



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-
BIOLÓGICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**Análisis configuracional y conformacional de
epoxitimoles por Dicroísmo Circular Electrónico**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

PRESENTA:

Q.F.B ANTONIO DE JESUS OLIVEROS ORTIZ

DIRECTORES:

**D.Q. MARIO ARMANDO GÓMEZ HURTADO
D.C. ROSA ELVA NORMA DEL RÍO TORRES**

Morelia, Michoacán

Mayo 2021

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Química de Productos Naturales del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo bajo la dirección del D.Q. Mario Armando Gómez Hurtado y del D.C. Rosa Elva Norma del Río Torres, con la beca de maestría 956977 otorgada por el Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| RESUMEN | v |
| ABSTRACT..... | vi |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2. ANTECEDENTES | 3 |
| 2.1 Configuración Absoluta | 3 |
| 2.1.1 Cristalografía de Rayos X de Monocristal | 4 |
| 2.1.2 Resonancia Magnética Nuclear | 5 |
| 2.1.3 Rotación Óptica y Dispersión Óptica Rotatoria | 5 |
| 2.1.4 Dicroísmo Circular | 6 |
| 2.1.4.1 Dicroísmo Circular Vibracional | 6 |
| 2.1.4.2 Dicroísmo Circular Electrónico..... | 7 |
| 2.2 Cálculos de Espectros DCE..... | 8 |
| 2.3 Timol | 9 |
| 2.4 Estudios de Configuración Absoluta Derivados de Timol..... | 10 |
| 3. JUSTIFICACIÓN | 15 |
| 4. OBJETIVOS | 16 |
| Objetivo General | 16 |
| Objetivos Específicos..... | 16 |
| 5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS | 17 |
| 6. CONCLUSIONES | 47 |
| 7. PARTE EXPERIMENTAL | 48 |
| 7.1 Generalidades | 48 |
| 7.2 Determinación de Proporciones Escalémicas Utilizando (S)-BINOL | 48 |
| 7.3 Mediciones de Dicroísmo Circular Electrónico | 48 |
| 7.4 Materia Vegetal..... | 49 |
| 7.5 Extracción y Aislamiento | 49 |
| 7.6 Metodología General de Cálculo de DCE..... | 53 |
| 8. REFERENCIAS..... | 54 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Timol y derivado epoxitímolo..... | 1 |
| Figura 2. Penicilina V | 3 |
| Figura 3. Ejemplo de espectro de DCE para enantiómeros | 8 |
| Figura 4. Estructura del compuesto 3 aislado de <i>Ageratina cylindrica</i> | 10 |
| Figura 5. Derivados de timol obtenidos por síntesis enantioselectiva..... | 11 |
| Figura 6. Estructura del (8 <i>R</i>)-hidroxil-9-angeloiloxitímolo | 11 |
| Figura 7. Estructura de compuesto 7 | 12 |
| Figura 8. Epoxitimoles aislados de <i>Ageratina glabrata</i> | 12 |
| Figura 9. Derivado de timol aislado de <i>Eupatorium chinense</i> | 13 |
| Figura 10. (<i>S</i>)-areolal | 13 |
| Figura 11. Espectro de RMN de ¹ H a 400 MHz en CDCl ₃ del extracto de CH ₂ Cl ₂ de hojas de <i>A. glabrata</i> | 17 |
| Figura 12. Espectro de RMN de ¹ H a 400 MHz en CDCl ₃ de isobutirato de (+)-(8 <i>S</i>)-10-benzoiloxi-6-hidroxi-8,9-epoxitímolo (7)..... | 19 |
| Figura 13. Espectro de RMN de ¹³ C a 100 MHz en CDCl ₃ isobutirato de (+)-(8 <i>S</i>)-10-benzoiloxi-6-hidroxi-8,9-epoxitímolo (7)..... | 19 |
| Figura 14. Espectro de RMN de ¹ H a 400 MHz en CDCl ₃ del extracto hexánico de raíz de <i>P. areolare</i> | 20 |
| Figura 15. Espectro de RMN de ¹ H a 400 MHz en CDCl ₃ de areolal (13) | 22 |
| Figura 16. Espectro de RMN de ¹³ C a 100 MHz en CDCl ₃ de areolal (13) | 22 |
| Figura 17. Comparación de espectros de RMN de ¹ H de a) 7 y c) 13 con su variante RMN de ¹ H-BINOL b) 7 y d) 13 para la determinación de la pureza enantiomérica | 23 |
| Figura 18. Espectro de DCE (trazo superior) y de UV (trazo inferior) del epoxitímolo 7 | 25 |
| Figura 19. Espectro de DCE (trazo superior) y de UV (trazo inferior) del epoxitímolo 13 | 25 |
| Figura 20. Espectro de RMN de ¹ H a 300 MHz en CDCl ₃ de isobutirato de 10-cinamoiloxi-8,9-epoxitímolo (14) | 26 |

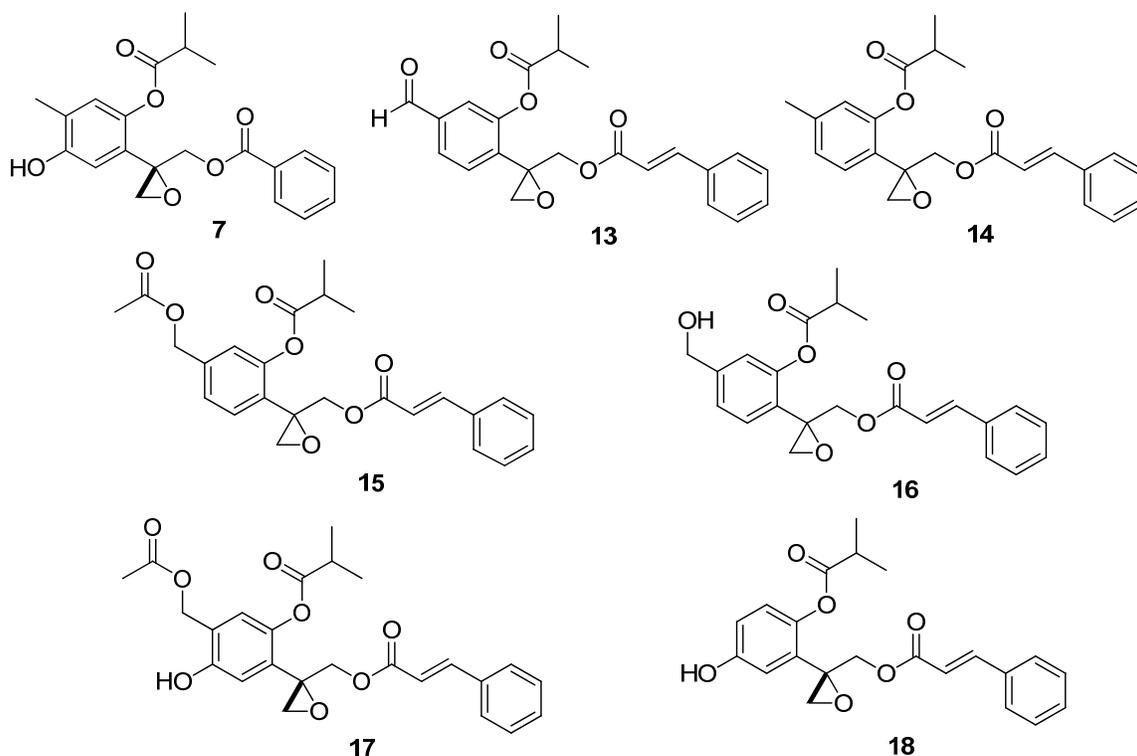
| | |
|---|----|
| Figura 21. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 del extracto de CH_2Cl_2 de flores de <i>P. areolare</i> | 27 |
| Figura 22. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz en CDCl_3 de isobutirato de 7-acetoxi-10-cinamoiloxi-8,9-epoxitimilo (15)..... | 28 |
| Figura 23. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz en CDCl_3 de isobutirato de 10-cinamoiloxi-7-hidroxi-8,9-epoxitimilo (16)..... | 29 |
| Figura 24. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz en CDCl_3 de isobutirato de 7-acetoxi-10-cinamoiloxi-6-hidroxi-8,9-epoxitimilo (17)..... | 31 |
| Figura 25. Espectro de RMN de ^{13}C a 75.4 MHz en CDCl_3 de isobutirato de 7-acetoxi-10-cinamoiloxi-6-hidroxi-8,9-epoxitimilo (17)..... | 31 |
| Figura 26. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz en CDCl_3 de isobutirato de 10-cinamoiloxi-8,9-epoxi-6-hidroxi-7-nortimilo (18)..... | 33 |
| Figura 27. Espectro de RMN de ^{13}C a 75.4 MHz en CDCl_3 de isobutirato de 10-cinamoiloxi-8,9-epoxi-6-hidroxi-7-nortimilo (18)..... | 33 |
| Figura 28. Comparación de espectros de RMN de ^1H de a) 14 , c) 15 , e) 16 , g) 17 , i) 18 con su variante RMN de ^1H -BINOL b) 14 , d) 15 , f) 16 , h) 17 , j) 18 para la determinación de la pureza enantiomérica..... | 34 |
| Figura 29. Comparación de espectros de DCE (trazos superiores) y de UV (trazos inferiores) del epoxitimoles 13-18 | 36 |
| Figura 30. Confórmeros de menor energía de 7 representando el 64% de la población conformacional..... | 37 |
| Figura 31. Comparación de espectro experimental y espectros teóricos de DCE de 7 | 40 |
| Figura 32. Comparación de espectro experimental de 7 y espectros teóricos de DCE calculados con el funcional CAM-B3LYP..... | 40 |
| Figura 33. Confórmeros de menor energía de 14 representando el 55% de la población conformacional..... | 42 |
| Figura 34. Comparación espectro experimental y calculado de 14 | 43 |
| Figura 35. Estructura de 14 y su modelo truncado..... | 44 |
| Figura 36. Confórmeros de menor energía de 19 representando el 64% de la población conformacional..... | 44 |
| Figura 37. Comparación de espectros experimentales, calculados compuesto 14 y estructura truncada 19 | 46 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Principales transiciones electrónicas observadas en espectros de DCE de 13-18 | 35 |
| Tabla 2. Absorción máxima observada en espectros de UV de 13-18 | 35 |
| Tabla 3. Análisis termoquímico de isobutirato de (+)-(8 <i>S</i>)-10-benzoiloxi-6-hidroxi-8,9-epoxitimilo (7) a nivel PBE/DGDZVP. | 38 |
| Tabla 4. Población conformacional en mecánica molecular compuestos 13-18 | 41 |
| Tabla 5. Análisis termoquímico de isobutirato de (8 <i>S</i>)-10-cinamoiloxi-8,9-epoxitimilo (14) a nivel PBE/DGDZVP | 42 |
| Tabla 6. Análisis termoquímico de 19 a nivel PBE/DGDZVP | 45 |

RESUMEN

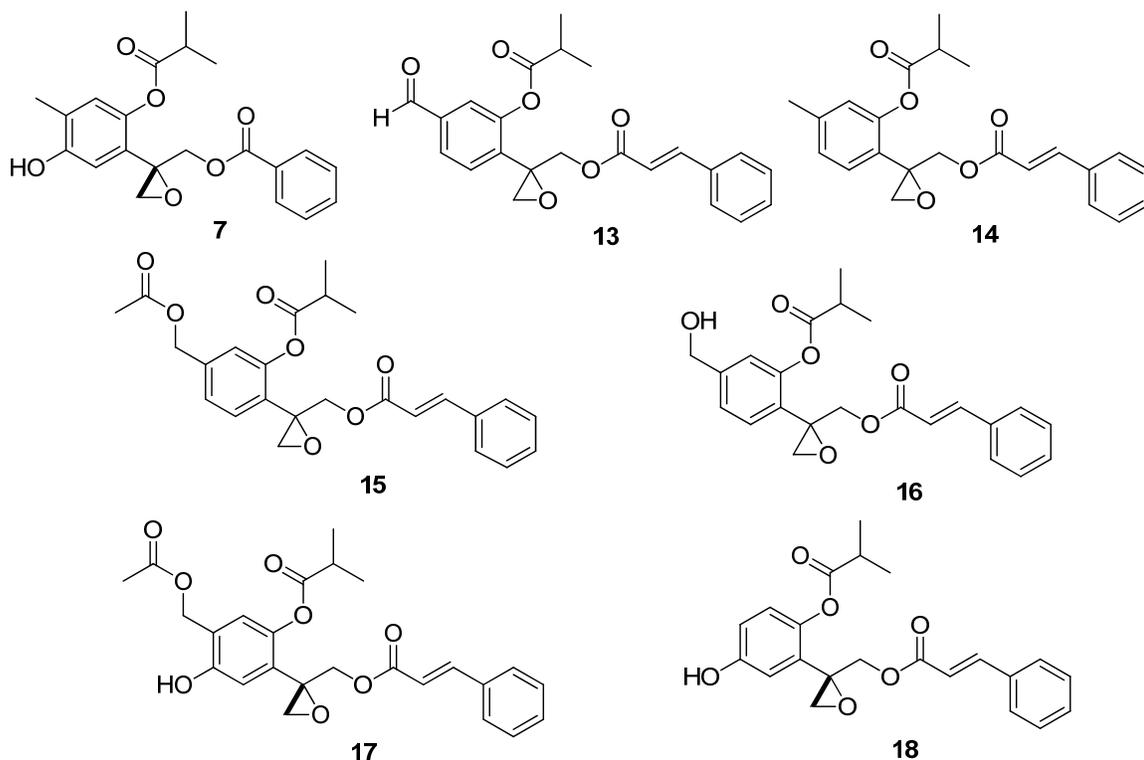
En el presente trabajo se describe la obtención del derivado de timol isobutirato de (+)-(8*S*)-10-benzoiloxi-6-hidroxi-8,9-epoxitimilo (**7**), aislado de las hojas de *Ageratina glabrata* y de los derivados areolal (**13**), isobutirato de 10-cinamoiloxi-8,9-epoxitimilo (**14**), isobutirato de 7-acetoxi-10-cinamoiloxi-8,9-epoxitimilo (**15**), isobutirato de 10-cinamoiloxi-7-hidroxi-8,9-epoxitimilo (**16**), isobutirato de (8*S*)-7-acetoxi-10-cinamoiloxi-6-hidroxi-8,9-epoxitimilo (**17**) e isobutirato de (8*S*)-10-cinamoiloxi-8,9-epoxi-6-hidroxi-7-*nortimilo* (**18**), aislados de las flores y raíces de *Piptothrix areolare*. Las purezas enantioméricas de los compuestos se determinaron mediante mediciones de RMN-BINOL, obteniendo a **13-16** como mezclas escalémicas mientras que, **7**, **17** y **18** fueron enantioméricamente puros. En un trabajo previo de nuestro grupo de investigación se determinó la configuración absoluta de **13** a partir de DCV asignándola como (*S*). La obtención de los espectros de DCE de los epoxitimoles **14-18** y su comparación con los adquiridos para **13** permitieron determinar su configuración absoluta. Adicionalmente, se propone una metodología para la obtención de espectros teóricos de DCE mediante teoría de funcionales de la densidad dependiente del tiempo (TD-DFT).



Palabras clave: Epoxitimoles, DCE, configuración absoluta, *Ageratina glabrata*, *Piptothrix areolare*

ABSTRACT

The present work describes the isolation of (+)-(8*S*)-10-benzoyloxy-6-hydroxy-8,9-epoxythymol isobutyrate (**7**) from the leaves of *Ageratina glabrata*, and areolal (**13**), and 10-cinnamoyloxy-8,9-epoxythymol isobutyrate (**14**) from the roots of *Piptothrix areolare*, as well as, 7-acetoxy-10-cinnamoyloxy-8,9-epoxythymol isobutyrate (**15**), 10-cinnamoyloxy-7-hidroxy-8,9-epoxythymol isobutyrate (**16**), (8*S*)-7-acetoxy-10-cinnamoyloxy-6-hydroxy-8,9-epoxythymol isobutyrate (**17**), and (8*S*)-10-cinnamoyloxy-8,9-epoxy-6-hydroxy-7-*northymol* isobutyrate (**18**), from the flowers of *P. areolare*. The enantiomeric purity of the above compounds was determined by ¹H NMR-BINOL measurements, where **13-16** as scalemic mixtures were evidenced, while **7**, **17** and **18** are enantiomerically pure compounds. After, Absolute Configuration (AC) determination studies for **14-18** were achieved by ECD measurements and results were compared with that ECD spectrum from **13**, whose AC was known. Results revealed the δS - configuration for **17** and **18**, as well as for the major enantiomer in **14-16**. In addition, a methodology to obtain theoretical spectra of ECD using TD-DFT calculations for AC studies in epoxythymol derivatives is proposed.



Keywords: Epoxythymols, ECD, absolute configuration, *Ageratina glabrata*, *Piptothrix areolare*

1. INTRODUCCIÓN

El timol (**1**) (**Figura 1**) es un monoterpeno aromático del cual se ha descrito una amplia variedad de derivados, destacando aquellos funcionalizados en las posiciones C-8, C-9 y/o C-10, debido a la posibilidad de generar un centro estereogénico o proestereogénico. Este tipo de compuestos han sido reportados en 98 especies vegetales, distribuidas en 42 géneros de la familia Asteraceae. Los epoxitimoles constituyen un amplio grupo de derivados de timol funcionalizados con un anillo de oxirano en C-8/C-9 y que pueden presentar simultáneamente grupos funcionales en C-3, C-6, C-7 y C-10. Se han reportado un grupo de 63 derivados de epoxitimol obtenidos de 67 especies vegetales distribuidas en 32 géneros de la familia Asteraceae.¹

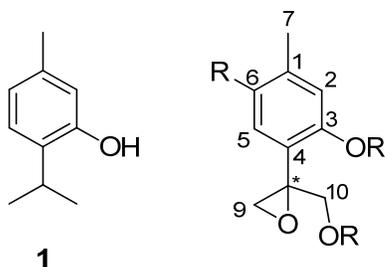


Figura 1. Timol y derivado epoxitimol

La determinación de la configuración absoluta (CA) de estos productos naturales ha sido poco estudiada a pesar del potencial biológico descrito. Recientemente, se ha reportado la elucidación de la CA de algunos epoxitimoles, en cuyos casos plantean problemas desafiantes, ya que se han abordado varios enfoques para la solución del problema, por ejemplo, la cristalografía de rayos X y el dicroísmo circular vibracional (DCV), cada uno con sus propias limitaciones.

El dicroísmo circular electrónico (DCE) es la contraparte quiróptica de la espectroscopia de absorción UV-Vis, de la misma manera que todas las demás técnicas, como el DCV, la dispersión de rotación óptica (DRO), entre otras, son las contrapartes de la espectroscopia infrarroja (IR) o dispersión de índice de refracción, respectivamente. La principal ventaja de estas técnicas sobre sus análogos no quirópticos es, obviamente, el hecho de que las primeras son

sensibles a la quiralidad molecular y supramolecular. Por lo tanto, la aplicación principal de estas espectroscopias está en la asignación de CA. Sin embargo, a menudo se dice que también son sensibles a la conformación molecular. Esto significa que, al asignar configuraciones absolutas, DCE se presta también como herramientas para el estudio de la conformación molecular.^{2, 3}

2. ANTECEDENTES

2.1 Configuración Absoluta

Una molécula quiral es la que no contiene elementos de simetría. La causa más común de la quiralidad en las moléculas orgánicas es la presencia de un átomo de carbono tetraédrico unido a cuatro grupos diferentes, llamado centro estereogénico. Los compuestos quirales pueden existir como un par de estereoisómeros llamados enantiómeros, los cuales son idénticos en todas sus propiedades físicas con excepción de su actividad óptica, o en la dirección en la cual rotan la luz polarizada en un plano.^{4,5}

Varios fármacos se aíslan directamente de las plantas o bacterias, y otros se generan por la modificación química de compuestos que se encuentran en la naturaleza. Usualmente son quirales aquellos fármacos que provienen de fuentes naturales, ya sea directamente o después de una modificación química, y por lo general se encuentran únicamente como un solo enantiómero en lugar de una mezcla racémica. Por ejemplo, la penicilina V (**2**) (**Figura 2**), aislado del moho *Penicillium*, tiene la configuración (2*S*, 5*R*, 6*R*) y presenta actividad antibiótica mientras que su enantiómero, el cual no se encuentra de manera natural pero puede producirse en el laboratorio, no tiene actividad.⁴

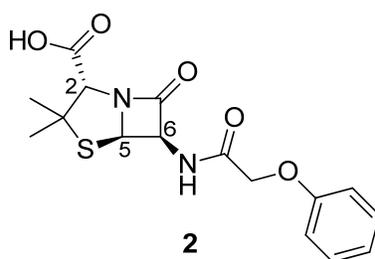


Figura 2. Penicilina V

Cada vez que se descubre un nuevo compuesto natural, especialmente cuando se investiga su bioactividad y actividad farmacológica potencial, la elucidación de su estructura debe incluir necesariamente una asignación estereoquímica completa, es decir, la determinación de su CA. Sin

embargo, en la mayoría de los casos, este es el paso más difícil de toda la elucidación de la estructura, especialmente aquellos con estructuras complejas. Durante varias décadas, el problema de la asignación de CA se ha basado en el método de difracción de Rayos X de monocristal o en correlaciones químicas con compuestos conocidos. Hace relativamente poco tiempo, la asignación de CA se ha convertido en el primer propósito de las espectroscopias quirópticas, es decir, aquellos fenómenos que surgen de la interacción de la luz polarizada circularmente con materia quiral. Estas técnicas incluyen, DCE, DCV y RO.⁶ En los últimos años, las espectroscopias quirópticas han experimentado un nuevo auge debido al desarrollo de la potencia computacional, que ha hecho posible calcular espectros de DCV/DCE/RO de moléculas con relativa complejidad como los productos naturales, con métodos de mecánica cuántica de alto nivel y en tiempos cortos.⁷

2.1.1 Cristalografía de Rayos X de Monocristal

La difracción de rayos X de monocristales tiene la capacidad de distinguir entre los enantiómeros de una molécula quiral. Esta técnica se puede aplicar a compuestos de una amplia gama de composición química. La información química esencial, como la geometría molecular, las distancias y los ángulos de los enlaces, y el empaquetamiento de las moléculas en el cristal, son parte de los resultados aportados por un análisis de difracción de rayos X. La determinación de la estructura molecular se lleva a cabo con métodos como el de Bijvoet que, se basa en las pequeñas diferencias en la intensidad de la difracción causadas por el fenómeno de la dispersión anómala de los rayos X por ciertos átomos presentes en la molécula.⁸

La CA se puede determinar mediante el uso de los parámetros de Flack y Hooft. El parámetro de Flack es utilizado para estimar la configuración absoluta de un modelo estructural determinado por el análisis de estructura monocristalina, este tomará valores cercanos a 0 cuando la estructura absoluta dada por el refinamiento probablemente sea correcta, y si el valor está cerca de 1 la estructura invertida será la correcta. El parámetro de Hooft es un parámetro estadístico que se lleva a cabo al término del refinamiento y proporciona una ruta de sustento al parámetro de Flack.^{9, 10} El principal problema que presenta esta técnica es que se requiere un monocristal de la sustancia a analizar. Por ello, se debe intentar la cristalización de la sustancia y esto, a menudo, no es fácil, más aún cuando se dispone de poca cantidad de producto. Además, esta técnica no se

puede aplicar a disoluciones, sistemas amorfos (que son la gran mayoría dentro de los productos sólidos) o a gases.¹¹

2.1.2 Resonancia Magnética Nuclear

La resonancia magnética nuclear (RMN) utiliza dos enfoques para la determinar CA. El primero involucra aquellos procedimientos donde no es necesaria la derivatización del sustrato cuya CA se estudia. El enantiómero puro se analiza mediante RMN en un entorno quirral proporcionado por un disolvente quirral o un agente solvatante quirral. En este enfoque, no existe un enlace covalente entre el sustrato y el reactivo quirral, y esto es el origen de su principal limitación: el entorno quirral produce diferencias muy pequeñas pero significativas en los desplazamientos químicos para los dos enantiómeros cuyas RMN son muy similares; muchas veces, los dos enantiómeros deben estar disponibles para la comparación y se debe contemplar un análisis conformacional de los diastereoisómeros generados para inferir la CA a través de fenómenos de apantallamiento o desprotección electrónica lo que en ocasiones es complicado y puede generar ambigüedad de los resultados. El segundo enfoque implica la derivatización del enantiómero puro con los dos enantiómeros de un agente derivatizante quirral, produciendo dos derivados diastereoméricos. En este caso, el entorno quirral lo proporciona el reactivo auxiliar; la asociación con el sustrato es covalente y conduce a diferencias mucho mayores en los desplazamientos químicos, por lo que la derivatización con reactivos auxiliares quirales es, con mucho, el método de elección para determinar CA por RMN.¹²

2.1.3 Rotación Óptica y Dispersión Óptica Rotatoria

La rotación óptica (RO) es la capacidad de rotar el plano de la luz polarizada linealmente, siendo la primera técnica utilizada para el estudio de moléculas quirales. La RO todavía se usa ampliamente para caracterizar compuestos quirales, distinguir entre enantiómeros de compuestos conocidos y determinar excesos enantioméricos. Sin embargo, hasta que la predicción de RO por métodos de mecánica cuántica se volvió suficientemente fiable, el signo de RO se consideró inútil para asignar la CA de compuestos desconocidos en el proceso de elucidación estructural, excepto por unas pocas relaciones empíricas en casos especiales. La RO depende de la longitud de onda de

la luz polarizada utilizada. Los polarímetros estándar permiten la medición de RO en una o pocas longitudes de onda fijas (por lo general, incluye la línea D del sodio a 589 nm). Por el contrario, los espectropolarímetros permiten la medición de RO en función de la longitud de onda, proporcionando un espectro que se conoce como espectro de dispersión óptica rotatoria (DOR). La DOR y DCE proporcionan información similar. Por lo tanto, la mayoría de las aplicaciones de DOR se pueden realizar mejor utilizando el DCE más sensible, además los espectropolarímetros DOR comerciales ya no se producen y no son fáciles de encontrar en un laboratorio. Como consecuencia, la DOR ahora se usa raramente.¹³

2.1.4 Dicroísmo Circular

Entre las distintas técnicas para la determinación de la CA se encuentra el dicroísmo circular (DC), que es la absorción diferencial de la luz polarizada circularmente (LPC) hacia la izquierda y hacia la derecha por una sustancia quiral. En la LPC el campo eléctrico tiene una longitud constante, pero gira según la dirección de propagación, formando una especie de hélice en el espacio, esto se consigue mediante un modulador fotoelástico; este dispositivo convierte la luz polarizada linealmente en LPC y es un componente central de muchos instrumentos quirópticos. Cuando el fenómeno de DC ocurre en la región infrarroja da como resultado un DC “vibracional” (DCV), mientras que se obtendrá un DC “electrónico” (DCE) en las regiones ultravioleta y visible.^{14, 15}

2.1.4.1 Dicroísmo Circular Vibracional

Las mediciones de DC se pueden realizar utilizando radiación IR polarizada circularmente. Debido a que la absorción de IR está relacionada con las vibraciones moleculares, esta técnica se llama dicroísmo circular vibracional. La mayoría de las mediciones de DCV se realizan en la región del infrarrojo medio ($2000-900\text{ cm}^{-1}$) porque en esta región se observan bandas que se pueden interpretar adecuadamente utilizando predicciones teóricas dentro de aproximaciones armónicas. Aquellos en la región de estiramiento de hidrógeno de mayor energía (región de $3500-2500\text{ cm}^{-1}$) generalmente se complican por la presencia de efectos anarmónicos, mientras que las mediciones en la región de energía más baja ($900-100\text{ cm}^{-1}$) aún no están establecidas.

