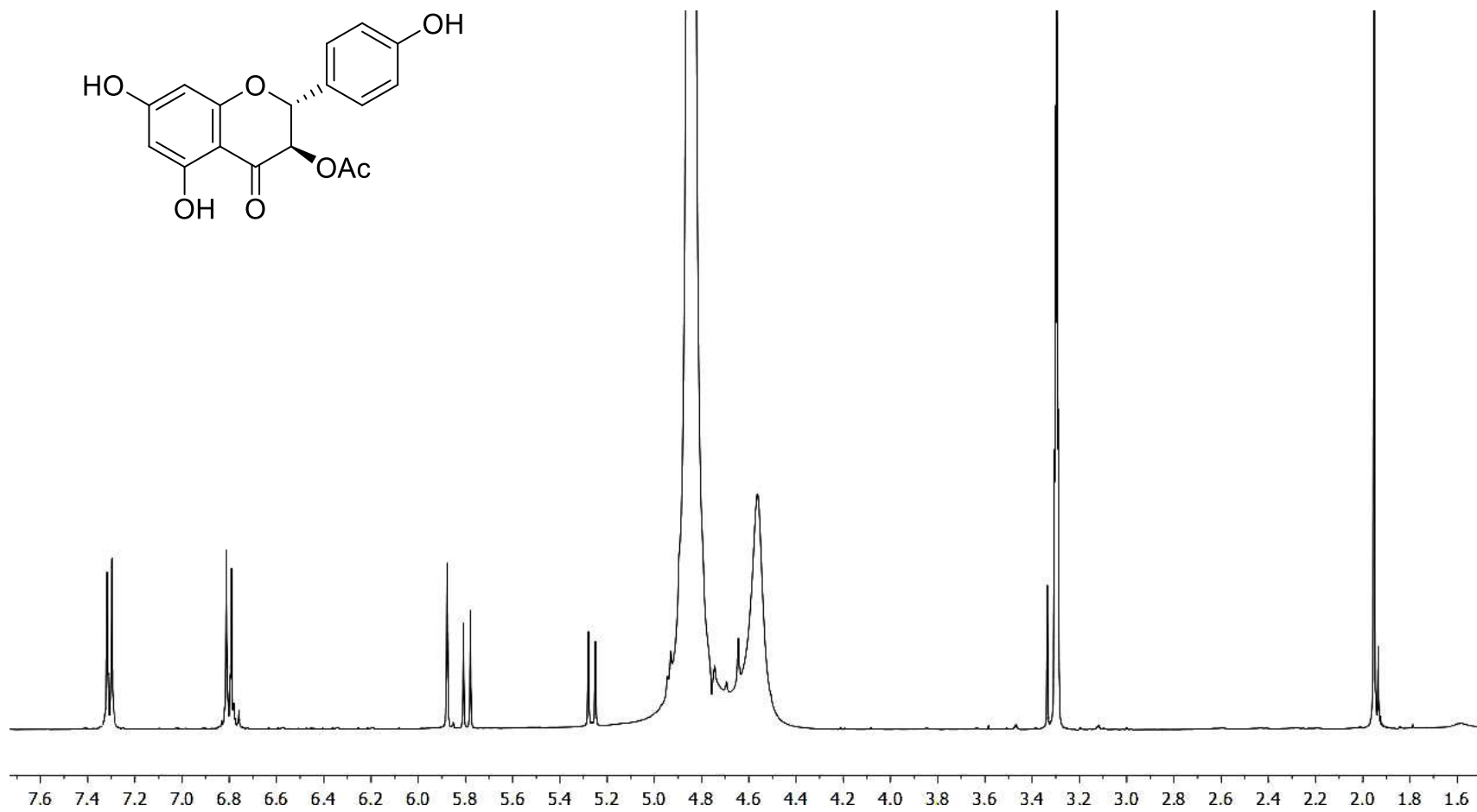
**Figura S16.** Espectro de <sup>13</sup>C RMN (100 MHz) del dihidrokaempferol (6) en CD<sub>3</sub>OD.



