



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO-BIOLÓGICAS**

**Estudio Químico de Extractos Polares de
Ageratina glabrata H.B.K.**

T E S I S

Que para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICAS

Presenta:

Q.F.B. Julio César Pardo Novoa

Asesores:

**Doctora en Ciencias Químicas: Rosa Elva Norma del Río
Torres**

Doctor en Química: Mario Armando Gómez Hurtado

Morelia, Michoacán

Febrero 2014

DEDICATORIA

A DIOS

Por permitirme despertar cada mañana e iluminarme día a día.

A MIS PADRES

Que son los pilares en mi vida.

***Esperanza Novoa Mendoza** por ser el mejor ejemplo en mi vida así como brindarme todo su cariño y amor incondicional. Gracias.*

***Enrique Pardo Bautista** por ser el mejor ejemplo en mi vida, también por darme el apoyo moral. Gracias.*

A MI ESPOSA

*“**Gloria Rodríguez Moreno**, le doy gracias a Dios por haberte conocido y que día a día me brindas tu amor incondicional no tengo palabras para agradecerte todo lo que me has apoyado y la paciencia que has tenido para la culminación de este proyecto con mucho Cariño y Amor”*

AGRADECIMIENTOS

INSTITUCIONES

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por brindarme la oportunidad y los medios para obtener el grado.

Al Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas por poner a la disposición las instalaciones para realizar el proyecto de investigación.

A CONACYT por la beca número 268710 para la obtención del grado de Maestro en Ciencias.

A MIS ASESORES DE TESIS

*A la **D.C. Rosa Elva Norma Del Rio Torres** por recibirme y darme la oportunidad de estar en su grupo de trabajo y así guiarme en mi formación científica, académica y con ello culminar mi proyecto de tesis y la obtención del grado de Maestro en Ciencias. Gracias.*

*Al **D.Q. Mario Armando Gómez Hurtado** por guiarme y apoyarme durante la realización del proyecto de tesis. Gracias.*

AL COMITÉ TUTORAL

Por el apoyo en cuanto a la revisión de la tesis y sus recomendaciones en cada seminario para la culminación de este proyecto y contribución en mi formación.

D.C. Juan Diego Hernández Hernández

D.C. Judit Araceli Aviña Verduzco

D.C. Hugo Alejandro García Gutiérrez

Parte de los resultados de este trabajo han sido presentados en los siguientes foros:

Primer Encuentro de Jóvenes Investigadores del Estado de Michoacán, en el marco del 7° Congreso Estatal de Ciencia, Tecnología e Innovación. Con la ponencia del trabajo titulado: "Aislamiento y Determinación Estructural de Derivados del Mentol" Celebrado el 30 y 31 de octubre de 2012. Morelia, Mich.

Recibió el Primer lugar de los avances del proyecto de tesis presentados en el Encuentro otorgando un estímulo económico.

El presente trabajo se llevó a cabo en los Laboratorios de Química de Productos Naturales del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo bajo la asesoría de la D.C. Rosa Elva Norma del Río Torres y el D.Q. Mario Armando Gómez Hurtado. Con apoyo económico de la CIC-UMSNH, PROMEP-PTC-332.

ÍNDICE

SÍMBOLOS, ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS	vi
RESUMEN	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1. Familia Asteraceae	2
2.2. El género <i>Ageratina</i>	3
2.3. Fitoquímica y aplicaciones biológicas del género <i>Ageratina</i>	3
2.4. <i>Ageratina glabrata</i> H.B.K.	7
2.5. Fitoquímica y actividad biológica de <i>Ageratina glabrata</i> H.B.K.	8
2.6. Aplicaciones de derivados del mentol y <i>p</i> -mentano	11
3. JUSTIFICACIÓN	14
4. OBJETIVO	15
4.1. Objetivos particulares	15
5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	16
6. CONCLUSIONES	75
7. PARTE EXPERIMENTAL	77
7.1. Generalidades	77
7.2. Material vegetal	77
7.3. Obtención de extractos	78
7.4. Tratamiento ácido	78
7.5. Cromatografía en columna	78
8. MARCHA FITOQUÍMICA	92
9. BIBLIOGRAFÍA	93

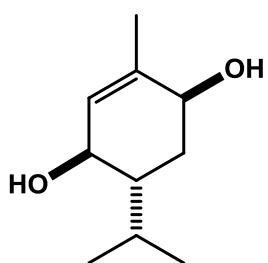
SÍMBOLOS, ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

%	Por ciento
[α]	Rotación específica
α	Alfa
β	Beta
δ	Desplazamiento químico
°C	Grados Celsius
COSY	COrrrelation SpectroscopY
HETCOR	HETeronuclear COrrrelation
NOESY	Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY
Ac.	Ácido
AcO	Acetoxi
AcOEt	Acetato de etilo
Anh.	Anhídrido
ax	Axial
B.E.	Baja Energía
c	Concentración
cm	Centímetros
d	Señal doble
da	Señal doble ancha
dd	Señal doble de dobles
ddd	Señal doble de doble de dobles
dddd	Señal doble de doble de doble de dobles
ddt	Señal doble de doble de triples
dt	Señal doble de triples
dtd	Señal doble de triple de dobles
EMIE	Espectro de Masa de Impacto Electrónico

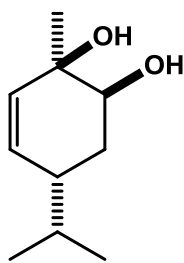
eq	Ecuatorial
eV	Electrón volts
g	Gramos
h	Horas
Hex	Hexano
Hz	Hertz
kg	Kilogramos
m	Señal múltiple
mg	Miligramos
mL	Mililitros
MO	Microondas
m/z	Masa carga
ppm	Partes por millón
RMN de ¹H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
RMN de ¹³C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono Trece
s	Señal simple
septd	Señal séptuple de dobles
t	Señal triple
ta	Señal triple ancha

RESUMEN

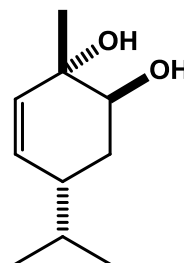
El presente trabajo describe el estudio químico del extracto metanólico de las hojas de *A. glabrata*, el tratamiento ácido de este extracto, permitió aislar cinco derivados del *p*-menteno denominados *p*-ment-1-eno-3,6-diol (**56**), *p*-ment-2-eno-1,6-diol (**57**), 1-*epi-p*-ment-2-eno-1,6-diol (**58**), *p*-ment-2-eno-1,5,6-triol (**59**) y 1-*epi-p*-ment-2-eno-1,5,6-triol (**60**).



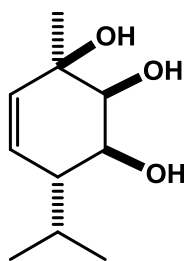
56



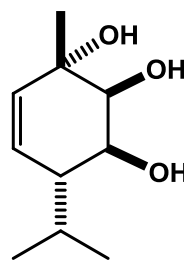
57



58

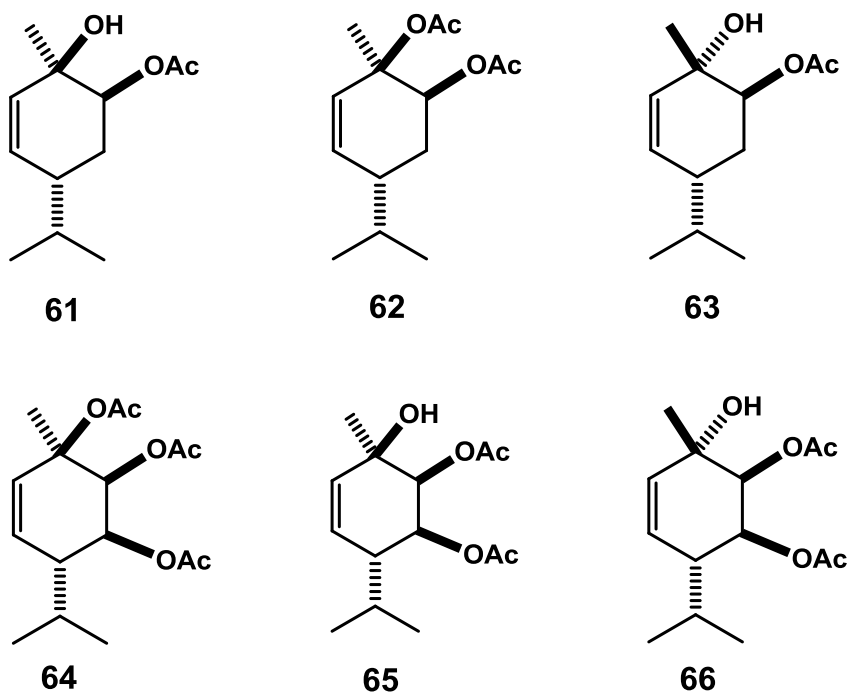


59

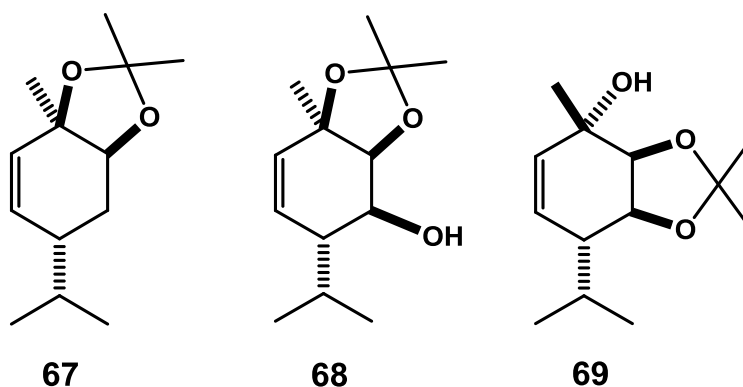


60

Asimismo, se describe la preparación de los derivados acetilados **61-66**, que confirman la presencia de grupos hidroxilo en **57-60**.



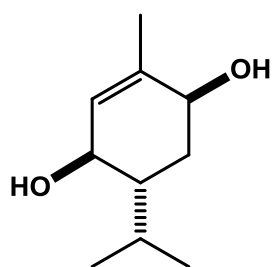
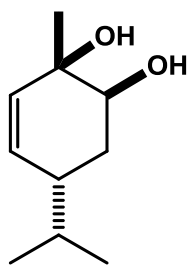
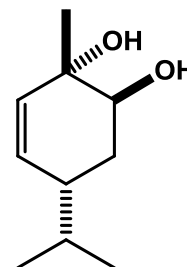
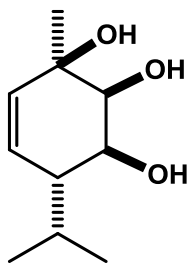
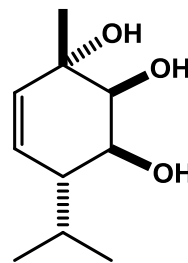
Mientras que la preparación de los acetónidos **67-69** revelaron la posición *cis* de los hidroxilos vecinales OH-1/OH-6 en **67** y **68**, OH-5/OH-6 en **69**.



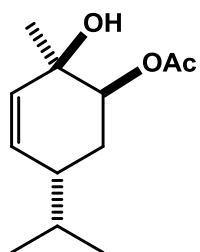
La caracterización estructural de todos los compuestos fue realizada mediante métodos físicos y espectroscópicos, principalmente por RMN de 1D y 2D. La configuración relativa de los *p*-mentenos **57-60** fue establecida a partir del diol **56**, cuya configuración absoluta ya ha sido reportada. Las estructuras **58-66**, así como los derivados **68** y **69** son reportados por primera vez en este estudio.

ABSTRACT

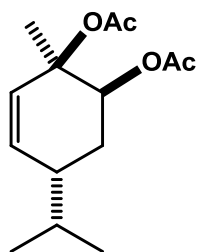
This work describes the chemical study of the methanol extract from the leaves of *A. glabrata*; the acid treatment of this extract, allowed the isolation of five *p*-menthene derivatives named as *p*-menth-1-ene-3,6-diol (**56**), *p*-menth-2-ene-1,6-diol (**57**), 1-*epi-p*-menth-2-ene-1,6-diol (**58**), *p*-menth-2-ene-1,5,6-triol (**59**) and 1-*epi-p*-menth-2-ene-1,5,6-triol (**60**).

**56****57****58****59****60**

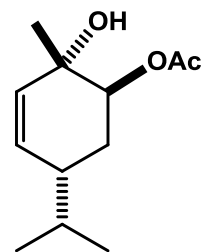
Also, the preparation of acetylated derivatives **61-66**, confirming the presence of hydroxyl groups at **57-60**.



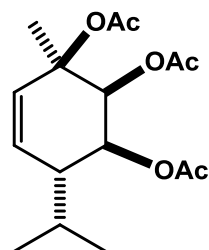
61



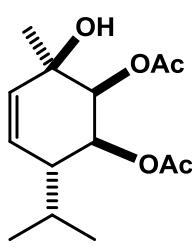
62



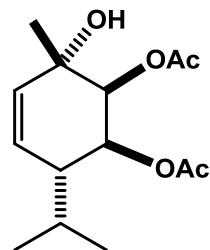
63



64

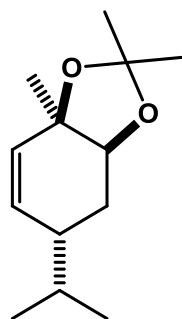


65

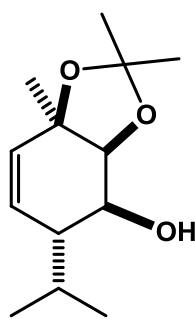


66

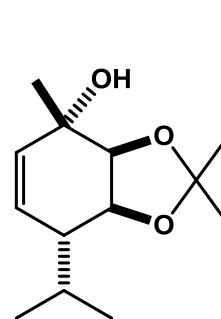
While preparing the acetonides **67-69** revealed the vicinal *cis* position of hydroxyl groups OH-1/OH-6 in **67** and **68**, as well as OH-5/OH-6 in **69**.



67



68



69

The structural characterization of all compounds was performed by physical and spectroscopical methods, mainly 1D and 2D NMR. The relative configuration of the *p*-menthene derivatives **57-60** was established from the diol **56**, whose absolute configuration has already been reported. This is the first report of the chemical structures of **58-66**, **68** and **69**.

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas producen y emiten numerosos compuestos conocidos como metabolitos secundarios, moléculas orgánicas que no parecen tener una función directa en procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos; pero que algunos de ellos intervienen en la defensa vegetal. Estos compuestos se dividen en tres grupos principalmente: los terpenos o terpenoides, que constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios (más de 40,000 moléculas diferentes); los compuestos fenólicos son un grupo muy diverso que comprende desde moléculas sencillas como ácidos fenólicos hasta polímeros complejos como los taninos y la lignina, en este grupo también se encuentran pigmentos como los flavonoides. Finalmente, los alcaloides que son una familia de más de 15,000.^{1, 2}

Desde hace más de un siglo, los metabolitos secundarios han reportado diferentes aplicaciones, desde fármacos, pesticidas, herbicidas, insecticidas y fungicidas, hasta colorantes saborizantes y fragancias. Estos compuestos comúnmente se extraen de plantas silvestres o cultivadas, plantas medicinales y aromáticas. Su acumulación en las plantas es baja y lenta, ya que está regulada espacial y temporalmente, es decir, ocurre en células, órganos y tejidos específicos, en fases determinadas del ciclo de vida de la planta, bajo condiciones estacionales o de estrés.³⁻⁵

México es reconocido a nivel mundial por su diversidad florística en el cual están representados casi todos los tipos de vegetación del planeta, se ha calculado que nuestro país cuenta con un 10 % de la flora del planeta y de acuerdo con las últimas publicaciones se encuentra en el tercer lugar entre los países o regiones con más de 22,000 especies y de 2,663 géneros, de los cuales 218 se consideran endémicos. Los datos muestran que Chiapas, Oaxaca, Veracruz, Jalisco, Michoacán y Guerrero son los Estados con mayor número de especies de plantas vasculares de México.⁶ Las familias con mayor número de géneros en México, destaca en primer lugar la familia Asteraceae con 362 géneros

seguida de las familias Poaceae, Orchidaceae, Fabaceae y Rubiaceae. Estas familias destacan igualmente por su número de especies.⁷

2. ANTECEDENTES

A lo largo de la historia, las plantas han jugado un papel muy importante en la vida del ser humano proporcionando alimentos, fibras, materiales de construcción, medicinas, combustibles y muchos otros productos para satisfacer múltiples necesidades de las poblaciones rurales y urbanas. Tan sólo en México, existen entre 5,000 y 7,000 especies de plantas que tienen algún uso conocido.⁸

2.1. Familia Asteraceae

La familia Asteraceae también conocida como Compositae es una de las más importantes en la medicina tradicional de los pueblos, comprende más de 1,700 géneros y unas 24,000 a 30,000 especies distribuidas por todo el mundo, excepto en la Antártida. Se han encontrado ejemplares desde pequeñas hierbas de 1 cm de altura hasta árboles de más de 30 m. Se caracterizan por su estructura reproductiva, el capítulo donde las flores se disponen en forma sécil sobre un receptáculo ensanchado. La familia Asteraceae en México ocupa un lugar preponderante en la flora, tanto a nivel de géneros como de especies y contribuye substancialmente a la enorme riqueza florística de nuestro País. Actualmente, se calcula para la República Mexicana un total de 3,005 especies nativas de asteráceas, distribuidas en 362 géneros de los cuales 67 son endémicos, los Estados más ricos florísticamente en el sureste mexicano son Chiapas, Oaxaca y Veracruz, y en el oeste son Jalisco y Michoacán. Alrededor del 66% de las especies restringen su área de distribución al Territorio Nacional. Estas cifras aumentan continuamente, debido a la exploración de áreas hasta ahora poco colectadas.⁹⁻¹⁰

2.2. El género *Ageratina*

El género *Ageratina* pertenece a la familia Asteraceae y es un miembro de la tribu Eupatorieae que comprende cerca de 146 especies en México de acuerdo a King y Robinson (1970).¹¹ Se encuentra en las regiones tropicales y templadas, con una amplia distribución que va desde San Luis Potosí hasta Oaxaca; habita en clima templado donde crece a orillas de los caminos, asociada a vegetación perturbada de pastizal, bosques de pino y encino y bosque mesófilo.¹² En general, las especies del género *Ageratina* poseen propiedades terapéuticas, tales como el efecto analgésico y son utilizadas en la medicina tradicional en diferentes partes del mundo incluyendo México, empleando las diferentes partes de la planta para curar dolencias consumidas en forma de infusiones. Actualmente existen reportes de compuestos obtenidos de especies del género *Ageratina* que han demostrado tener actividades antimicrobianas y antiinflamatorias interesantes.¹³

2.3. Fitoquímica y aplicaciones biológicas del género *Ageratina*

De los tallos de *Ageratina glechonophylla*, reportaron tres derivados del timol un compuesto ya conocido; 10-acetoxi-3-O-isobutiril-8,9-epoxitimol (**1**) y dos nuevos compuestos; 8,9,10-trihidroxitimol (**2**) y 10-acetoxi-8,9-dihidroxi-3-O-isobutiriltimol (**3**), los autores mencionan la posibilidad de que 2 y 3 sean artificios generados durante el proceso de purificación por cromatografía.¹⁴ **Figura 1.**

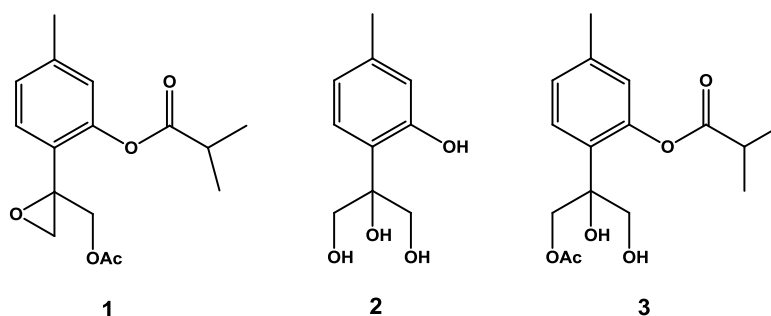


Figura 1. Derivados del timol aislados de *Ageratina glechonophylla*.

En otro estudio de las partes aéreas de *A. glechonophylla*, fueron reportados el espathulenol (**4**) y dos nuevos compuestos derivados del timol denominados glechonina A (**5**) y glechonina B (**6**).¹⁵ **Figura 2.**

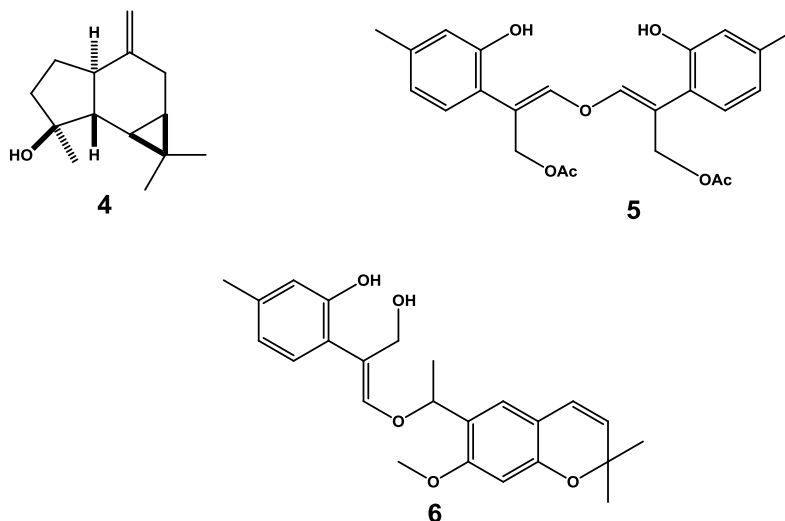


Figura 2. Compuestos aislados de *A. glechonophylla*.

De las partes aéreas del extracto etanólico de *A. vacciniaefolia* reportaron un nuevo compuesto identificado como β -D-glucopiranosil éster de (-)-17-(β -glucopiranosiloxil)-16-hidroxi-kauran-19-oico (**7**).¹⁶ **Figura 3.**

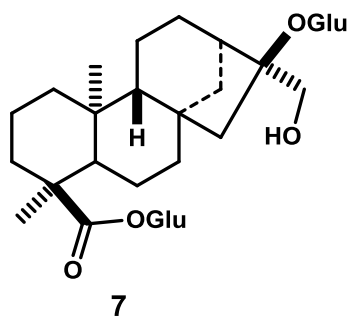


Figura 3. Compuesto aislado de *A. vacciniaefolia*.