La técnica parece atractiva porque, a diferencia de DCE, no requiere la presencia de un cromóforo y, por lo tanto, es potencialmente aplicable a todo tipo de moléculas orgánicas. Además, los espectros IR son más ricos en información que los espectros UV. Sin embargo, dos inconvenientes han obstaculizado fuertemente sus aplicaciones generales. El primer problema es la baja sensibilidad, en la que se necesitan miligramos de muestras y horas de tiempo de adquisición ya que la intensidad de la señal de DCV es de 1,000 a 10,000 veces más débil que la de los espectros de IR estándar. La otra dificultad es la ausencia de métodos simples para correlacionar el espectro de DCV con la CA de compuestos, de modo que la interpretación de un espectro de DCV requiere invariablemente cálculos de mecánica cuántica que, si bien tienen la ventaja de poder cuantificar la confiabilidad de los resultados, en ocasiones son poco accesibles debido a elevados costos de cómputo.^{13, 16}

2.1.4.2 Dicroísmo Circular Electrónico

El DCE solo puede ser observado por compuestos quirales que contienen uno o más grupos cromóforos con absorciones electrónicas en el rango de 170–1300 nm. Comúnmente, el rango utilizado por equipos UV-vis es entre 170–800 nm. Por lo tanto, la presencia de cromóforos es esencial para la observación de DCE. Una transición electrónica, que normalmente da lugar a una banda de absorción en el espectro puede asociarse con una banda de DCE, de un signo positivo o negativo, que es siempre opuesto para los dos enantiómeros de la misma sustancia (**Figura 3**). Una molécula que no contiene cromóforos puede a menudo ser transformada en un buen candidato para DCE, mediante modificaciones químicas adecuadas para agregar grupos cromóforos a la estructura. En general, la determinación de CA usando DCE compara el espectro de un compuesto que tiene CA desconocida con la de compuestos análogos de CA conocida. Sin embargo, la determinación de CA mediante la predicción del signo de una o más bandas en el espectro DCE mediante el uso de reglas empíricas, semi-empíricas o no empíricas puede ser una opción. No obstante, es importante considerar que la modificación de grupos funcionales en moléculas quirales puede alterar el signo de la absorción de luz polarizada. Otra alternativa, que se ha utilizado más ampliamente en los últimos años, es comparar los espectros de DCE calculados y experimentales.^{14,}

17

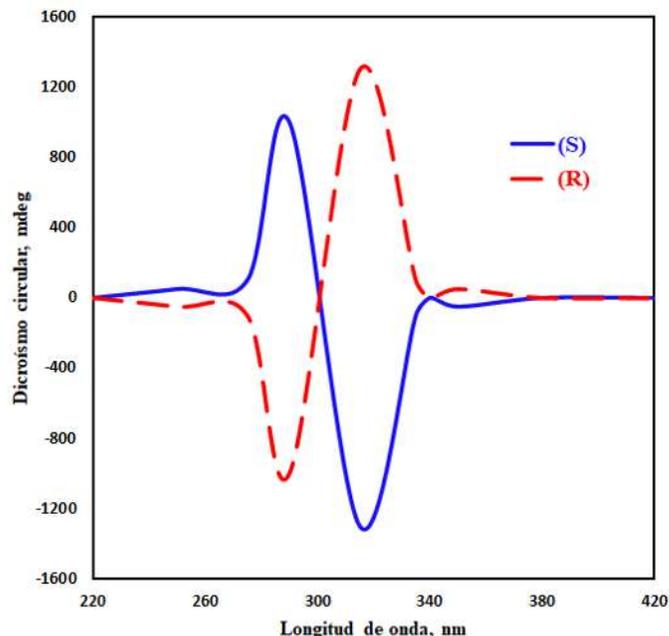


Figura 3. Ejemplo de espectro de DCE para enantiómeros

2.2 Cálculos de Espectros DCE

Los cálculos de mecánica cuántica de propiedades quirópticas se han convertido rápidamente en el método más popular para asignar configuraciones absolutas de compuestos orgánicos, incluidos los productos naturales. Los cálculos de la mecánica cuántica de los espectros quirópticos permiten asignar CA por comparación directa con el espectro experimental.¹⁸

En el contexto específico de DCE, donde es necesaria una predicción de estados excitados para la simulación, se ha dado un paso adelante con el uso del método de la teoría de funcionales de la densidad dependiente del tiempo (TD-DFT) el cual es muy rentable.¹⁹ Los cálculos de DCE generalmente involucran dos pasos, primero el análisis conformacional del compuesto para obtener los posibles conformeros, y segundo, el cálculo de UV/DCE por TD-DFT de cada conformero. El análisis conformacional se realiza a menudo por métodos de Monte Carlo usando mecánica molecular y/o métodos semi-empíricos para la evaluación de energía relativa de los conformeros. Los conformeros resultantes luego se optimizan utilizando métodos de teoría de funcionales de la densidad (DFT) antes de someterse a los cálculos TD-DFT de UV/DCE. Para obtener los espectros UV/DCE calculados. Los espectros de cada conformero se promedian según

su población de Boltzmann. Finalmente, son comparados los espectros experimental y calculado del producto natural en cuestión.¹⁸

La elección de la combinación de conjunto funcional/base en los cálculos TD-DFT es la elección más crucial en todo el procedimiento. Sin embargo, al preguntarse ¿Cuál es la mejor combinación funcional/base? Desafortunadamente, no existe una respuesta general a esta pregunta. De hecho, lo más importante es simplemente probar diferentes combinaciones de funcionales y conjuntos de bases, elegir dentro de un conjunto de funcionales populares y conjuntos de bases razonables, y verificar la consistencia de sus resultados. En cuanto al funcional, se deben probar al menos dos familias de funcionales, es decir, funcionales híbridos y de rango separado. Los funcionales híbridos populares son B3LYP, PBE, M06, BH&HLYP y M06-2X. Mientras que los funcionales de rango separado se tiene a CAM-B3LYP y ω B97X. En cuanto al conjunto de bases, se recomiendan conjuntos de calidad doble o triple ζ con un conjunto suficientemente amplio de funciones de polarización.^{13, 18, 20}

2.3 Timol

El timol (**1**) es un monoterpeno distribuido típicamente en los géneros *Thymus* y *Origanum*, fue descubierto por Caspar Neumann, que en 1719 informa en su tratado: *De Camphora*, a la Real Sociedad de Ciencias, que logró extraer una sustancia cristalina del aceite de tomillo común.²¹ Se biosintetiza mediante la aromatización de γ -terpineno a *p*-cimeno seguido de hidroxilación de *p*-cimeno.²² Los estudios biológicos han demostrado la relevancia del timol como una molécula con una amplia variedad de aplicaciones prácticas en medicina, industrias alimentarias y agroquímicas, entre otras. Sus aplicaciones farmacológicas han sido las más investigadas y reportadas, destacando actividades antimicrobianas, antioxidantes, antiinflamatorias y cicatrizantes. En agricultura se han estudiado usos como agroquímico natural e insecticida, mientras que, en la industria alimenticia se usa como conservador.²³

Se ha descrito una amplia variedad de derivados de timol, funcionalizados en distintas partes de su esqueleto base destacando las posiciones 8, 9 y/o 10, debido a la posibilidad de generar un centro estereogénico o proestereogénico. La variedad de derivados de timol con un centro estereogénico en C-8, como consecuencia de la funcionalización en uno o ambos grupos metilo

(C-9 o C-10), y alternativamente en el propio C-8, se amplía aún más mediante sustituciones en las posiciones C-3, C-6 y/o C-7. Los epoxitimoles son una variedad de derivados de timol funcionalizados con grupo epóxido en las posiciones C-8/C-9, siendo el grupo más abundante de derivados de timol con un centro estereogénico en C-8. Estos compuestos se pueden identificar fácilmente mediante RMN de ^1H observando las señales de los protones aromáticos del anillo de timol en conjunto con las del grupo epoximetileno C-9 que se muestran como dobletes en la región de 3.20-2.47 ppm, además de los dobletes de H-10a y H-10b que se encuentran entre 4.67-4.08 ppm.¹

2.4 Estudios de Configuración Absoluta Derivados de Timol

El primer estudio de CA de derivados de timol se reportó en 2014 donde fue aislado, de las hojas de *Ageratina cylindrica*, el derivado de timol isobutirato de (+)-(8*S*)-10-benzoiloxi-6-hidroxi-7-oxo-8,9-epoxitimilo (**3**) (**Figura 4**). La CA de **3** se estableció mediante espectroscopia de DCV en combinación con cálculos de DFT. Adicionalmente, la obtención de un cristal del compuesto permitió su evaluación por difracción de rayos X de monocristal bajo los parámetros de Flack y Hoofst, complementando así la CA de dicho compuesto.²⁴

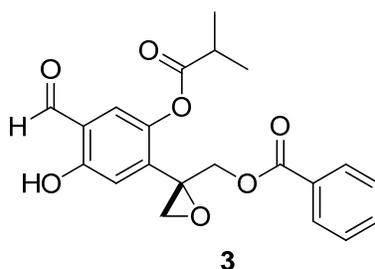


Figura 4. Estructura del compuesto **3** aislado de *Ageratina cylindrica*

En 2015, se reportó la asignación de la CA de dos derivados de timol (**Figura 5**) mediante su síntesis enantioselectiva. El compuesto **4**, aislado de *Eupatorium fortunei*, mostró consistencia en la comparación de su rotación óptica con la obtenida para el derivado sintético (*R*)-**4**. Por lo tanto, la CA del compuesto natural **4** se estableció como *R*. En el camino hacia la molécula objetivo fueron sintetizados otros productos naturales estrechamente relacionados, logrando establecer la configuración del compuesto **5** como *S*.²⁵

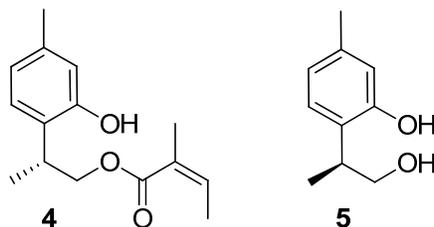


Figura 5. Derivados de timol obtenidos por síntesis enantioselectiva

Un nuevo estudio donde se asignó la CA de un derivado de timol a partir de una síntesis asimétrica se reportó en 2016. En dicho estudio se sintetizó el 8-hidroxil-9-angeloiloxitimol (**6**), aislado de *Eupatorium fortunei*. La síntesis se logró a través de una ruta de siete pasos, utilizando *m*-cresol como materia de partida. La muestra sintética enantioméricamente enriquecida del compuesto (*R*)-**6** mostró datos espectroscópicos consistentes con los del producto natural. La CA del centro estereogénico C-8 del compuesto natural **6** se infirió como *R* basándose en el hecho de que el signo de la rotación óptica del compuesto natural es igual al del sintético (*R*)-**6** (**Figura 6**).²⁶

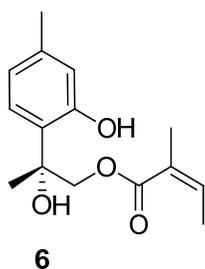


Figura 6. Estructura del (8*R*)-hidroxil-9-angeloiloxitimol

En 2016, se reportó la CA del compuesto isobutirato de (+)-(8*S*)-10-benzoiloxi-6-hidroxi-8,9-epoxitimilo (**7**) (**Figura 7**) aislado de las hojas de *Ageratina glabrata*, mediante el uso de difracción de rayos X de monocristal y la evaluación de los parámetros de Flack.²⁷

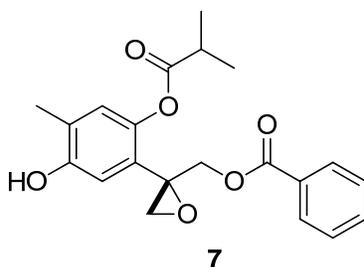


Figura 7. Estructura de compuesto 7

Estudios realizados en 2018, permitieron establecer una metodología para determinar el exceso enantiomérico y la CA de epoxitimoles utilizando cinco compuestos aislados de *Ageratina glabrata*. La metodología se basó en la determinación de la pureza enantiomérica empleando 1,1'-bi-2-naftol (BINOL) como reactivo de solvatación quiral, en combinación con mediciones y cálculos de DCV. Se reportó el aislamiento de los compuestos derivados de epoxitimol, isobutirato de (+)-(8*S*)-10-benzoiloxi-6-hidroxi-8,9-epoxitimilo (**7**) isobutirato de 10-isobutiriloxi-8,9-epoxitimilo (**8**), isobutirato de 10-benzoiloxi-8,9-epoxitimilo (**9**), isobutirato de (+)-(8*S*)-10-acetoxi-6-metoxi-8,9-epoxitimilo (**10**), y isobutirato de (+)-(8*S*)-10-benzoiloxi-6-metoxi-8,9-epoxitimilo (**11**) (**Figura 8**), donde los compuestos **7**, **10** y **11** se encontraron enantioméricamente puros mientras que, **8** y **9** estaban presentes como mezclas escalémicas con proporción 75:25 *S/R* y 56:44 *S/R* respectivamente.²⁸

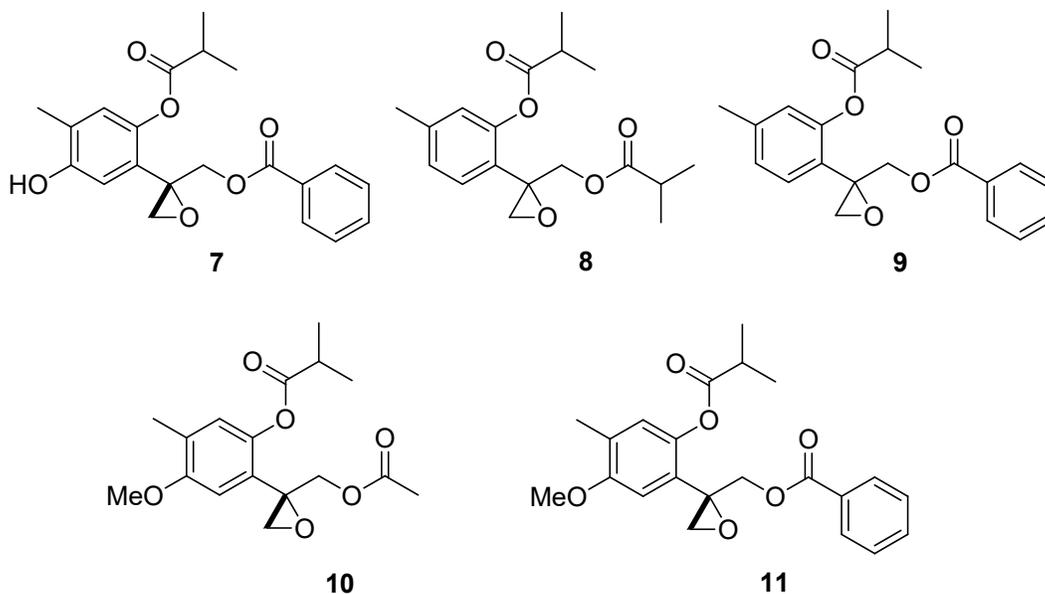


Figura 8. Epoxitimoles aislados de *Ageratina glabrata*

Recientemente, en 2019, se reportó el aislamiento de un nuevo derivado del timol **12** (Figura 9) de las raíces de *Eupatorium chinense*. Su estructura se determinó mediante RMN de 1D y 2D. La CA de dicho compuesto se asignó basándose en una comparación de espectros de DCE calculado y experimental. El espectro DCE calculado para el enantiómero *R* coincidió con el espectro de DCE experimental.²⁹

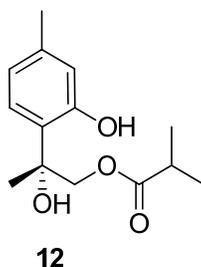


Figura 9. Derivado de timol aislado de *Eupatorium chinense*

El areolal (**13**) es un epoxitimol que fue aislado de *Piptothrix areolare* en 1986 y que a pesar de contener un centro estereogénico en su estructura no presentó rotación óptica, por lo que se reportó como una mezcla racémica. Esto se confirmó mediante el uso RMN de ¹H en conjunto con un reactivo de desplazamiento quiral de Europio, que produjo la división de la señal atribuida a H-10b en dos dobletes de igual intensidad.³⁰ Estudios realizados en 2019 de muestras secuenciales de areolal (**13**), mostraron variaciones en las proporciones de los enantiómeros dependiendo de la época de colecta, teniendo valores dextrorrotatorios (ee 32%), casi racémicos (ee 4%) y levorotatorios (ee 82%). La CA de areolal (Figura 10) se determinó por DCV como 8*S* para una muestra levorotatoria enriquecida.³¹

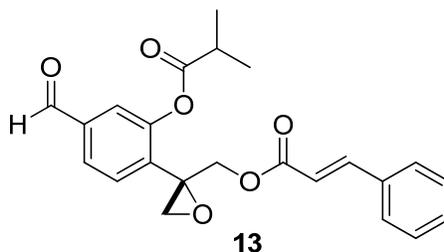


Figura 10. (*S*)-areolal

A pesar de que el DCE se ha utilizado clásicamente en química orgánica y en estudios de productos naturales para la determinación de CA, esta técnica no ha sido explorada en el caso de los epoxitimoles, aun y cuando estos presentan cromóforos adecuados cerca del centro estereogénico. El uso de esta técnica tendría como ventaja su alta sensibilidad, tiempos de medición más rápidos y una mayor accesibilidad. Con base en lo anterior, surge el interés de desarrollar un proyecto de investigación científica en el que se aislen derivados del timol ópticamente activos de fuentes naturales y evaluar su comportamiento en DCE.

3. JUSTIFICACIÓN

En la bibliografía se tienen reportes de numerosos derivados de timol entre ellos los epoxitimoles; sin embargo, existen escasos estudios sobre configuración absoluta de estos, por lo que surge el interés por desarrollar un estudio dirigido a determinar el comportamiento de estos compuestos en DCE, para así poder validar una metodología más accesible para la determinación de CA de estos compuestos.

4. OBJETIVOS

Objetivo General

Analizar las preferencias conformacionales y espectroscopia de Dicroísmo Circular Electrónico de epoxitimoles ópticamente activos, para establecer una potencial metodología de determinación de la configuración absoluta para esta clase de compuestos, que sea rápida, accesible e igual de eficiente que las técnicas actualmente empleadas.

Objetivos Específicos

1. Aislar y purificar epoxitimoles de *A. glabrata* y *P. areolare*.
2. Realizar el análisis conformacional de los epoxitimoles mediante cálculos computacionales.
3. Determinar el comportamiento de los epoxitimoles en espectroscopia DCE.
4. Realizar un análisis sistemático de los resultados experimentales y calculados.

5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El extracto total de CH_2Cl_2 de hojas de *Ageratina glabrata* se analizó preliminarmente por RMN de ^1H (**Figura 11**) con la finalidad de identificar señales características de derivados de epoxitimol. Entre 8.20 y 6.50 ppm se observaron señales de protones aromáticos, entre 4.80 y 4.40 ppm se tienen señales que corresponden a los protones base de oxígeno del sistema AB del CH_2 -10. En 3.20 y 2.80 ppm se observaron señales pertenecientes al CH_2 -9 base de epóxido. Este análisis confirma que los derivados de timol se encuentran como componentes mayoritarios del extracto.

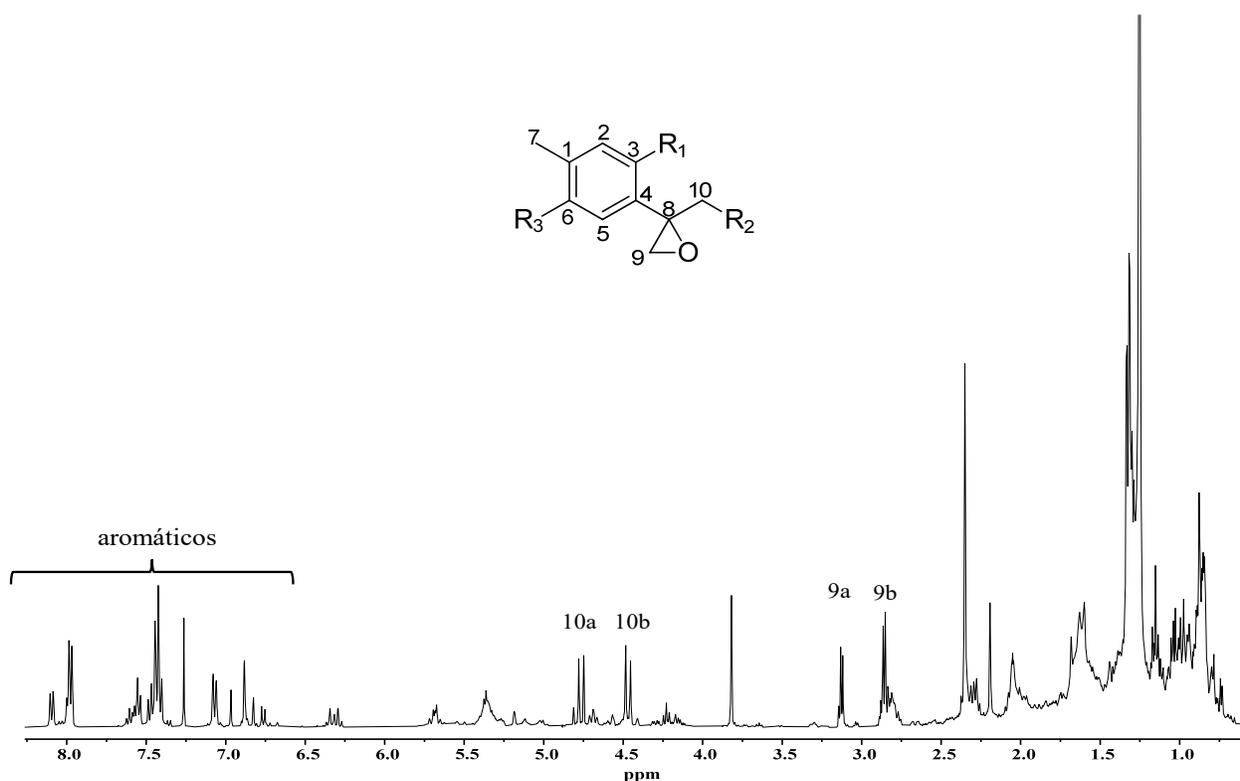


Figura 11. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 del extracto de CH_2Cl_2 de hojas de *A. glabrata*

Después de una cromatografía de columna en la polaridad hexanos-CH₂Cl₂ (4:1) se obtuvo al compuesto mayoritario como cristales en forma de agujas con punto de fusión 111-113 °C. En el espectro de RMN de ¹H (**Figura 12**) se observa en 7.97 ppm una señal doble de dobles con $J = 7.8$ y 1.5 Hz que integra para dos protones y se asigna a los protones aromáticos H-3'' y H-7'', en 7.55 ppm se tiene una señal triple de triples con $J = 7.8$ y 1.5 Hz para el protón aromático H-5'', en 7.41 ppm se observa una triple que integra para dos protones con $J = 7.8$ Hz para los protones aromáticos H-4'' y H-6'', dicho conjunto de señales es típico para un grupo benzoato. En 6.93 y 6.81 ppm se observan dos señales simples para los protones H-5 y H-2 en posición *para* del anillo de timol. En 5.40 ppm se tiene una señal simple asignada al protón de OH, en 4.76 y 4.47 ppm se tienen dos señales dobles con $J = 12.3$ Hz para los protones H-10a y H-10b, en 3.12 y 2.85 ppm se observan dos señales dobles con $J = 5.3$ Hz correspondientes a los protones base de epóxido H-9a y H-9b, en 2.82 ppm se observa una señal séptuple con $J = 6.8$ Hz para el protón H-2' del isopropilo, en 2.21 ppm se tiene una señal simple, que integra para tres protones correspondiente al metilo de la posición H-7, en 1.30 y 1.29 ppm se observan dos señales dobles con $J = 6.8$ Hz correspondientes a los metilos de isopropilo de las posiciones H-3' y H-4'.