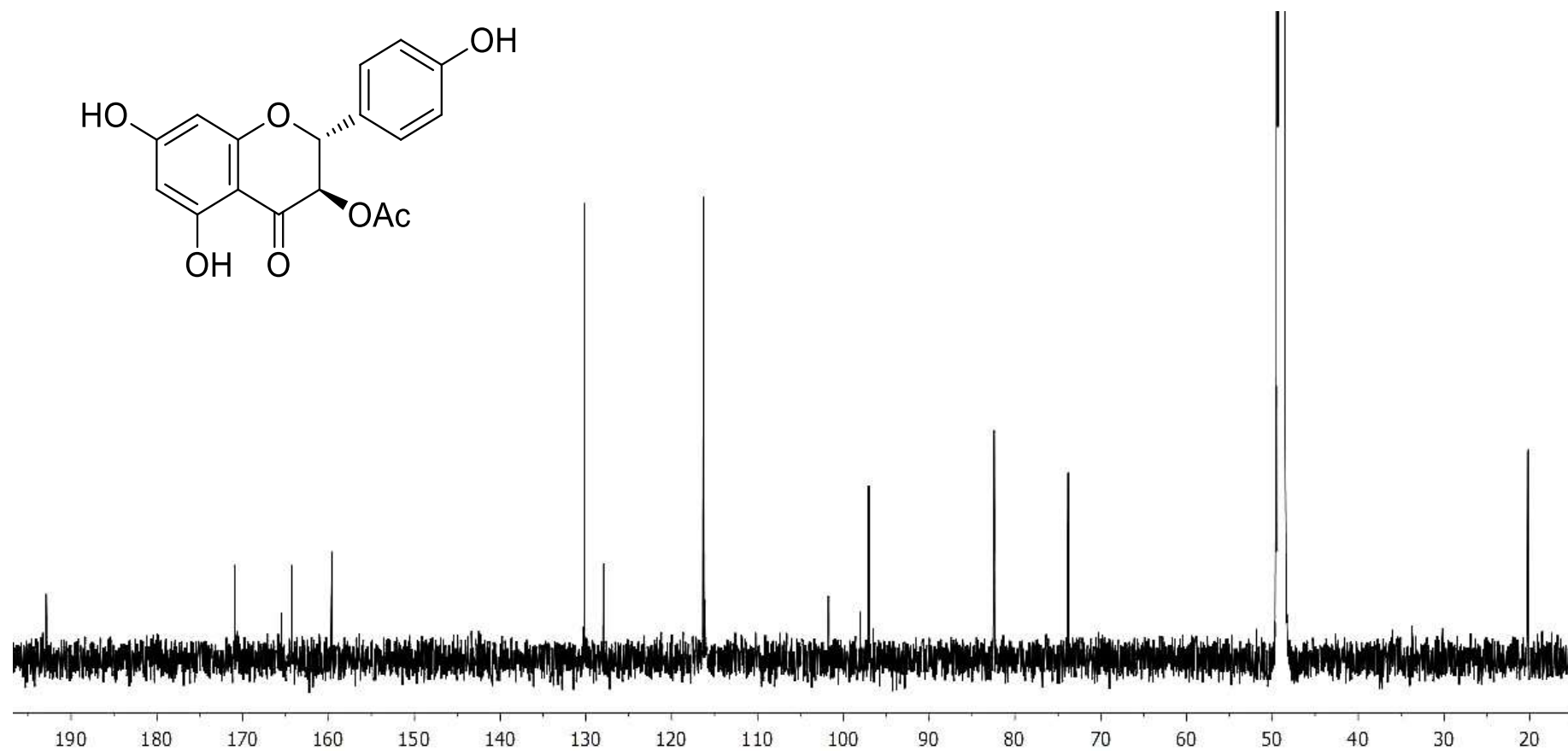
**Figura S17.** Espectro de  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz) de cartamidina (7) en  $\text{CD}_3\text{OD}$ .