De la fracción soluble en agua, proveniente del extracto etanólico de las hojas de *A. arbutifolia*, se reportaron los flavonoides glicosilados quercetagetina-6-metoxi-3-O- β -galactósido (**8**) y quercetina-3-O- β -galactósido (**9**) cuyas estructuras

fueron determinadas con base en sus datos espectroscópicos y los de sus agliconas.¹⁷ **Figura 4.**

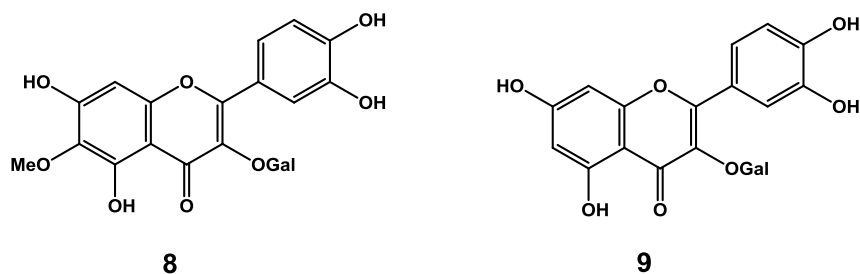


Figura 4. Flavonoides aislados de *A. arbutifolia*.

De los extractos de éter de petróleo tanto de hojas como de flores de *A. fastigiata*, se identificaron derivados del kaurano; el *ent*-kauran-16 α -ol (**10**), *ent*-kauran-16,20-diol (**11**) y así como las flavonas metoxiladas; 5-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavona (**12**) y la 5-hidroxi-3,7,4'-trimetoxi-flavona (**13**).¹⁸ **Figura 5.**

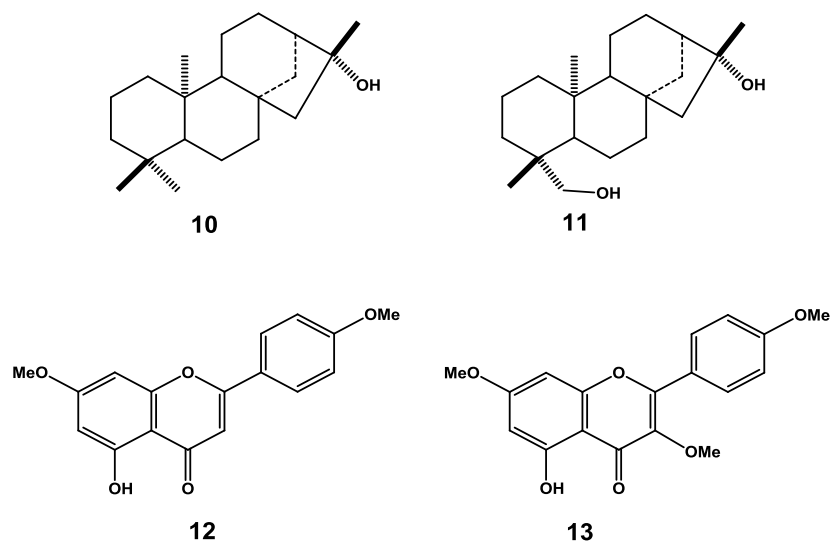


Figura 5. Compuestos aislados de *A. fastigiata*.

El carvacrol (**14**) y timol (**15**) han sido reportados en *A. ibaguensis* (*Eupatorium ibaguense*) cuya actividad antimicrobiana también fue descrita.¹⁹ **Figura 6.**

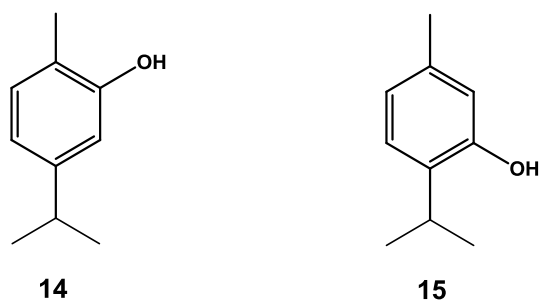


Figura 6. Compuestos aislados de *A. ibaguensis*.

Por otro lado, ha sido descrita la actividad antiviral contra el herpes simple tipo I y II, de cuatro compuestos mayoritarios de tipo flavonoide; 5,4'-dihidroxi-7-metoxiflavanona (sakuranetina) (**16**), 3,5,4'-trihidroxi-7-metoxiflavanona (7-metoxiaromadendrina) (**17**), 4'-O- β -D-glucosil-5,3'-dihidroxi-7-metoxiflavanona (4'-O- β -D-glucosil-7-metoxi-eriodictiol) (**18a**) y 4'-O- β -D-glucosil-5-hidroxi-7-metoxiflavanona (4'-O- β -D-glucosil-sakuranetin) (**18b**) obtenidos mediante cromatografía del extracto de acetato de etilo de hoja de *A. havanensis*.²⁰ **Figura 7.**

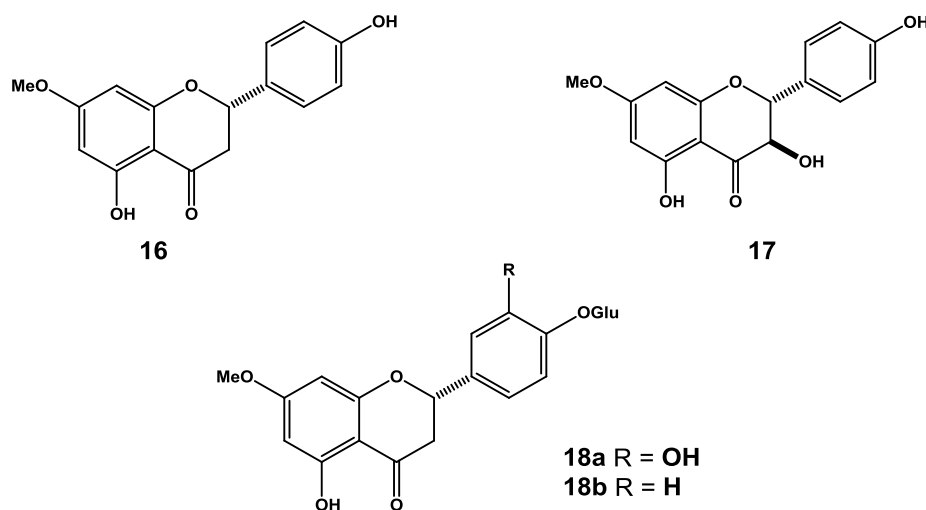


Figura 7. Flavonoides aislados de *A. havanensis*.

De *A. pichinchensis* fue descrito el cromeno sonorol (**19**), el sesquiterpeno bicíclico (+)- β -eudesmol (**20**), sus derivados **20a** y **20b**; así como el triterpeno taraxerol (**21**) los cuales presentan actividad antimicrobiana contra dermatofitos

responsables de la infección por tiña, *Trichophyton rubrum* y *T. mentagrophytes*, así como frente a *Candida albicans* y *Aspergillus niger*.²¹ **Figura 8.**

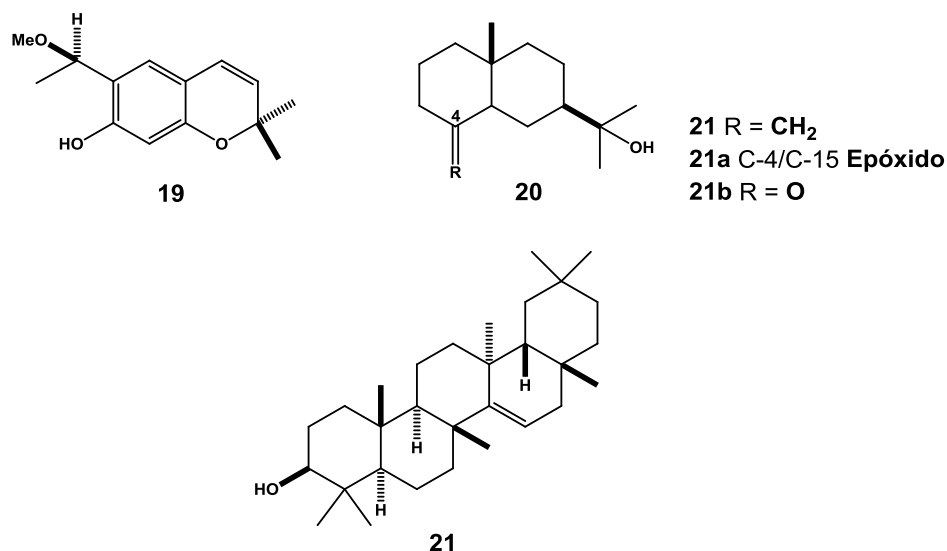


Figura 8. Compuestos aislados de *A. pichinchensis*.

La actividad farmacológica del extracto etanólico de los tallos de *A. sternbergiana*, el cual presentó una mayor efectividad antiinflamatoria a dosis de 200 mg/kg, el análisis fitoquímico de los tallos de la planta, reveló la presencia de azúcares, flavonoides, alcaloides, esteroides, cumarinas, taninos y aminoácidos.²²

2.4. *Ageratina glabrata* H.B.K.

Ageratina glabrata en Michoacán, se ha establecido exitosamente en la zona del volcán Paricutín.^{23, 24} Crece en forma de arbusto silvestre con una altura de 1.5 a 2 metros de altura en favorable condición de humedad. Es un arbusto erecto, ramoso, de tallos estriados, hojosos hasta la inflorescencia y hojas romboideo-oblongadas con distribución opuesta, de flores blanquecinas rosadas en capítulos numerosos **Figura 9**. Es conocida popularmente con el nombre de chamizo blanco, cedazo o zacate de mula, hierba del golpe e hilo y se emplea por su presunta actividad analgésica.^{25, 26} En el Estado de México se le emplea para

abatir el dolor de estómago tomando la infusión de la raíz; y en el Estado de Hidalgo se usa la parte aérea en cocimiento para baños postparto.²⁷



Figura 9. *Ageratina glabrata*

2.5. Fitoquímica y actividad biológica de *Ageratina glabrata* H.B.K.

La especie *A. glabrata*, cuenta con estudios químicos previos, se reportaron de los extractos de éter de petróleo de raíz, hoja y flor once derivados del timol con esqueletos base (I) y (II)²⁸ como se muestran en la **Figura 10**.

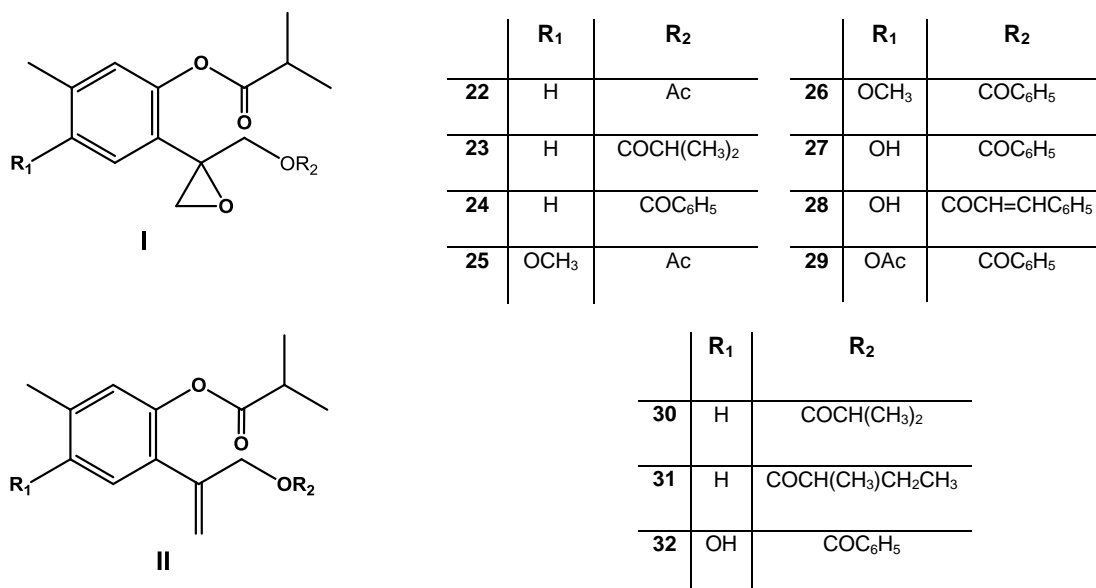


Figura 10. Derivados del timol aislados de *A. glabrata*.

Más tarde fueron reportados de los extractos de cloroformo de *A. glabrata* al ácido benzóico (**33**), 5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavona ó acacetina (**34**), ácido ilícico (**35**) y un compuesto nuevo llamado eupaglabrina (**36**).²⁹ **Figura 11.**

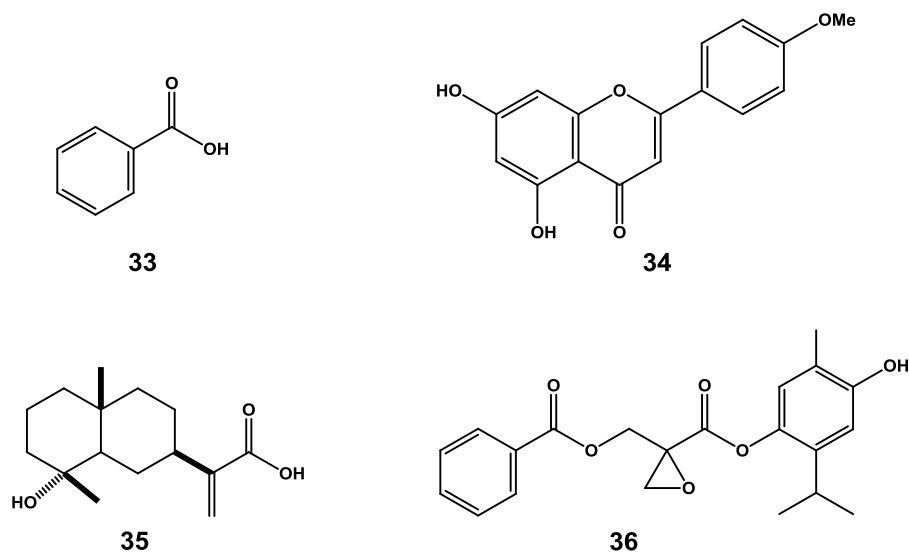


Figura 11. Compuestos aislados de *A. glabrata*.

En nuestro grupo de trabajo, con la finalidad de comprobar el uso medicinal atribuido a la planta *A. glabrata* donde se le reconoce por su presunta actividad analgésica y antimicrobiana,^{26, 27} se realizó un estudio preliminar de los extractos hexano, diclorometano y metanol, de las diferentes partes de la planta (hoja, flor, tallo y raíz) contra bacterias y hongos representativos causantes de infecciones de interés humano, obteniendo el mejor resultado para el extracto metanólico de hoja.³⁰ Posteriormente, para el extracto de diclorometano de hoja de *A. glabrata* se evaluó la posible actividad analgésica y utilizando la técnica del plato caliente aplicando dosis de 100 mg/kg, este estudio preliminar indica un efecto antinociceptivo cuando es utilizado a la dosis mencionada, con cinco horas posteriores a la administración.³¹ Demostrando así la actividad analgésica y antimicrobiana de *A. glabrata* primeramente se llevó a cabo el fraccionamiento del extracto metanólico de hoja mediante cromatografía en columna con la finalidad de aislar y purificar el compuesto o compuestos mayoritarios responsables de dicha actividad microbiana logrando obtener dos compuestos mayoritarios el 6-O-

β -D-glucopiranosiloxi-1-*p*-menten-3-ol (37) y 10-benzoiloxi-6,8,9-trihidroxi-3-isobutirato de timilo (38).³⁰ **Figura 12.**

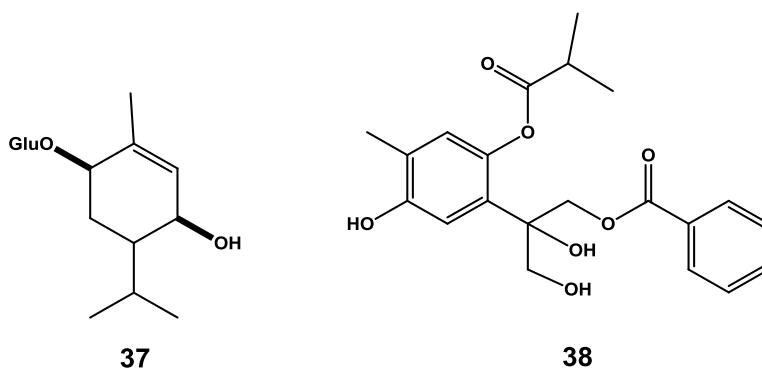


Figura 12. Compuestos aislados del extracto metanólico de hojas de *A. glabrata*.

De igual manera para encontrar los compuestos responsables de dicha actividad analgésica se realizó un estudio químico del extracto de diclorometano de hojas de *A. glabrata* del cual se aislaron y caracterizaron; tres derivados del timol; ³² 10-benzoiloxi-6,8,9-trihidroxi-3-isobutirato de timilo (38) el cual se acetiló, obteniendo un nuevo derivado (39), 10-benzoiloxi-8,9-epoxi-isobutirato de timilo (24) y 10-benzoiloxi-8,9-epoxi-6-hidroxi-isobutirato de timilo (27) reportados por Bohlmann y col. 1977, así como dos sesquiterpenos de tipo eudesmano, el ácido ilícico (35) reportado por Guerrero y col. 1978 y el ácido 3-oxo- γ -cóstico (40).

Figura 13.

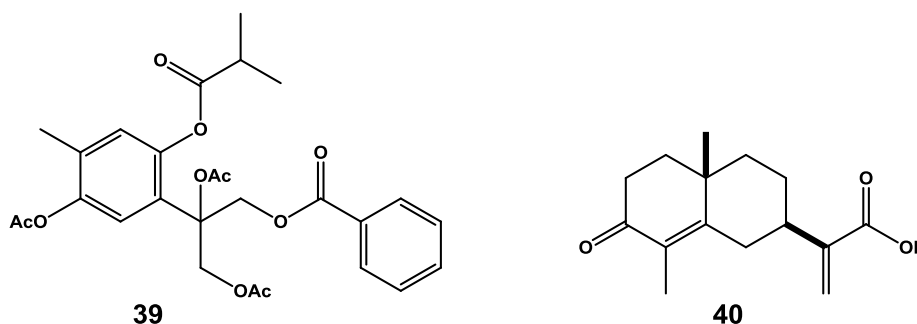


Figura 13. Compuestos aislados del extracto de diclorometano de hojas de *A. glabrata*.

Como se pudo apreciar, existen reportes previos de *A. glabrata* sobre derivados de monoterpenos, principalmente del timol, por lo que resulta interesante la búsqueda de este tipo de estructuras en este género y así contribuir con el conocimiento quimiotaxonómico del género *Ageratina*. Por otro lado existen numerosos reportes de aplicaciones tanto biológicas como en la industria alimentaria tanto del mentol como de derivados de este, de los cuales se mencionan algunos a continuación.

2.6. Aplicaciones de derivados del mentol y *p*-mentano

Uno de los estudios muestra que el (-)-mentol (**41**) presenta propiedades analgésicas a través de la activación selectiva del receptor *k*-opioide.³³ Otros terpenos naturales exhiben propiedades de enfriamiento como el (-)-Isopulegol (**42**) y los *cis*, *trans*-*p*-mentano-3,8-dioles (**43a** y **43b**) que imparten una sensación de frescura, textura crujiente, y frescor a fragancias de tipo de cítricos y algunos se venden bajo el nombre Coolact P (FEMA-2962) por Takasago International.³⁴⁻³⁷

Figura 14.

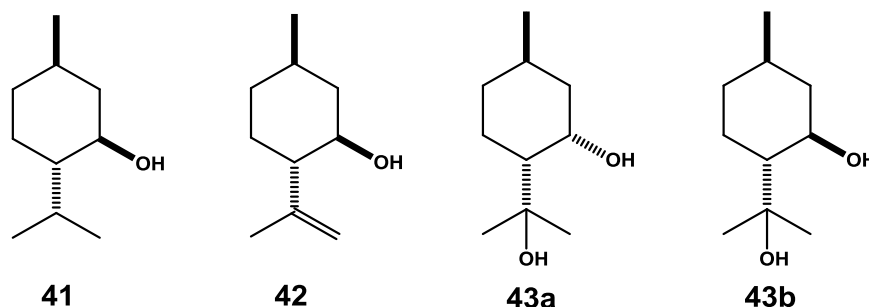


Figura 14. Compuestos derivados del mentol.

De los extractos metanólicos de *Brickellia rosmarinifolia* Vent. introducida en el Sur de China, de la planta completa reportaron una potente actividad antifúngica contra *Colletotrichum musae* y *Peronophythora litchii*, del fraccionamiento de los extractos metanólicos de esta especie encontraron dos compuestos

monoterpénicos conocidos; (1*R*,3*S*,4*R*,6*S*)-(+)-6-hidroxi-mentol (**44**) y 4-isopropil-1-metilciclohex-2-eno-1,6-diol (**45**).³⁸⁻⁴⁰ **Figura 15.**

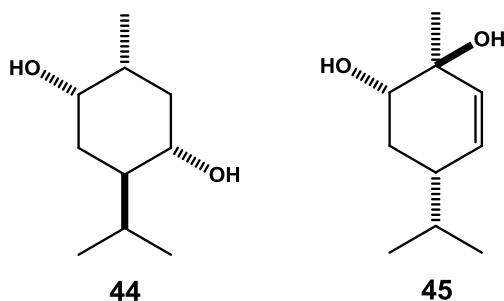


Figura 15. Derivados del *p*-mentano aislados de *B. rosmarinifolia*.

A partir del mentol (**41**) en la incubación con el hongo *Rhizoctonia solani* mediante un proceso de biotransformación se generaron: (1*S*,3*R*,4*S*,6*S*)-(-)-6-hidroxi-mentol (**46**), (1*S*,3*R*,4*S*)-(-)-1-hidroxi-mentol (**47**) y (1*S*,3*R*,4*R*,6*S*)-(+)-6,8-dihidroxi-mentol (**48**).⁴¹ **Figura 16.**

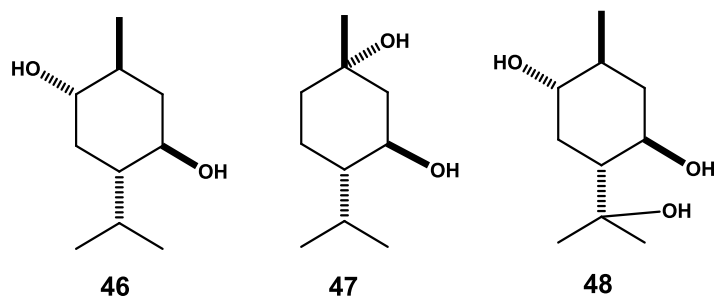


Figura 16. Derivados del mentol.