En el espectro de RMN de ¹³C (**Figura 13**) se observan en 175.0 y 166.0 ppm las señales de carbonilo de ésteres C-1' y C-1'' respectivamente, en 151.7 y 141.7 ppm se observan dos señales para carbonos cuaternarios base de oxígeno de las posiciones C-6 y C-3, respectivamente; en 133.2 ppm se observa la señal del carbono C-5''; los carbonos C-3'' y C-7'' se encuentran en 129.7 ppm, en 129.5 ppm se observa la señal para el carbono C-4. Las señales C-4'' y C-6'' se encuentran traslapadas en 128.4 ppm. Las señales observadas en 127.1, 125.8, 124.7 y 114.7 ppm son asignadas a los carbonos C-2'', C-1, C-2 y C-5, respectivamente, en 65.5 ppm se observa la señal para el carbono C-10 base de benzoato, mientras que en 57.0 ppm se encuentra la señal para el carbono cuaternario C-8 base de epóxido, en 51.0 ppm se localiza la señal para C-9 base de epóxido, en 34.1 ppm se observó la señal para el carbono C-2' base de isopropilo, en 19.0 ppm se localiza la señal para los carbonos pertenecientes a los metilos de isopropilo C-3' y C-4', en 15.7 ppm se encontró la señal que corresponde al carbono de metilo de la posición C-7. Los datos obtenidos concuerdan con los del compuesto isobutirato de (+)-(8*S*)-10-benzoiloxi-6-hidroxi-8,9-epoxitimilo (**7**) reportados por Bustos-Brito *et al* en 2016.²⁷

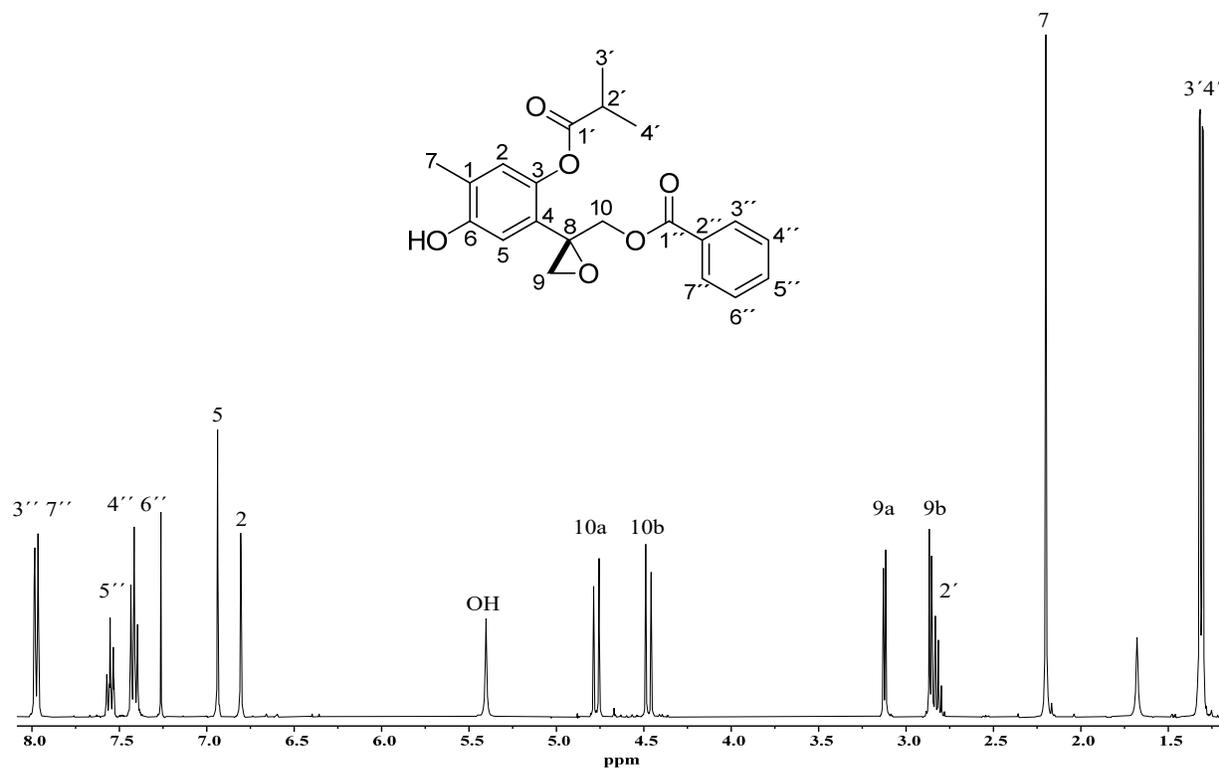


Figura 12. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 de isobutirato de (+)-(8*S*)-10-benzoiloxi-6-hidroxi-8,9-epoxitimilo (7)

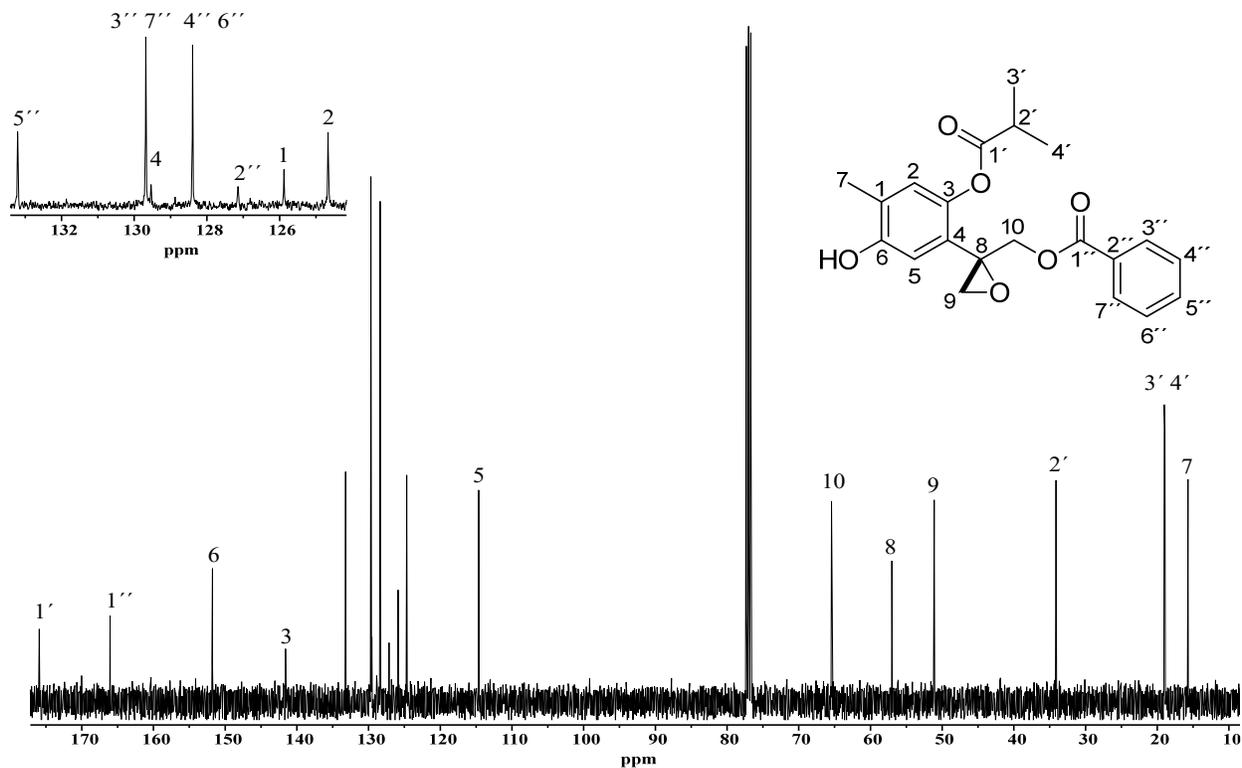


Figura 13. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz en CDCl_3 isobutirato de (+)-(8*S*)-10-benzoiloxi-6-hidroxi-8,9-epoxitimilo (7)

Por su parte, los extractos totales de raíz de *P. areolare* se analizaron preliminarmente por RMN de ^1H (**Figura 14**) con la finalidad de identificar señales características de derivados de epoxitimol. En 10.00 ppm se observan señales de protones de aldehído, entre 7.90 y 7.30 ppm se observan señales de protones aromáticos, entre 6.40 y 6.30 ppm se tienen señales para protones vinílicos. Entre 4.80 y 4.40 ppm se tienen señales que corresponden a los protones base de oxígeno del sistema AB de CH_2 -10. En 3.20 y 2.80 ppm se observan señales pertenecientes a la base de epóxido CH_2 -9. Con base en este análisis se confirma que los derivados de timol se encuentran como componentes mayoritarios en el extracto.

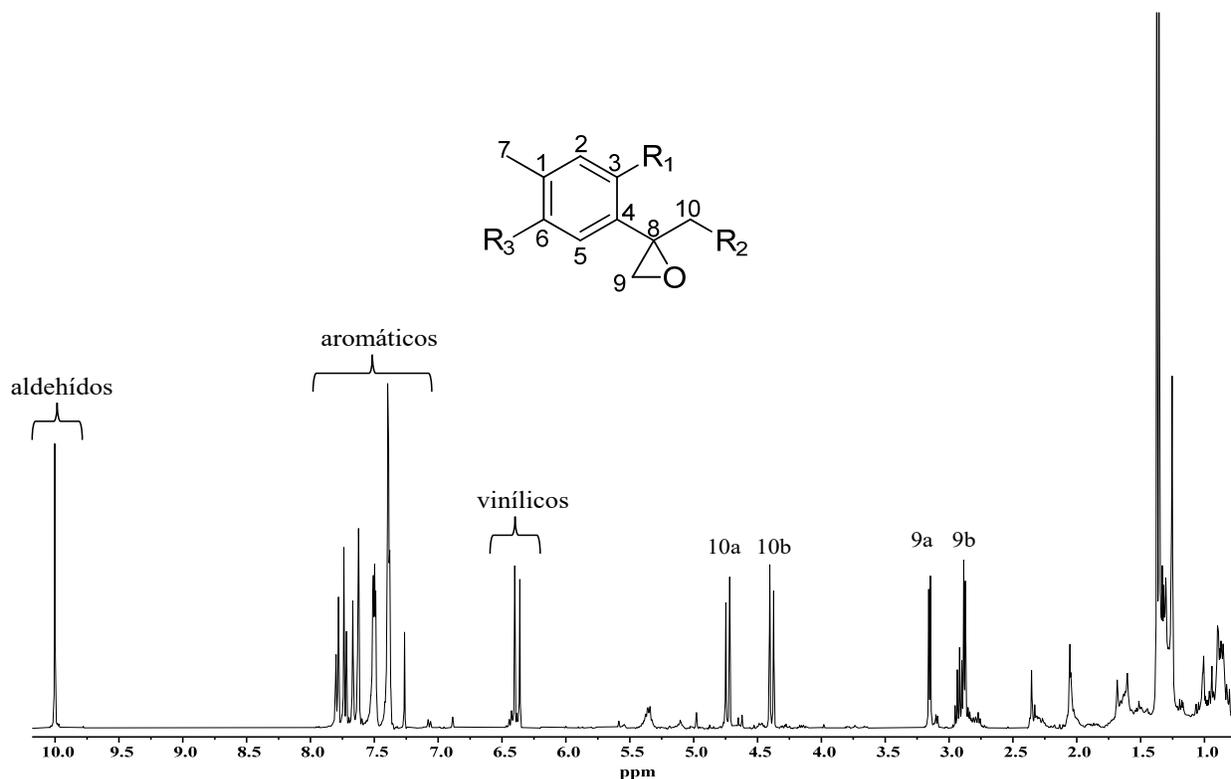


Figura 14. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 del extracto hexánico de raíz de *P. areolare*

El extracto hexánico de raíces se sometió a cromatografía empleando gel de sílice como fase estacionaria y mezclas de hexanos-AcOEt en polaridad ascendente como fase móvil. En la polaridad hexanos-AcOEt (7:3) se obtuvo al compuesto mayoritario como una miel amarilla, en su espectro de RMN de ^1H (**Figura 15**) se observa que presenta en 10.00 ppm una señal para H-7 correspondiente a un protón de aldehído, en 7.79 ppm se encuentra una señal doble de dobles con $J = 7.8$ y 1.6 Hz asignada a H-6, en 7.73 ppm se tiene una señal doble con $J = 7.8$ Hz para el protón H-5, en 7.65 ppm aparece una señal doble con $J = 16.2$ Hz correspondiente al protón vinílico H-2'', en 6.38 ppm se observa otra señal doble con $J = 16.2$ Hz que se asigna al protón vinílico H-3'' confirmado la presencia de un doble enlace con configuración *E*, en 7.50 y 7.38 ppm se localizan dos señales múltiples que integran para dos y tres protones respectivamente y se asignan a las protones aromáticos de un benceno mono sustituido, que junto a con las señales vinílicas, sugiere la presencia de un grupo cinamato. En 4.73 y 4.34 ppm se tienen dos señales dobles con $J = 12.3$ Hz para los protones H-10a y H-10b, en 3.15 y 2.88 ppm se observan dos señales dobles con $J = 5.1$ Hz correspondientes a los protones base de epóxido H-9a y H-9b, en 2.92 ppm se observa una señal séptuple con $J = 7.0$ Hz para el protón de isopropilo H-2', en 1.36 ppm se observaron una señal doble con $J = 7.0$ Hz que integra para seis protones correspondientes a los metilos de isopropilo de las posiciones H-3' y H-4'.

En el espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 16**) se observan en 190.7 ppm la señal del carbonilo de aldehído C-7, en 174.9 y 166.2 ppm se tienen las señales de carbonilo de ésteres C-1' y C-1'', respectivamente, en 149.4 ppm se observa la señal para un carbono cuaternario base de oxígeno de la posición C-3, en 145.9 y 116.9 ppm se ubican las señales de carbonos de doble enlace C-3'' y C-2'', entre 137.5 y 123.3 ppm se localizan las señales de los carbonos aromáticos restantes, en 65.3 ppm se observa la señal para el carbono C-10 base de cinamato, mientras que en 57.0 ppm se encuentra la señal para el carbono C-8 base de epóxido, en 51.0 ppm se localiza la señal para C-9 base de epóxido, en 34.2 ppm se observa la señal para el carbono C-2' base de isopropilo, en 18.9 y 18.8 ppm se localizan las señales para los carbonos pertenecientes a los metilos de isopropilo C-3' y C-4', respectivamente. Los datos espectroscópicos fueron idénticos a los del areolal (**13**), reportado anteriormente por Hernández *et al.* en 1986.³⁰

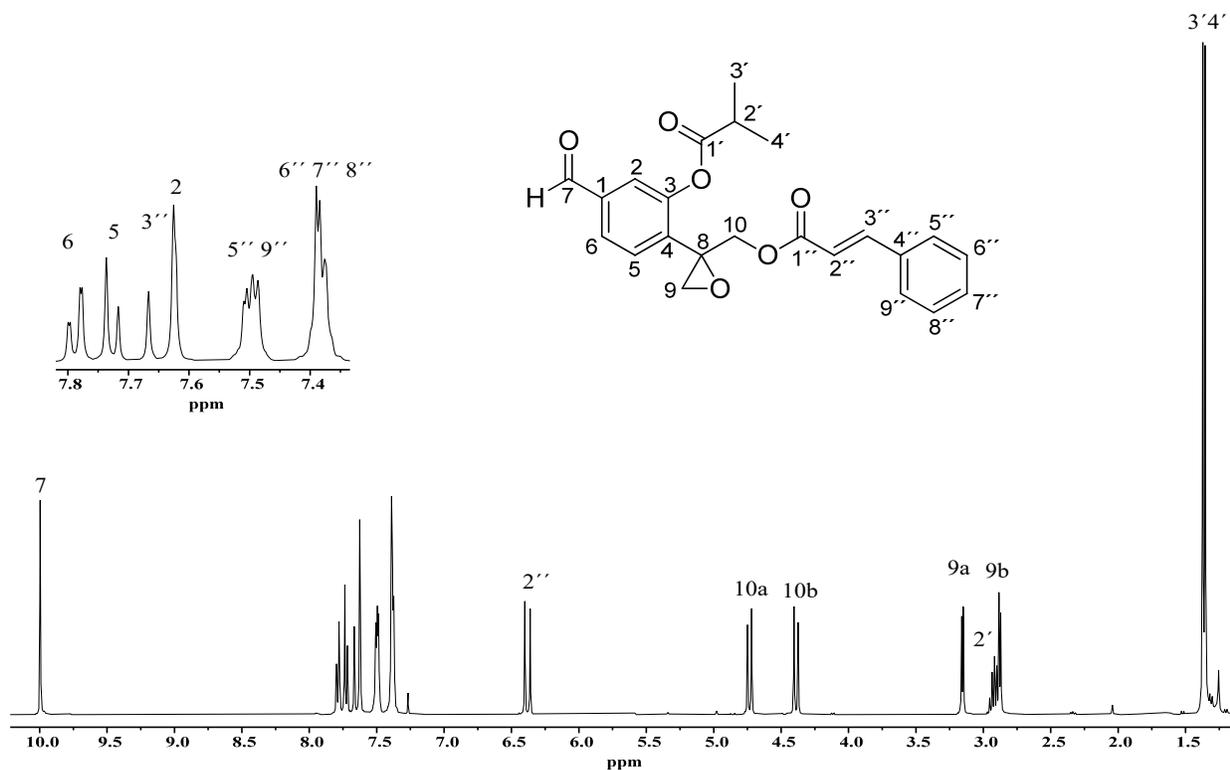


Figura 15. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 de areolal (13)

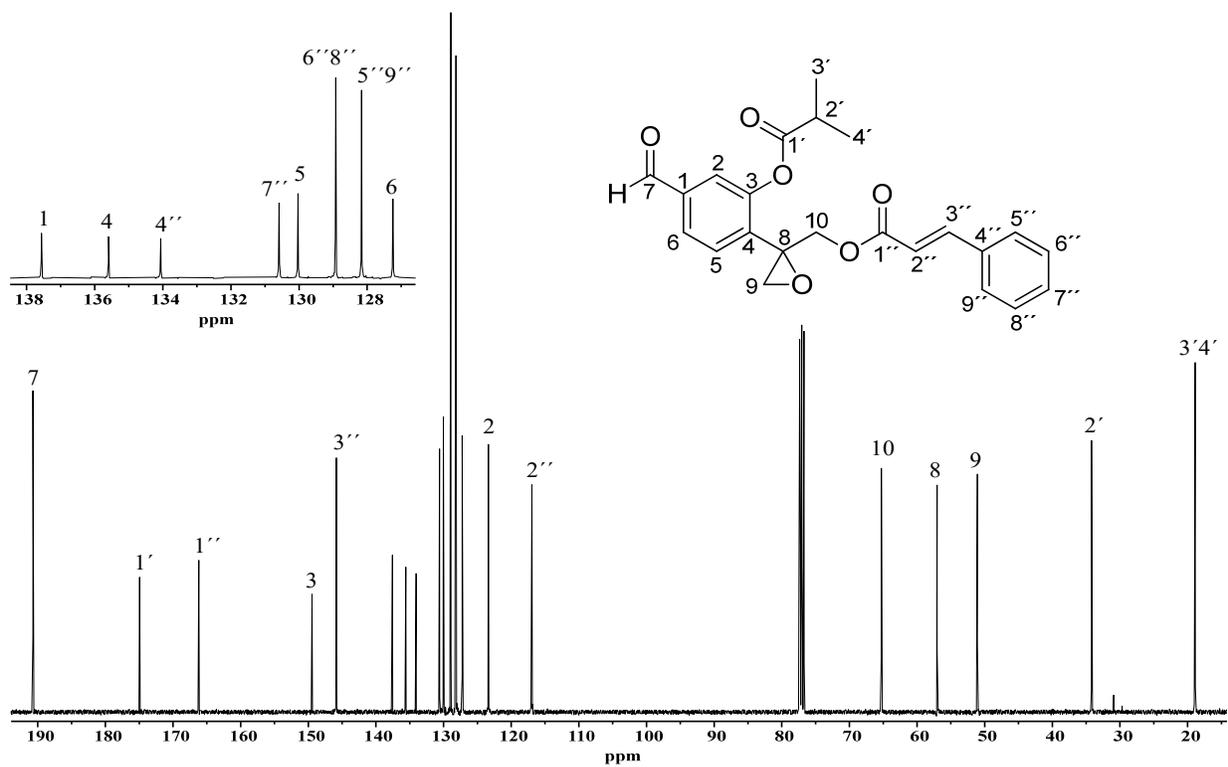


Figura 16. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz en CDCl_3 de areolal (13)

Una vez aislados los compuestos mayoritarios **7** y **13** se procedió a realizar pruebas preliminares del comportamiento de los epoxitimoles en DCE, para esto primeramente se evaluó la pureza enantiomérica de estos compuestos de acuerdo con la metodología del grupo de trabajo²⁸, mediante el análisis de RMN de ¹H utilizando el reactivo de solvatación quiral (*S*)-BINOL. En esta determinación se observaron los cambios en las señales dobles correspondientes a los protones cercanos al centro estereogénico H-10a y H-10b. Para el compuesto **7** se observa que las señales solamente presentan un ligero cambio en su desplazamiento químico por lo que se demostró que el compuesto es enantioméricamente puro (**Figura 17b**), mientras que en el compuesto **13** se observó el desdoblamiento de la señal H-10b cuya integración demostró que el compuesto existe como mezcla escalémica de proporción 91:9 (ee 82%) (**Figura 17d**).

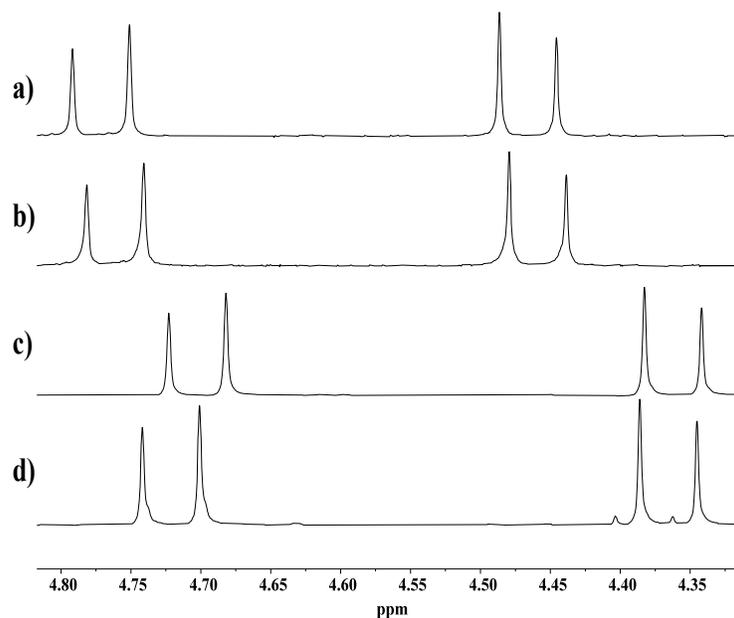


Figura 17. Comparación de espectros de RMN de ¹H de a) **7** y c) **13** con su variante RMN de ¹H-BINOL b) **7** y d) **13** para la determinación de la pureza enantiomérica

Establecida la proporción enantiomérica de los compuestos se procedió a medir los espectros de UV y DCE correspondientes. Primero se preparó una solución madre con 1 mg de compuesto en 1 mL de EtOH, a partir de esta se prepararon diluciones de 5, 10, 15, 20 y 25 $\mu\text{g/mL}$ en EtOH. Al comparar las distintas concentraciones se determinó 20 $\mu\text{g/mL}$ como concentración ideal para el compuesto **7** y 10 $\mu\text{g/mL}$ para el compuesto **13**, ya que en estas concentraciones se observaron valores cercanos a 0.8 en su absorbancia. El espectro de DCE (**Figura 18**) del

compuesto **7** mostró una transición electrónica principal en aproximadamente 226 nm y transiciones menores en 255 y 274 nm, mientras que en su espectro de UV (**Figura 18**) mostró dos absorciones principales en 230 y 275 nm. El compuesto **13** en su espectro de DCE (**Figura 19**) mostró 4 transiciones electrónicas principales alrededor de 255, 262, 269 y 297 nm, mientras que en el espectro de UV (**Figura 19**) se observan dos absorciones en 247 y 272 nm.