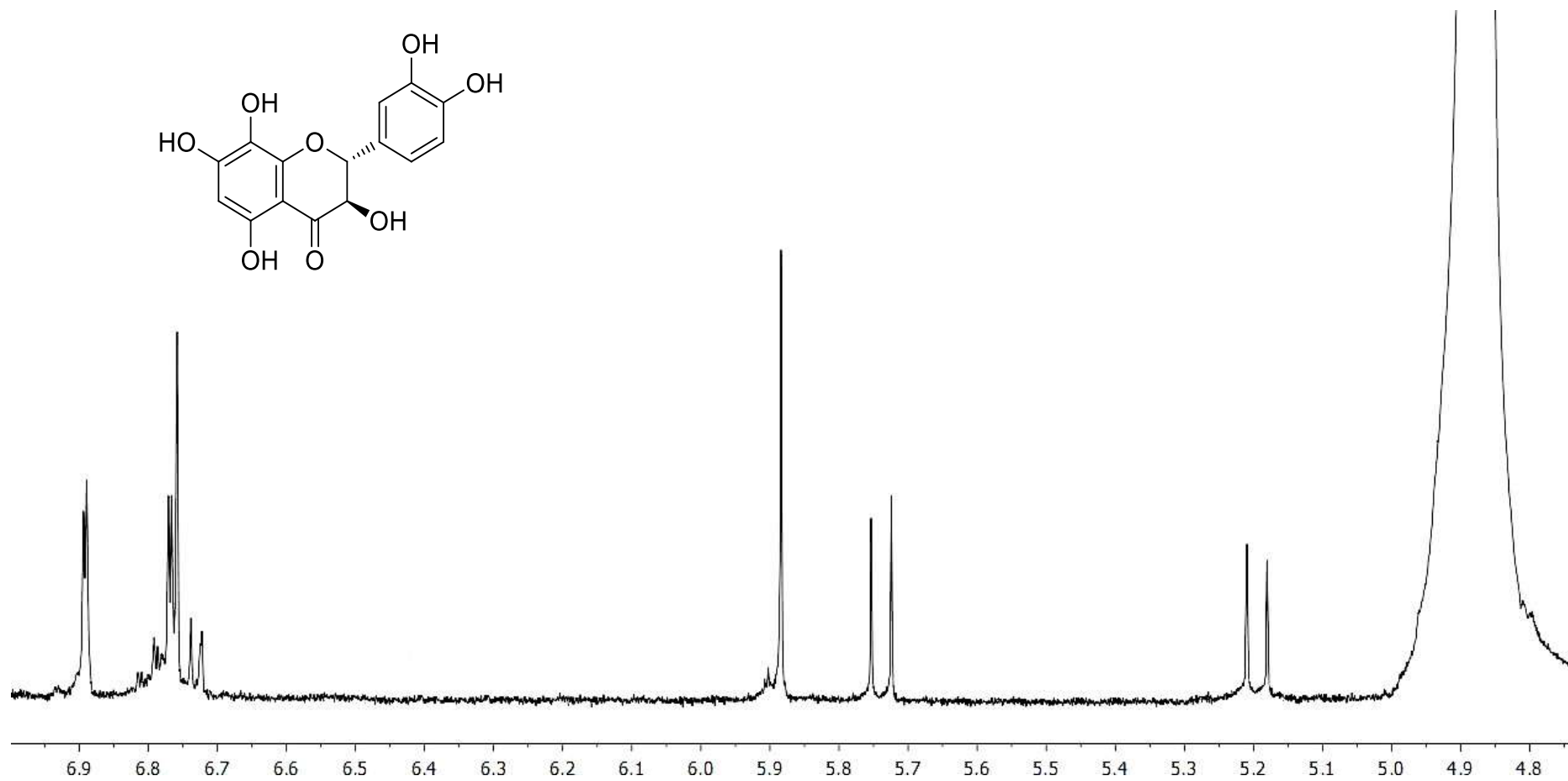
**Figura S18.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz) de la cartamidina (7) en  $\text{CD}_3\text{OD}$ .