Posteriormente demostraron la actividad lítica de estos metabolitos contra *Micronectriella nivalis* hongo filamentoso causante de la pudrición de hortalizas y frutos, enfermedad conocida como tizón de nieve. Los resultados indicaron que el aumento de un grupo hidroxilo en 1 y la hidroxilación en la posición C-6 son factores importantes para la actividad lítica contra *M. nivalis*. Por otro lado, los ésteres de acetilo **41a**, **46a**, **47a**, y **48a** mostraron actividad lítica más alta en comparación con los alcoholes.⁴² **Figura 17.**

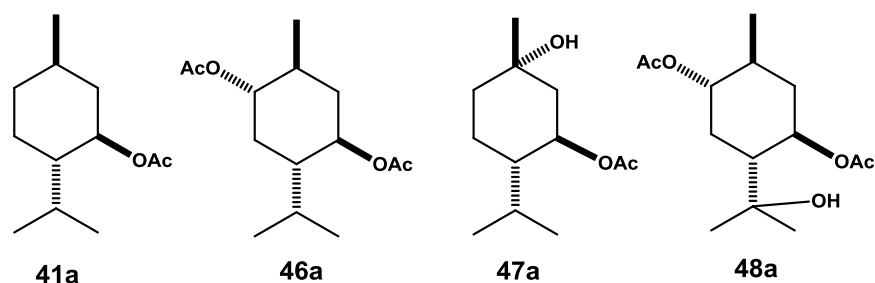


Figura 17. Derivados acetilados del mentol *R. solani*.

Biotransformaciones del (*R*)-(-)-felandreno (**49**) con el hongo *Corinespora cassicola* DSM 62474 y del (*S*)- α -terpineno-4-ol (**52**) con el hongo *Gibberella cyanea* DSM 62719 condujeron a yabunikkeol (**50**), 5-*p*-menten-2-ona (**51**) y (1*S*,2*S*,4*S*)-*p*-mentan-1,2,4-triol (**53**), 6-*p*-menten-2,4-diol (**54**) y (1*R*,2*R*,4*S*)-2-hidroxi-1,4-cineol (**55**) respectivamente.⁴³ **Figura 18.**

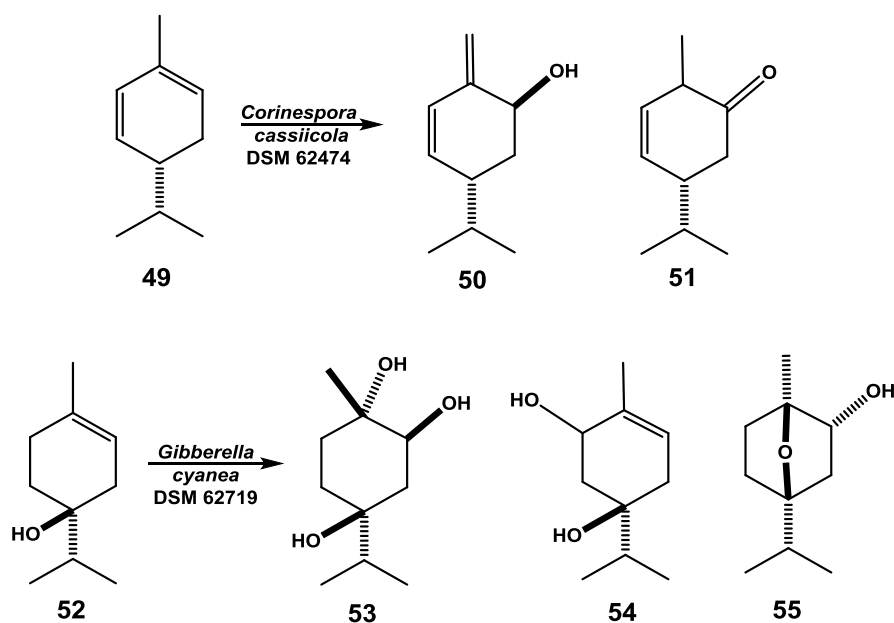


Figura 18. Derivados del *p*-mentano obtenidos de *C. cassicola* y *G. cyanea*.

Como se puede apreciar existe una gran variedad de compuestos derivados del *p*-mentano con diferentes actividades biológicas obtenidos de fuentes naturales, modificaciones químicas así como por biotransformaciones.

3. JUSTIFICACIÓN

La búsqueda de compuestos de origen vegetal ha sido de gran importancia desde el punto de vista socioeconómico así como de salud humana, ya que las plantas cuentan con una diversidad de principios activos, debido a que son organismos que carecen de movimiento y tienen la necesidad de producir compuestos químicos que ayudan a su defensa contra patógenos y agresores, así como para la comunicación con el entorno y su reproducción, de quienes es posible aislar compuestos que presenten alguna utilidad farmacológica.

Las especies del género *Ageratina* son utilizadas en la medicina tradicional en diferentes partes del mundo incluyendo México, empleando las diferentes partes de la planta para curar dolencias consumida en forma de infusiones, además ya existen reportes de compuestos con actividades antimicrobianas y antiinflamatorias interesantes.

A pesar de que existen reportes previos de estudios químicos de *A. glabrata*, no hay reportes de análisis químicos de los extractos metanólicos de ninguna de las partes de esta planta por lo que es necesario complementar la información descrita de esta especie debido a la posibilidad de contribuir con el conocimiento de nuevos metabolitos secundarios polares dentro del género.

4. OBJETIVO

Aislar, purificar e identificar los compuestos presentes en el extracto metanólico de hojas de *Ageratina glabrata*.

4.1. Objetivos particulares

1. Obtener el extracto metanólico de hojas de *A. glabrata*.
2. Fraccionar el extracto metanólico total mediante particiones líquido-líquido con diclorometano y/o extracciones selectivas para alcaloides.
3. Aislar mediante técnicas cromatográficas los componentes obtenidos de las extracciones selectivas.
4. Determinar la estructura molecular de las sustancias aisladas mediante métodos físicos, químicos y espectroscópicos.

5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se llevó a cabo la colecta de *A. glabrata*, se dejó secar a la sombra para su separación en sus distintas partes; flor, hoja, tallo y raíz, posteriormente se tomaron las hojas y se pusieron a macerar a temperatura ambiente durante tres días usando como primer disolvente hexano, posteriormente se concentró en un rotavapor repitiendo ésta etapa tres veces; obteniendo el extracto hexánico. Se continuó la maceración utilizando diclorometano como segundo disolvente y por último metanol, repitiendo el procedimiento anteriormente descrito hasta la obtención del extracto de diclorometano y metanólico.

Una vez obtenido el extracto metanólico de hoja de *A. glabrata* y analizar su espectro de RMN de ^1H se pudo apreciar la presencia de protones aromáticos de 8.0 - 6.0 ppm, bases de heteroátomo de 4.5 - 3.0 ppm en mayor proporción y grupos alifáticos de 2.0 - 0.5 **Figura 19**.

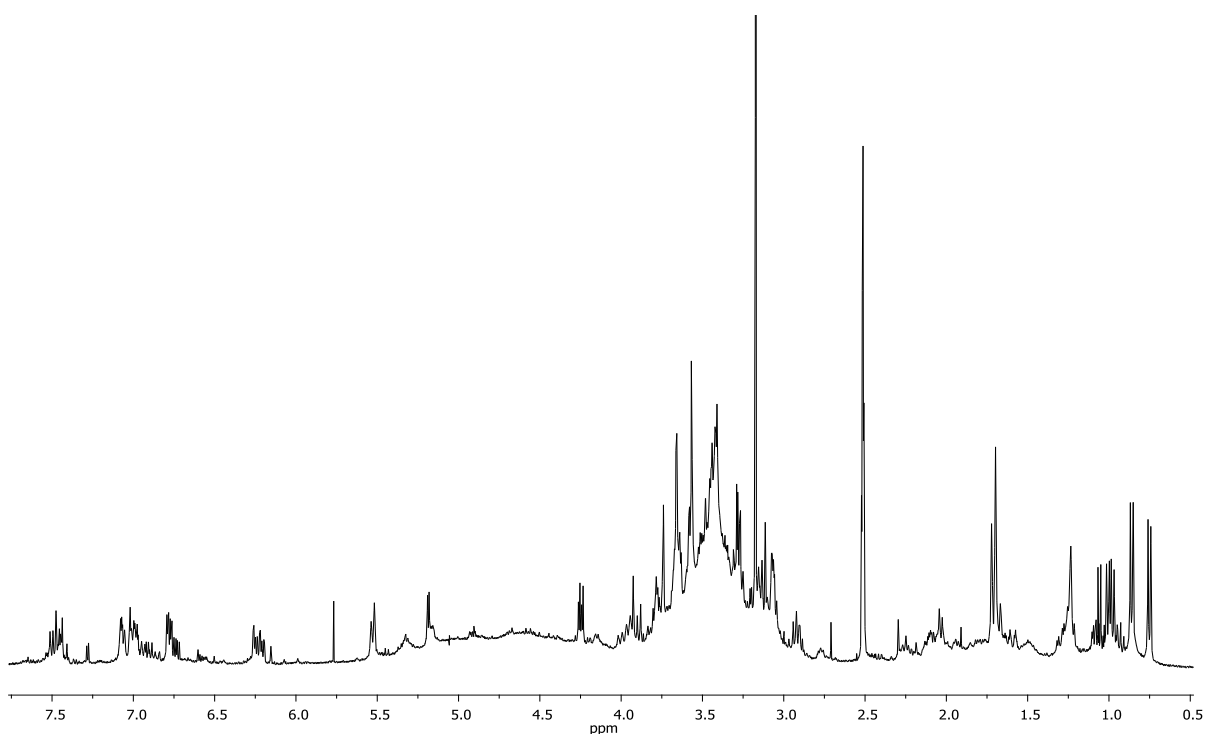


Figura 19. Espectro de RMN de ^1H del extracto metanólico total de hoja de *A. glabrata*.

Este extracto fue sometido a una extracción selectiva de alcaloides⁴⁴ de la cual se obtuvo una miel color marrón, que al ser analizada por RMN de ^1H se observa la presencia de señales correspondientes a protones aromáticos de 8.2 - 7.3 ppm, hidrógenos vinílicos entre 5.8 - 5.5 ppm, bases de heteroátomo en 3.7 ppm y señales correspondientes a protones alifáticos de 2.5 - 0.7 ppm, destacando la presencia de grupos metilos, **Figura 20**.

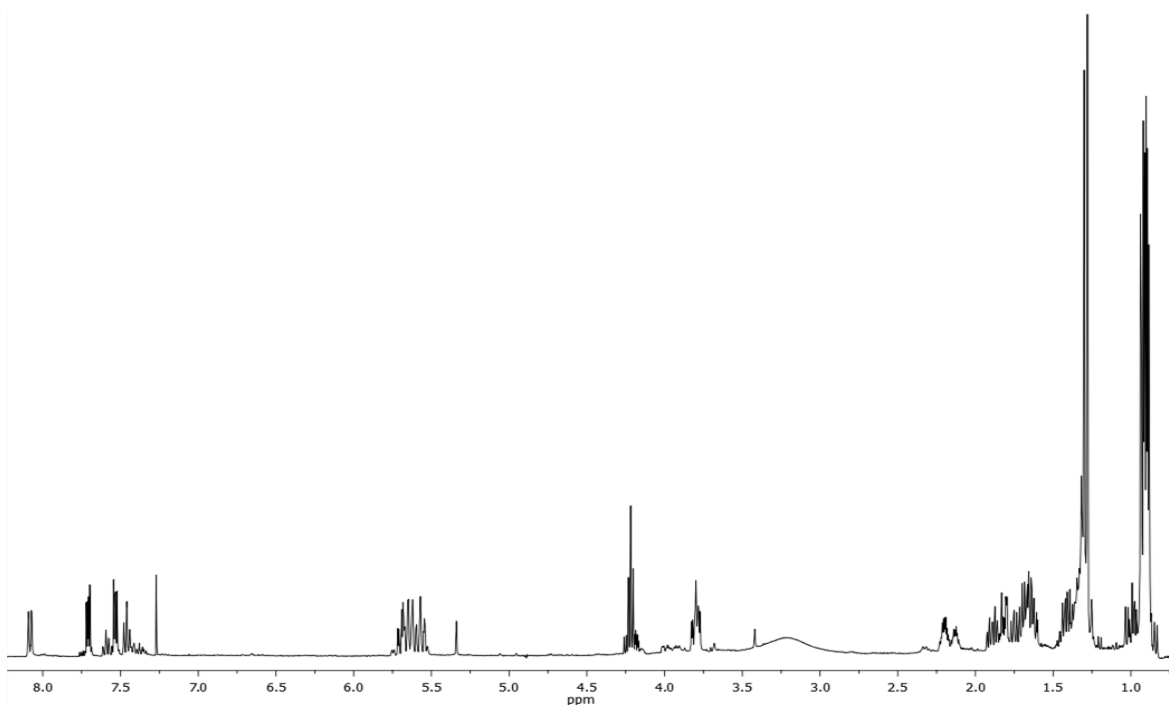


Figura 20. Espectro de RMN de ^1H del tratamiento ácido del extracto metanólico de hoja de *A. glabrata* en CDCl_3 .

Esta miel color marrón fue llevada a columna cromatográfica para su separación y después de varias recromatografías sucesivas utilizando como fase móvil mezclas de hexano-diclorometano, comenzando con hexano y aumentando crecientemente la polaridad diclorometano-metanol se aislaron cinco derivados del *p*-menteno, **56-60 Figura 21**.

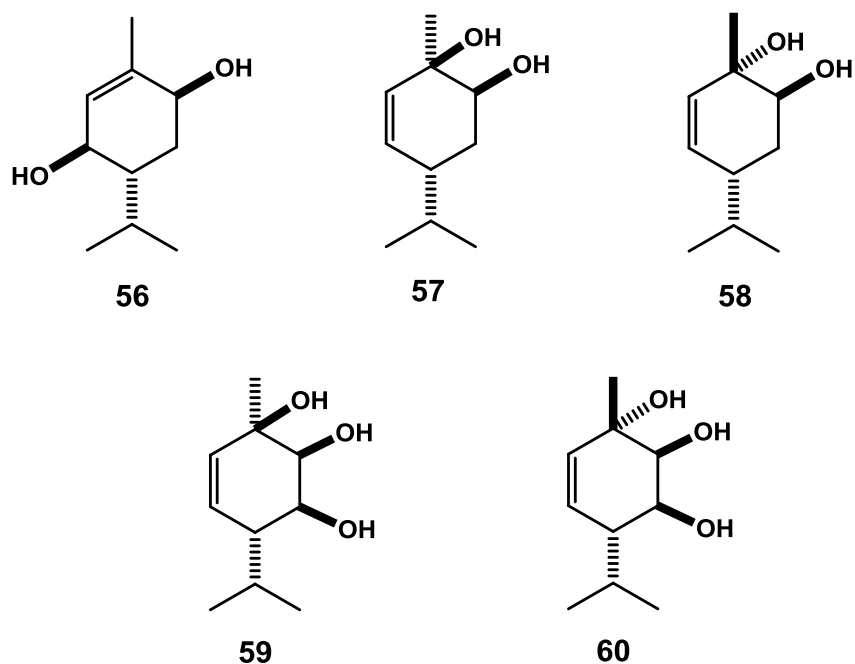


Figura 21. Derivados del *p*-menteno.

Después de analizar los productos **56** al **60** obtenidos con la técnica de extracción selectiva para alcaloides⁴⁴ y ver que en su estructura no se encontró la presencia de compuestos nitrogenados, se decidió tratar el extracto metanólico de hojas de *A. glabrata* en medio ácido en agitación durante 2 h a temperatura ambiente, pudiéndose observar por RMN de ¹H la misma mezcla de compuestos obtenidos con la extracción selectiva de alcaloides **Figura 20**. Por lo que la obtención posterior de estos derivados del *p*-menteno se llevó a cabo bajo esas condiciones, a continuación se discuten los espectros de RMN de 1D y 2D obtenidos para cada compuesto.

En el espectro de RMN de ¹H del *p*-ment-1-eno-3,6-diol (**56**) se observa una señal simple ancha en 5.44 ppm correspondiente a H-2, además una señal triple ancha en 3.89 ppm con una $J = 4.1$ Hz correspondiente al protón base de alcohol en la posición H-6 y en 3.82 ppm una señal doble ancha con una $J = 9.2$ Hz correspondiente al protón base de alcohol en la posición H-3. En 2.09 ppm se observa una señal séptuple de dobles con una $J = 6.8$ y 2.8 Hz correspondiente al H-7 base del isopropilo; en 1.74 ppm se observa una señal simple correspondiente

al metilo vinílico CH₃-10; en 1.69 se observa una señal doble de doble de dobles con una $J = 13.5, 2.8$ y 2.8 Hz correspondiente al protón geminal H-5eq y en 1.36 ppm se observa una señal doble de doble de dobles con una $J = 13.5, 13.1$ y 4.1 Hz para el protón geminal en la posición H-5ax. El H-4 se observa como una señal doble de doble de doble de dobles en 1.56 ppm con una $J = 13.1, 9.2, 2.8$ y 2.8 Hz. En 0.95 ppm y 0.80 ppm se observan dos señales dobles correspondientes a dos metilos de isopropilo etiquetados como CH₃-8 y CH₃-9, con una $J = 6.8$ y 6.8 Hz respectivamente. **Figura 22.**

En el espectro de RMN de ¹³C **Figura 23**, se observan las 10 señales indicando la presencia de un monoterpeno; se observan dos señales en 137.3 y 130.9 ppm respectivamente, correspondientes a los carbonos vinílicos C-1 y C-2. Las señales encontradas en 69.8 y 68.3 ppm corresponden a los carbonos base de alcohol C-3 y C-6. En 42.7 y 26.8 ppm se observan las señales correspondientes a los carbonos metínicos C-4 y C-7. En 30.7 ppm la señal de un metileno correspondiente al carbono C-5. Además de la señal de un metilo vinílico en 20.7 ppm correspondiente al C-10 y las señales características de los metilos de isopropilo en 21.3 y 17.0 ppm.

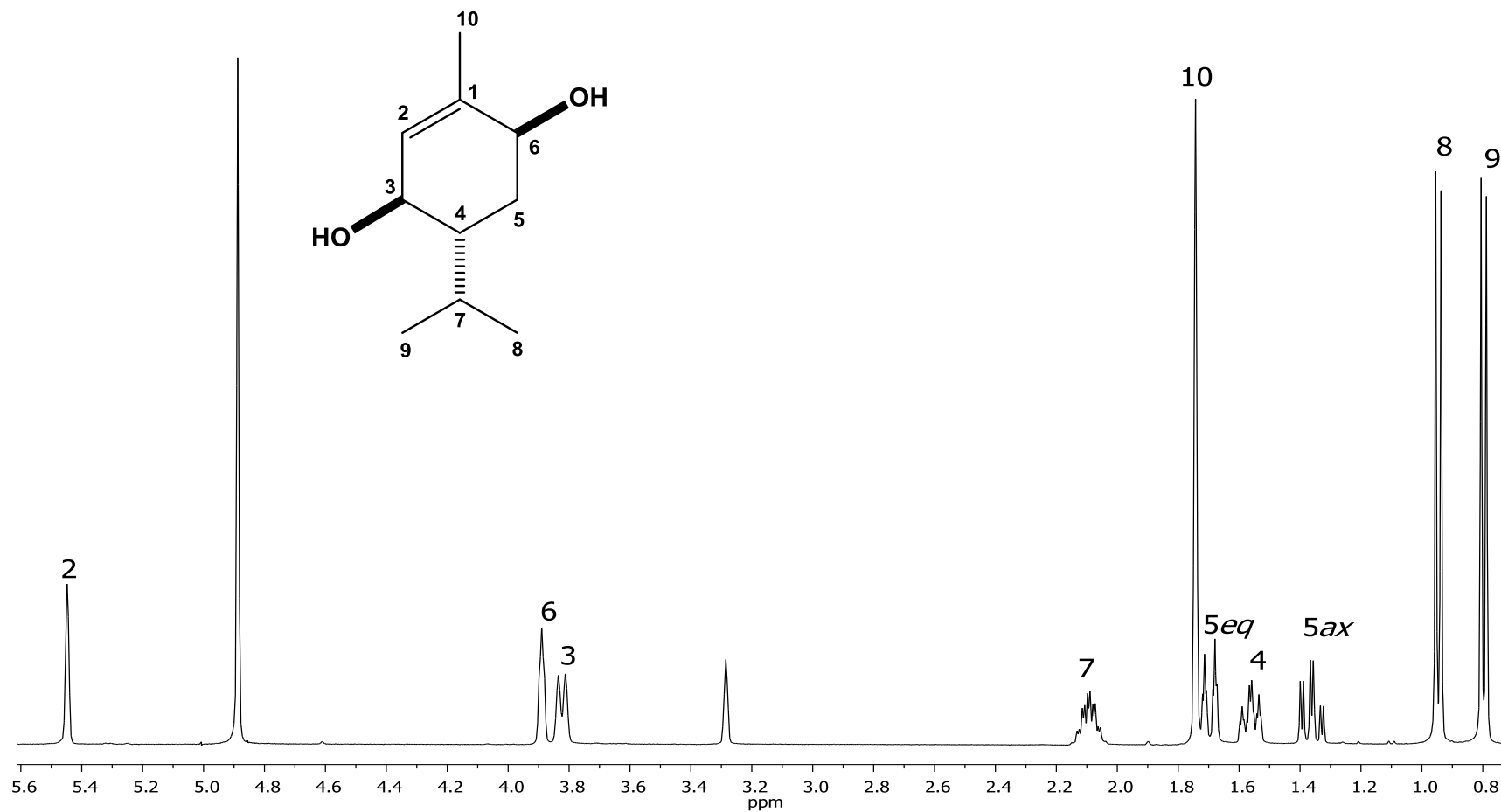


Figura 22. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del *p*-ment-1-eno-3,6-diol (56) en CD_3OD .