Al comparar los espectros de DCE de **7** y **13** se logró observar mejores resultados para el espectro del epoxitimol **13** ya que presenta un mayor número de transiciones electrónicas entre 220 a 420 nm, que es la región del espectro electromagnético utilizada para este estudio. Estas diferencias en el número de transiciones observadas se atribuyen principalmente a los diferentes grupos cromóforos esterificados en el C-10 adyacente al centro estereogénico, teniendo para **7** un benzoato que, de acuerdo con la literatura presenta absorciones en UV en longitudes menores a los 220 nm³². En cambio, **13** presenta un grupo cinamato el cual, según los reportes, suele tener absorciones de UV en aproximadamente 270 nm,³³ lo que hace más factible que derivados con esta función muestren transiciones de DCE en la región del espectro utilizada para este estudio.

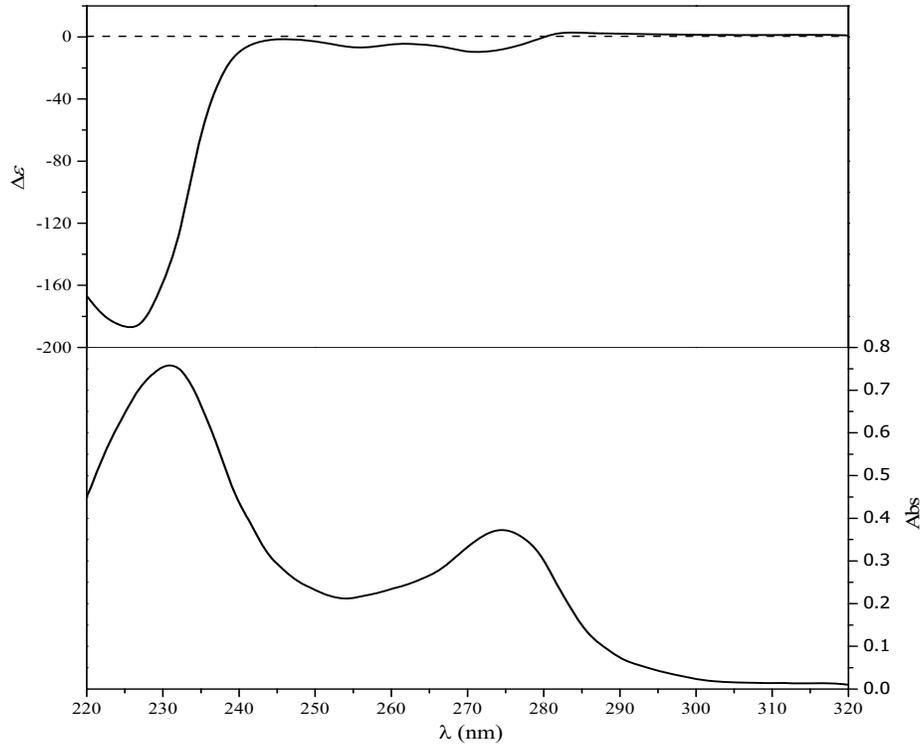


Figura 18. Espectro de DCE (trazo superior) y de UV (trazo inferior) del epoxitimol 7

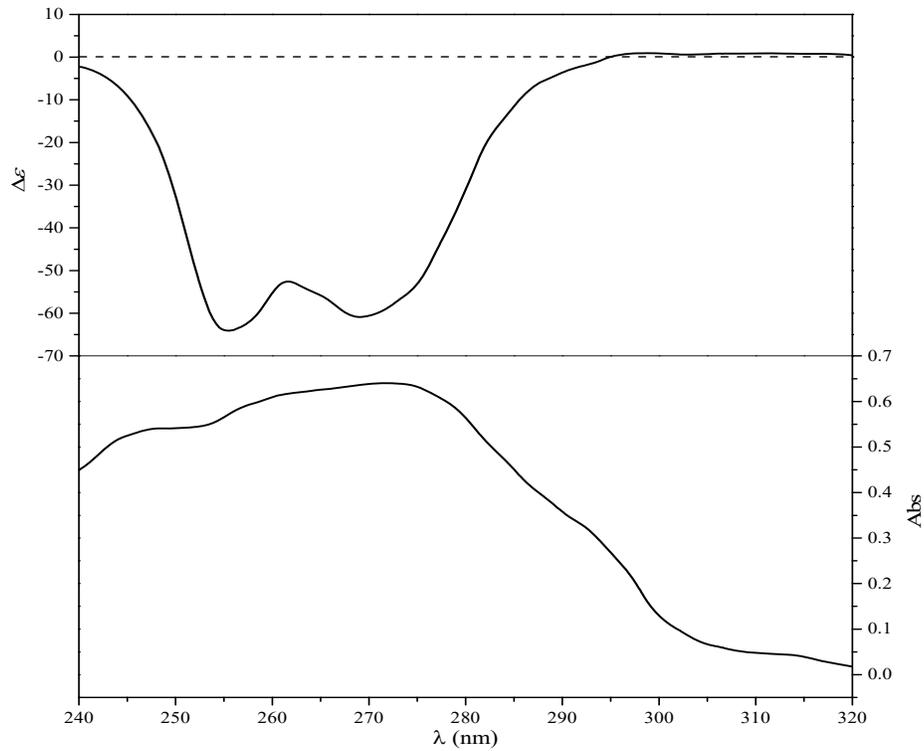


Figura 19. Espectro de DCE (trazo superior) y de UV (trazo inferior) del epoxitimol 13

Debido a que los compuestos con grupo cinamato presentaron mejores resultados en su espectro de DCE se continuó trabajando con *P. areolare* ya que es más probable la obtención de este tipo de epoxitimoles en dicha especie vegetal. El extracto hexánico de raíces se sometió a cromatografía empleando gel de sílice como fase estacionaria y mezclas de hexanos-AcOEt en polaridad ascendente como fase móvil. En la polaridad hexanos-AcOEt (3:2) se obtuvo una miel amarilla, que al ser analizada por RMN de ^1H (**Figura 20**), muestra las señales típicas de los grupos isobutirato, cinamato y anillo de epóxido, mientras que las señales del anillo de timol muestran un patrón de triple sustitución, observando en 7.41 ppm una señal doble con $J = 7.9$ Hz asignada al hidrógeno H-5, en 7.07 ppm una señal doble de dobles con $J = 7.9$ y 1.7 Hz asignada a H-6, una señal simple ancha en 6.89 ppm asignada al hidrógeno H-2, además en 2.36 ppm se observa una señal simple del metilo CH_3 -7, dichos datos corresponden con los del isobutirato de 10-cinamoiloxi-8,9-epoxitimilo (**14**) reportado por Tamayo-Castillo *et al.* en 1988.³⁴

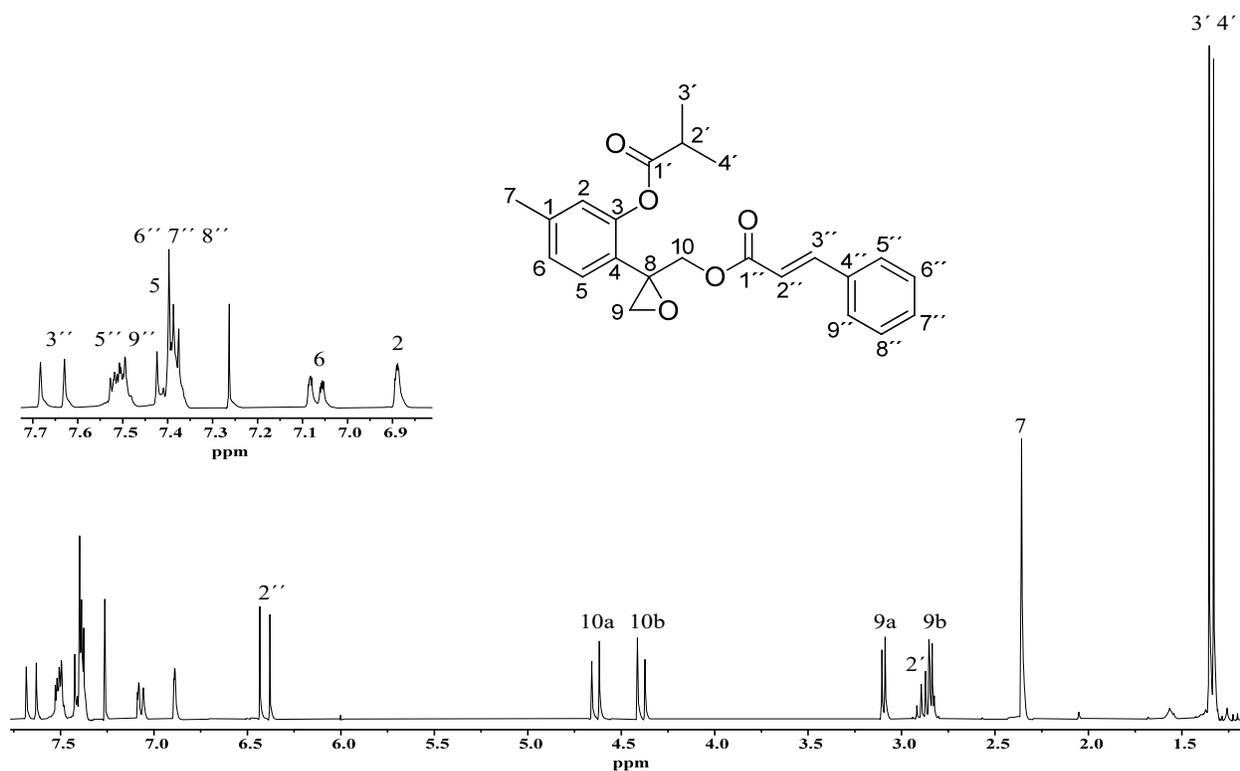


Figura 20. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz en CDCl_3 de isobutirato de 10-cinamoiloxi-8,9-epoxitimilo (**14**)

Continuando con el análisis químico de *P. areolare* se procedió a obtener el extracto de CH_2Cl_2 de flores, para lo cual las flores secas se maceraron utilizando diclorometano como disolvente durante 3 días.

Los extractos totales se analizaron preliminarmente por RMN de ^1H (**Figura 21**) observándose señales típicas de epoxitimol, entre 7.90 y 7.30 ppm de protones aromáticos, entre 6.40 y 6.30 ppm se tienen señales para protones vinílicos, entre 4.80 y 4.40 ppm se encontraron las señales que corresponden a los protones base de oxígeno del sistema AB de CH_2 -10. En 3.20 y 2.80 ppm se observaron señales pertenecientes a la base de epóxido CH_2 -9.

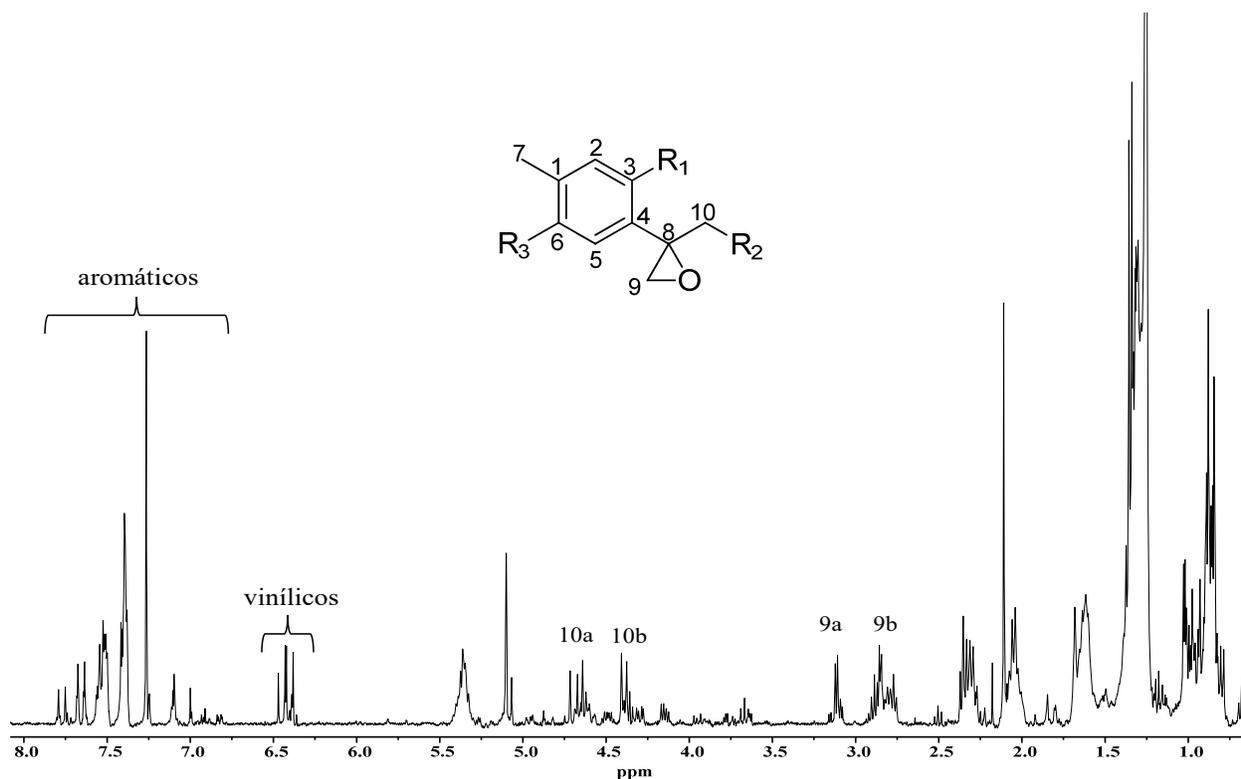


Figura 21. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 del extracto de CH_2Cl_2 de flores de *P. areolare*

El extracto de flores se sometió a cromatografía empleando gel de sílice como fase estacionaria y mezclas de hexanos-AcOEt en polaridad ascendente como fase móvil. En la polaridad hexanos-AcOEt (7:3) se obtuvo una miel amarilla la cual fue sometida a análisis por RMN de ^1H (**Figura 22**) donde en su espectro presenta señales propias de un epoxitimol con funciones isobutirato y cinamato. Las señales del anillo de timol se observan como una señal doble en 7.52 con $J = 7.9$ Hz asignada al hidrógeno H-5, en 7.25 una señal doble de dobles con $J = 7.9$ y 1.7 Hz para el hidrógeno H-6 y una señal doble con $J = 1.7$ Hz en 7.09 ppm asignada al hidrógeno H-2, además en 5.10 ppm se observó una señal simple del metileno CH_2 -7 y en 2.10 ppm una señal simple para el metilo del acetato CH_3 -2''', dichos datos corresponden con los del isobutirato de 7-acetoxi-10-cinamoiloxi-8,9-epoxitimilo (**15**) reportado por Hernández *et al.* en 1986.³⁰

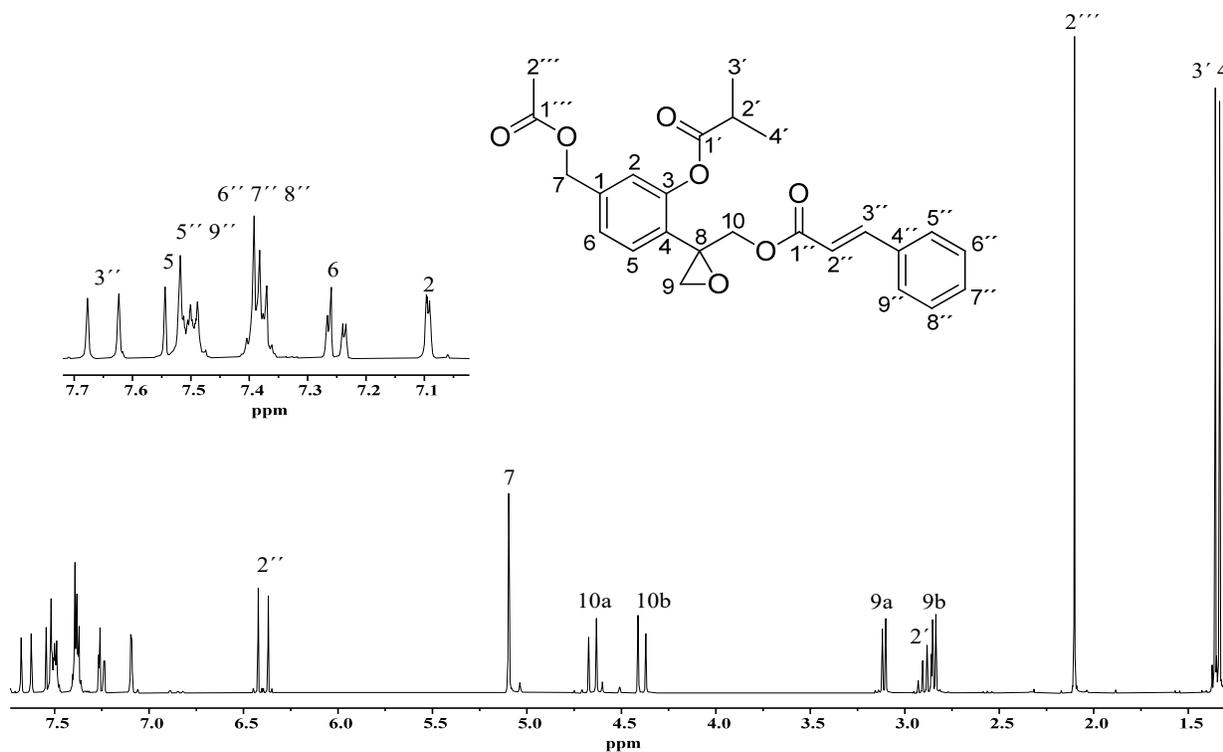


Figura 22. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz en CDCl_3 de isobutirato de 7-acetoxi-10-cinamoiloxi-8,9-epoxitimilo (**15**)

Continuando con la cromatografía, en la polaridad hexanos-AcOEt (3:2) se obtuvo una miel amarilla en la cual al observar su espectro de RMN de ^1H (**Figura 23**) muestra los patrones de señales de un epoxitimol con una trisustitución de su anillo aromático al igual que patrones típicos para los grupos cinamato e isobutirato. En 4.68 ppm una señal simple que integra para dos hidrógenos correspondiente a la señal del metileno base de alcohol CH_2 -7, estos datos corresponden a los reportados por Hernández *et al.* en 1986 para el isobutirato de 10-cinamoiloxi-7-hidroxi-8,9-epoxitimilo (**16**).³⁰

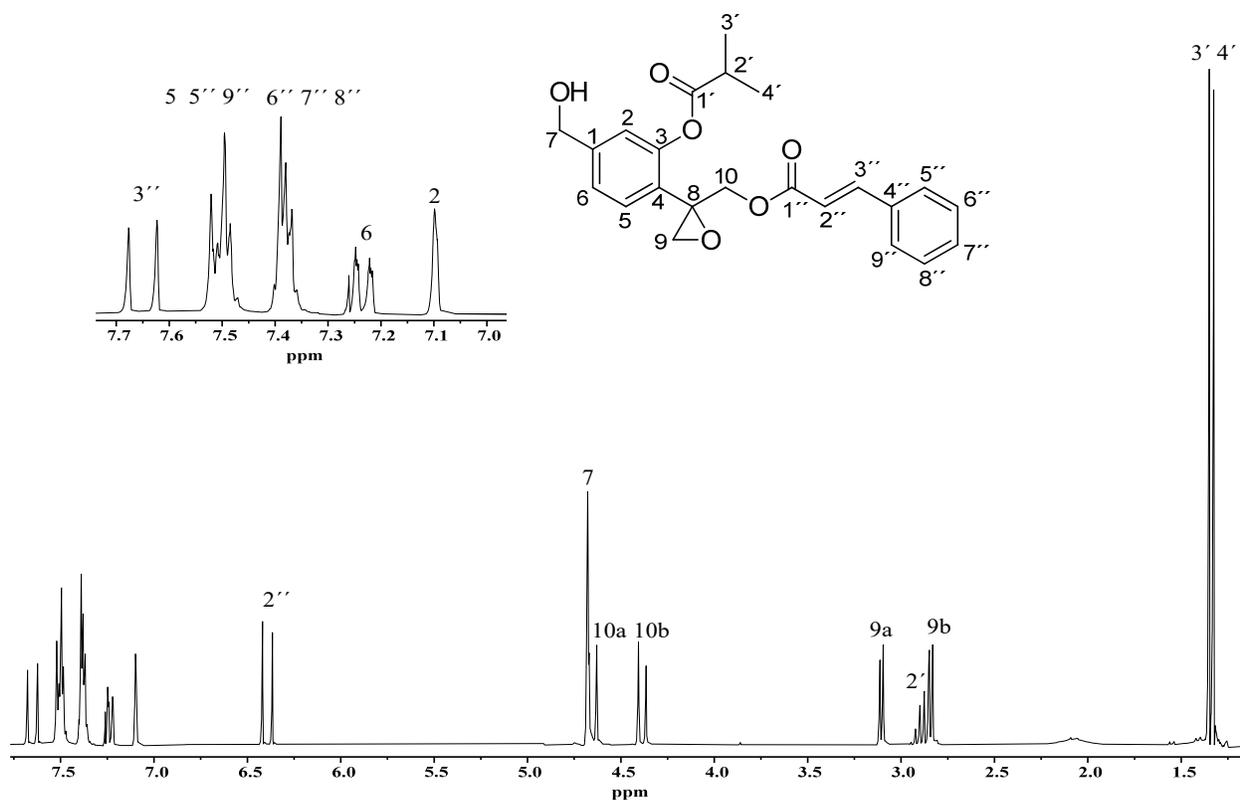


Figura 23. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz en CDCl_3 de isobutirato de 10-cinamoiloxi-7-hidroxi-8,9-epoxitimilo (**16**)

En la misma polaridad se obtuvo una miel amarilla que en su espectro de RMN de ^1H (**Figura 24**), muestra en 7.66 y 6.41 ppm las señales dobles con de $J = 16.0$ Hz correspondiente a los hidrógenos vinílicos H-3' y H-2' del grupo cinamato, en 7.51 y 7.39 ppm se encuentran dos señales múltiples que integran para dos y tres protones respectivamente correspondientes a los hidrógenos aromáticos del anillo del cinamato, en 7.11 y 7.00 ppm se tienen dos señales simples que integran cada una para un protón, lo que sugiere un anillo de timol tetrasustituido, y se asignan a H-5 y H-2, respectivamente. En 5.06 ppm se observa una señal simple que integra para dos hidrógenos y se asigna al metileno CH_2 -7. Las señales de los hidrógenos H-10a y H-10b correspondientes a las bases de ésteres se observan en 4.64 y 4.38 ppm como señales dobles cada una con constante de acoplamiento de $J = 12.2$ Hz, en 3.08 y 2.83 ppm se observan otras dos señales dobles con $J = 5.2$ Hz correspondiente a los hidrógenos bases de epóxido H-9a y H-9b. La señal séptuple en 2.85 ppm con $J = 7.0$ Hz corresponde al protón base de isopropilo H-2', una señal simple en 2.11 ppm que integra para tres protones fue asignada al metilo de acetato 2'', en 1.33 ppm se observa la señal doble con $J = 7.0$ Hz, que integró para seis hidrógenos correspondiente a los metilos CH_3 -3'' y CH_3 -4'' del isopropilo.

El espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 25**) muestra en 175.6, 173.6 y 166.3 ppm las señales de los carbonilos de los ésteres C-1', C-1'' y C-1''', respectivamente. De 153.2 a 117.2 ppm se observan las señales de los carbonos de los anillos aromáticos y del doble enlace del cinamato. La señal del carbono CH_2 -10 base del éster cinamato se encuentra en 65.3 ppm. La señal del carbono metilénico base de acetato C-7 se observa en 62.4 ppm mientras que el metilo del acetato C-2''' se observa en 20.9 ppm. En 56.8 y 50.9 ppm se observan las señales de los carbonos base de epóxido C-8 y C-9, respectivamente, mientras que en 34.1, 19.0 y 18.9 ppm se observaron las señales del grupo isopropilo. Con estos datos se propone la presencia del isobutirato de 7-acetoxi-10-cinamoiloxi-6-hidroxi-8,9-epoxitimilo (**17**) del cual no se encuentran reportes previos en la literatura.

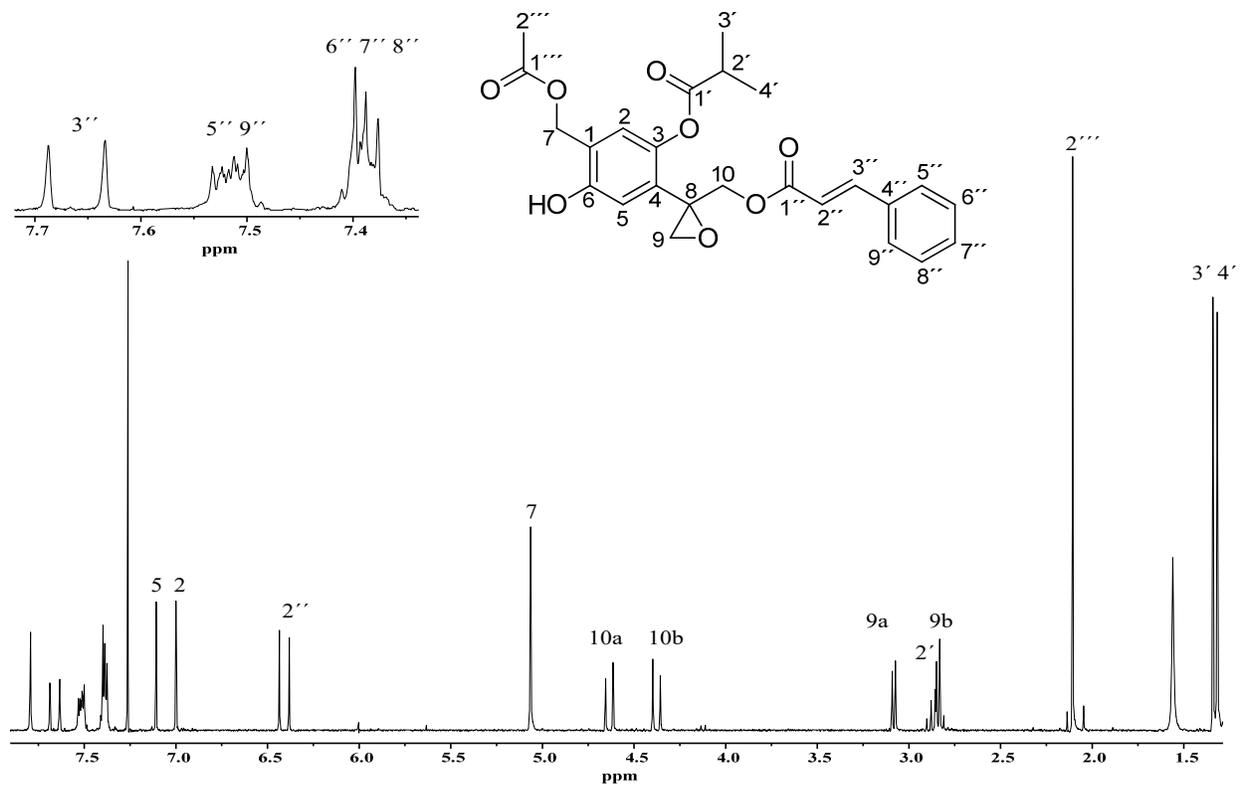


Figura 24. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz en CDCl_3 de isobutirato de 7-acetoxi-10-cinamoiloxi-6-hidroxi-8,9-epoxitimilo (17)

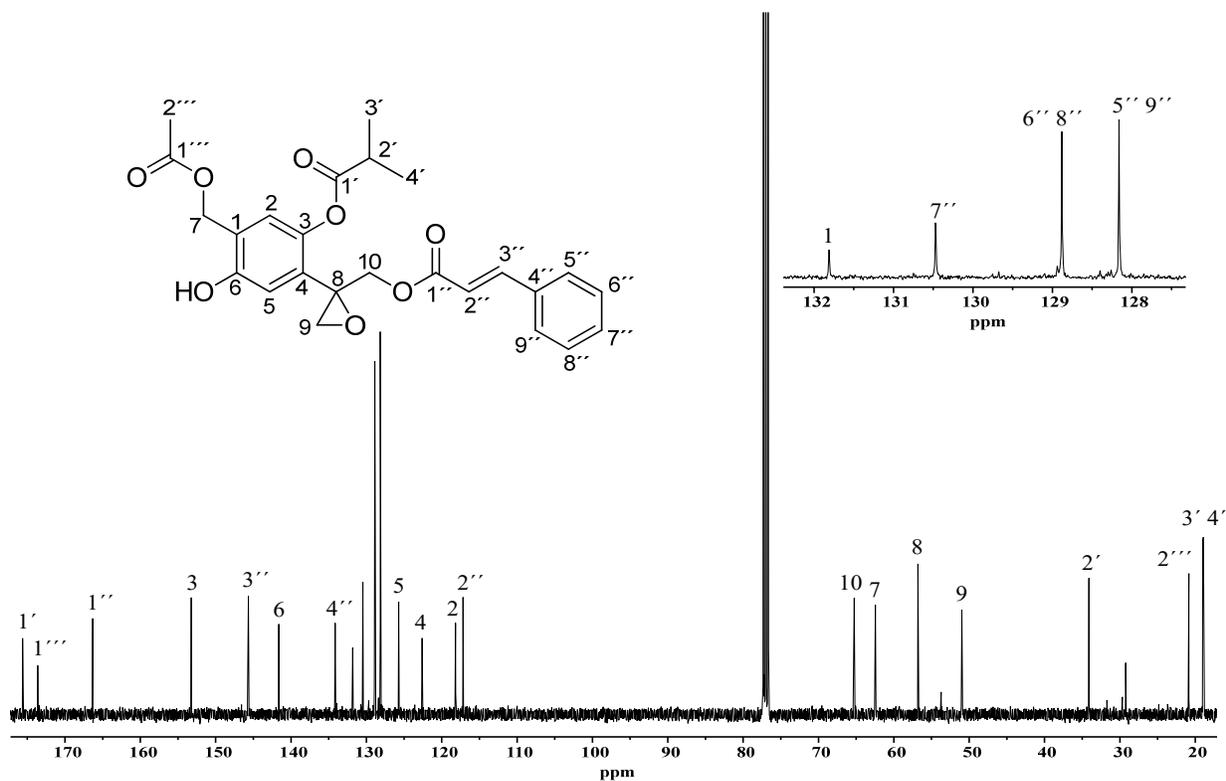


Figura 25. Espectro de RMN de ^{13}C a 75.4 MHz en CDCl_3 de isobutirato de 7-acetoxi-10-cinamoiloxi-6-hidroxi-8,9-epoxitimilo (17)

De igual forma en la polaridad hexanos-AcOEt (3:2) se obtuvo una miel amarilla que al ser analizada por RMN de ^1H (**Figura 26**), muestra en 7.66 y 6.40 ppm dos señales dobles con constante de acoplamiento de $J = 16.0$ Hz correspondiente a los hidrógenos vinílicos H-3' y H-2' del grupo cinamato. En 7.51 y 7.39 ppm se encuentran dos señales múltiples correspondientes a los hidrógenos aromáticos del anillo del cinamato. Para el anillo de timol se observa en 6.98 ppm una señal doble con $J = 3.1$ Hz para el hidrógeno H-5, la señal doble en 6.93 ppm con $J = 8.8$ Hz se asigna al hidrógeno H-2, en 6.81 ppm se observó una señal doble de dobles con $J = 8.8$ y 3.1 Hz del hidrógeno H-1, la cual sugiere la ausencia del metilo de la posición 7 del esqueleto de timol. Las señales dobles con constante de acoplamiento de $J = 12.2$ Hz observadas en 4.67 y 4.39 ppm corresponden a los hidrógenos H-10a y H-10b bases de ésteres, en 3.10 y 2.85 ppm se observaron dos señales dobles con $J = 5.4$ Hz correspondiente a los hidrógenos H-9a y H-9b. En 2.85 ppm se observa una señal séptuple con $J = 7.1$ Hz correspondiente al protón base de isopropilo H-2'', en 1.33 ppm se observa la señal doble con $J = 7.1$ Hz, que integra para seis hidrógenos correspondiente a los metilos CH₃-3'' y CH₃-4'' del isopropilo.

En el espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 27**) se observan en 175.8 y 166.4 ppm dos señales de carbonilos C-1' y C-1'', respectivamente. De 153.5 a 115.5 ppm se observan las señales de los carbonos de los anillos aromáticos y del doble enlace del cinamato. La señal del carbono metilénico C-10 base del éster cinamato se encuentra en 65.0 ppm. En 567.0 y 51.0 ppm se observan las señales de los carbonos base de epóxido C-8 y C-9, respectivamente, mientras que en 19.0 y 18.9 ppm se observan las señales de los metilos del isopropilo. Con estos datos se propone la presencia del compuesto isobutirato de 10-cinamoiloxi-8,9-epoxi-6-hidroxi-7-nortimilo (**18**) que no presenta reportes anteriores en la literatura.

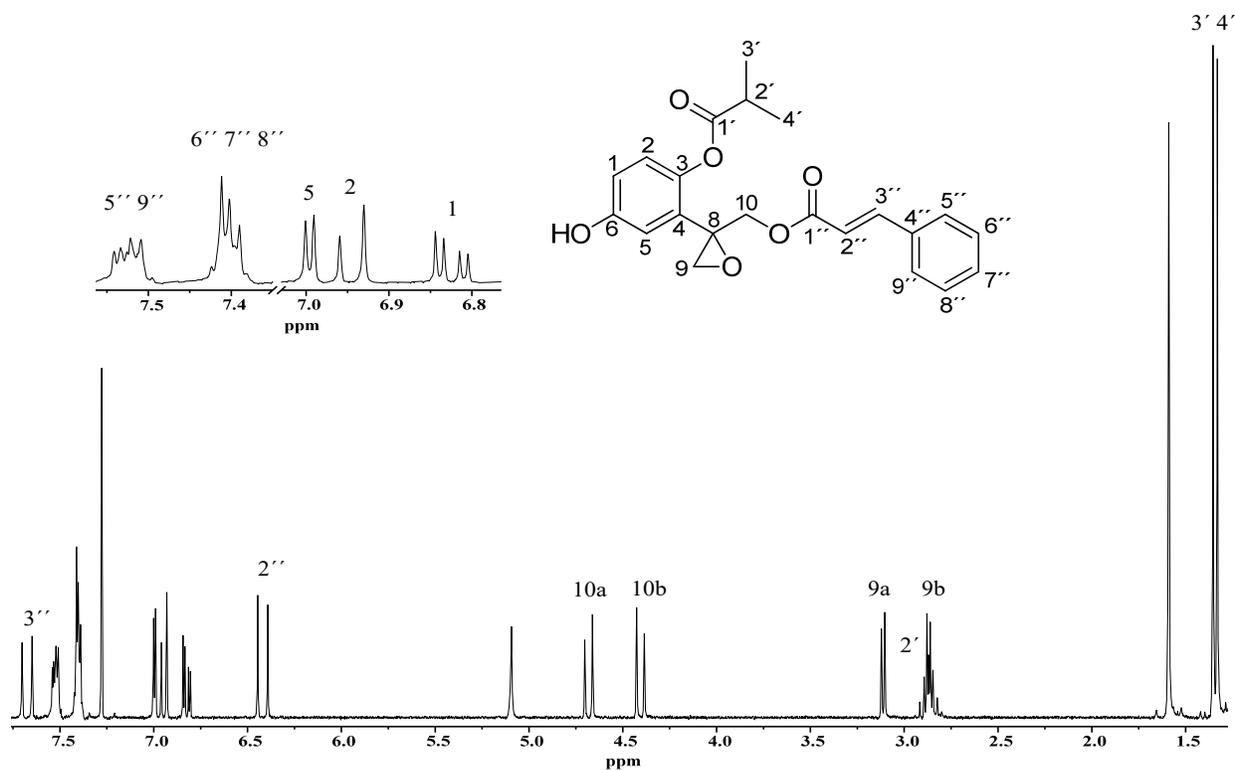


Figura 26. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz en CDCl_3 de isobutirato de 10-cinamoiloxi-8,9-epoxi-6-hidroxi-7-nortimilo (**18**)

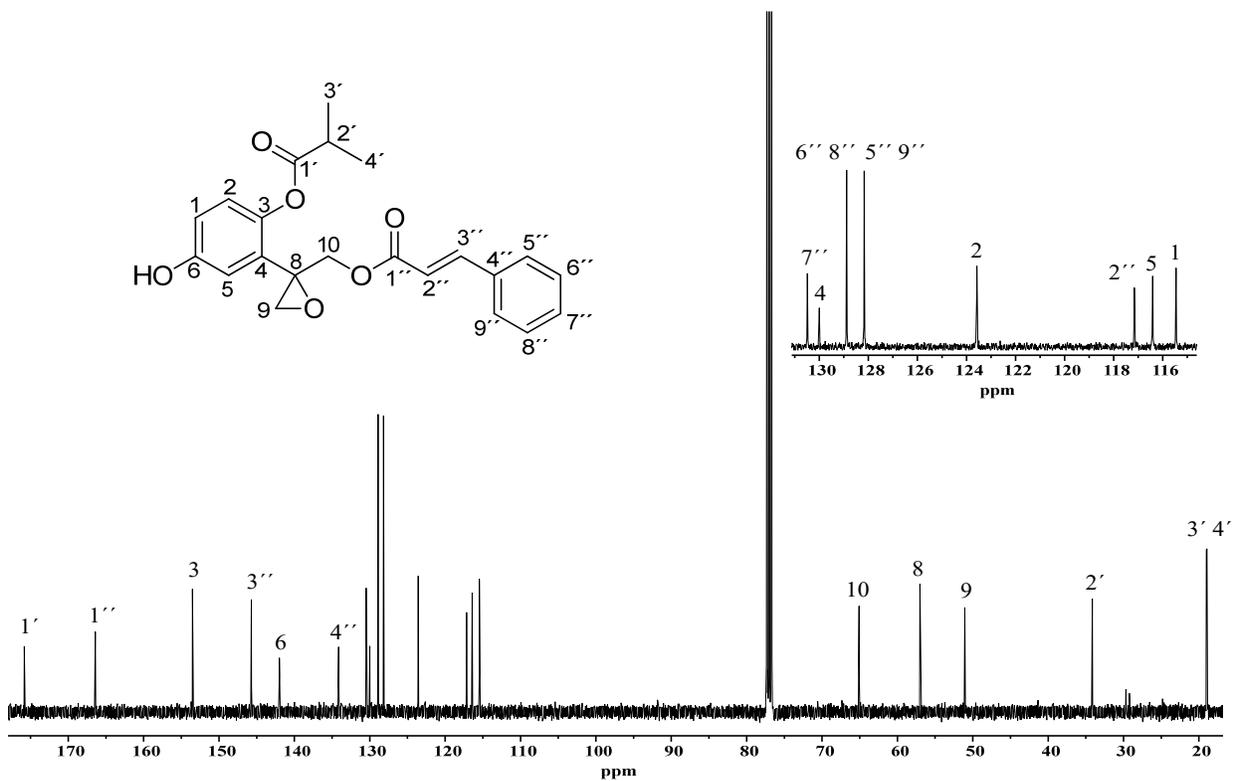


Figura 27. Espectro de RMN de ^{13}C a 75.4 MHz en CDCl_3 de isobutirato de 10-cinamoiloxi-8,9-epoxi-6-hidroxi-7-nortimilo (**18**)

Purificados los compuestos **14-18** se determinó la pureza enantiomérica mediante el método de análisis de RMN de ^1H en conjunto con (*S*)-BINOL, el cual ha sido usado satisfactoriamente en la diferenciación enantiomérica de isoflavonoides,³⁵ alkaloides³⁶ y epoxitimoles.²⁸ Para los compuestos **14-16** se observó desdoblamiento de las señales dobles correspondientes a los protones H-10a y H-10b. La intensidad de estas señales demostró que los compuestos se encuentran como mezclas escalémicas de proporciones 73:27 (ee 46%), 90:10 (ee 80%), 82:18 (ee 64%), respectivamente. Los derivados **17** y **18** mostraron una pureza enantiomérica de 100% ya que las señales no mostraron desdoblamientos (**Figura 28**).

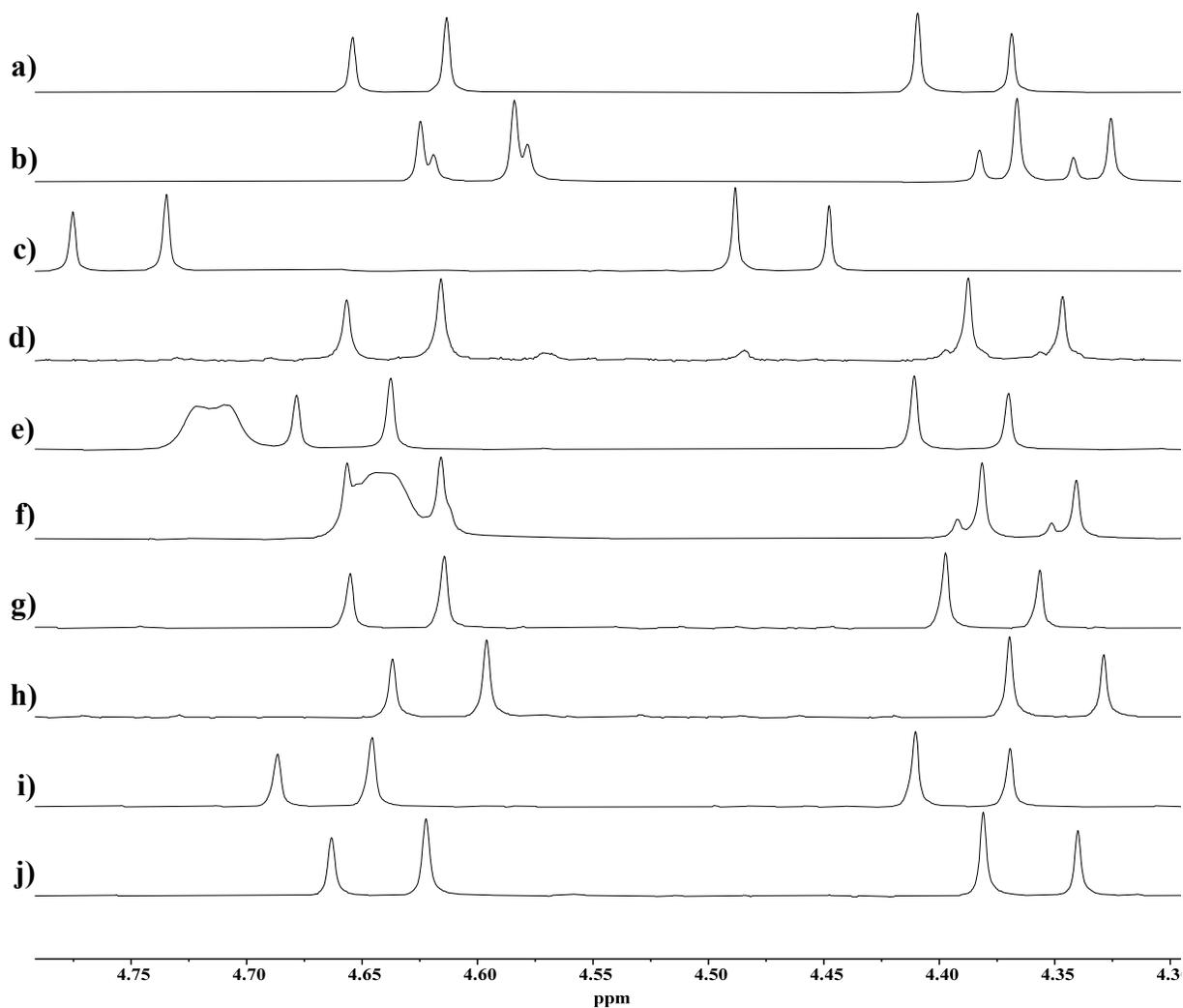


Figura 28. Comparación de espectros de RMN de ^1H de a) **14**, c) **15**, e) **16**, g) **17**, i) **18** con su variante RMN de ^1H -BINOL b) **14**, d) **15**, f) **16**, h) **17**, j) **18** para la determinación de la pureza enantiomérica

Establecida la relación enantiomérica de los derivados de timol **14-18** se procedió a obtener los espectros de UV y DCE, como primer paso se preparó una solución madre de 1 mg/mL de cada compuesto con EtOH como disolvente. A partir de ella, se prepararon diluciones a la concentración óptima previamente establecida con **13** que fue de 10 µg/mL, se inyectó 1 mL de EtOH como línea base en el detector de DCE, seguido de 1 mL de disolución para realizar las mediciones. Los datos de salida se adquirieron en el programa WinDag y se procesaron en el programa Excel. Todos los espectros de DCE mostraron efectos Cotton negativos en las regiones de 255-258 y 261-263 nm asociadas con las transiciones $\pi-\pi^*$ de la unidad de epoxiestireno,³⁷ mientras que las transiciones $\pi-\pi^*$ del fragmento cinamato se relacionaron con los efectos Cotton negativos en la región de 269-272 nm. Los espectros también mostraron efectos Cotton positivos débiles en 296-297 nm para la transición $n-\pi^*$ del grupo cinamato (**Figura 29**).³³ Por su parte sus espectros UV mostraron una absorción principal alrededor de 273 nm correspondiente con transición electrónica $\pi-\pi^*$ los anillos aromáticos³⁸ del timol y cinamato. En las tablas 1 y 2 se resumen los valores observados en los espectros de DCE y UV.

Tabla 1. Principales transiciones electrónicas observadas en espectros de DCE de **13-18**

| Compuesto | λ_1 (nm) | $\Delta\epsilon$ | λ_2 (nm) | $\Delta\epsilon$ | λ_3 (nm) | $\Delta\epsilon$ | λ_4 (nm) | $\Delta\epsilon$ |
|-----------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| 13 | 255 | -69.1 | 262 | -52.5 | 269 | -60.0 | 297 | 0.8 |
| 14 | 257 | -21.7 | 262 | -19.4 | 271 | -25.7 | 297 | 3.4 |
| 15 | 258 | -18.1 | 262 | -14.8 | 271 | -19.3 | 296 | 3.5 |
| 16 | 258 | -21.6 | 261 | -18.1 | 270 | -22.9 | 296 | 3.5 |
| 17 | 257 | -13.0 | 263 | -10.2 | 272 | -16.8 | 296 | 2.1 |
| 18 | 258 | -26.3 | 263 | -22.9 | 271 | -33.8 | 296 | 3.5 |

Tabla 2. Absorción máxima observada en espectros de UV de **13-18**

| Compuesto | λ (nm) | Log ϵ | Transición |
|-----------|----------------|----------------|-------------|
| 13 | 272 | 0.64 | $\pi-\pi^*$ |
| 14 | 272 | 0.53 | $\pi-\pi^*$ |
| 15 | 273 | 0.43 | $\pi-\pi^*$ |
| 16 | 272 | 0.48 | $\pi-\pi^*$ |
| 17 | 274 | 0.55 | $\pi-\pi^*$ |
| 18 | 273 | 0.65 | $\pi-\pi^*$ |

Los espectros de DCE y UV (Figura 29) de los derivados **14-17** muestran el mismo patrón de comportamiento que **13**, compuesto cuya CA fue previamente establecida mediante DCV,³¹ por esta razón es posible inferir que la CA del único centro estereogénico presente en la posición C-8 de estos derivados también es *S*.