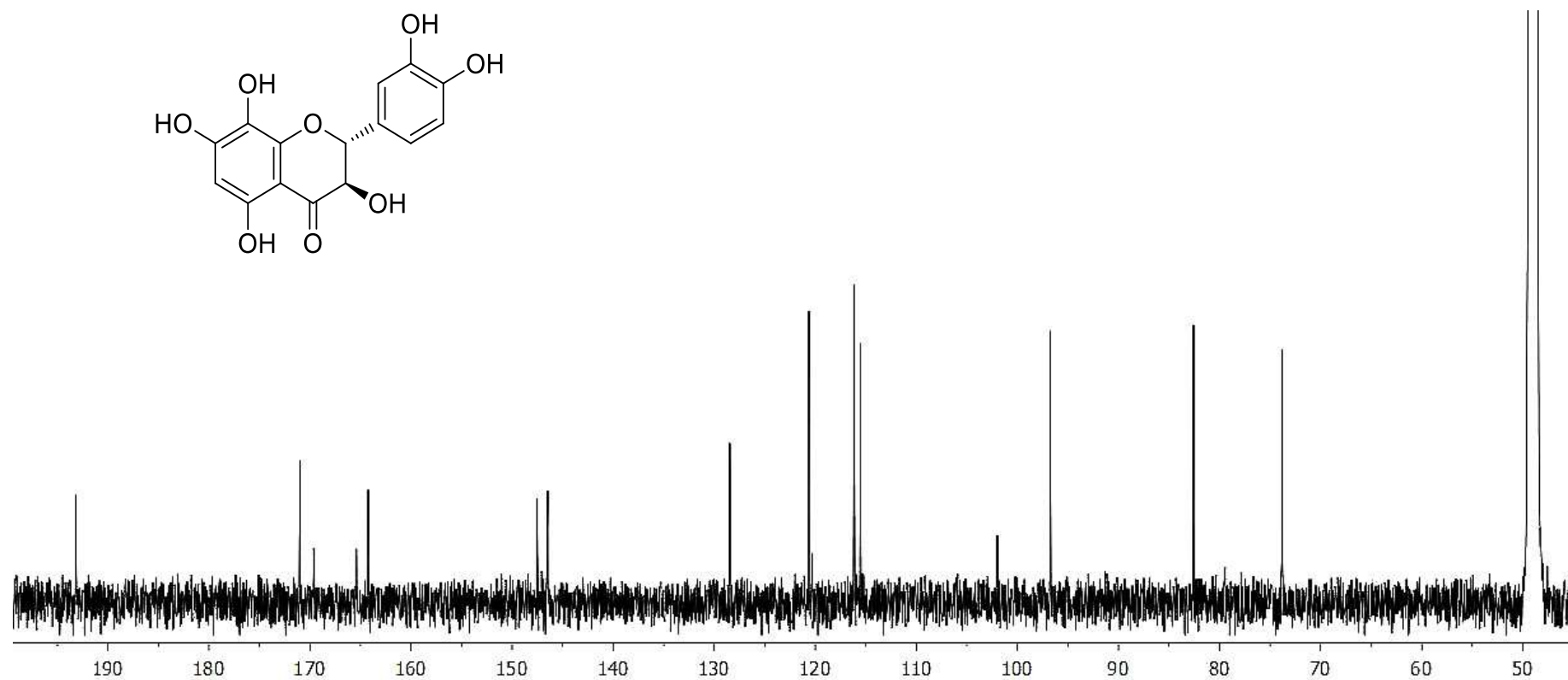
**Figura S19.** Espectro de <sup>1</sup>H RMN (400 MHz) de 2*R*,3*R*-acetoxi-aromadendrina (**9**) en CD<sub>3</sub>OD.



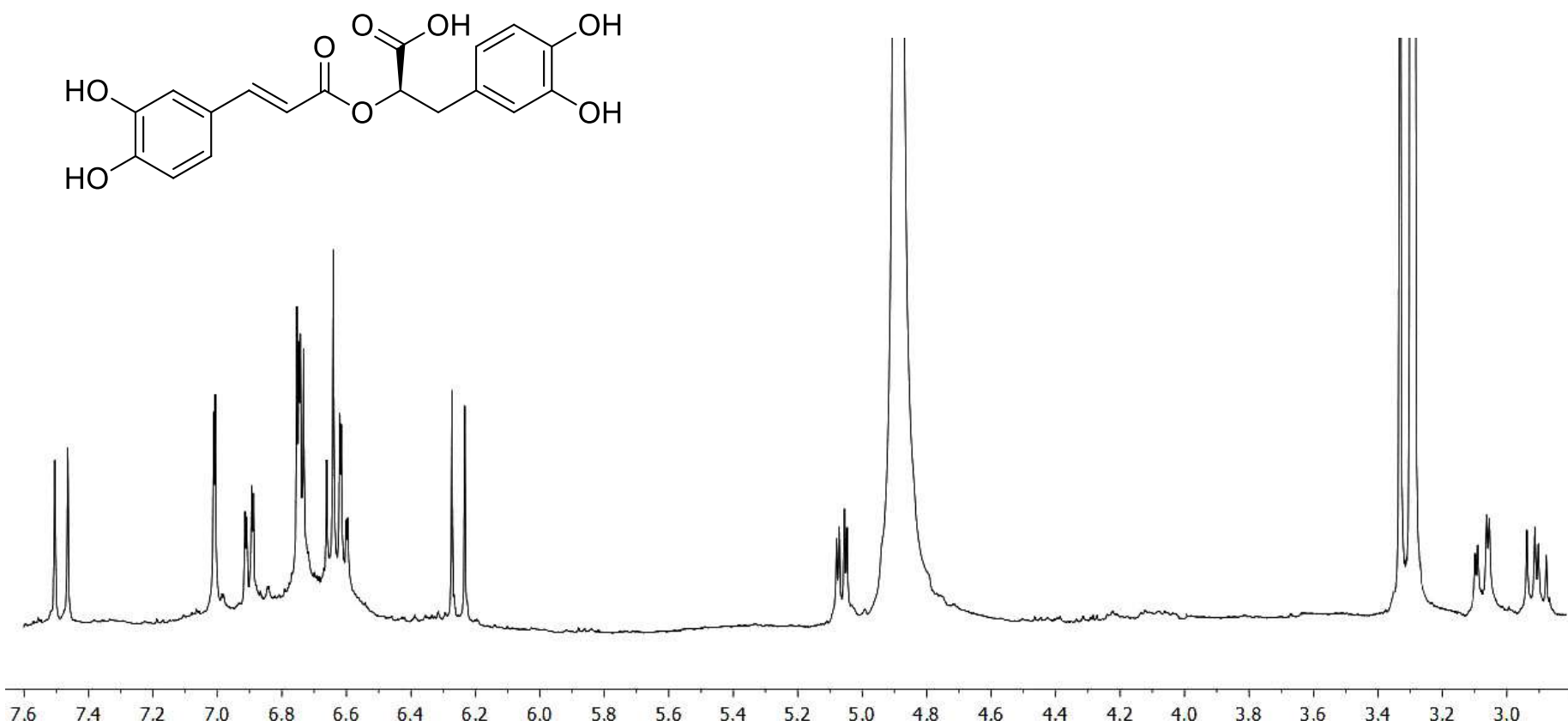
**Figura S20.** Espectro de <sup>13</sup>C RMN (100 MHz) de la 2R,3R-acetoxi-aromadendrina (9) en CD<sub>3</sub>OD.