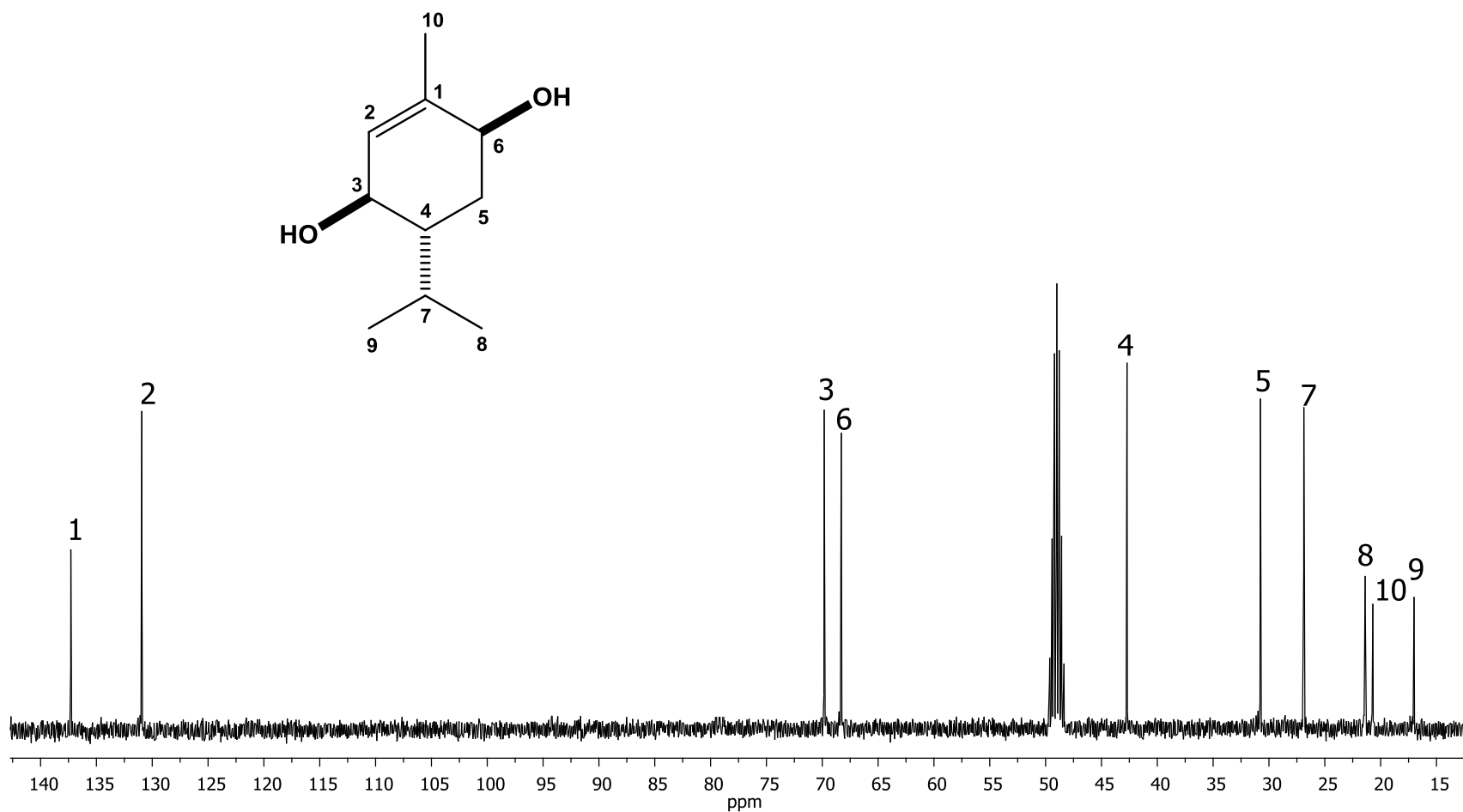


Figura 23. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del *p*-ment-1-eno-3,6-diol (56) en CD_3OD .

Para el diol **56** se obtuvieron cristales incoloros en forma de agujas cuyo punto de fusión fue de 205-207 °C, el análisis mediante RMN arrojó como resultado un compuesto dihidroxilado derivado del *p*-menteno cuyos datos físicos y espectroscópicos fueron iguales a los descritos en la literatura,⁴⁵ la difracción de rayos X de monocristal de este compuesto confirmó de manera inequívoca la estructura molecular **Figura 24**.

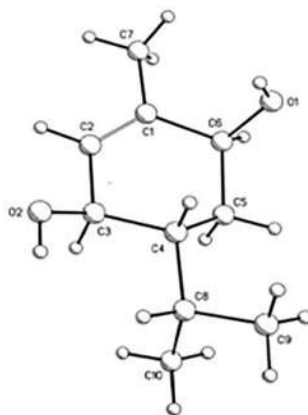


Figura 24. Diagrama ORTEP del *p*-ment-1-eno-3,6-diol (**56**).

En el espectro de RMN de ^1H del *p*-ment-2-eno-1,6-diol (**57**) se observan una señal doble de doble de dobles con $J = 10.4, 2.8$ y 1.0 Hz en 5.65 ppm y en 5.55 ppm otra señal doble de doble de dobles con $J = 10.4, 2.8$ y 1.6 Hz correspondiente a los hidrógenos vinílicos H-3 y H-2, respectivamente; en 3.76 ppm se observa una señal doble de triple correspondiente al hidrógeno base de alcohol H-6 con una $J = 5.6, 1.6$ y 1.6 Hz; en 2.19 ppm se encuentra una señal doble de doble de triples con una $J = 14.4, 5.6$ y 2.8 Hz para el H-4; en 1.88 ppm se observa una señal doble de triple de dobles con una $J = 14.2, 5.8$ y 1.0 Hz correspondiente al protón geminal H-5_{eq} y en 1.63 ppm se observa una señal triple con una $J = 14.2$ Hz del protón geminal H-5_{ax}; en 1.62 ppm se aprecian una señal múltiple para H-7; en 1.26 ppm aparece una señal simple correspondiente al metilo base de alcohol en la posición CH₃-10; en 0.88 y 0.87 ppm se observan dos señales dobles correspondientes a dos metilos de isopropilo en las posiciones CH₃-9 y CH₃-8 con una $J = 6.8$ Hz. **Figura 25**.

En el espectro de RMN de ^{13}C **Figura 26**, se observan 10 señales lo que sugiere la presencia de un monoterpeno; se observan dos señales en 132.0 y 131.0 ppm correspondientes a los carbonos vinílicos C-2 y C-3 respectivamente; las señales encontradas en 72.7 y 70.2 ppm corresponden cada una a los carbonos base de alcohol C-6 y C-1 en orden de aparición; en 37.4 y 31.4 ppm se observan las señales correspondientes a los carbonos metínicos C-4 y C-7; en 29.3 ppm es observada la señal del metileno C-5; finalmente se aprecia la señal del metilo vinílico en 27.0 ppm correspondiente al C-10 así como las señales características de los metilos de isopropilo en 19.6 y 19.3 ppm.

El *p*-ment-2-eno-1,6-diol (**57**) corresponde a un compuesto ya conocido, cabe mencionar que los datos físicos y espectroscópicos correspondieron a los reportados en la literatura.³⁹

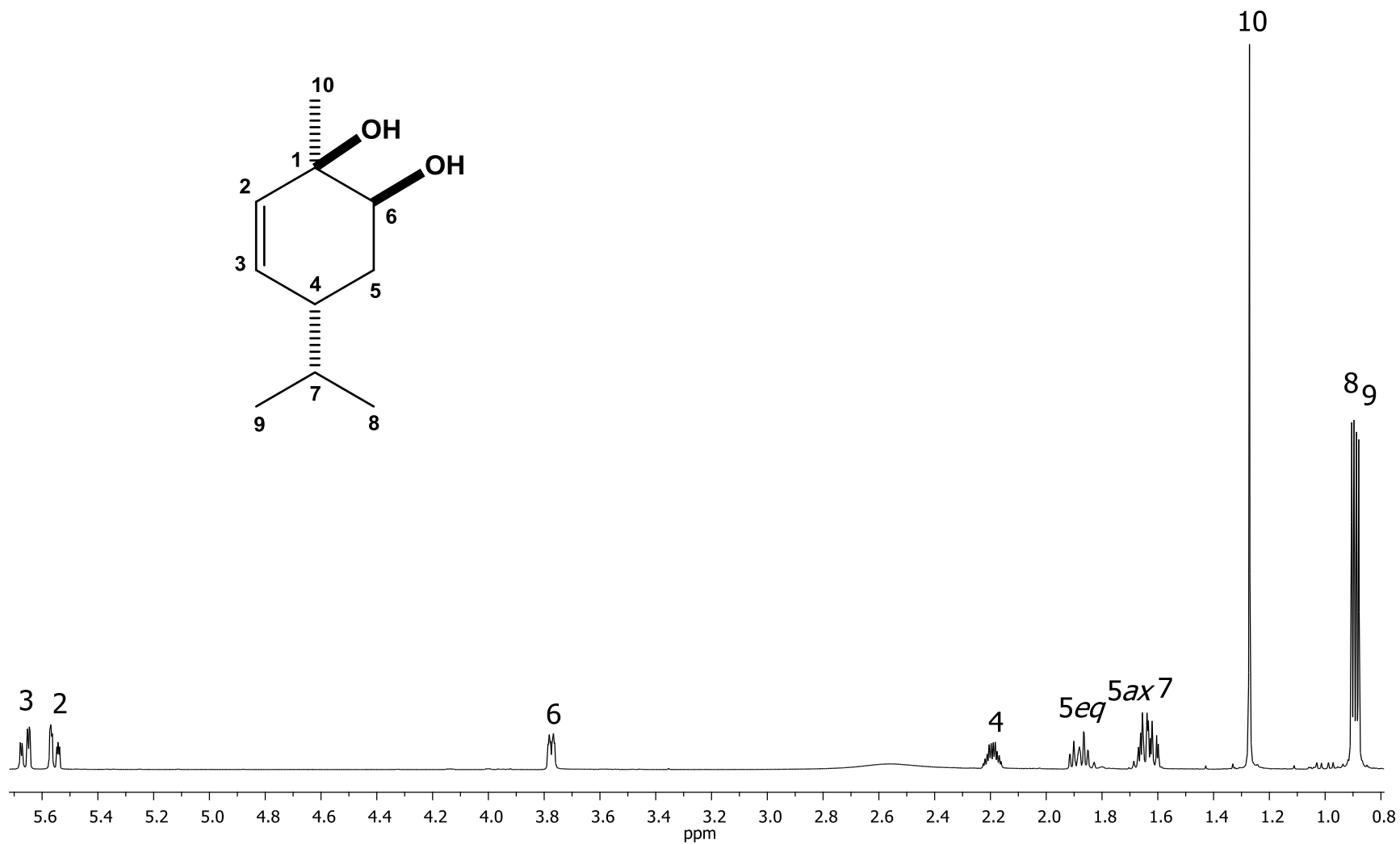


Figura 25. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del *p*-ment-2-eno-1,6-diol (57) en CDCl_3 .

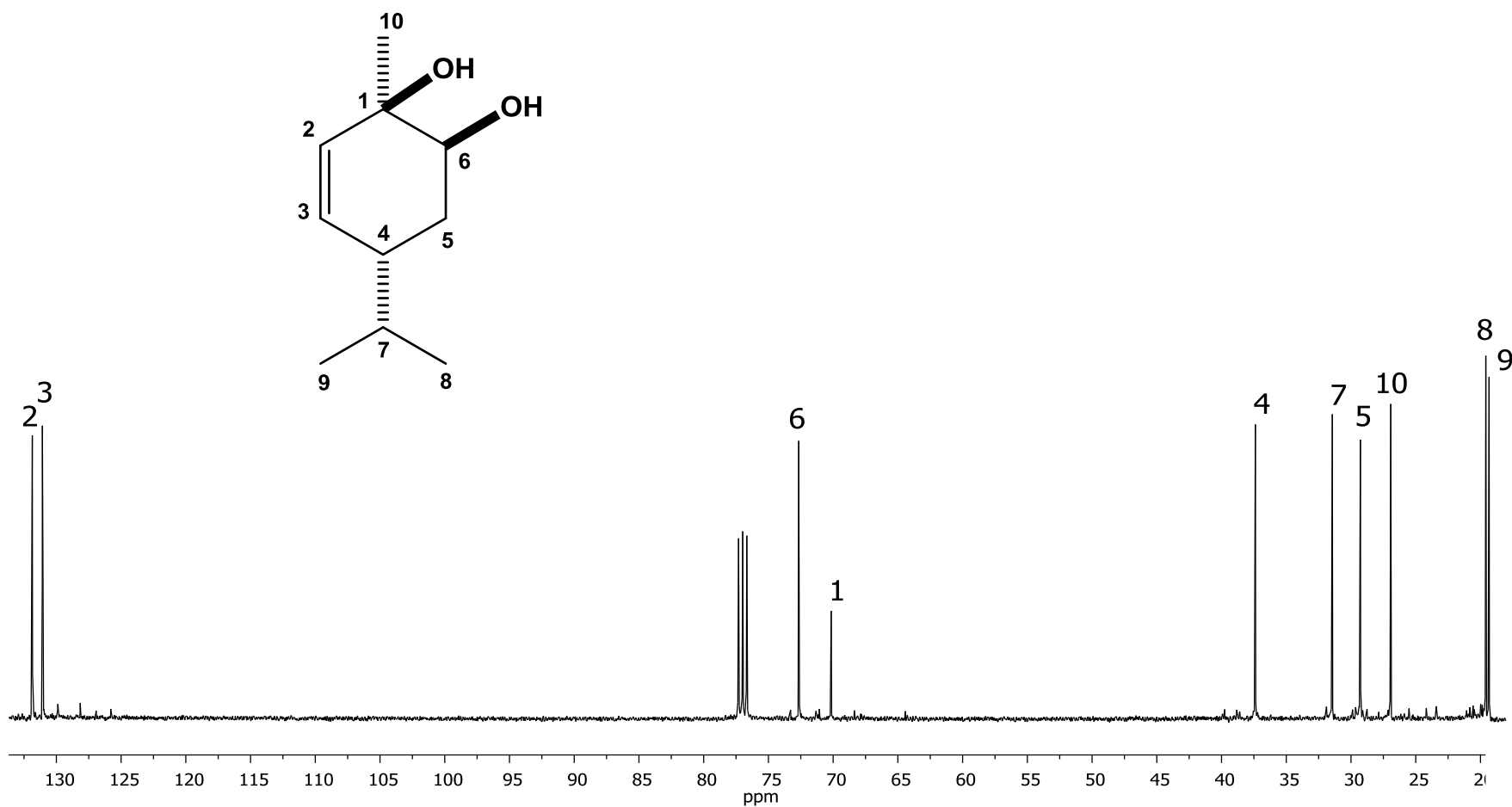


Figura 26. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del *p*-ment-2-eno-1,6-diol (57) en CDCl_3 .

El 1-*epi-p*-ment-2-eno-1,6-diol (**58**) muestra espectros de RMN muy similar al derivado **57**, lo que hace suponer que ambos tienen estructuras químicas muy cercanas. En el espectro de RMN de ^1H se observa una señal doble de dobles con $J = 10.0$ y 3.0 Hz en 5.71 ppm y otra señal doble de doble de dobles con $J = 10.0$, 2.4 y 0.8 Hz en 5.62 ppm las cuales corresponden a los hidrógenos vinílicos H-3 y H-2 respectivamente; en 3.80 ppm se observa una señal doble de dobles con $J = 7.6$, 3.2 Hz correspondiente al hidrógeno base de alcohol H-6. En 2.14 se observa una señal doble de doble de triples con una $J = 12.4$, 6.8 , 3.0 Hz correspondiente al hidrógeno base de isopropilo H-4; en 1.83 la señal doble de doble de dobles correspondiente al hidrógeno geminal H-5 $_{eq}$ con una $J = 13.6$, 6.8 , 3.2 Hz y en 1.73 ppm una señal triple de dobles para el hidrógeno geminal H-5 $_{ax}$ con una $J = 13.6$ y 7.6 Hz. En 1.70 ppm se observa una señal séptuple con una $J = 7.0$ Hz correspondiente al hidrógeno metínico de isopropilo H-7; en 1.30 ppm aparece la señal simple correspondiente al metilo base de alcohol en la posición CH_3 -10. En 0.93 y 0.92 ppm se observan dos señales dobles correspondientes a los metilos de isopropilo de las posiciones CH_3 -8 y CH_3 -9 con $J = 7.0$ Hz. **Figura 27.**

En el espectro de RMN de ^{13}C **Figura 28**, se observan 10 señales lo que sugiere la presencia de un monoterpeno; se observan dos señales en 132.1 y 131.9 ppm correspondientes a los carbonos vinílicos C-3 y C-2 respectivamente; las señales encontradas en 73.3 y 71.0 ppm corresponden cada una a los carbonos base de alcohol C-6 y C-1 en orden de aparición; en 38.4 y 31.9 ppm se observan las señales correspondientes a los carbonos metínicos C-4 y C-7; en 28.7 ppm es observada la señal del metileno C-5; finalmente se aprecia la señal del metilo vinílico en 23.6 ppm correspondiente al C-10 así como las señales características de los metilos de isopropilo en 19.9 y 19.8 ppm.

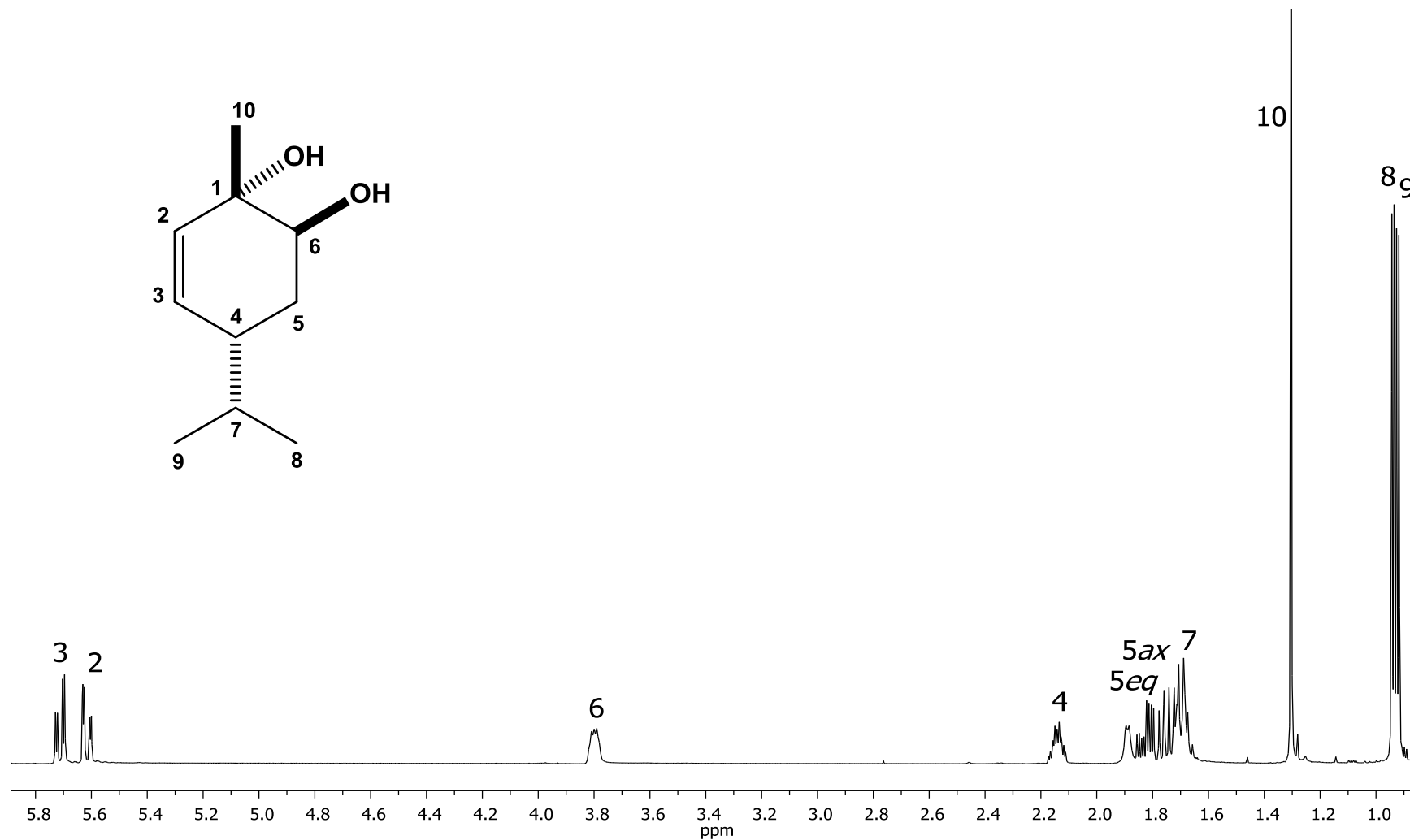


Figura 27. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del 1-*epi-p*-ment-2-eno-1,6-diol (58) en CDCl_3 .

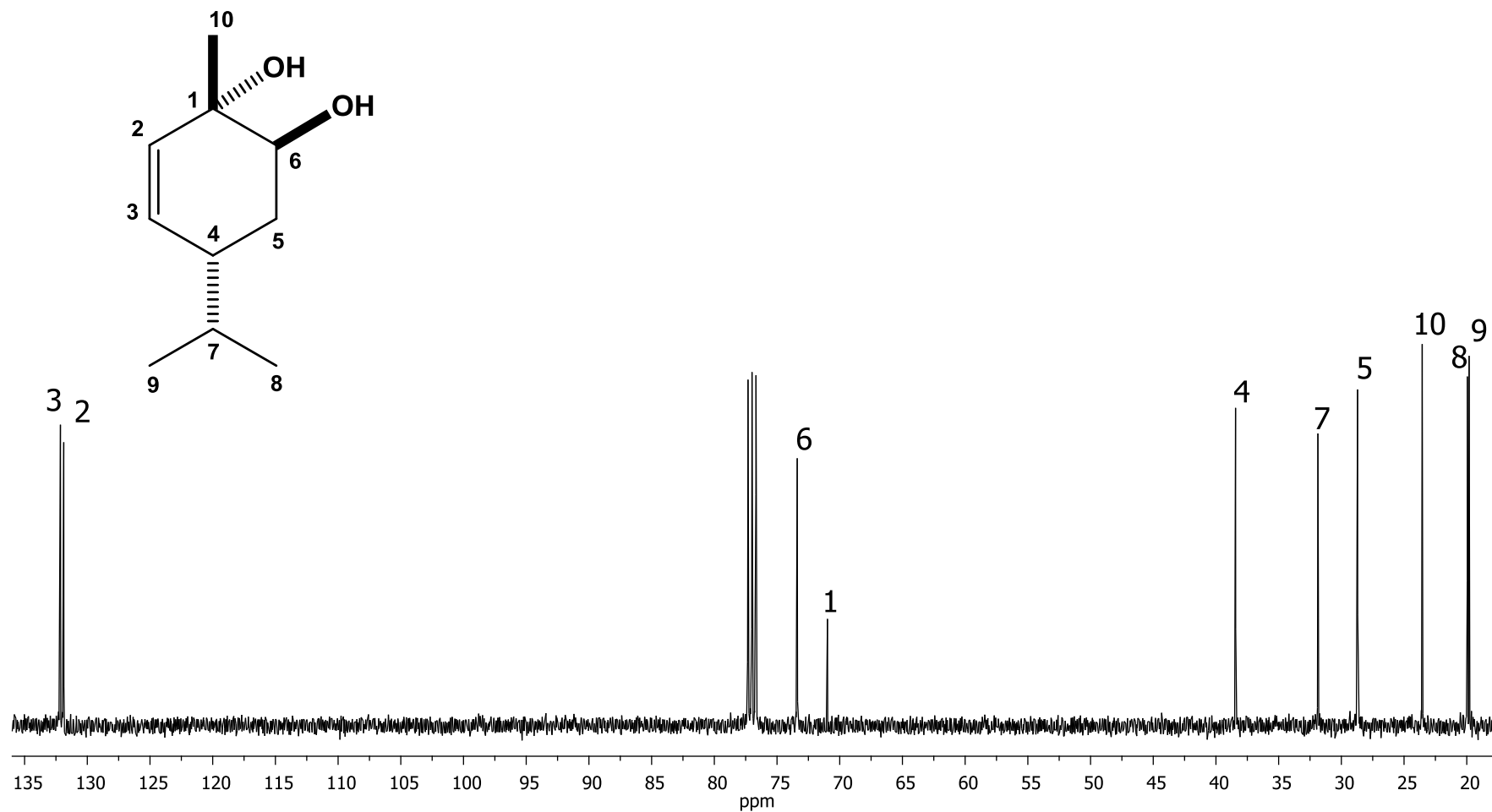


Figura 28. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del 1-*epi-p*-ment-2-eno-1,6-diol (58) en CDCl_3 .