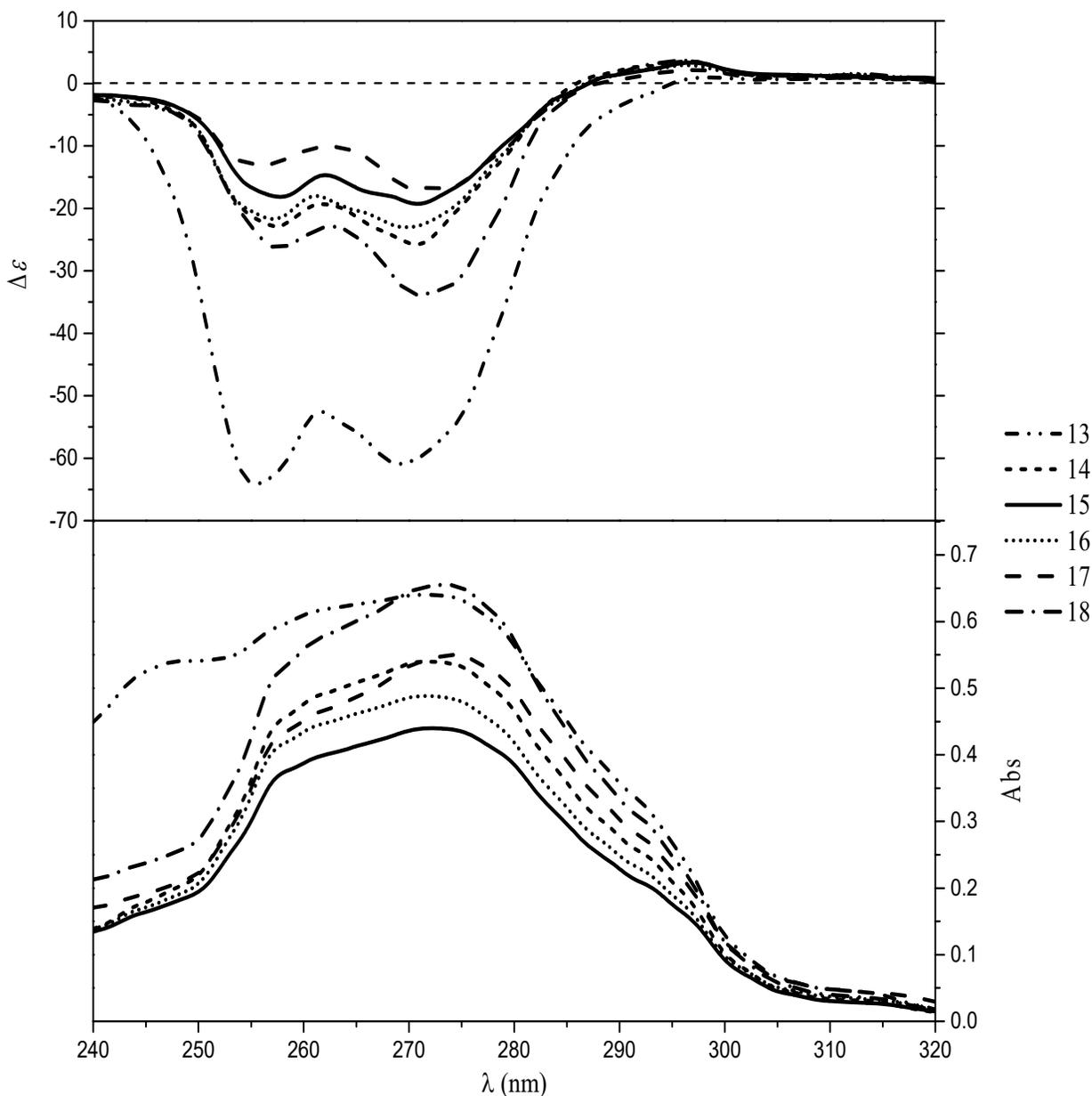


Figura 29. Comparación de espectros de DCE (trazos superiores) y de UV (trazos inferiores) del epoxitimoles **13-18**

Cálculos DCE

En la literatura se tienen diversos reportes de metodologías de cálculo de espectros de DCE, sin embargo, varias de estas son complicadas y requieren de numerosos pasos de cálculo,²⁰ por esta razón se propone plantear una metodología más accesible lo que repercutiría en un ahorro de tiempo de cálculo. Para esto se comenzó usando como modelo el compuesto **7** cuya CA es conocida por estudios de DCV y difracción de rayos X de monocristal. Se modeló el enantiómero (*S*)-**7** y se llevó a cabo una búsqueda sistemática de conformeros de acuerdo con lo reportado por el grupo de trabajo,²⁸ mediante el programa Spartan'04, utilizando mecánica molecular y el campo de fuerza MMFF94,³⁹ considerando un límite de energía de 10 kcal/mol obteniéndose 139 conformeros. Todos los conformeros fueron examinados para descartar duplicados. Posteriormente, fue optimizada la energía de los conformeros con el nivel de teoría DFT B3LYP/6-31G (d), se seleccionaron aquellos conformeros ubicados en una ventana energética de 0-3 kcal/mol. Estos conformeros fueron sometidos a una optimización de su geometría y cálculo de frecuencias a un nivel de teoría PBE/DGDZVP utilizando el programa Gaussian 09, arrojando 31 conformeros dentro del rango de 0-2 kcal/mol (**Figura 30**). Se verificó la ausencia de frecuencias imaginarias en todas las estructuras de energía mínima, y se emplearon sus energías libres relativas para calcular su población de Boltzmann (**Tabla 3**).

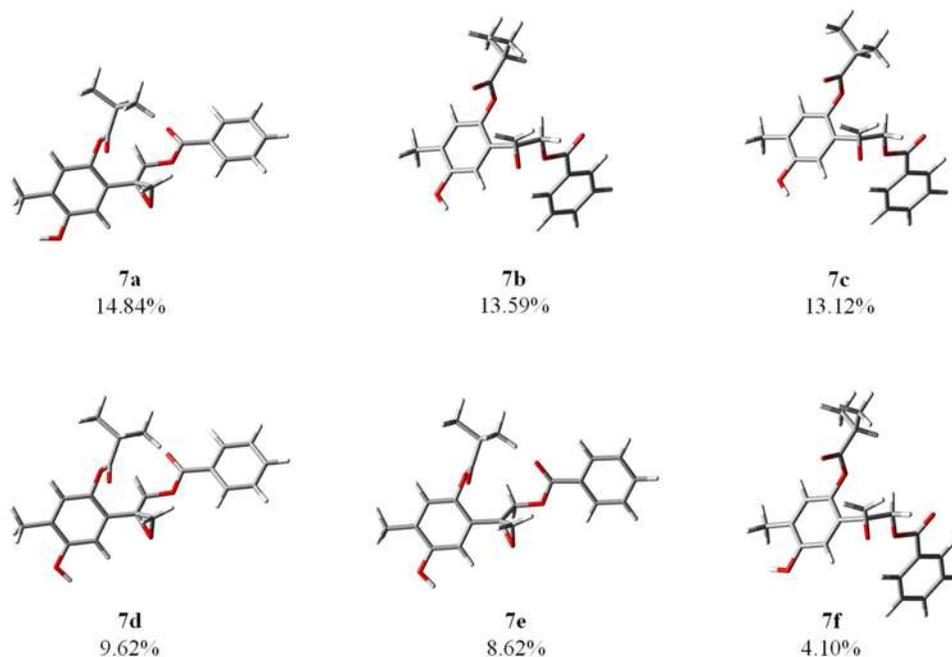


Figura 30. Conformeros de menor energía de **7** representando el 64% de la población conformacional

Tabla 3. Análisis termoquímico de isobutirato de (+)-(8*S*)-10-benzoiloxi-6-hidroxi-8,9-epoxitimilo (**7**) a nivel PBE/DGDZVP

| Confórmero | $\Delta E_{\text{MMFF}}^{\text{a}}$ | %MMFF ^b | $\Delta E_{\text{DFT}}^{\text{c}}$ | %DFT ^d | $\Delta G_{\text{opt}}^{\text{e}}$ | %opt ^f |
|------------|-------------------------------------|--------------------|------------------------------------|-------------------|------------------------------------|-------------------|
| 7a | 4.5048 | 0.0448 | 5.7642 | 0.0045 | 0.0000 | 14.84 |
| 7b | 2.7878 | 0.7982 | 4.1686 | 0.0652 | 0.0527 | 13.59 |
| 7c | 3.1752 | 0.4168 | 5.3763 | 0.0086 | 0.0734 | 13.12 |
| 7d | 3.7100 | 0.1700 | 0.0000 | 70.9743 | 0.2585 | 9.62 |
| 7e | 3.0774 | 0.4911 | 6.1482 | 0.0024 | 0.3238 | 8.62 |
| 7f | 4.1749 | 0.0779 | 7.4435 | 0.0003 | 0.7668 | 4.10 |
| 7g | 2.4957 | 1.3028 | 4.4627 | 0.0398 | 0.8158 | 3.78 |
| 7h | 2.6725 | 0.9685 | 6.1940 | 0.0022 | 0.8189 | 3.76 |
| 7i | 3.5136 | 0.2362 | 6.1358 | 0.0024 | 0.8898 | 3.34 |
| 7j | 4.9988 | 0.0196 | 6.8801 | 0.0007 | 0.9563 | 2.98 |
| 7k | 2.3618 | 1.6311 | 5.2202 | 0.0112 | 1.0310 | 2.63 |
| 7l | 2.7066 | 0.9147 | 6.2609 | 0.0020 | 1.2211 | 1.91 |
| 7m | 4.4600 | 0.0501 | 1.1381 | 10.5207 | 1.3661 | 1.50 |
| 7n | 3.3938 | 0.2888 | 7.5516 | 0.0002 | 1.3837 | 1.46 |
| 7o | 3.1504 | 0.4345 | 5.0159 | 0.0157 | 1.4565 | 1.29 |
| 7p | 3.7344 | 0.1631 | 6.5466 | 0.0012 | 1.5004 | 1.20 |
| 7q | 3.6788 | 0.1791 | 5.7533 | 0.0046 | 1.6008 | 1.01 |
| 7r | 2.5876 | 1.1168 | 5.5871 | 0.0060 | 1.6183 | 0.98 |
| 7s | 3.9092 | 0.1217 | 6.4246 | 0.0015 | 1.6296 | 0.96 |
| 7t | 3.4840 | 0.2483 | 5.8215 | 0.0041 | 1.6874 | 0.88 |
| 7u | 3.5400 | 0.2245 | 0.8137 | 18.1275 | 1.6924 | 0.87 |
| 7v | 3.9068 | 0.1222 | 6.4826 | 0.0013 | 1.6949 | 0.86 |
| 7w | 1.8765 | 3.6811 | 5.4920 | 0.0071 | 1.7476 | 0.79 |
| 7x | 3.7059 | 0.1711 | 5.2016 | 0.0115 | 1.7633 | 0.77 |
| 7y | 4.0636 | 0.0939 | 5.9285 | 0.0034 | 1.8166 | 0.70 |
| 7z | 3.9214 | 0.1192 | 7.0798 | 0.0005 | 1.8706 | 0.64 |
| 7a' | 0.0000 | 85.6996 | 3.5980 | 0.1698 | 1.8775 | 0.64 |
| 7b' | 3.2001 | 0.3997 | 5.9020 | 0.0036 | 1.8775 | 0.64 |
| 7c' | 4.7385 | 0.0303 | 6.2518 | 0.0020 | 1.8781 | 0.64 |
| 7d' | 4.7058 | 0.0320 | 6.2494 | 0.0020 | 1.9164 | 0.60 |
| 7e' | 4.0086 | 0.1030 | 7.1485 | 0.0004 | 1.9202 | 0.59 |

^a Energía relativa en mecánica molecular respecto a **7a'** con $E_{\text{MMFF}} = -53.533$ kcal/mol. ^b Población en % calculada a partir de las energías MMFF según $\Delta E_{\text{MMFF}} \approx -RT \ln K$. ^c Energías relativas en Single-point B3LYP/6-31G (d) respecto a **7d**, $E_{6-31G(d)} = -793707.737$ kcal/mol. ^d Población en % calculada a partir de las energías de B3LYP/6-31G(d) según $\Delta E_{6-31G(d)} \approx -RT \ln K$. ^e Energías libres de Gibbs relativas a **7a** con $G_{\text{PBE/DGDZVP}} = -792638.484$ kcal/mol. ^f Población en % calculada a partir de las energías libres de Gibbs de acuerdo con $\Delta G = -RT \ln K$.

Los conformeros de mínima energía se usaron para calcular el espectro teórico de DCE con el método de teoría de funcionales de la densidad dependiente del tiempo (TD-DFT) en el programa Gaussian 16. Se eligieron cinco funcionales de cálculo de acuerdo a la literatura, siendo estos: B3LYP⁴⁰⁻⁴³ funcional muy popular que generalmente funciona bien, siendo la opción para la mayoría de los cálculos TD-DFT⁴⁴ y que ha presentado buenos resultados en cálculos de DCE para un derivado de timol²⁹; PBE⁴⁵ es un funcional que presenta buenos resultados en el cálculo de propiedades quirópticas y que ha sido usado para calcular espectros de DCV de epoxitimoles^{24, 28, 31}; APFD⁴⁶ funcional de elección en la bibliografía del programa Gaussian⁴⁷; CAM-B3LYP⁴⁸ y WB97XD⁴⁹ funcionales de rango separado que han demostrado ser mejores que los funcionales híbridos en la predicción de propiedades quirópticas.⁵⁰⁻⁵² En cuanto a las bases de cálculo se eligió trabajar con las bases mínimas sugeridas por la literatura, por lo que se usaron bases de doble Z incluyendo funciones polarizadas.^{20, 44}

Los espectros se calcularon tomando en cuenta 20 estados excitados para cada nivel de teoría. Los espectros obtenidos se ponderaron a partir de la población de Boltzmann, utilizando el programa SpecDis,⁵³ ajustándose a un ancho de curva (σ) de 0.33 eV y desplazados en +5 nm (UV shift), ya que de acuerdo a la literatura estos son parámetros que pueden ajustarse para tener una mejor similitud con la curva experimental, dichos parámetros se ajustan típicamente usando valores de entre 0.1 a 0.4 eV para σ y de -30 a +30 nm para UV shift.¹³ Al comparar los espectros teóricos con el experimental (**Figura 31**) se pudo observar que el nivel PBE/DGDZVP no muestra similitud con el espectro experimental, mientras que a los niveles APFD/6-311+** y B3LYP/DGDZVP se observa una buena similitud espectral en la región negativa del espectro pero se sobre estima la transición positiva, además se observó que los espectros son muy similares entre sí a dichos niveles de teoría. Para CAM-B3LYP/DGDZVP y WB97XD/DGDZVP se observó espectros iguales, siendo CAM-B3LYP/DGDZVP el mejor ya que su tiempo de cálculo es tres veces menor, al comparar con el espectro experimental se observa una tendencia muy similar a este, la cual es más evidente al escalar sus intensidades (**Figura 32**). Una vez establecido CAM-B3LYP como mejor funcional de cálculo se aumentaron las bases de cálculo de doble a triple Z, observando que no se tienen cambios significativos (**Figura 32**), por lo que es preferible usar el nivel de cálculo menor.

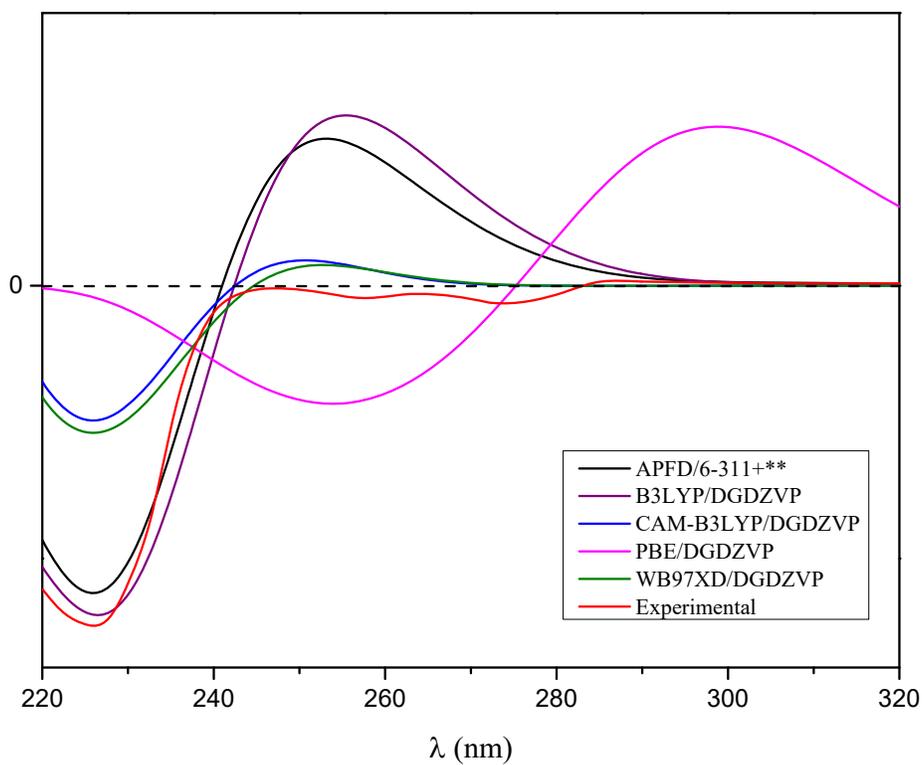


Figura 31. Comparación de espectro experimental y espectros teóricos de DCE de 7

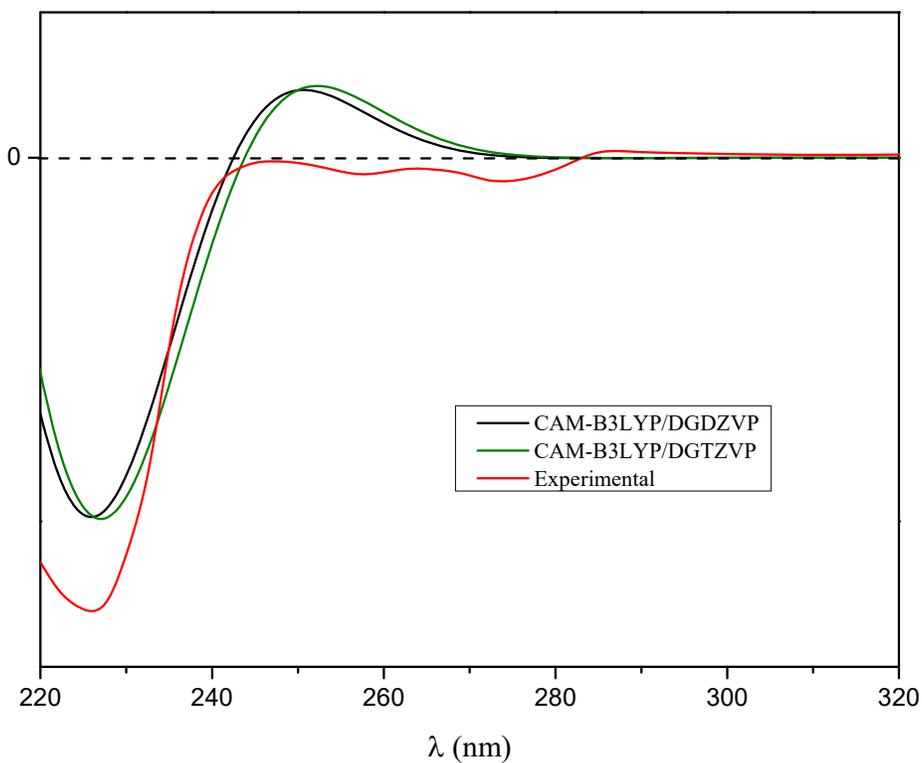


Figura 32. Comparación de espectro experimental de 7 y espectros teóricos de DCE calculados con el funcional CAM-B3LYP

Establecido el mejor nivel de cálculo se procedió a implementar la metodología de cálculo para los compuestos **13-18**; sin embargo, las búsquedas conformacionales preliminares con mecánica molecular arrojaron un número significativamente alto de conformeros para cada compuesto (**Tabla 4**), lo que conllevaría a un tiempo y costo de cálculo muy elevado.

Tabla 4. Población conformacional en mecánica molecular compuestos **13-18**

| Compuesto | Número de conformeros ^a |
|-----------|------------------------------------|
| 13 | 304 |
| 14 | 277 |
| 15 | 393 |
| 16 | 404 |
| 17 | 452 |
| 18 | 394 |

^a Población conformacional calculada con campo de fuerza MMFF94 en un intervalo de 0-10 kcal/mol

Por este motivo se realizó una revisión bibliográfica, donde se encontró que es posible calcular espectros de DCE a partir de derivados o estructuras truncadas que reduzcan el número de conformeros y los tiempos de cálculo. El truncamiento de estructuras consiste en eliminar cadenas laterales flexibles o los fragmentos moleculares que no modifican electrónicamente los cromóforos de un modelo molecular para simplificar la estructura y reducir el número de conformeros que se deben considerar para el cálculo.⁵⁴ Como ejemplo de esto se tiene el ácido dauricroménico, el cual se modificó con una ciclación para reducir la flexibilidad de la molécula⁵⁵ o el caso de la Psammaphisina A donde el espectro de DCE se calculó partir de un modelo truncado de la molécula⁵⁶ y los diterpenoides diméricos, bicunninginas A y B, de los cuales se determinó su CA a partir del cálculo del espectro de DCE de un modelo con cadenas alquílicas truncadas.⁵⁷ En base a lo anterior y tomando en cuenta que los compuestos **13-18** presentan un mismo esqueleto base y mostraron espectros experimentales de DCE con una misma tendencia se decidió realizar el cálculo únicamente para el compuesto **14**, que presenta el menor número de conformeros.

Para obtener el espectro calculado de DCE del compuesto **14** los 277 conformeros obtenidos entre 0-10 kcal/mol con mecánica molecular se optimizaron en su energía con el nivel de teoría DFT B3LYP/6-31G (d). Los conformeros del intervalo de energía de 0-3 kcal/mol se optimizaron en su geometría y se calcularon sus frecuencias a un nivel de teoría PBE/DGDZVP, arrojando 26 conformeros dentro del rango de 0-2 kcal/mol (**Figura 33**). Se verificó la ausencia

de frecuencias imaginarias y se emplearon sus energías libres relativas para calcular su población de Boltzmann (**Tabla 5**).

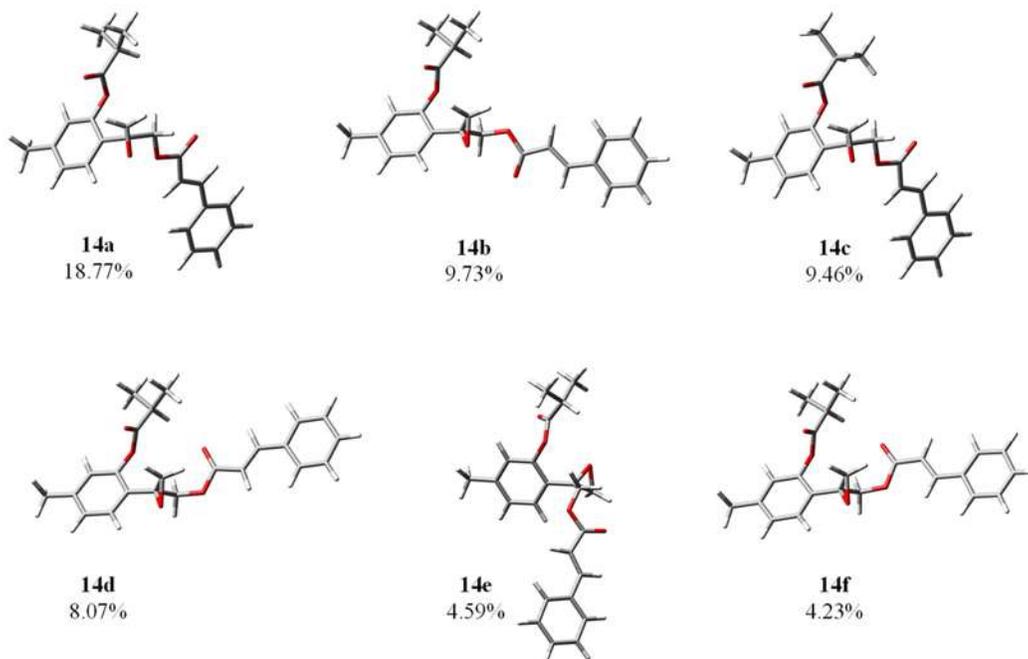


Figura 33. Conformeros de menor energía de **14** representando el 55% de la población conformacional

Tabla 5. Análisis termoquímico de isobutirato de (8*S*)-10-cinamoiloxi-8,9-epoxitimilo (**14**) a nivel PBE/DGDZVP

| Conformero | $\Delta E_{\text{MMFF}}^{\text{a}}$ | %MMFF ^b | $\Delta E_{\text{DFT}}^{\text{c}}$ | %DFT ^d | $\Delta G_{\text{opt}}^{\text{e}}$ | %opt ^f |
|------------|-------------------------------------|--------------------|------------------------------------|-------------------|------------------------------------|-------------------|
| 14a | 3.1096 | 0.0633 | 1.5703 | 1.0456 | 0.0000 | 18.60 |
| 14b | 4.7349 | 0.0041 | 2.3835 | 0.2651 | 0.3891 | 9.64 |
| 14c | 3.2753 | 0.0479 | 2.9539 | 0.1012 | 0.4054 | 9.38 |
| 14d | 1.9739 | 0.4307 | 1.2915 | 1.6740 | 0.4995 | 8.00 |
| 14e | 2.4204 | 0.2027 | 2.2325 | 0.3420 | 0.8333 | 4.55 |
| 14f | 2.8556 | 0.0972 | 1.7158 | 0.8180 | 0.8817 | 4.19 |
| 14g | 4.3425 | 0.0079 | 2.5931 | 0.1861 | 0.8848 | 4.17 |
| 14h | 3.4396 | 0.0363 | 2.4276 | 0.2461 | 0.8942 | 4.10 |
| 14i | 3.3293 | 0.0437 | 2.6166 | 0.1789 | 0.9049 | 4.03 |
| 14j | 3.2766 | 0.0478 | 2.7684 | 0.1384 | 0.9312 | 3.86 |
| 14k | 2.7602 | 0.1142 | 2.8839 | 0.1139 | 1.0103 | 3.37 |
| 14l | 3.6639 | 0.0249 | 2.8839 | 0.1139 | 1.1872 | 2.50 |
| 14m | 3.9063 | 0.0165 | 2.7756 | 0.1368 | 1.2983 | 2.07 |
| 14n | 1.2885 | 1.3692 | 0.0508 | 13.5876 | 1.3228 | 1.99 |
| 14o | 3.3375 | 0.0431 | 2.9851 | 0.0960 | 1.5041 | 1.46 |
| 14p | 2.7949 | 0.1077 | 2.8009 | 0.1310 | 1.5079 | 1.46 |

| | | | | | | |
|------------|--------|---------|---------------|--------|--------|------|
| 14q | 2.3844 | 0.2154 | 2.2245 | 0.3466 | 1.5368 | 1.39 |
| 14r | 0.9885 | 2.2716 | 0.5969 | 5.4058 | 1.6045 | 1.24 |
| 14s | 3.0118 | 0.0747 | 2.1000 | 0.4277 | 1.6792 | 1.09 |
| 14t | 0.0924 | 10.3081 | 0.9226 | 3.1197 | 1.7269 | 1.01 |
| 14u | 0.1730 | 8.9971 | 0.7700 | 4.0366 | 1.7288 | 1.00 |
| 14v | 0.6363 | 4.1165 | 1.3677 | 1.4719 | 1.7627 | 0.95 |
| 14w | 0.5846 | 4.4914 | 1.2106 | 1.9189 | 1.7702 | 0.93 |
| 14x | 0.4410 | 5.7231 | 0.9989 | 2.7427 | 1.7815 | 0.92 |
| 14y | 0.9002 | 2.6369 | 0.0000 | 1.4803 | 1.7878 | 0.91 |
| 14z | 3.1397 | 0.0602 | 2.1008 | 0.4271 | 2.0193 | 0.61 |

^a Energía relativa en mecánica molecular respecto a conformero de menor energía con $E_{\text{MMFF}} = -47.801$ kcal/mol. ^b Población en % calculada a partir de las energías MMFF según $\Delta E_{\text{MMFF}} \approx -RT \ln K$. ^c Energías relativas en Single-point B3LYP/6-31G(d) respecto a **14y**, $E_{6-31G(d)} = -795052.896$ kcal/mol. ^d Población en % calculada a partir de las energías de B3LYP/6-31G(d) según $\Delta E_{6-31G(d)} \approx -RT \ln K$. ^e Energías libres de Gibbs relativas a **14a** con $G_{\text{PBE/DGDZVP}} = -793964.739$ kcal/mol. ^f Población en % calculada a partir de las energías libres de Gibbs de acuerdo con $\Delta G = -RT \ln K$.