**Figura S21.** Espectro de <sup>1</sup>H RMN (400 MHz) de 2*R*,3*R*-dihidrogospetina (**8**) en CD<sub>3</sub>OD.



**Figura S22.** Espectro de <sup>13</sup>C RMN (100 MHz) de la 2R,3R-dihidrogossipetina (**8**) en CD<sub>3</sub>OD.



**Figura S23.** Espectro de <sup>1</sup>H RMN (400 MHz) del ácido rosmarínico (10) en CD<sub>3</sub>OD.



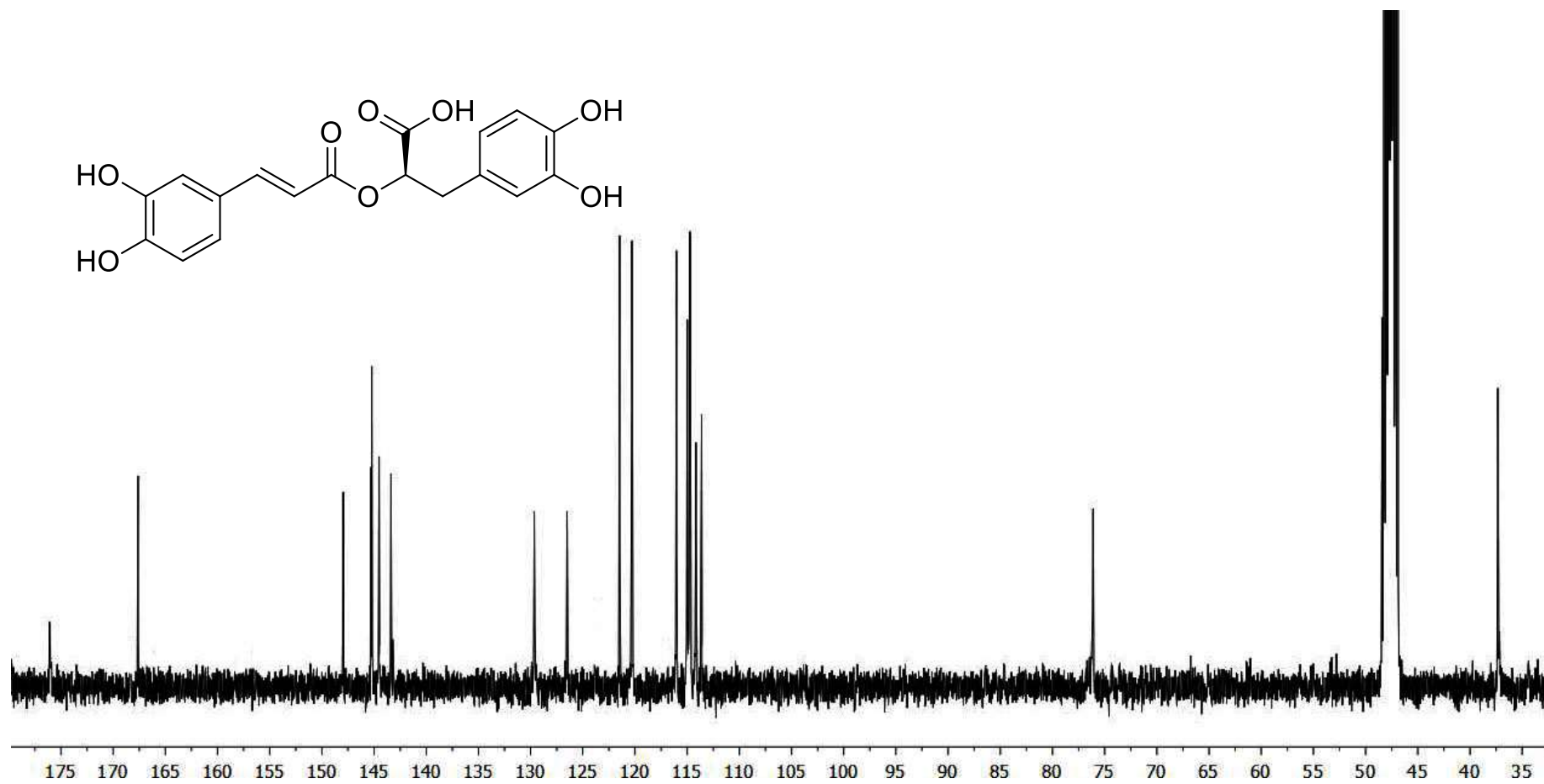
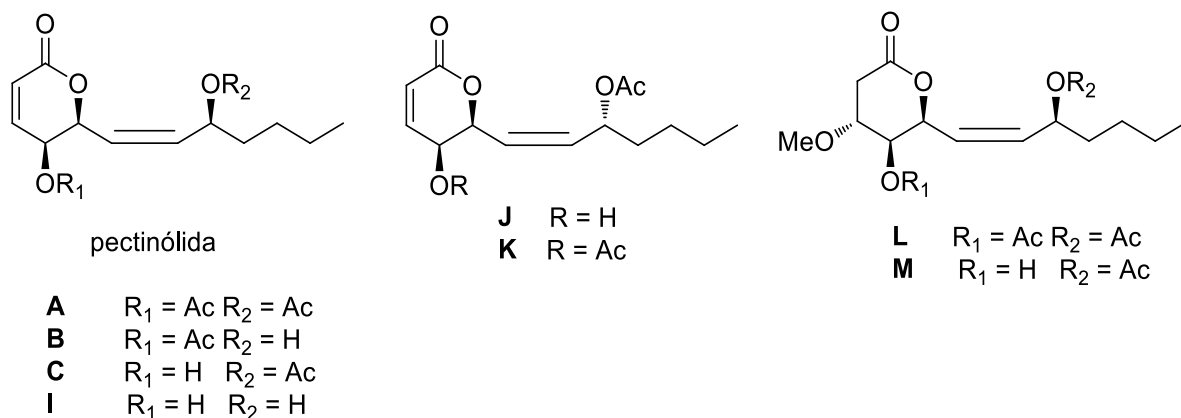


Figura S24. Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz) del ácido rosmarínico (10) en  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