Para confirmar la asignación del espectro de RMN de ^1H se llevó a cabo el experimento COSY **Figura 29**. Se puede observar que el hidrógeno H-4 correlaciona con las señales de los hidrógenos vinílicos H-3 y H-2 en 5.71 y 5.62 ppm respectivamente, además en 1.83 ppm correlaciona con el hidrógeno geminal H-5_{eq}, así como con una señal en 1.70 ppm correspondiente a la posición H-7. También se puede observar la correlación entre los protones vinílicos H-3 y H-2 en 5.62 ppm.

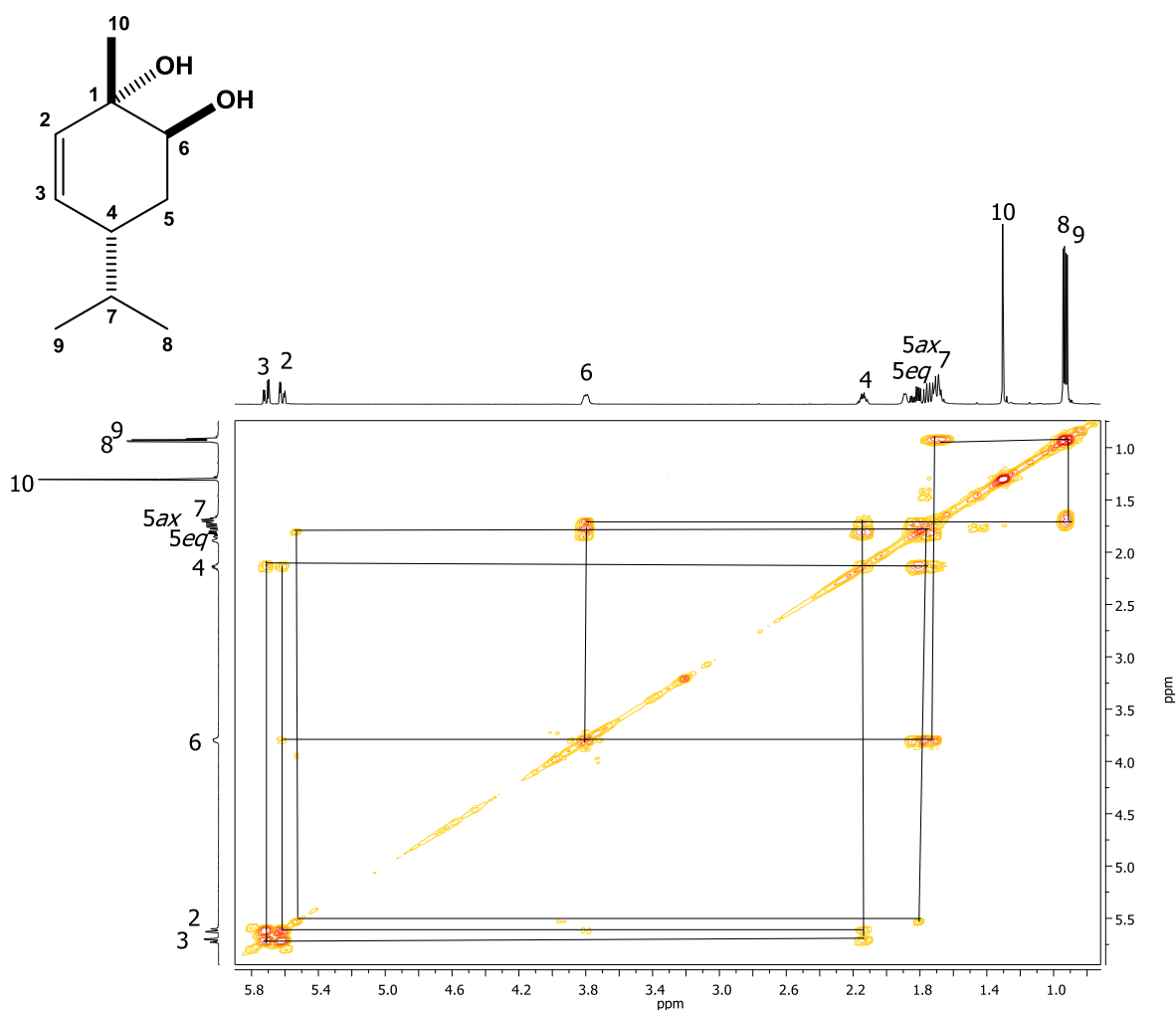


Figura 29. Espectro COSY del 1-*epi-p*-ment-2-eno-1,6-diol (**58**).

El espectro de RMN de ^{13}C fue asignado en base al experimento HETCOR **Figura 30**. Así por ejemplo, se puede ver que la señal en 2.14 ppm en la escala de hidrógeno asignada para H-4 correlaciona con la señal en 38.4 ppm en escala de carbono, por lo que esta señal corresponde a C-4. De la misma manera la señal en 3.80 ppm correspondiente a H-2 correlaciona con la señal en 73.4 ppm por lo tanto a esta señal se le asigna al C-6.

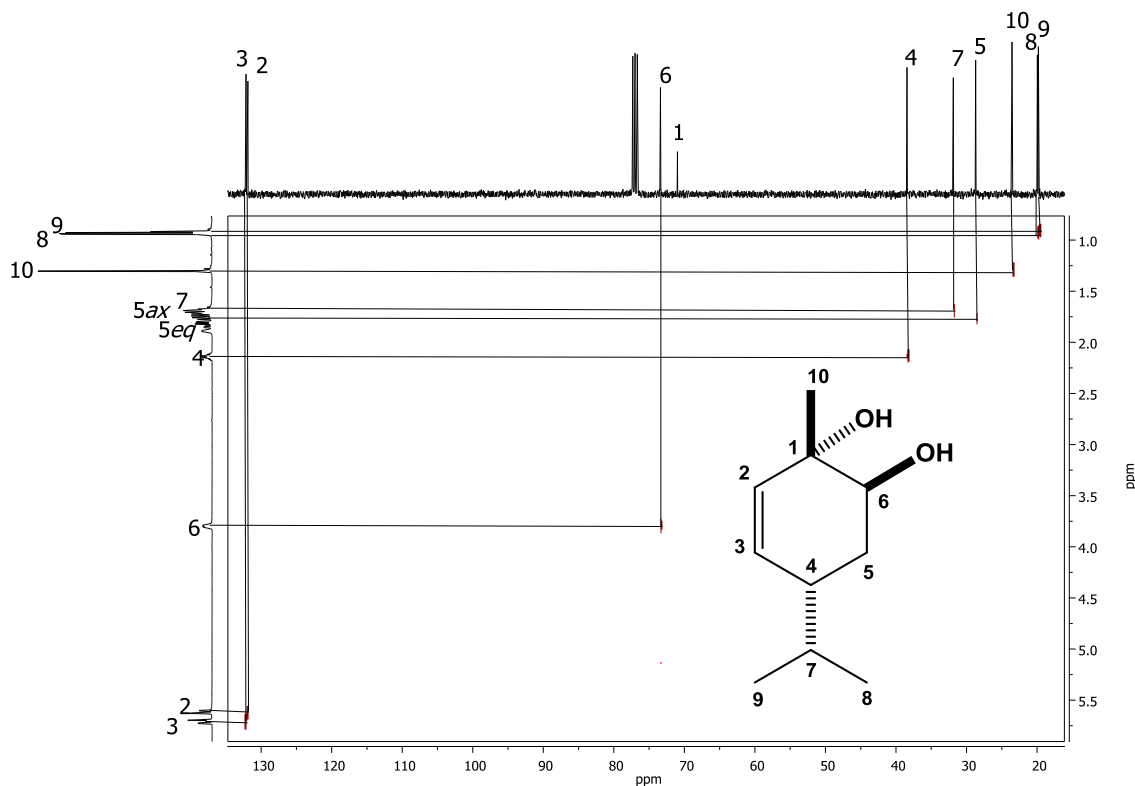


Figura 30. Espectro HETCOR del 1-*epi-p*-ment-2-eno-1,6-diol (58).

Con ayuda del experimento NOESY **Figura 31** se propuso la configuración relativa del compuesto **58**. Así por ejemplo, se puede observar que la señal que aparece en 2.14 ppm asignada para el hidrógeno H-4 correlaciona con la señal del metilo CH₃-10 en 1.30 ppm además CH₃-10 correlaciona con el hidrógeno vinílico H-2 en 5.62 ppm.

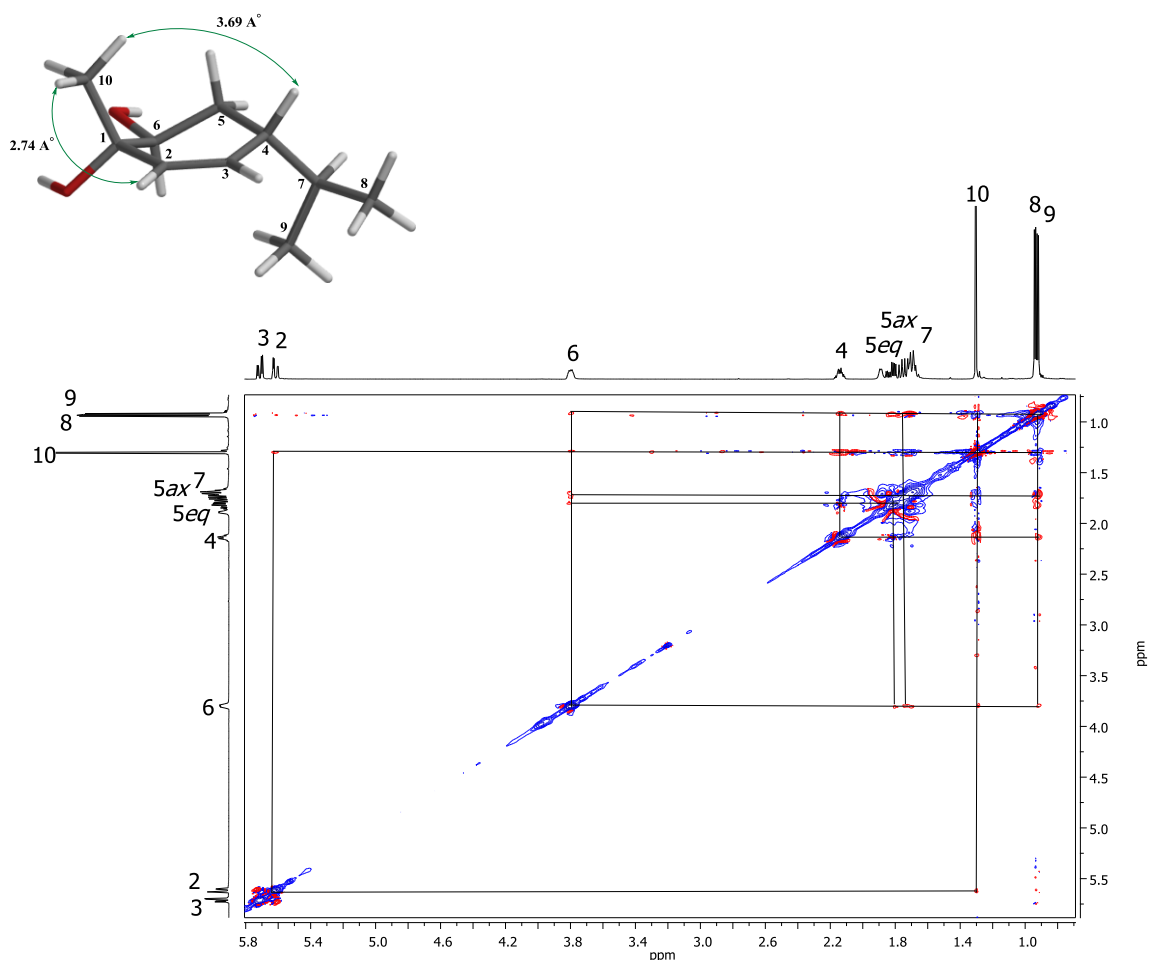


Figura 31. Espectro NOESY del 1-*epi-p*-ment-2-eno-1,6-diol (**58**).

Para el 1-*epi-p*-ment-2-eno-1,6-diol (**58**) el único reporte indica la obtención de este derivado a través del (*R*)-(-)-felandreno transformado por el hongo *Corinespora cassicola* DSM 62474,⁴³ cabe mencionar que los datos reportados de H¹ y C¹³ concuerdan con nuestros datos espectroscópicos; sin embargo la rotación específica presenta ambigüedad de $[\alpha]_D^{20} = -46.4$ (c 1.0, CHCl₃)⁴⁶ con respecto $[\alpha]_D^{20} = +58.4$ (c 0.9, CHCl₃) para el derivado **58**. Por lo que la comparación de este

resultado sugiere que se tratan de estereoestructuras distintas ya que la rotación específica es característica para cada compuesto.

En el espectro de RMN de ^1H de *p*-ment-2-eno-1,5,6-triol (**59**) se observan una señal doble de dobles con una $J = 10.4$ y 1.2 Hz en 5.65 ppm y en 5.62 ppm se observa una señal doble de dobles con $J = 10.4$ y 2.8 Hz correspondientes a los hidrógenos vinílicos H-2 y H-3; en 3.92 ppm se observa una señal doble de dobles correspondiente al hidrógeno base de alcohol H-5 con una $J = 5.6$ y 2.4 Hz y en 3.66 ppm se encuentra una señal doble ancha con una $J = 2.4$ Hz correspondiente al hidrógeno base de alcohol H-6; en 2.19 ppm se observa una señal múltiple correspondiente a H-4 y en 1.83 ppm se observa una señal séptuple de dobles con una $J = 6.8$ y 1.2 Hz para el hidrógeno de isopropilo H-7, en 1.29 ppm una señal simple correspondiente al metilo CH_3 -10; en 1.00 y 0.89 ppm se observan dos señales dobles correspondientes a los metilos de isopropilo etiquetados como CH_3 -8 y CH_3 -9, ambos con $J = 6.8$ Hz. La presencia de una nueva señal en la zona de los protones base de oxígeno y la desaparición de un hidrógeno del metileno en la posición 5, sugiere que el derivado **59** presenta un grupo oxidrilo adicional con respecto al compuesto **58**. **Figura 32.**

En el espectro de RMN de ^{13}C se observan las 10 señales típicas de un derivado de *p*-menteno; se observan dos señales en 132.2 y 127.2 ppm correspondientes a los carbonos vinílicos C-2 y C-3; las señales encontradas en 74.3 , 71.1 y 70.6 ppm corresponden a los carbonos base de alcohol C-6, C-5 y C-1 respectivamente. En 47.8 ppm se observa la señal correspondiente al carbono C-4; en 26.4 ppm la señal de un metilo; finalmente se apreciaron las señales características de los carbonos del residuo isopropilo en 29.0 , 21.0 y 19.0 ppm. **Figura 33.**

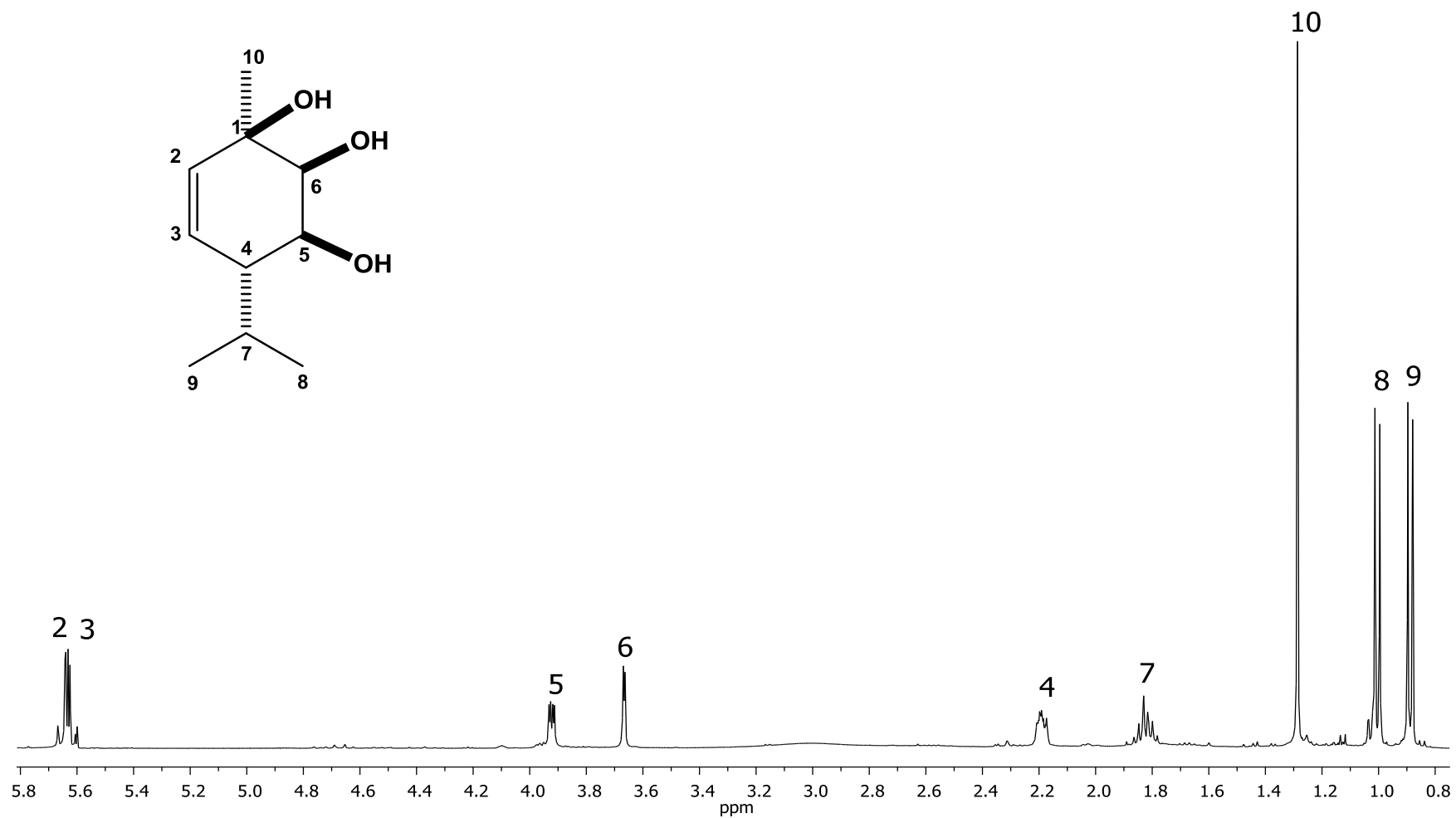


Figura 32. Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz del *p*-ment-2-eno-1,5,6-triol (59) en CDCl₃.

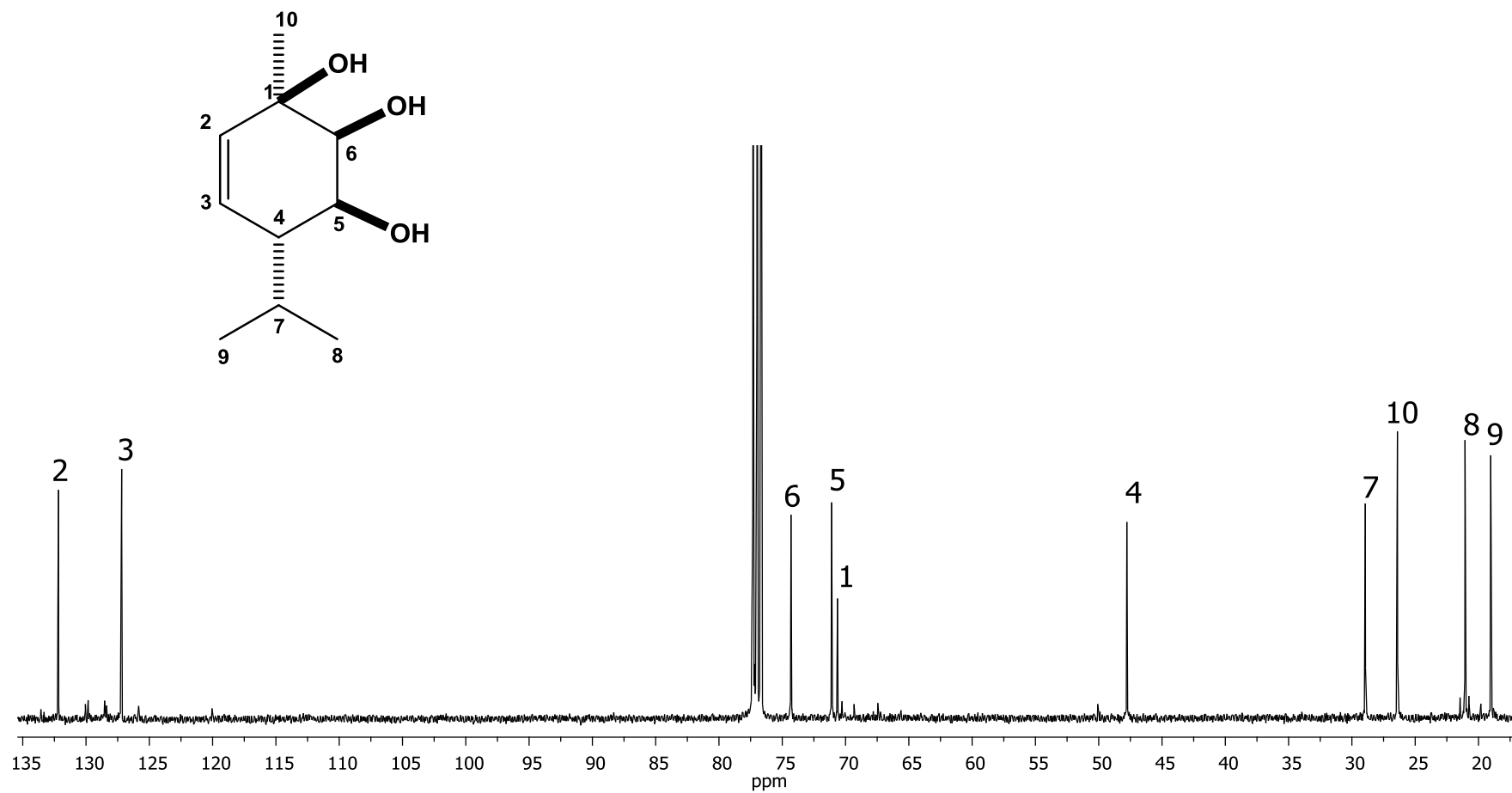


Figura 33. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del *p*-ment-2-eno-1,5,6-triol (59) en CDCl_3 .