El espectro DCE se calculó a partir de los conformeros de mínima energía a un nivel de teoría CAM-B3LYP/DGDZVP y fue promediado por su contribución de Boltzmann ajustándose a un ancho de curva (σ) de 0.33 eV y desplazados en +10 nm. Al comparar los espectros experimental y calculado se observa que ambos presentan una misma tendencia (**Figura 34**) por lo que la CA de los compuestos **14-18** se soporta como *S*.

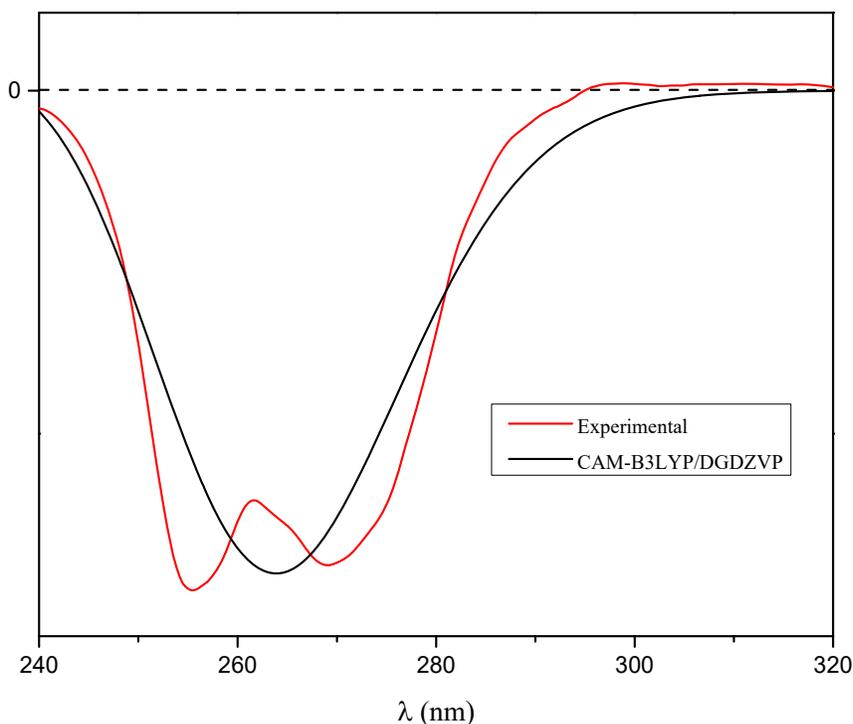


Figura 34. Comparación espectro experimental y calculado de **14**

Posteriormente se analizó la estructura del compuesto **14** para determinar si era posible obtener una estructura truncada, sin afectar los grupos cromóforos, que conllevara a una menor población conformacional y por lo tanto menor costo computacional. Se realizó un truncamiento de los metilos del grupo isobutirato dando como resultado la estructura de entrada **19** (Figura 35), la cual mediante mecánica molecular presentó un total de 58 conforméromos en el rango de 0-5 kcal/mol, un número significativamente menor al presentado por la estructura original.

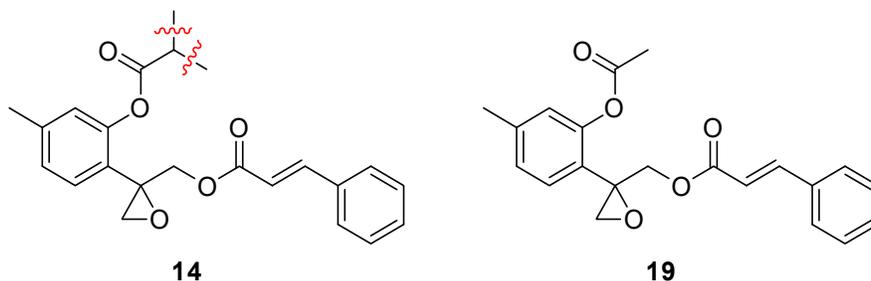


Figura 35. Estructura de **14** y su modelo truncado

Los conforméromos obtenidos se optimizaron en su geometría de acuerdo con la metodología establecida, dando como resultado 24 conforméromos (Figura 36) dentro de la ventana energética de 0-2 kcal/mol usando sus energías relativas para calcular su población de Boltzmann (Tabla 6).

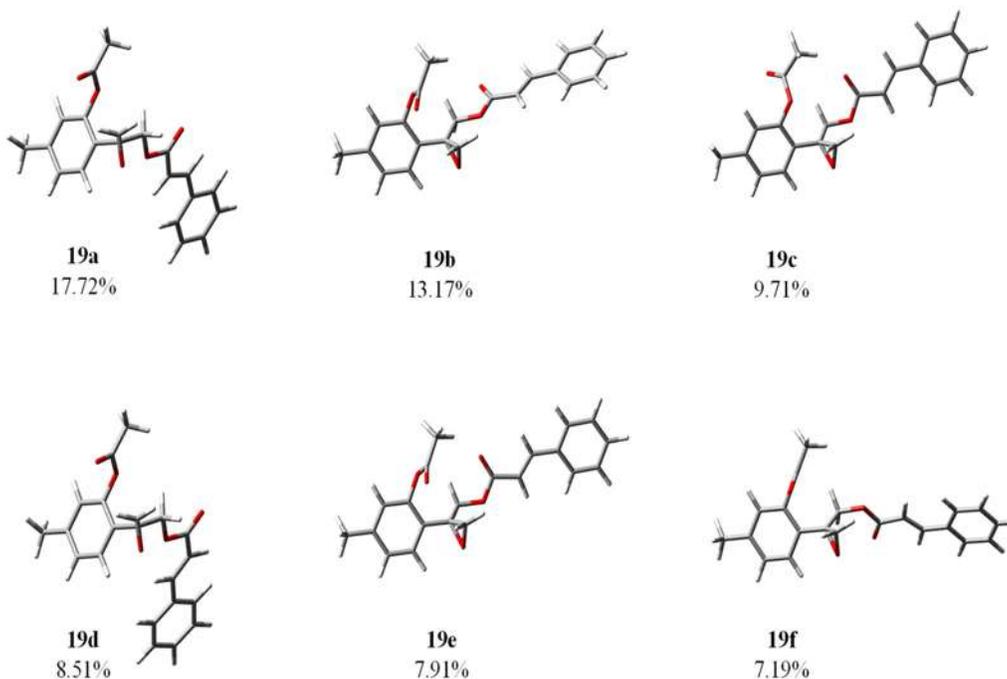


Figura 36. Conforméromos de menor energía de **19** representando el 64% de la población conformacional.

Tabla 6. Análisis termoquímico de **19** a nivel PBE/DGDZVP

| Confórmero | $\Delta E_{\text{MMFF}}^{\text{a}}$ | % $_{\text{MMFF}}^{\text{b}}$ | $\Delta G_{\text{opt}}^{\text{c}}$ | % $_{\text{opt}}^{\text{d}}$ |
|------------|-------------------------------------|-------------------------------|------------------------------------|------------------------------|
| 19a | 3.4676 | 0.1606 | 0.0000 | 17.72 |
| 19b | 3.6246 | 0.1232 | 0.1757 | 13.17 |
| 19c | 4.1402 | 0.0516 | 0.3564 | 9.71 |
| 19d | 3.6035 | 0.1277 | 0.4342 | 8.51 |
| 19e | 2.4950 | 0.8291 | 0.4775 | 7.91 |
| 19f | 4.6855 | 0.0206 | 0.5340 | 7.19 |
| 19g | 3.3433 | 0.1981 | 1.0542 | 2.99 |
| 19h | 4.2064 | 0.0462 | 1.0580 | 2.97 |
| 19i | 4.2922 | 0.0399 | 1.0655 | 2.93 |
| 19j | 2.7462 | 0.5426 | 1.1672 | 2.47 |
| 19k | 2.9286 | 0.3988 | 1.2211 | 2.25 |
| 19l | 4.7341 | 0.0189 | 1.2224 | 2.25 |
| 19m | 2.3795 | 1.0075 | 1.2374 | 2.19 |
| 19n | 3.2709 | 0.2238 | 1.3950 | 1.68 |
| 19o | 4.1382 | 0.0518 | 1.4037 | 1.65 |
| 19p | 3.1221 | 0.2877 | 1.4182 | 1.61 |
| 19q | 3.9573 | 0.0703 | 1.6654 | 1.06 |
| 19r | 2.3658 | 1.0311 | 1.6867 | 1.03 |
| 19s | 3.3004 | 0.2129 | 1.6993 | 1.00 |
| 19t | 0.0000 | 55.8888 | 1.7382 | 0.94 |
| 19u | 4.0369 | 0.0614 | 1.8505 | 0.78 |
| 19v | 0.7367 | 16.1199 | 1.8555 | 0.77 |
| 19w | 3.6374 | 0.1206 | 1.9723 | 0.63 |
| 19x | 2.9142 | 0.4086 | 1.9836 | 0.62 |

^a Energía relativa en mecánica molecular respecto a **19t** con $E_{\text{MMFF}} = -45.393$ kcal/mol. ^b Población en % calculada a partir de las energías MMFF según $\Delta E_{\text{MMFF}} \approx -RT \ln K$. ^c Energías libres de Gibbs relativas a **19a** con $G_{\text{PBE/DGDZVP}} = -744725.127$ kcal/mol. ^d Población en % calculada a partir de las energías libres de Gibbs de acuerdo con $\Delta G = -RT \ln K$.

El espectro de DCE de la estructura **19** se calculó usando la metodología establecida. El espectro obtenido se comparó con el experimental y calculado para el compuesto **14**, observando una misma tendencia entre los espectros (**Figura 37**), teniendo espectros muy similares para la estructura en cuanto a los espectros calculados de la estructura original y la simplificada. Con esto se comprueba la efectividad de una metodología de cálculo simplificada que permite reducir significativamente el tiempo de cálculo.

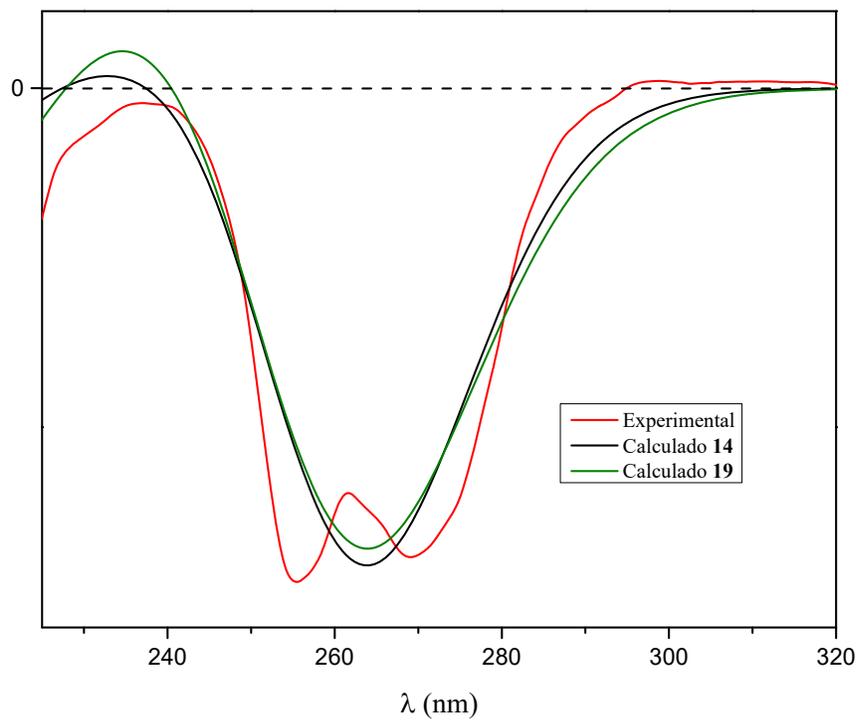


Figura 37. Comparación de espectros experimentales, calculados compuesto **14** y estructura truncada **19**

6. CONCLUSIONES

Se aisló el compuesto **7** de las hojas de *Ageratina glabrata*, mientras que de las raíces y flores de la especie vegetal *Piptothrix areolare* se aislaron los epoxitimoles **13-18**. Se obtuvieron los espectros de DCE y UV para todos los epoxitimoles observando mejores resultados para los compuestos **13-18** que presentan una función cinamato. La configuración absoluta de los compuestos **14-18** fue determinada por comparación de sus espectros de DCE con los del compuesto **13** cuya configuración absoluta es conocida. Se estableció una metodología de cálculo de espectros de DCE usando al compuesto **7** obtenido los mejores resultados al nivel de cálculo CAM-B3LYP/DGDZVP. La metodología de cálculo se aplicó para el compuesto **14**, calculando su espectro teórico para el enantiómero *S* que, al ser comparado con el espectro experimental mostró la misma tendencia, con lo cual se confirma que la asignación de la configuración absoluta de los compuestos **14-18**. Adicionalmente se probó una metodología de cálculo partiendo de la estructura troncada **19** la cual permitió obtener espectros teóricos de DCE reduciendo significativamente el costo computacional.

7. PARTE EXPERIMENTAL

7.1 Generalidades

Los espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H a 400 MHz y de ^{13}C a 100 MHz se determinaron en un espectrómetro Varian Mercury Plus-400; los espectros de ^1H a 300 MHz y de ^{13}C a 75.4 se determinaron en un espectrómetro Varian Mercury 300. Los valores de desplazamiento químico se reportaron en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento (J) en Hz. En todas las mediciones se utilizó CDCl_3 como disolvente y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los puntos de fusión se determinaron con un aparato Fisher-Johns y no están corregidos. Los FID de los espectros de RMN fueron procesados empleando el software MestRe Nova. En las columnas cromatográficas se utilizó gel de sílice de malla 230-400 marca Merck.

7.2 Determinación de Proporciones Escalémicas Utilizando (S)-BINOL

La pureza enantiomérica de los derivados de timol se determinó por RMN de ^1H utilizando disoluciones de 6.0 y 3.0 mg de muestra y reactivo de solvatación quiral, (S)-BINOL (Aldrich®), en cantidades de 30.0 y 15.0 mg, respectivamente y disolviendo en todos los casos con 0.7 mL de CDCl_3 . La relación enantiomérica se estableció analizando el desdoblamiento de las señales y las intensidades de estas.

7.3 Mediciones de Dicroísmo Circular Electrónico

Los espectros de DCE y UV se obtuvieron con el detector quiral de dicroísmo circular Jasco CD-2095. De cada muestra se prepararon soluciones madre de 1mg/mL con EtOH como disolvente, a partir de esta se obtuvieron disoluciones de 10 $\mu\text{g/mL}$. Para las mediciones de los espectros se inyectó en el equipo 1 mL de EtOH para obtener la línea, seguido de 1 mL de disolución de 10 $\mu\text{g/mL}$ de muestra. Los datos de salida se adquirieron en el programa WinDaq y se procesaron en el programa Excel.

7.4 Materia Vegetal

Las raíces y flores de *Piptothrix areolare* fueron colectadas en septiembre y octubre de 2019, cerca del km 35 de la carretera federal Tiripetío-Nocupétaro N 19° 20.645', W 101° 21.348' a 2509 m sobre el nivel del mar. Se depositó un espécimen en el Herbario del Instituto de Ecología A. C., Centro Regional del Bajío, Pátzcuaro, Michoacán, México.

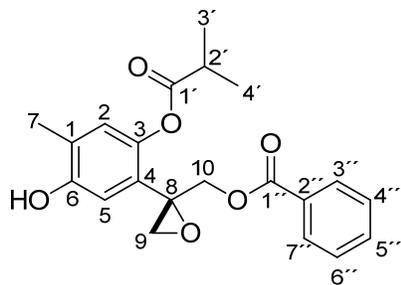
La parte aérea de la especie vegetal *Ageratina glabrata* fue colectada en febrero de 2019 en el km 4.5 de la carretera federal No. 200, Pátzcuaro-Santa Clara del Cobre, N 19° 29.516', W 101° 35.273' a 2285 m sobre el nivel del mar.

7.5 Extracción y Aislamiento

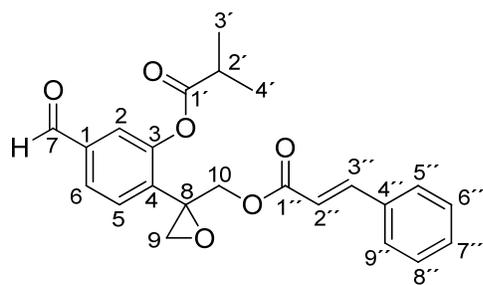
Las hojas y tallos de *A. glabrata* se separaron y posteriormente fueron secados a la sombra y a temperatura ambiente. Las hojas secas (500 g) se maceraron con CH₂Cl₂ como disolvente para obtener 50 g de extracto crudo con aspecto de miel verde. Un lote de 5 g de extracto se sometió a cromatografía de columna obteniendo a **7** (100 mg) en la polaridad 4:1 hexanos-CH₂Cl₂.

Las raíces frescas de *P. areolare* (2 kg) se maceraron con hexanos a temperatura ambiente por tres días. El disolvente fue filtrado y evaporado obteniendo 10 g de extracto crudo en forma de miel amarilla. La cromatografía en columna de una alícuota de 5 g de extracto de raíces, usando una mezcla de hexanos-AcOEt en polaridad ascendente, proporcionó los compuestos: **13** (60 mg) con 7:3 hexanos-AcOEt y **14** (22 mg) con 3:2 hexanos-AcOEt.

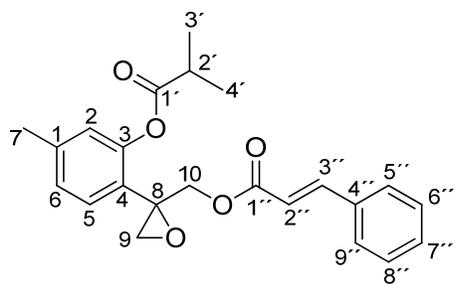
Las flores secas (200 g) de *P. areolare* se maceraron con CH₂Cl₂ a temperatura ambiente por tres días. Después de filtrar y evaporar el disolvente se obtuvieron 5 g de extracto crudo, en forma de miel café, que se sometió a cromatografía en columna con gel de sílice como fase estacionaria y con mezclas de hexanos-AcOEt en polaridad ascendente como fase móvil. La cromatografía permitió obtener **15** (73 mg) con hexanos-AcOEt 7:3, **16** (12 mg) con hexanos-AcOEt, **17** (8 mg) y **18** (20 mg) con 3:2 de hexanos-AcOEt.



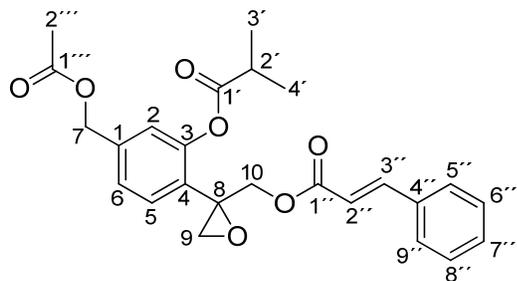
Isobutirato de (+)-(8*S*)-10-benzoiloxi-6-hidroxi-8,9-epoxitimilo (**7**): cristales incoloros, p. f. 112-114 °C; UV (EtOH) λ_{max} (log ϵ) 230 (0.75), 275 (0.38) nm; DCE (EtOH) λ_{max} ($\Delta\epsilon$): 226 (-185); RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.97 (2H, dd, $J = 7.8$, 1.5 Hz, H-3'', H-7''), 7.55 (1H, tt, $J = 7.8$, 1.5 Hz, H-5''), 7.41 (2H, t, $J = 7.8$ Hz, H-4'', H-6''), 6.93 (1H, s, H-5), 6.81 (1H, s, H-2), 4.76 (1H, d, $J = 12.3$ Hz, H-10a), 4.47 (1H, d, $J = 12.3$ Hz, H-10b), 3.10 (1H, d, $J = 5.3$ Hz, H-9a), 2.85 (1H, d, $J = 5.3$ Hz, H-9b), 2.82 (1H, sept, $J = 6.8$ Hz, H-2'), 2.21 (3H, s, H-7), 1.30 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-3'), 1.29 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-4'). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 175.0 (C, C-1'), 166.0 (C, C-1''), 151.7 (C, C-6), 141.7 (C, C-3), 133.2 (CH, C-5''), 129.7 (CH, C-3'', C-7''), 129.5 (C, C-4), 128.4 (CH, C-4'', C-6''), 127.1 (C, C-2''), 125.8 (C, C-1), 124.7 (CH, C-2), 114.5 (CH, C-5), 65.5 (CH_2 , C-10), 57.0 (C, C-8), 51.0 (CH_2 , C-9), 34.1 (CH, C-2'), 19 (CH_3 , C-3', C-4'), 15.7 (CH_3 , C-7).