## 7. Conclusiones

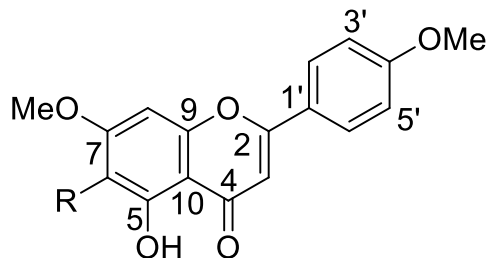
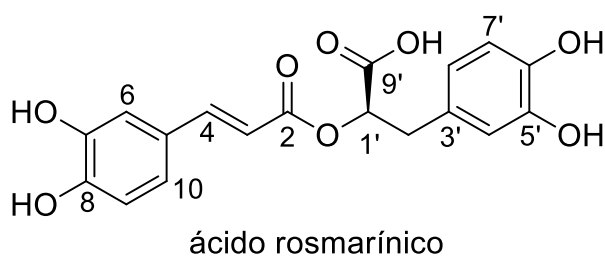
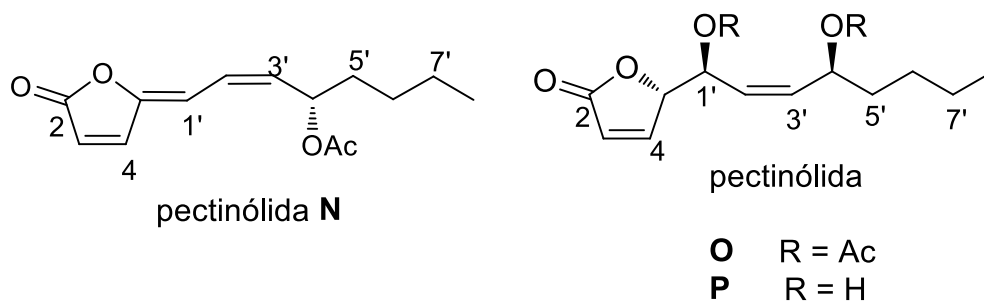
1.- A partir del estudio fitoquímico del extracto diclorometanólico de la especie *Hyptis pectinata* de una colecta mexicana se obtuvieron tres 5,6-dihidro-2*H*-piran-2-onas conocidas (pectinólidas A-C) junto con cinco nuevas  $\delta$ -lactonas (pectinólidas I-M), dos de las cuales, las pectinólidas K y J, resultaron epímeros de las pectinólidas A y C en el centro C-3' de la cadena lateral.