Para confirmar la asignación y ubicación de los grupos oxidrilos se llevó a cabo el experimento COSY **Figura 34**, donde se puede observar que el hidrógeno base de alcohol H-5 que aparece en 3.92 ppm correlaciona con la señal en 2.19 ppm correspondiente al hidrógeno H-4, así como con una señal en 3.66 ppm correspondiente al hidrógeno base de alcohol en la posición H-6, lo que indica que los grupos oxidrilos se encuentran vecinales; también se puede observar la correlación entre los metilos CH₃-9 y CH₃-8 y su vecino el hidrógeno H-7.

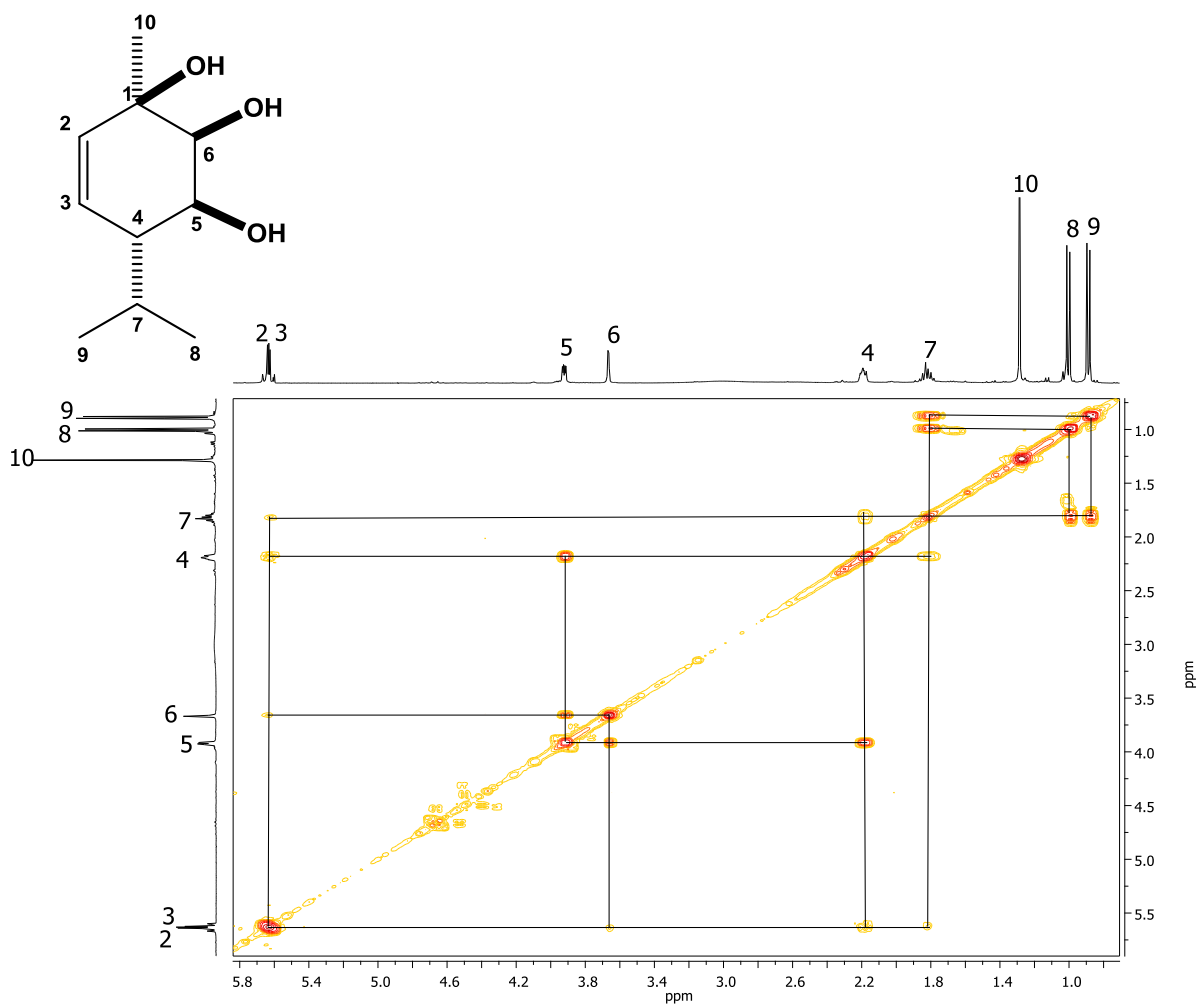


Figura 34. Espectro COSY del *p*-ment-2-eno-1,5,6-triol (**59**).

El espectro de RMN de ^{13}C fue asignado en base al experimento HETCOR **Figura 35**. Así por ejemplo, se puede ver que la señal en 3.92 ppm en la escala de hidrógeno asignada para H-5 correlaciona con la señal en 71.1 ppm en escala de carbono, por lo tanto esta señal corresponde a C-5. De la misma manera la señal en 2.19 ppm correspondiente a H-4 correlaciona con la señal en 47.8 ppm por lo tanto esta señal se le asigna al C-4.

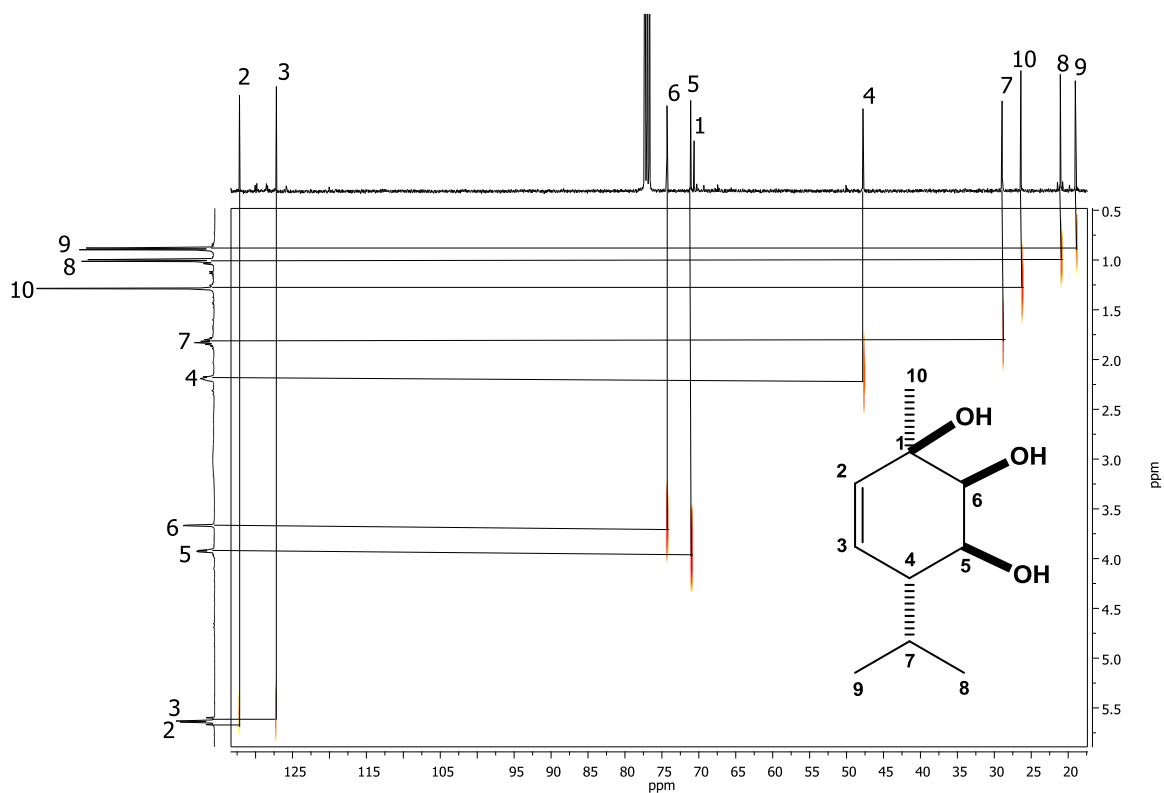


Figura 35. Espectro HETCOR del *p*-ment-2-eno-1,5,6-triol (59).

Con ayuda del experimento NOESY **Figura 36** se propuso la configuración relativa del compuesto **59**. Así por ejemplo, se puede observar que la señal que aparece en 5.65 ppm asignada para el hidrógeno vinílico H-2 correlaciona con la señal del metilo CH₃-10 en 1.29 ppm además CH₃-10 correlaciona con el hidrógeno base de alcohol H-6 en 3.66 ppm y este a su vez con el hidrógeno base de alcohol H-5 en 3.92 ppm.

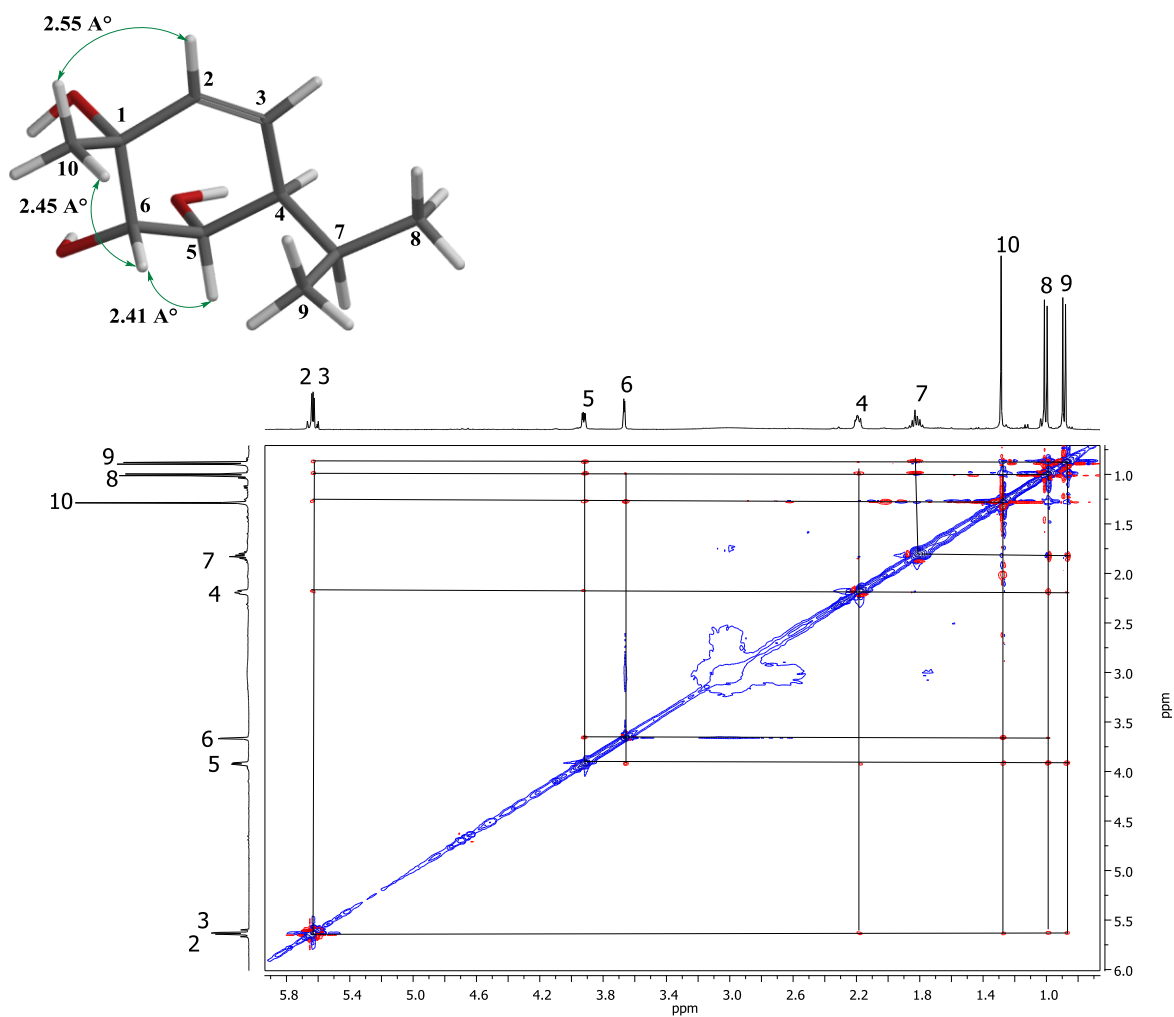


Figura 36. Espectro NOESY del *p*-ment-2-eno-1,5,6-triol (**59**).

El espectro de RMN de ^1H del 1-*epi-p*-ment-2-eno-1,5,6-triol (**60**) fue muy semejante al espectro del derivado **59**, mostrando pequeñas diferencias en los desplazamientos de los hidrógenos H-7 y H-4. Se observan en 5.68 ppm una señal doble de dobles con una $J = 10.1$ y 2.1 Hz y en 5.62 ppm una señal doble de dobles con una $J = 10.1$, 2.1 y 1.3 Hz correspondientes a los hidrógenos vinílicos H-3 y H-2. En 3.97 ppm se observa una señal doble de dobles correspondiente a un hidrógeno base de alcohol H-5 con una $J = 8.2$ y 2.6 Hz y en 3.73 ppm se encuentra una señal doble de dobles con una $J = 2.6$ y 1.3 Hz correspondiente al hidrógeno base de alcohol H-6. En 2.16 se observa una señal múltiple correspondiente a H-4 y en 2.11 ppm se observa una señal séptuple de dobles con una $J = 6.8$ y 3.3 Hz para H-7. Una señal simple en 1.40 ppm correspondiente al metilo CH_3 -10. En 1.04 y 0.85 ppm se observa dos señales dobles correspondientes a dos metilos de isopropilo CH_3 -8 y CH_3 -9 con $J = 6.8$ Hz.

Figura 37.

En el espectro de RMN de ^{13}C se observan las 10 señales características de monoterpeno; en 130.9 y 129.4 ppm se aprecian las señales correspondientes a los carbonos vinílicos C-2 y C-3, en orden de aparición; las señales encontradas en 77.1, 71.3 y 68.4 ppm corresponden a los carbonos base de alcohol C-6, C-1 y C-5 respectivamente; en 44.6 ppm se observa la señal correspondiente al carbono C-4 mientras que en 25.5 ppm la señal del metilo correspondiente al carbono C-10; finalmente de las señales características de los carbonos de isopropilo son apreciadas en 27.0, 20.8 y 17.6 ppm. **Figura 38.**

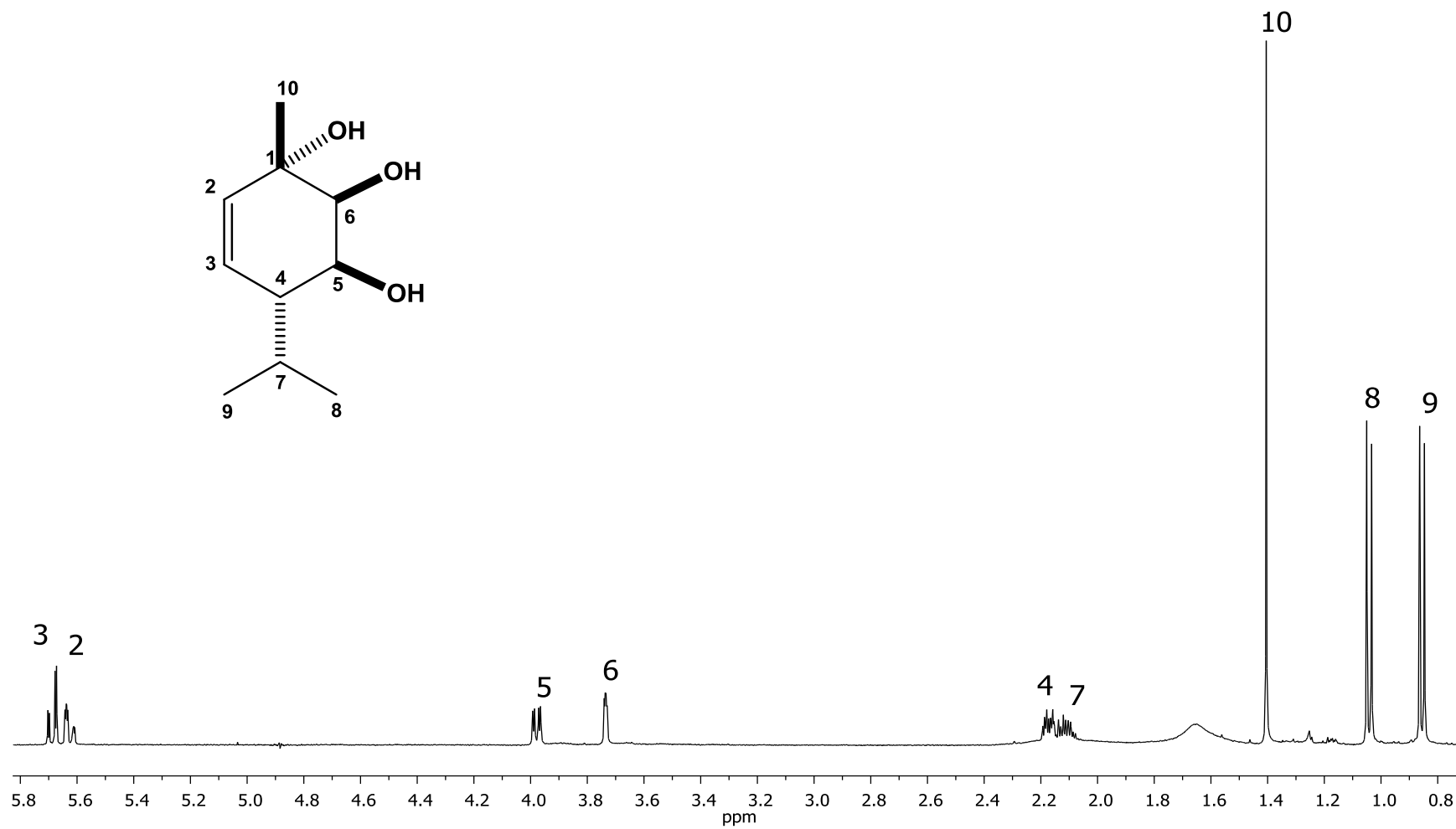


Figura 37. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del 1-*epi-p*-ment-2-eno-1,5,6-triol (**60**) en CDCl_3 .

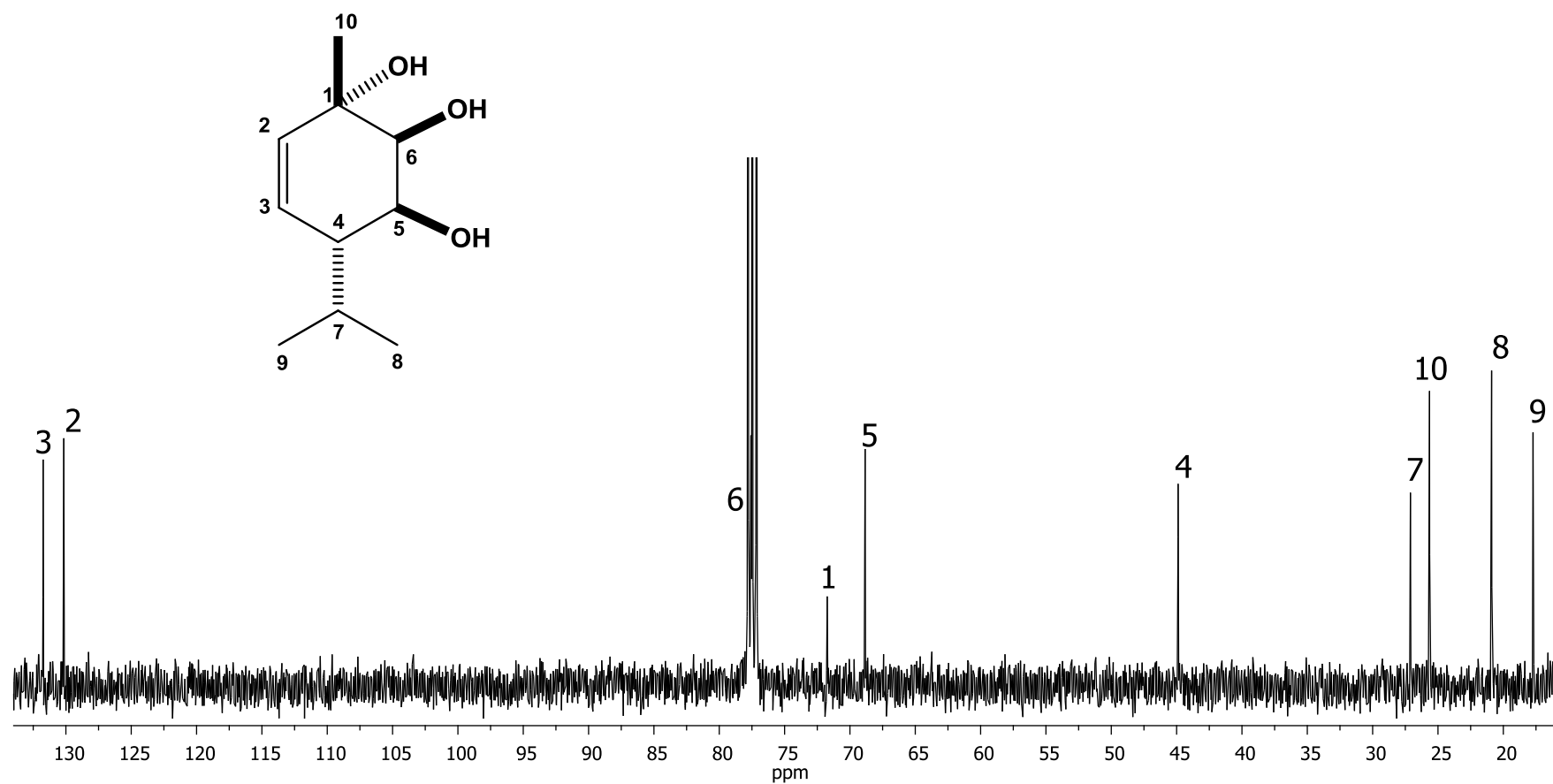


Figura 38. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del 1-*epi-p*-ment-2-eno-1,5,6-triol (60) en CDCl_3 .

Para confirmar la asignación del espectro de RMN de ^1H se llevó a cabo el experimento COSY **Figura 39**. Se puede observar que el hidrógeno base de alcohol H-5 que aparece en 3.97 ppm correlaciona con la señal en 2.16 ppm correspondiente al hidrógeno H-4, así como con una señal en 3.73 ppm correspondiente a la posición H-6 base de alcohol lo que nos indica que están vecinales; además el H-4 correlaciona con la señal en 5.62 ppm correspondiente al hidrógeno vinílico H-2 y en 2.11 ppm correlaciona con el hidrógeno H-7; por último también se puede observar la correlación entre los metilos CH_3 -9 y CH_3 -8 y su vecino el hidrógeno H-7.