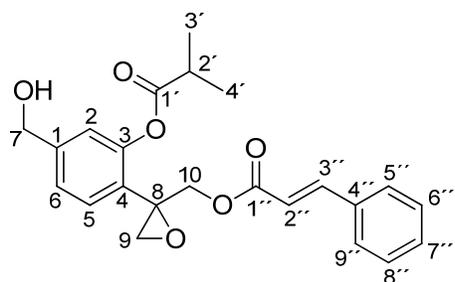
Areolal (**13**): miel amarilla; UV (EtOH) λ_{max} (log ϵ) 272 (0.64) nm; DCE (EtOH) λ_{max} ($\Delta\epsilon$): 255 (-69.1), 262 (-52.5), 269 (-60), 297 (0.8); RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 10.0 (1H, s, H-7), 7.79 (1H, dd, $J = 7.8$, 1.6 Hz, H-6), 7.73 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-5), 7.65 (1H, d, $J = 16.4$ Hz, H-2''), 7.63 (1H, s, H-2), 7.50 (2H, m, H-5'', H-9''), 7.38 (3H, m H-6'', H-7'', H-8''), 6.38 (1H, d, $J = 16.4$ Hz, H-3''), 4.73 (1H, d, $J = 12.4$ Hz, H-10a), 4.39 (1H, d, $J = 12.4$ Hz, H-10b), 3.15 (1H, d, $J = 5.2$ Hz, H-9a), 2.90 (1H, sept, $J = 7.2$ Hz, H-2'), 2.88 (1H, d, $J = 5.2$ Hz, H-9b), 1.36 (6H, d, $J = 7.2$ Hz, H-3', H-4'). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 190.6 (C, C-7), 175.2 (C, C-1'), 166.1 (C, C-1''), 149.3 (CH, C-3), 145.8 (CH, C-3''), 137.5 (C,C-1), 135.5 (C,C-4), 134.0 (C, C-4''), 130.5 (CH, C-7''), 130.0 (CH, C-5), 128.9 (CH, C-6'', C-8''), 128.1 (CH, C-5'', C-9''), 127.2 (CH, C-6), 123.3 (CH, C-2), 116.6 (CH, C-2''), 65.2 (CH_2 , C-10), 57.0 (C, C-8), 51.0 (CH_2 , C-9), 34.1 (CH, C-2'), 18.9 (CH_3 , C-3'), 18.8 (CH_3 , C-4').



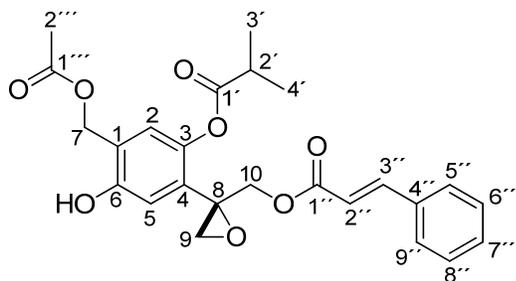
Isobutirato de 10-cinamoiloxi-8,9-epoxitimilo (**14**): miel amarilla; UV (EtOH) λ_{max} (log ϵ) 272 (0.53) nm; DCE (EtOH) λ_{max} ($\Delta\epsilon$): 257 (-21.7), 262 (-19.4), 271 (-25.7), 297 (3.4); RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 7.66 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-3''), 7.51 (2H, m, H-5'', H-9''), 7.41 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-5) 7.38 (3H, m, H-6'', H-7'', H-8''), 7.07 (1H, dd, $J = 7.9, 1.7$ Hz, H-6), 6.89 (1H, s, H-2), 6.41 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-2''), 4.63 (1H, d, $J = 12.2$ Hz, H-10a), 4.39 (1H, d, $J = 12.2$ Hz, H-10b), 3.10 (1H, d, $J = 5.3$ Hz, H-9a), 2.86 (1H, sept, $J = 7.0$ Hz, H-2'), 2.85 (1H, d, $J = 5.3$ Hz, H-9b), 2.36 (3H, s, H-7) 1.34 (6H, d, $J = 7.0$ Hz, H-3', H-4').



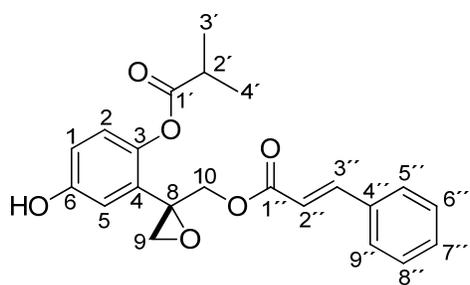
Isobutirato de 7-acetoxi-10-cinamoiloxi-8,9-epoxitimilo (**15**): miel amarilla; UV (EtOH) λ_{max} (log ϵ) 273 (0.43) nm; DCE (EtOH) λ_{max} ($\Delta\epsilon$): 258 (-18.1), 262 (-14.8), 271 (-19.3), 296 (3.5); RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 7.65 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-3''), 7.52 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-5), 7.50 (2H, m, H-5'', H-9''), 7.38 (3H, m, H-6'', H-7'', H-8''), 7.25 (1H, dd, $J = 7.9, 1.7$ Hz, H-6), 7.09 (1H, d, $J = 1.7$ Hz, H-2), 6.40 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-2''), 5.10 (2H, s, H-7), 4.65 (1H, d, $J = 12.2$ Hz, H-10a), 4.39 (1H, d, $J = 12.2$ Hz, H-10b), 3.11 (1H, d, $J = 5.2$ Hz, H-9a), 2.88 (1H, sept, $J = 7.0$ Hz, H-2'), 2.84 (1H, d, $J = 5.2$ Hz, H-9b), 2.10 (3H, s, H-1'''), 1.35 (6H, d, $J = 7.0$ Hz, H-3', H-4').



Isobutirato de 10-cinamoiloxi-7-hidroxi-8,9-epoxitimilo (**16**): miel amarilla; UV (EtOH) λ_{max} (log ϵ) 272 (0.48) nm; DCE (EtOH) λ_{max} ($\Delta\epsilon$): 258 (-21.6), 261 (-18.1), 270 (-22.9), 296 (3.5); RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.62 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-3''), 7.50 (3H, m, H-5, H-5'', H-9''), 7.38 (3H, m, H-6'', H-7'', H-8''), 7.23 (1H, dd, $J = 7.9, 1.3$ Hz, H-6), 7.09 (1H, s, H-2), 6.39 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-2''), 4.68 (2H, s, H-7), 4.65 (1H, d, $J = 12.3$ Hz, H-10a), 4.39 (1H, d, $J = 12.3$ Hz, H-10b), 3.10 (1H, d, $J = 5.2$ Hz, H-9a), 2.96 (1H, sept, $J = 7.0$ Hz, H-2'), 2.84 (1H, d, $J = 5.2$ Hz, H-9b), 1.34 (6H, d, $J = 7.0$ Hz, H-3', H-4').



Isobutirato de (8*S*)-7-acetoxi-10-cinamoiloxi-6-hidroxi-8,9-epoxitimilo (**17**): miel amarilla; UV (EtOH) λ_{max} (log ϵ) 274 (0.55) nm; DCE (EtOH) λ_{max} ($\Delta\epsilon$): 257 (-13.0), 263 (-10.2), 272 (-16.8), 296 (2.1); RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 7.66 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-3''), 7.51 (2H, m, H-5'', H-9''), 7.39 (3H, m, H-6'', H-7'', H-8''), 7.11 (1H, s, H-5), 7.00 (1H, s, H-2), 6.41 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-2''), 5.06 (2H, s, H-7), 4.64 (1H, d, $J = 12.2$ Hz, H-10a), 4.38 (1H, d, $J = 12.2$ Hz, H-10b), 3.08 (1H, d, $J = 5.2$ Hz, H-9a), 2.85 (1H, sept, $J = 7.0$ Hz, H-2'), 2.83 (1H, d, $J = 5.2$ Hz, H-9b), 2.11 (3H, s, H-1'''), 1.33 (6H, d, $J = 7.0$ Hz, H-3', H-4'). RMN de ^{13}C (75.4 MHz, CDCl_3) δ : 175.6 (C, C-1'), 173.6 (C, C-1'''), 166.3 (C, C-1''), 153.2 (C, C-3), 145.6 (C, C-3''), 141.6 (CH, C-6), 134.1 (C, C-4''), 131.8 (C, C-1), 130.5 (CH, C-7''), 128.9 (CH, C-6'', C-8''), 128.2 (CH, C-5'', C-9''), 125.7 (CH, C-5), 122.6 (C, C-4), 118.2 (CH, C-2), 117.2 (CH, C-2''), 65.3 (CH₂, C-10), 62.4 (CH₂, C-7), 56.8 (C, C-8), 50.9 (CH₂, C-9), 34.1 (CH, C-2'), 20.9 (CH₃, C-2'''), 19.0 (CH₃, C-3'), 18.9 (CH₃, C-4').



Isobutirato de (8*S*)-10-cinamoiloxi-8,9-epoxi-6-hidroxi-7-nortimilo (**18**): miel amarilla; UV (EtOH) λ_{max} (log ϵ) 273 (0.65) nm; DCE (EtOH) λ_{max} ($\Delta\epsilon$): 258 (-26.3), 263 (-22.9), 271 (-33.8), 296 (3.5); RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 7.66 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-3''), 7.51 (2H, m, H-5'', H-9''), 7.39 (3H, m, H-6'', H-7'', H-8''), 6.98 (1H, d, $J = 3.1$ Hz, H-5), 6.93 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2), 6.81 (1H, dd, $J = 8.8, 3.1$ Hz, H-1), 6.40 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-3''), 4.67 (1H, d, $J = 12.2$ Hz, H-10a), 4.39 (1H, d, $J = 12.2$ Hz, H-10b), 3.10 (1H, d, $J = 5.4$ Hz, H-9a), 2.85 (1H, d, $J = 5.4$ Hz, H-9b), 2.85 (1H, sept, $J = 7.1$ Hz, H-2'), 1.33 (6H, d, $J = 7.1$ Hz, H-3', H-4'). RMN de ^{13}C (75.4 MHz, CDCl_3) δ : 175.8 (C, C-1'), 166.4 (C, C-1'''), 153.5 (C, C-3), 145.7 (CH, C-3''), 141.9 (C, C-6), 134.1 (C, C-4''), 130.5 (C, C-7), 130.0 (C, C-4), 128.8 (CH, C-6'', C-8''), 128.1 (CH, C-5'', C-9''), 123.6 (CH, C-2), 117.2 (CH, C-2''), 116.4 (CH, C-5), 115.5 (CH, C-1), 65.0 (CH₂, C-10), 57.0 (C, C-8), 51.0 (CH₂, C-9), 34.1 (CH, C-2'), 19.0 (CH₃, C-3'), 18.9 (CH₃, C-4').

7.6 Metodología General de Cálculo de DCE

La búsqueda conformacional se realizó en el programa Spartan'04, partiendo de cuatro conformeros de mínima energía mediante el protocolo Monte Carlo con un campo de fuerza de mecánica molecular MMFF94, tomando en cuenta una ventana energética de 0-10 kcal/mol. Posteriormente, se optimizó la energía de todos los conformeros a un nivel de teoría DFT B3LYP/6-31G(d) en el programa Spartan'04 realizando un nuevo corte a 3 kcal/mol. Los conformeros resultantes se sometieron a optimización de su geometría y cálculo de frecuencias a un nivel de teoría B3LYP/DGDZVP utilizando el programa Gaussian 09. Se verificó la ausencia de frecuencias imaginarias en todas las estructuras y se emplearon sus energías libres relativas para calcular su población de Boltzmann mediante un script para python 3. Los conformeros dentro con energías relativas entre 0-2 kcal/mol se emplearon para calcular los espectros de DCE utilizando el método de teoría de funcionales de la densidad dependiente del tiempo (TD DFT) calculando 20 estados excitados a niveles de teoría B3LYP/DGDZVP, PBEPBE/DGDZVP, APFD/6-311+**, WB97XD/DGDZVP, CAM-B3LYP/DGDZVP, CAM-B3LYP/DGTZVP usando programa el Gaussian 16. Los espectros obtenidos de cada nivel de teoría se promediaron en el programa SpecDis a partir de la población de Boltzman. La optimización de los cálculos requirió entre 20 y 60 minutos de tiempo de CPU por conformero usando un nodo de procesamiento con 10 núcleos a 2,3 GHz con 20 Gb de RAM.

8. REFERENCIAS

1. Talavera-Alemán, A.; Rodríguez-García, G.; López, Y.; García-Gutiérrez, H. A.; Torres-Valencia, J. M.; del Río, R. E.; Cerda-García-Rojas, C. M.; Joseph-Nathan, P.; Gómez-Hurtado, M. A., Systematic evaluation of thymol derivatives possessing stereogenic or prostereogenic centers. *Phytochemistry Reviews* **2016**, *15* (2), 251-277.
2. Padula, D.; Pescitelli, G., How and how much molecular conformation affects electronic circular dichroism: The case of 1,1-diarylcarbinols. *Molecules* **2018**, *23* (1), 128.
3. Pescitelli, G.; Di Bari, L.; Berova, N., Conformational aspects in the studies of organic compounds by electronic circular dichroism. *Chemical Society Reviews* **2011**, *40* (9), 4603-4625.
4. McMurry, J.; Mondragón, C. H.; Pozo, V. G., *Química orgánica*. 7 ed.; Cengage learning México, DF, **2008**.
5. Carey, F. A., *Química orgánica*. 6 ed.; McGraw-Hill: México, D. F., **2006**.
6. Superchi, S.; Scafato, P.; Gorecki, M.; Pescitelli, G., Absolute configuration determination by quantum mechanical calculation of chiroptical spectra: Basics and applications to fungal metabolites. *Current Medicinal Chemistry* **2018**, *25* (2), 287-320.
7. Polavarapu, P. L., Renaissance in chiroptical spectroscopic methods for molecular structure determination. *The Chemical Record* **2007**, *7* (2), 125-136.
8. Bijvoet, J. M.; Peerdeman, A. F.; van Bommel, A. J., Determination of the absolute configuration of optically active compounds by means of X-Rays. *Nature* **1951**, *168* (4268), 271-272.
9. Watkin, D. J.; Cooper, R. I., Howard Flack and the Flack parameter. *Chemistry* **2020**, *2* (4), 796-804.
10. Hooft, R. W. W.; Straver, L. H.; Spek, A. L., Determination of absolute structure using Bayesian statistics on Bijvoet differences. *Journal of Applied Crystallography* **2008**, *41* (1), 96-103.
11. Cedrón, J., Métodos para determinar la configuración absoluta de una molécula. *Revista de Química* **2008**, *22* (1-2), 19-31.

12. Seco, J. M.; Quiñoá, E.; Riguera, R., The assignment of absolute configuration by NMR. *Chemical Reviews* **2004**, *104* (1), 17-118.
13. Grauso, L.; Teta, R.; Esposito, G.; Menna, M.; Mangoni, A., Computational prediction of chiroptical properties in structure elucidation of natural products. *Natural Product Reports* **2019**, *36* (7), 1005-1030.
14. Tranter, G. E., Spectroscopic analysis: Electronic circular dichroism. In *Comprehensive Chirality*, Carreira, E. M.; Yamamoto, H., Eds. Elsevier: Amsterdam, **2012**; pp 422-437.
15. Tranter, G. E., Spectroscopic analysis: Polarized light and optics. In *Comprehensive Chirality*, Carreira, E. M.; Yamamoto, H., Eds. Elsevier: Amsterdam, **2012**; pp 406-410.
16. Polavarapu, P. L.; Santoro, E., Vibrational optical activity for structural characterization of natural products. *Natural Product Reports* **2020**, *37* (12), 1661-1699.
17. Berova, N.; Bari, L. D.; Pescitelli, G., Application of electronic circular dichroism in configurational and conformational analysis of organic compounds. *Chemical Society Reviews* **2007**, *36* (6), 914-931.
18. Nugroho, A. E.; Morita, H., Circular dichroism calculation for natural products. *Journal of Natural Medicines* **2014**, *68* (1), 1-10.
19. Autschbach, J.; Nitsch-Velasquez, L.; Rudolph, M., Time-dependent density functional response theory for electronic chiroptical properties of chiral molecules. In *Electronic and Magnetic Properties of Chiral Molecules and Supramolecular Architectures*, Naaman, R.; Beratan, D. N.; Waldeck, D., Eds. Springer Berlin, **2011**; pp 1-98.
20. Pescitelli, G.; Bruhn, T., Good computational practice in the assignment of absolute configurations by TDDFT calculations of ECD spectra. *Chirality* **2016**, *28* (6), 466-474.
21. Lewin, L., Das thymol ein antisepticum und antifermentativum. *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin* **1875**, *65* (2), 164-189.
22. Poulou, A. J.; Croteau, R., Biosynthesis of aromatic monoterpenes: Conversion of γ -terpinene to *p*-cymene and thymol in *Thymus vulgaris* L. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1978**, *187* (2), 307-314.

23. Escobar, A.; Pérez, M.; Romanelli, G.; Blustein, G., Thymol bioactivity: A review focusing on practical applications. *Arabian Journal of Chemistry* **2020**, *13* (12), 9243-9269.
24. Bustos-Brito, C.; Sánchez-Castellanos, M.; Esquivel, B.; Calderón, J. S.; Calzada, F.; Yépez-Mulia, L.; Hernández-Barragán, A.; Joseph-Nathan, P.; Cuevas, G.; Quijano, L., Structure, Absolute configuration, and antidiarrheal activity of a thymol derivative from *Ageratina cylindrica*. *Journal of Natural Products* **2014**, *77* (2), 358-363.
25. Xu, M.; Zhu, S.; Xu, Z.; Wu, Y.; Gao, P., Synthesis and absolute configuration of two natural phenolic homobenzyl esters. *Chinese Journal of Chemistry* **2015**, *33* (7), 729-738.
26. Yang, Y. Q., Synthesis and absolute configuration of natural 8-hydroxyl-9-angeloyloxythymol. *Synthetic Communications* **2016**, *46* (11), 971-976.
27. Bustos-Brito, C.; Vázquez-Heredia, V. J.; Calzada, F.; Yépez-Mulia, L.; Calderón, J. S.; Hernández-Ortega, S.; Esquivel, B.; García-Hernández, N.; Quijano, L., Antidiarrheal thymol derivatives from *Ageratina glabrata*. Structure and absolute configuration of 10-Benzoyloxy-8,9-epoxy-6-hydroxythymol Isobutyrate. *Molecules* **2016**, *21* (9), 1132.
28. Arreaga-González, H. M.; Pardo-Novoa, J. C.; del Río, R. E.; Rodríguez-García, G.; Torres-Valencia, J. M.; Manríquez-Torres, J. J.; Cerda-García-Rojas, C. M.; Joseph-Nathan, P.; Gómez-Hurtado, M. A., Methodology for the absolute configuration determination of epoxythymols using the constituents of *Ageratina glabrata*. *Journal of Natural Products* **2018**, *81* (1), 63-71.
29. Zhang, Q. Q.; Sun, Z. Y.; Feng, X. Y.; Chen, R. J.; Deng, W.; Tang, Y. L.; Guo, Z. Y.; Liu, C. X.; Chen, J. F.; Zou, K., Thymol derivatives from the roots of *Eupatorium chinense* and their cytotoxic activities. *Phytochemistry Letters* **2019**, *29*, 165-168.
30. Hernández, J. D.; Roman, L. U.; Rodríguez M, J.; Espiñeira, J.; Joseph-nathan, P., Areolal, a thymol from *Piptotrix areolare*. *Phytochemistry* **1986**, *25* (7), 1743-1744.
31. Arreaga-González, H. M.; Rodríguez-García, G.; del Río, R. E.; Ferreira-Sereno, J. A.; García-Gutiérrez, H. A.; Cerda-García-Rojas, C. M.; Joseph-Nathan, P.; Gómez-Hurtado, M. A., Configurational variation of a natural compound within its source species. The unprecedented case of areolal in *Piptothrix areolare*. *Journal of Natural Products* **2019**, *82* (12), 3394-3400.

32. Hassan, M. M. A.; Mossa, J. S., Benzyl benzoate. In *Analytical Profiles of Drug Substances*, Florey, K.; Bishara, R.; Brewer, G. A.; Fairbrother, J. E.; Grady, L. T.; Leemann, H.-G.; Mollica, J. A.; Rudy, B. C., Eds. Academic Press: **1981**; Vol. 10, pp 55-74.
33. Abu-Eittah, R. H.; Khedr, M. K.; Goma, M.; Zordok, W., The structure of cinnamic acid and cinnamoyl azides, a unique localized π system: The electronic spectra and DFT-treatment. *International Journal of Quantum Chemistry* **2012**, *112* (5), 1256-1272.
34. Tamayo-Castillo, G.; Jakupovic, J.; Bohlmann, F.; Rojas, A.; Castro, V.; King, R. M., Germacranolides and other constituents from *Ageratina* species. *Phytochemistry* **1988**, *27* (9), 2893-2897.
35. Yi, J.; Du, G.; Yang, Y.; Li, Y.; Li, Y.; Guo, F., Chiral discrimination of natural isoflavanones using (*R*)- and (*S*)-BINOL as the NMR chiral solvating agents. *Tetrahedron: Asymmetry* **2016**, *27* (22), 1153-1159.
36. Yuste, F.; Sánchez-Obregón, R.; Díaz, E.; García-Carrillo, M. A., Enantiodifferentiation of the antitumor alkaloid crispine A using the NMR chiral solvating agents (*R*)- and (*S*)-BINOL. *Tetrahedron: Asymmetry* **2014**, *25* (3), 224-228.
37. Kland-English, M. J.; Summerbell, R. K.; Klotz, I. M., The structure of styrene oxide dimers. I. Ultraviolet spectra of 2,5-diphenyl-1,4-dioxanes and related compounds. *Journal of the American Chemical Society* **1953**, *75* (15), 3709-3712.
38. Skoog, D. A.; Crouch, S. R.; Holler, F. J.; Anzures, M. B., *Principios de análisis instrumental* Cengage Learning: 2008.
39. Halgren, T. A., Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. *Journal of Computational Chemistry* **1996**, *17* (5-6), 490-519.
40. Becke, A. D., Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *The Journal of Chemical Physics* **1993**, *98* (7), 5648-5652.
41. Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G., Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Physical Review B* **1988**, *37* (2), 785-789.

42. Vosko, S. H.; Wilk, L.; Nusair, M., Accurate spin-dependent electron liquid correlation energies for local spin density calculations: a critical analysis. *Canadian Journal of Physics* **1980**, *58* (8), 1200-1211.
43. Stephens, P. J.; Devlin, F. J.; Chabalowski, C. F.; Frisch, M. J., *Ab Initio* calculation of vibrational absorption and circular dichroism spectra using density functional force fields. *The Journal of Physical Chemistry* **1994**, *98* (45), 11623-11627.
44. Li, X. C.; Ferreira, D.; Ding, Y., Determination of absolute configuration of natural products: theoretical calculation of electronic circular dichroism as a tool. *Current Organic Chemistry* **2010**, *14* (16), 1678-1697.
45. Ernzerhof, M.; Scuseria, G. E., Assessment of the Perdew–Burke–Ernzerhof exchange–correlation functional. *The Journal of Chemical Physics* **1999**, *110* (11), 5029-5036.
46. Austin, A.; Petersson, G. A.; Frisch, M. J.; Dobek, F. J.; Scalmani, G.; Throssell, K., A Density functional with spherical atom dispersion terms. *Journal of Chemical Theory and Computation* **2012**, *8* (12), 4989-5007.
47. Foresman, J. B.; Frisch, M., *Exploring chemistry with electronic structure methods*. 3rd ed.; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, 2015.
48. Yanai, T.; Tew, D. P.; Handy, N. C., A new hybrid exchange–correlation functional using the Coulomb-attenuating method (CAM-B3LYP). *Chemical Physics Letters* **2004**, *393* (1), 51-57.
49. Chai, J. D.; Head-Gordon, M., Long-range corrected hybrid density functionals with damped atom–atom dispersion corrections. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2008**, *10* (44), 6615-6620.
50. Rudolph, M.; Autschbach, J., Performance of conventional and range-separated hybrid density functionals in calculations of electronic circular dichroism spectra of transition metal complexes. *The Journal of Physical Chemistry A* **2011**, *115* (51), 14677-14686.
51. Jorge, F. E.; Jorge, S. S.; Suave, R. N., Electronic circular dichroism of chiral alkenes: B3LYP and CAM-B3LYP calculations. *Chirality* **2015**, *27* (1), 23-31.

52. Jacquemin, D.; Perpète, E. A.; Scuseria, G. E.; Ciofini, I.; Adamo, C., TD-DFT performance for the visible absorption spectra of organic dyes: conventional versus long-range hybrids. *Journal of Chemical Theory and Computation* **2008**, *4* (1), 123-135.
53. Bruhn, T.; Schaumlöffel, A.; Hemberger, Y.; Bringmann, G., SpecDis: Quantifying the comparison of calculated and experimental electronic circular dichroism spectra. *Chirality* **2013**, *25* (4), 243-249.
54. Mándi, A.; Kurtán, T., Applications of OR/ECD/VCD to the structure elucidation of natural products. *Natural Product Reports* **2019**, *36* (6), 889-918.
55. Mándi, A.; Swamy, M. M. M.; Taniguchi, T.; Anetai, M.; Monde, K., Reducing molecular flexibility by cyclization for elucidation of absolute configuration by CD calculations: Daurichromenic acid. *Chirality* **2016**, *28* (6), 453-459.
56. Mándi, A.; Mudianta, I. W.; Kurtán, T.; Garson, M. J., Absolute Configuration and conformational study of psammaplysins A and B from the balinese marine sponge *Aplysinella strongylata*. *Journal of Natural Products* **2015**, *78* (8), 2051-2056.
57. Hou, X. F.; Yao, S.; Mándi, A.; Kurtán, T.; Tang, C. P.; Ke, C. Q.; Li, X.Q.; Ye, Y., Bicunningines A and B, two new dimeric diterpenes from *Cunninghamia lanceolata*. *Organic Letters* **2012**, *14* (2), 460-463.