2.- La comparación de las constantes de acoplamiento vecinales experimentales ( $^3J_{\text{H,H}}$ ) y teóricas obtenidas a través de un protocolo de modelado molecular DFT-RMN a nivel B3LYP/DGDZVP permitió el establecimiento de la configuración absoluta de los centros quirales de la cadena heptenil de las 5,6-dihidro-2*H*-piran-2-onas entre pares de epímeros, en particular entre la pectinólida C y la pectinólida J. Las  $^3J_{\text{H,H}}$  por DFT fueron consistentes con las constantes experimentales, lo cual permitió la comparación entre epímeros utilizando el error cuadrático medio (RMSD) como análisis estadístico.

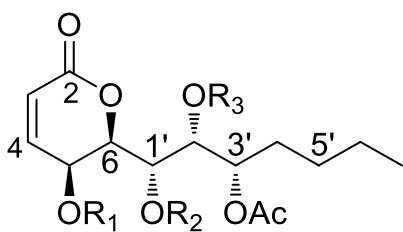
3.- La consideración del disolvente empleado experimentalmente en los cálculos teórico en solución (DFT PCM) reduce el nivel de error en los resultados obtenidos en fase gaseosa. La comparación entre constantes de acoplamiento vecinales en esta clase de moléculas pequeñas flexibles permite la determinación adecuada de la configuración absoluta que no se logra a través de los cálculos de los desplazamientos químicos de  $^1\text{H}$  RMN y  $^{13}\text{C}$  RMN.

4.- Se aislaron tres nuevas 5(2*H*)-furanonas (pectinólida N-P), un fenilpropanoide, el ácido rosmarínico, y dos flavonoides descritos previamente en la familia Lamiaceae. La butenólidas caracterizadas se encuentran biogénicamente relacionadas con las 5,6-dihidro-2*H*-piran-2-onas como se demostró mediante correlación química.

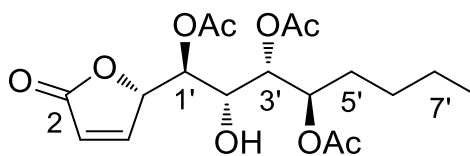


salvigenina                      R = OMe  
 5-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavona    R = H

5.- Del extracto dihidroetanólico de una colecta brasileña de *H. monticola* se aislaron tres nuevas 5,6-dihidro-2*H*-piran-2-onas (montecólida A-C), metabolitos relacionados biosintéticamente con las pectinólidas, junto con una nueva 5(2*H*)-furanona (montecólida D) y cuatro flavonoides, sustancias aromáticas ampliamente distribuidas en la familias pertenecientes al orden de las lamiales.

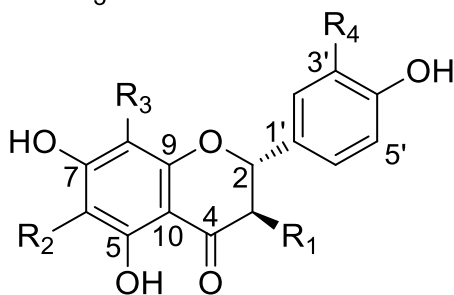


montecólida



montecólida **D**

- A**  $R_1 = \text{Ac}$   $R_2 = \text{Ac}$   $R_3 = \text{Ac}$   
**B**  $R_1 = \text{Ac}$   $R_2 = \text{H}$   $R_3 = \text{H}$   
**C**  $R_1 = \text{H}$   $R_2 = \text{H}$   $R_3 = \text{H}$