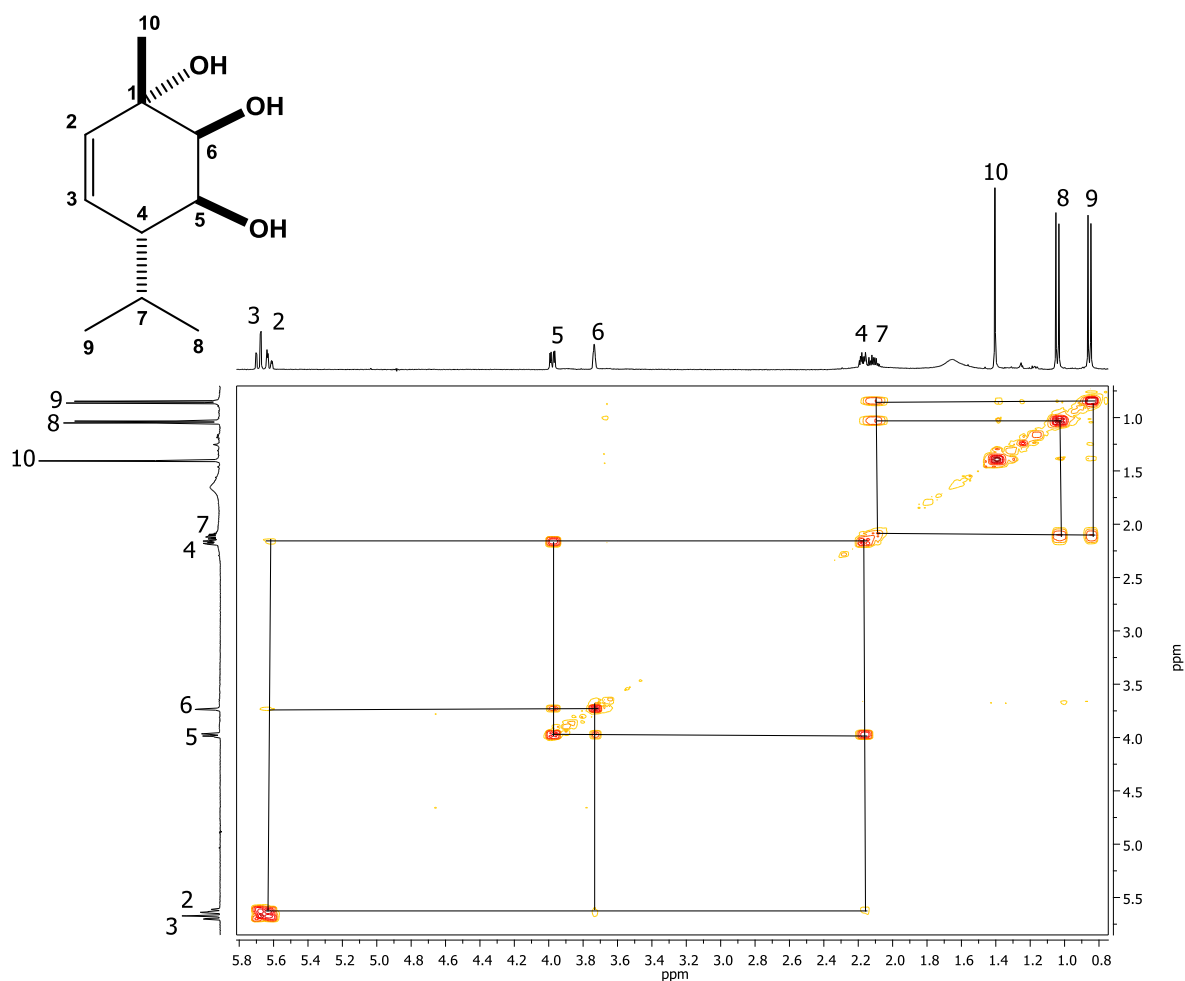


Figura 39. Espectro COSY del 1-*epi-p*-ment-2-eno-1,5,6-triol (**60**).

El espectro de RMN de ^{13}C fue asignado en base al experimento HETCOR **Figura 40**. Así por ejemplo, se puede ver que la señal en 3.97 ppm en la escala de hidrógeno asignada para H-5 correlaciona con la señal en 68.4 ppm en escala de carbono, por lo tanto esta señal corresponde a C-5. De la misma manera la señal en 2.16 ppm correspondiente a H-4 correlaciona con la señal en 44.6 ppm por lo tanto esta señal se le asigna al C-4.

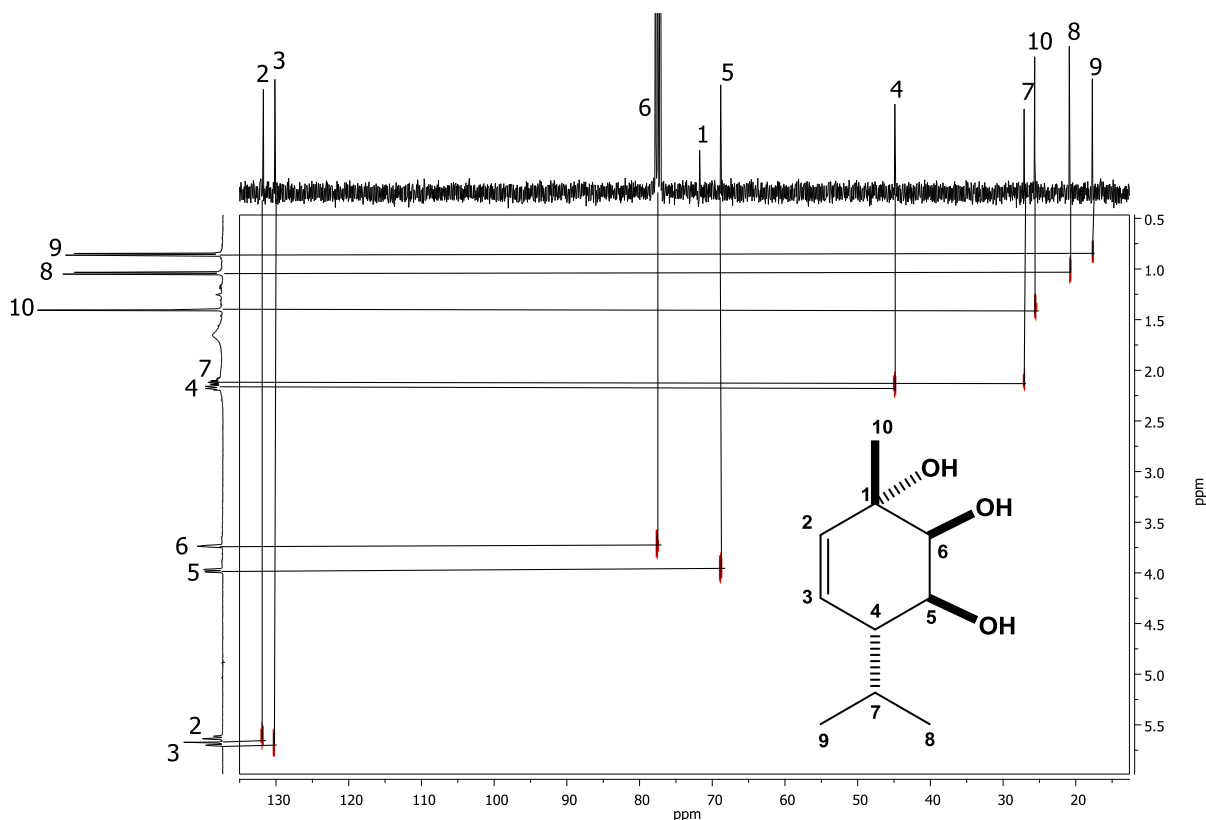


Figura 40. Espectro HETCOR del 1-*epi-p*-ment-2-eno-1,5,6-triol (**60**).

Con ayuda del experimento NOESY **Figura 41** se propuso la configuración relativa del compuesto **60**. Así por ejemplo, se puede observar que la señal que aparece en 2.16 ppm asignada para el hidrógeno H-4 correlaciona con la señal del metilo CH₃-10 en 1.40 ppm además el hidrógeno base de alcohol H-5 que aparece en 3.97 ppm correlaciona con el hidrógeno base de alcohol H-6 en 3.73 ppm.

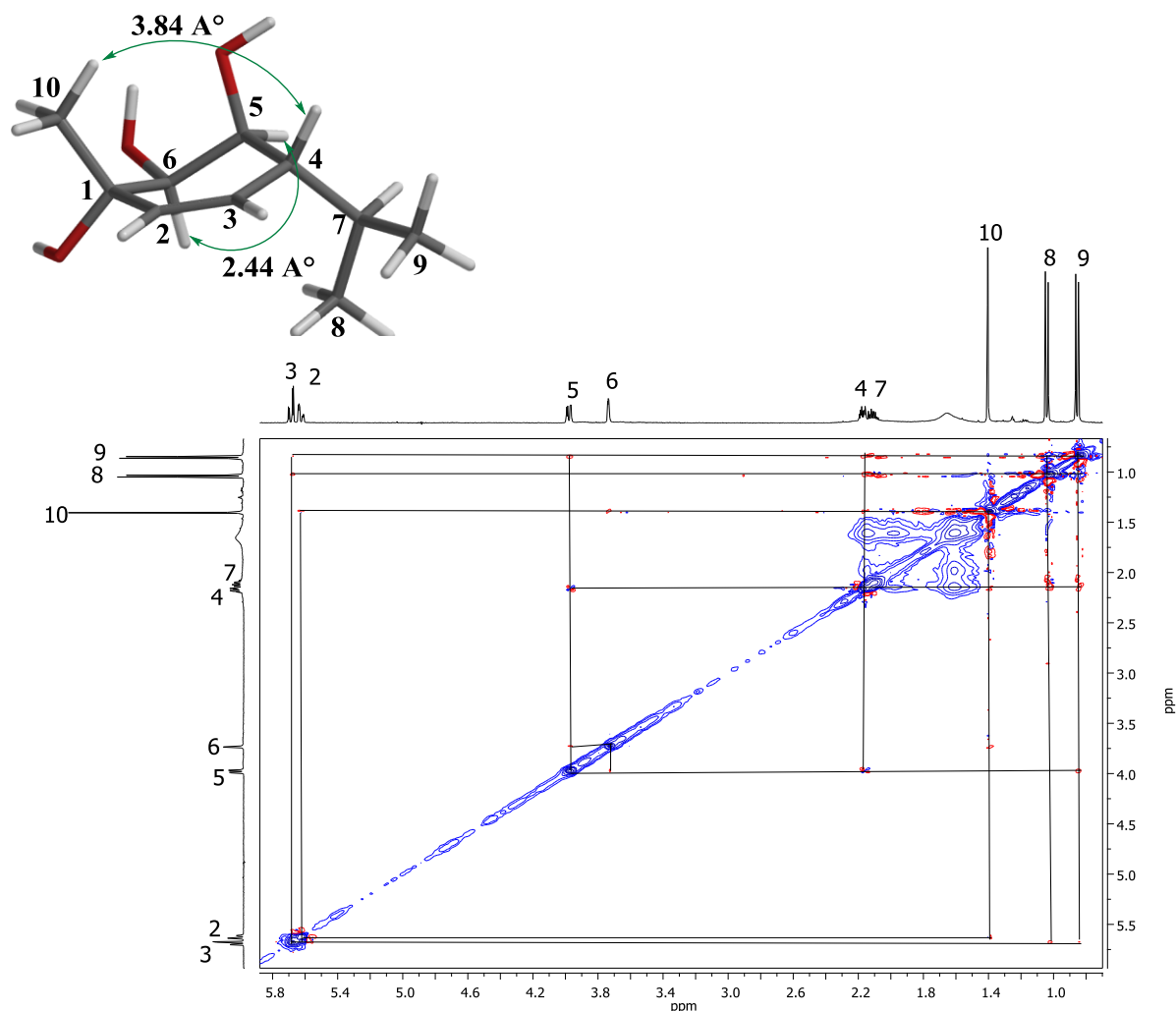
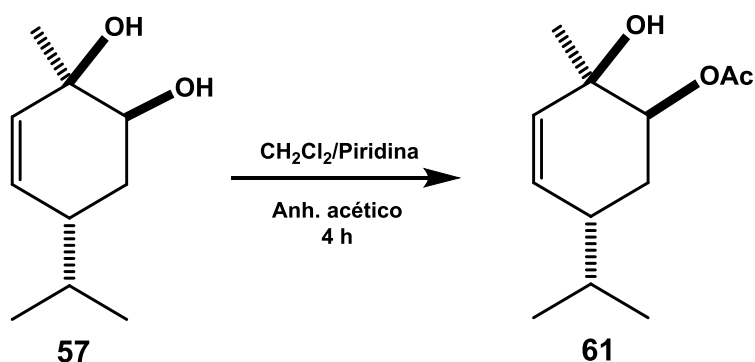


Figura 41. Espectro NOESY del 1-*epi-p*-ment-2-eno-1,5,6-triol (**60**).

Con los datos espectroscópicos determinados hasta ahora, podemos proponer las configuraciones relativas para los derivados **58**, **59** y **60**, en base a las constantes de acoplamiento y por el experimento de RMN de ^1H de NOESY además basándose en la configuración absoluta del derivado **56** y **57** de la cual ya es conocida.

Como podemos apreciar estos derivados del *p*-menteno se encuentran funcionalizados por grupos hidroxilo por lo que se llevó a cabo la preparación de derivados acetilados con la finalidad de comprobar la presencia de dicho grupos en cada una de las estructuras propuestas. A continuación se discuten los resultados obtenidos.

La monoacetilación de **57** se realizó utilizando anhídrido acético con piridina y diclorometano la mezcla de reacción se dejó en agitación por 4 h a temperatura ambiente y se purificó en columna cromatografía obteniendo en la polaridad 9:1 hexano-acetato de etilo una miel color verdosa del derivado **61**. **Esquema 1**.



Esquema 1. Derivado Monoacetilado del *p*-ment-2-eno-1,6-diol (**57**).

En el espectro de RMN de ^1H se puede observar que la señal doble de triples del hidrógeno 6 base de alcohol de **57** se desplazó de 3.76 a 4.94 ppm ahora siendo base de éster con una señal doble de doble de dobles para este hidrógeno de igual manera los hidrógenos del metileno 5_{eq} y 5_{ax} que aparecen en 1.88 y 1.63 ppm se desplazaron a 1.58 y 2.02 ppm respectivamente, además la presencia de una nueva señal simple correspondientes al metilo de acetilo en 2.10

ppm. Estos cambios en el espectro de RMN de ^1H indican la formación del 6-acetoxi-1-hidroxi-*p*-ment-2-eno (**61**). **Figura 42**.

En el espectro de RMN de ^{13}C **Figura 43**, se observan 12 señales lo que sugiere la presencia del monoterpeno monoacetilado **61**; se observa la señal del carbonilo de acetilo en 170.8 ppm; además se observa la señal del metilo de acetilo en 21.3 ppm y por último un corrimiento a campo alto en el desplazamiento del carbono 6 de **57** base de alcohol de 72.7 a 75.8 ppm ahora base de acetilo.

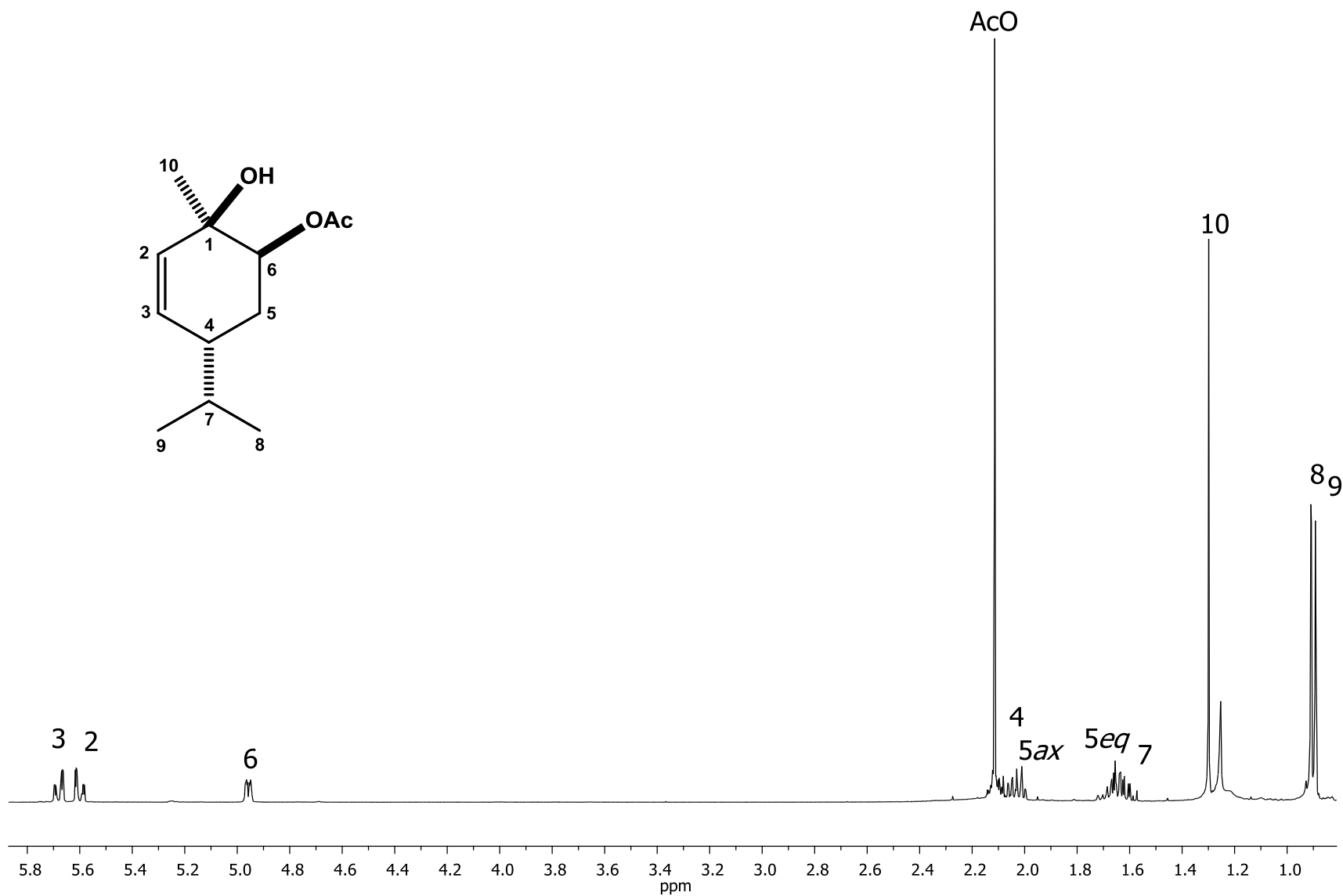


Figura 42. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del 6-acetoxi-1-hidroxi-*p*-ment-2-eno (61) en CDCl_3 .

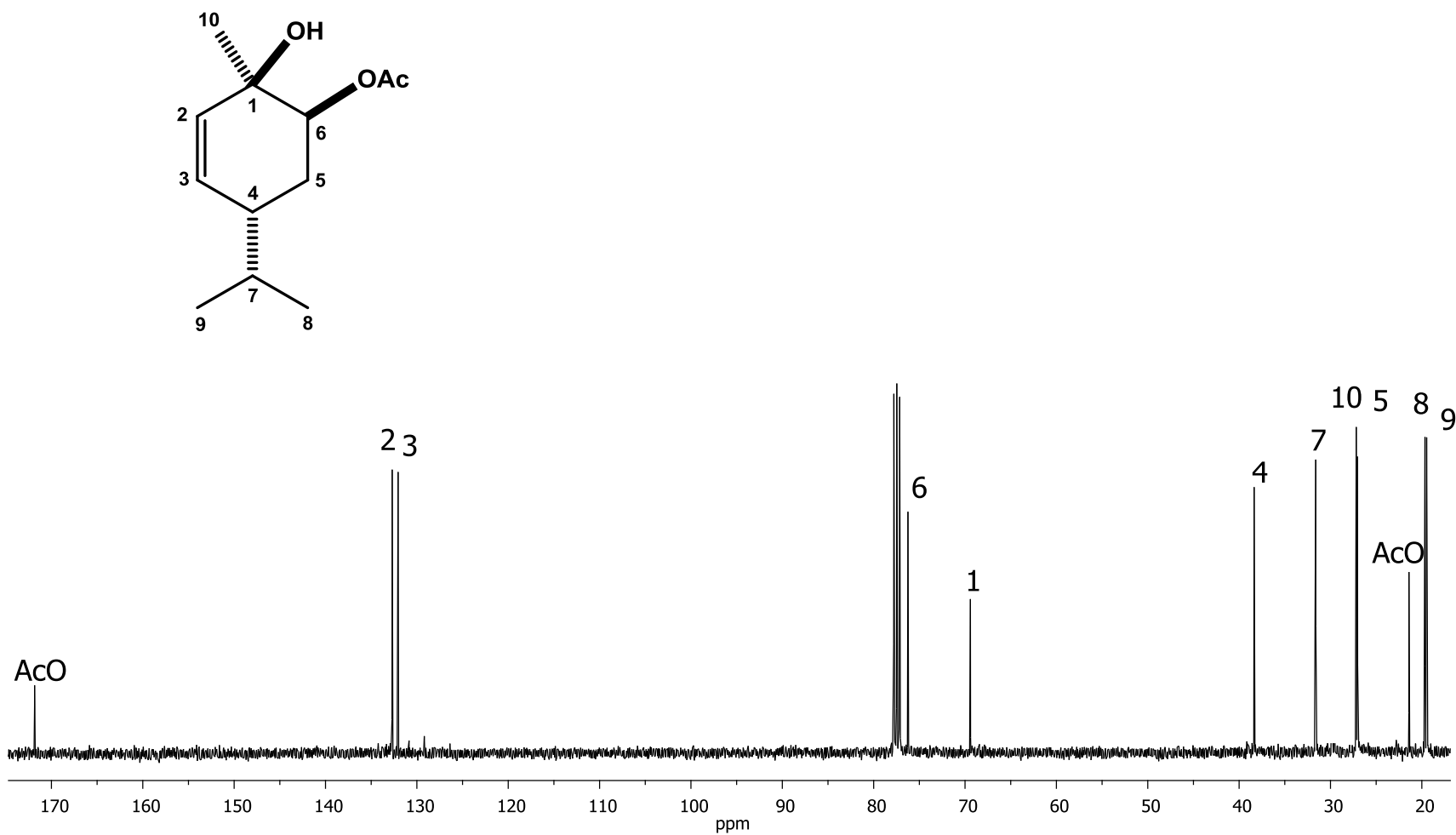
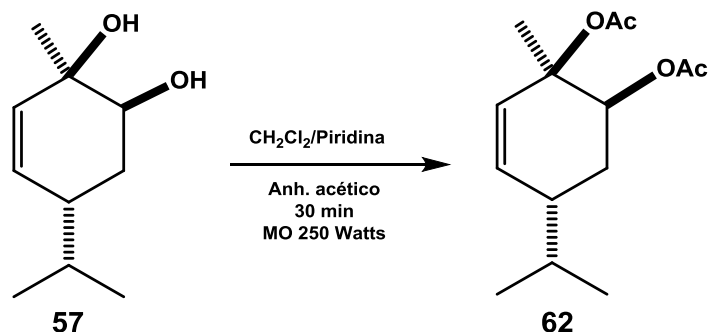


Figura 43. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del 6-acetoxy-1-hidroxi-p-ment-2-eno (**61**) en CDCl_3 .