- dihidrokaempferol  $R_1 = \text{OH}$   $R_2 = \text{H}$   $R_3 = \text{H}$   $R_4 = \text{H}$   
 cartamidina  $R_1 = \text{H}$   $R_2 = \text{OH}$   $R_3 = \text{H}$   $R_4 = \text{H}$   
 3-acetoxi-aromadendrina  $R_1 = \text{OAc}$   $R_2 = \text{H}$   $R_3 = \text{H}$   $R_4 = \text{H}$   
 2,3-dihidrogosipetina  $R_1 = \text{OH}$   $R_2 = \text{H}$   $R_3 = \text{OH}$   $R_4 = \text{OH}$

6.- El empleo de diversas de técnicas cromatográficas permitió la purificación de los metabolitos presentes en los extractos, en particular la cromatografía de líquidos de alta resolución, la cual a partir de su modalidad de reciclaje de la muestra permitió la máxima resolución de los metabolitos en estudio.

7.- La combinación de correlaciones químicas, mediciones quirópticas, el uso de agentes derivatizantes como los ésteres de Mosher, en conjunto con el análisis por RMN, permitió la confirmación de la configuración absoluta de los nuevos metabolitos aislados.

8.- Las pectinólidas y montecólidas se relacionan estructuralmente como derivados de un ácido dodecanoico polifuncionalizado cuyo precursor correspondería a un hexacétido biosintetizado en el metabolismo del acetato-malonato.

9.- A través del estudio de la actividad citotóxica frente a tres diferentes líneas celulares (HeLa, MCF-7 y HCT-5) de los nuevos compuestos aislados se encontró que sólo las 5,6-dihidro-2*H*-piran-2-onas que conservaban su doble enlace en el anillo de  $\delta$ -lactona- $\alpha,\beta$ -insaturada presentaban la actividad biológica; los valores más significativos ( $IC_{50}$  0.5-0.8  $\mu$ M) fueron para la pectinólida K. El estudio de acoplamiento molecular indicó que las 5,6-dihidro-2*H*-piran-2-onas tienen una alta afinidad para el sitio de unión en la subunidad  $\alpha$ -tubulina de la pironetina, lo cual posiblemente contribuye al potencial citotóxico de estos compuestos.

10.- El género *Hyptis* constituye la fuente de 5,6-dihidro-2*H*-piran-2-onas y 5(2*H*)-furanonas de interés quimiosistemático debido a su distribución restringida en la familia de las labiadas (Lamiaceae).

## Publicaciones y presentaciones en congresos

Publicación:

DOI 10.1021/acs.jnatprod.8b00908

JOURNAL OF  
**NATURAL  
PRODUCTS**

Cite This: *J. Nat. Prod.* 2019, 82, 520–531

Article

pubs.acs.org/jnp

### Structure Elucidation, Conformation, and Configuration of Cytotoxic 6-Heptyl-5,6-dihydro-2H-pyran-2-ones from *Hyptis* Species and Their Molecular Docking to $\alpha$ -Tubulin

Lucero Martínez-Fructuoso,<sup>†</sup> Rogelio Pereda-Miranda,<sup>\*,†</sup> Daniel Rosas-Ramírez,<sup>†</sup>  
Mabel Fragoso-Serrano,<sup>†</sup> Carlos M. Cerda-García-Rojas,<sup>‡</sup> Aline Soares da Silva,<sup>§</sup>  
Gilda Guimarães Leitão,<sup>⊥</sup> and Suzana Guimarães Leitão<sup>§</sup>

<sup>†</sup>Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Mexico City 04510, Mexico

<sup>‡</sup>Departamento de Química, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, A. P. 14-740, Mexico City 07000, Mexico

<sup>§</sup>Faculdade de Farmacia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, CCS, Bloco A, Ilha do Fundão, 21941-902, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>⊥</sup>Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, CCS, Bloco H, Ilha do Fundão, 21941-590, Rio de Janeiro, Brazil

#### Participación en congresos internacionales:

Phytochemical Society of Europe. Young Scientists' Meeting on Advances in Phytochemical Analysis (Trends in Natural Products Research). Liverpool, Reino Unido; Julio 2-5, 2018. Con el tema: "Conformational and configurational analysis by DFT calculations of cytotoxic 6-heptyl-5,6-dihydro-2H-pyran-2-ones from *Hyptis* species and their molecular docking to  $\alpha$ -tubulin".