Después de varios intentos y sabiendo que los alcoholes terciarios son difíciles de acetilar, se realizó la diacetilación del *p*-ment-2-eno-1,6-diol (**57**) utilizando anhídrido acético con piridina y diclorometano la mezcla de reacción se dejó por un periodo de 30 min, 80 °C, 250 Watts, en un reactor de microondas (Discovery®) y se purificó en columna cromatográfica obteniendo en la polaridad de diclorometano una miel color blanco del derivado (**62**). **Esquema 2**.



Esquema 2. Derivado diacetilado del *p*-ment-2-eno-1,6-diol (**57**).

En el espectro de RMN de ^1H se puede observar que la señal del hidrógeno vinílico 2 de **57** se desplazó de 5.55 a 6.01 ppm de igual manera el hidrógeno 6 base de alcohol que da una señal doble de triples que aparece en 3.76 ppm se desplazó a 5.23 ppm ahora siendo base de acetilo con una señal doble de dobles para este hidrógeno, además los hidrógenos del metileno 5 $_{eq}$ y 5 $_{ax}$ que aparecen en 1.88 y 1.63 ppm se desplazaron a 1.64 y 2.03 ppm respectivamente, además la presencia de dos nuevas señales simples correspondientes a los metilos de acetilos en 2.10 y 2.01 ppm. Estos cambios en el espectro de RMN de ^1H indican la formación del 1,6-diacetoxi-*p*-ment-2-eno (**62**). **Figura 44**.

En el espectro de RMN de ^{13}C **Figura 45**, se observan 14 señales lo que sugiere la presencia del monoterpene diacetilado **62**; se observa las señales de los carbonilos de acetilos en 170.5 y 170.1 ppm; además se observan las señales de los metilos de acetilos en 22.1 y 21.2 ppm y por último un corrimiento a campo alto en el desplazamiento del carbono 1 de **57** base de alcohol de 70.2 a 78.3 ppm ahora base de acetilo.

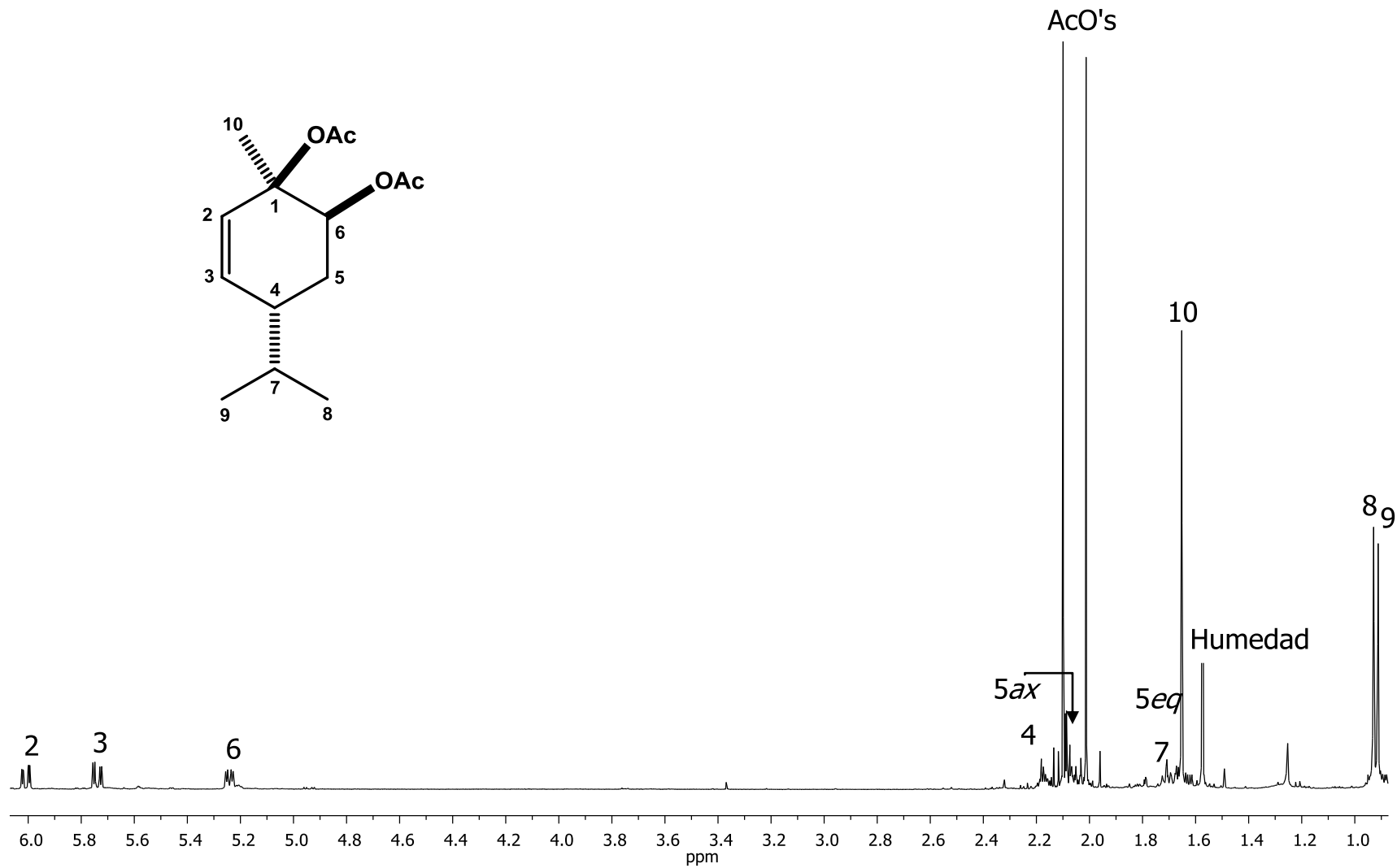


Figura 44. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del 1,6-diacetoxi-*p*-ment-2-eno (62) en CDCl_3 .

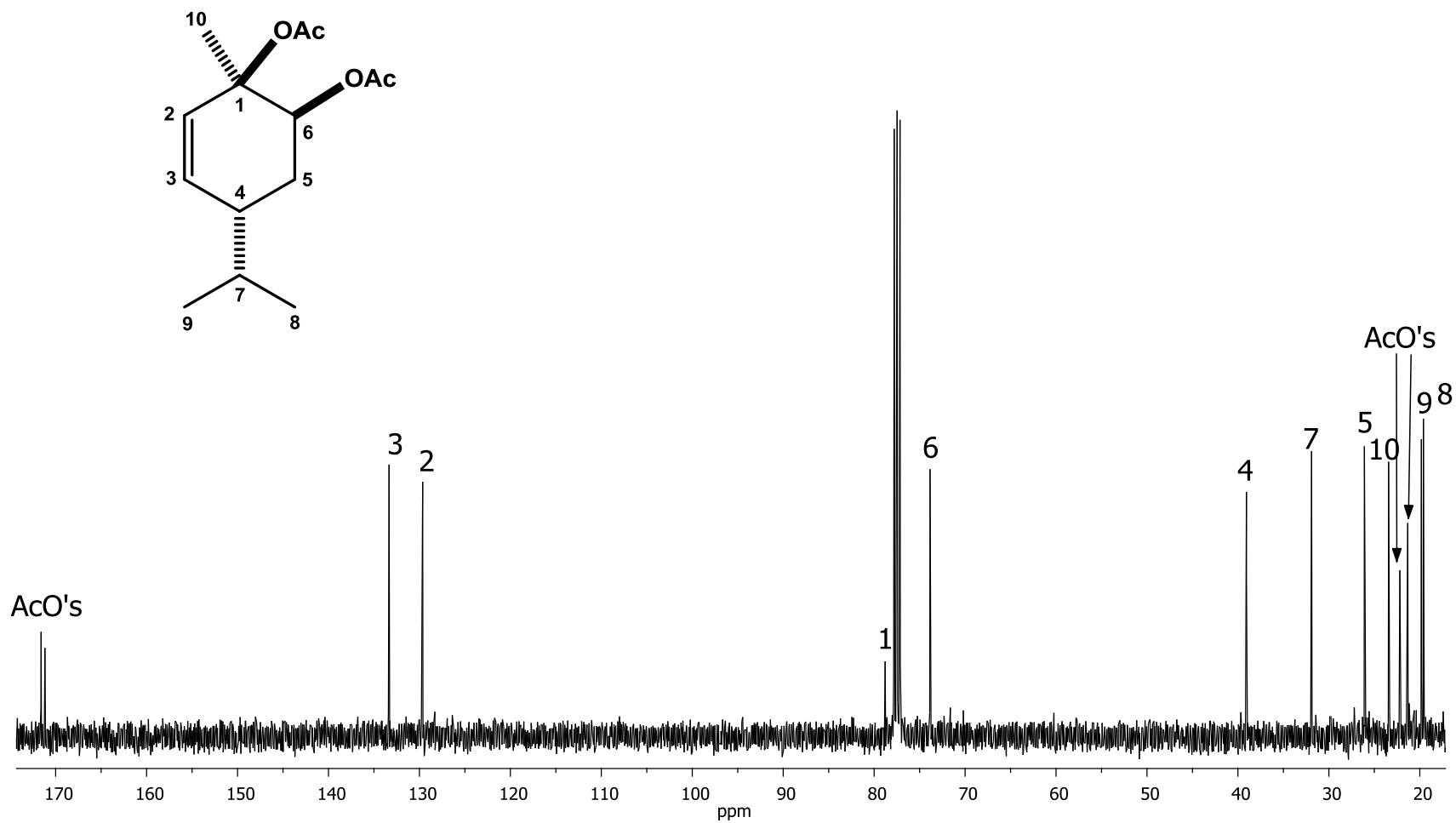
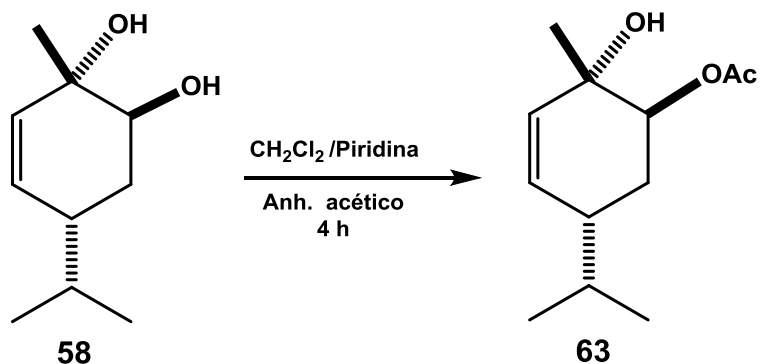


Figura 45. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz de 1,6-diacetoxi-*p*-ment-2-eno (**62**) en CDCl_3 .

Por otra parte, la preparación del derivado monoacetilado del 1-*epi-p*-ment-2-eno-1,6-diol (**58**), se llevó a cabo bajo las mismas condiciones descritas para la obtención del compuesto monoacetilado **61**, se realizó utilizando anhídrido acético con piridina y diclorometano la mezcla de reacción se dejó en agitación por 4 h a temperatura ambiente y se purificó en columna cromatografía obteniendo en la polaridad de diclorometano una miel color blanco del derivado **63**. **Esquema 3**.



Esquema 3. Derivado monoacetilado del 1-*epi-p*-ment-2-eno-1,6-diol (**58**)

En el espectro de RMN de ^1H se puede observar que la señal doble de dobles del hidrógeno 6 base de alcohol de **58** se desplazó de 3.80 a 4.97 ppm ahora siendo base de acetilo con una señal doble de dobles para este hidrógeno además la presencia de una nueva señal simple correspondientes al metilo de acetilo en 2.08 ppm. Estos cambios en el espectro de RMN de ^1H indican la formación del 6-acetoxi-1-hidroxi-1-*epi-p*-ment-2-eno (**63**). **Figura 46**.

En el espectro de RMN de ^{13}C **Figura 47**, se observan 12 señales lo que sugiere la presencia del monoterpeno monoacetilado **63**; se observa la señal del carbonilo de acetilo en 171.0 ppm; además se observa la señal del metilo de acetilo en 21.3 ppm y por último un ligero desplazamiento del carbono 6 de **58** base de alcohol de 73.4 a 75.6 ppm ahora base de acetilo.

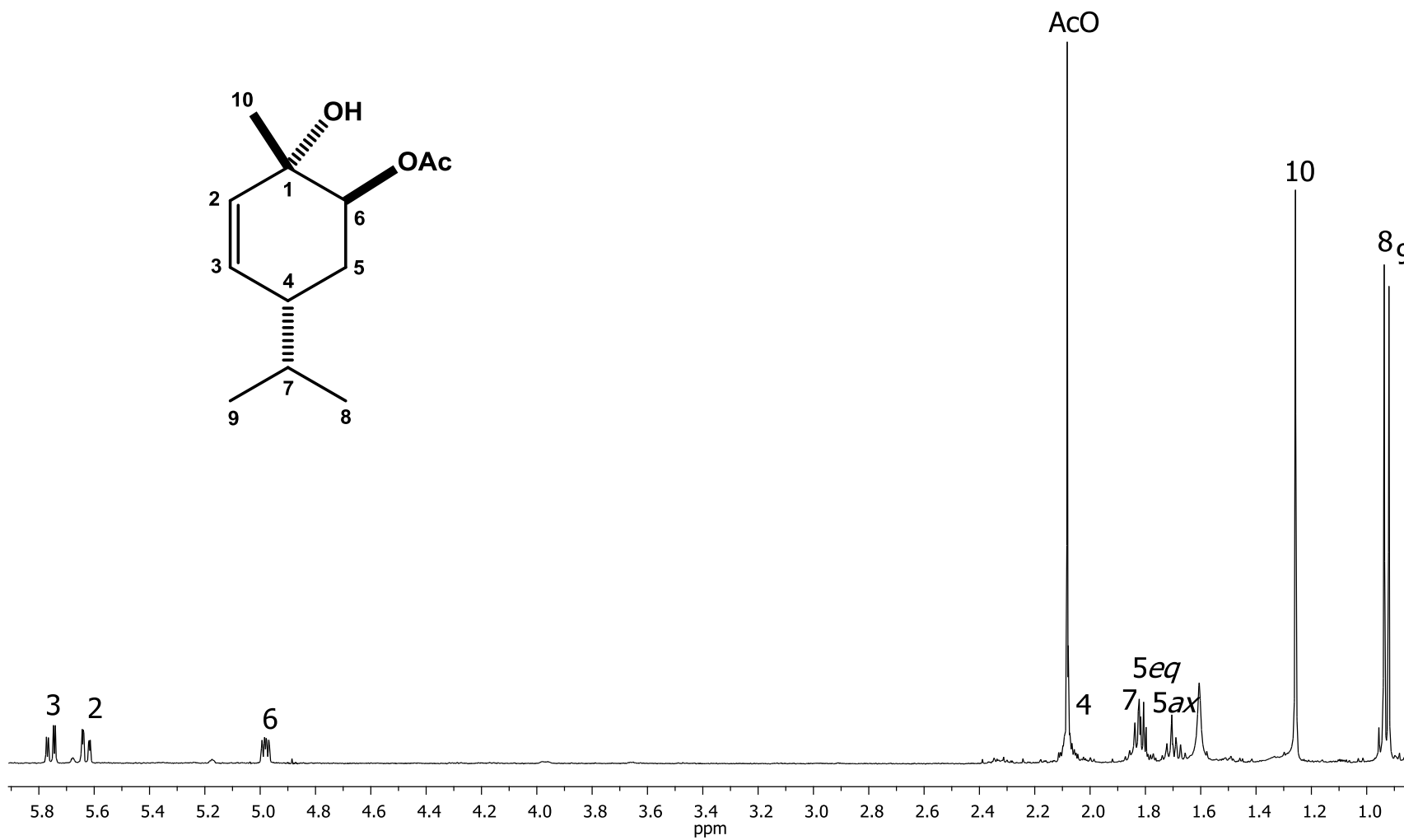


Figura 46. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del 6-acetoxi-1-hidroxi-1-*epi*-p-ment-2-eno (**63**) en CDCl_3 .

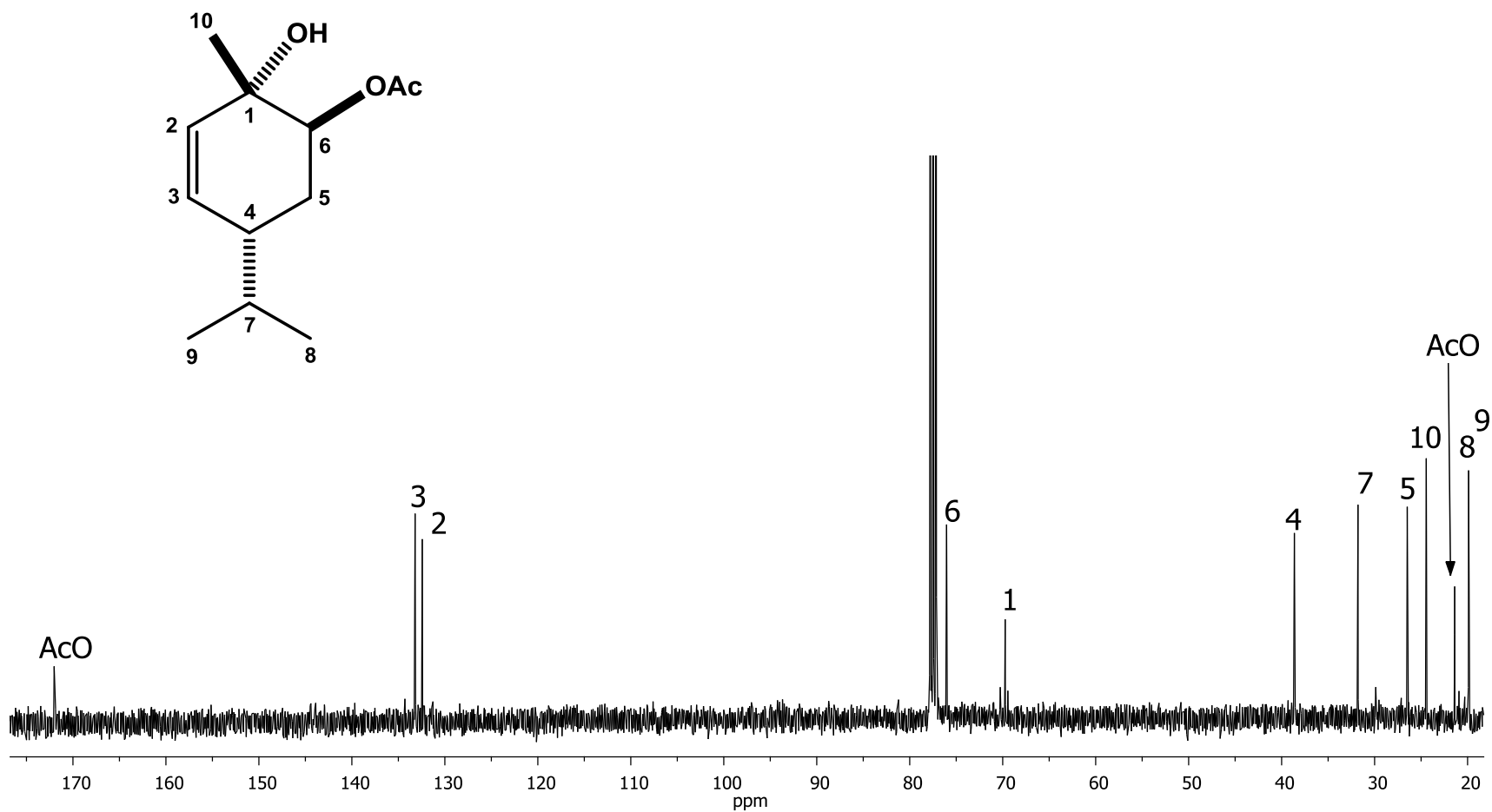
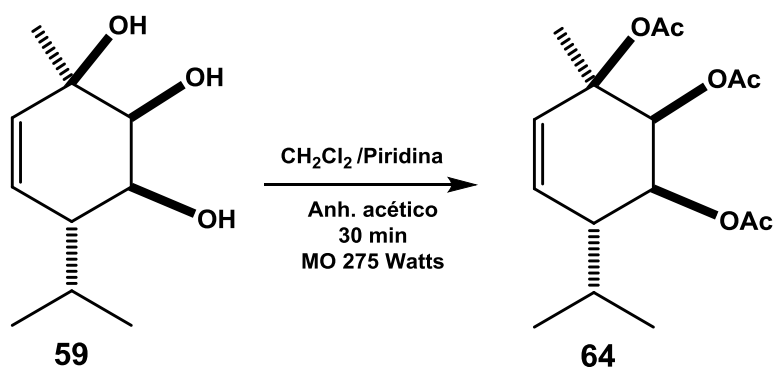


Figura 47. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del 6-acetoxi-1-hidroxi-1-epi-p-ment-2-eno (**63**) en CDCl_3 .

Después de varios intentos y con ayuda de la metodología descrita para la obtención de los derivados diacetilados anteriores, se buscaron las condiciones adecuadas para lograr la obtención del derivado triacetilado del *p*-ment-2-eno-1,5,6-triol (**59**); se realizó utilizando anhídrido acético con piridina y diclorometano la mezcla de reacción se dejó por un periodo de 45 min, 80 °C, 275 Watts, en un reactor de microondas (Discovery®) y se purificó en columna cromatografía obteniendo en la polaridad hexano-acetato de etilo un sólido color blanco para el derivado **64**. **Esquema 4**.



Esquema 4. Derivado Triacetilado del *p*-ment-2-eno-1,5,6-triol (**59**).

En el espectro de RMN de ¹H se puede observar que la señal doble de dobles del hidrógeno vinílico 2 de **59** se desplazó de 5.65 a 6.04 ppm con una señal doble de doble de dobles para este hidrógeno de igual manera los hidrógenos 5 y 6 que eran bases de alcohol se desplazaron de 3.66 y 3.92 ppm ahora bases de acetilo en 5.70 y 5.08 ppm respectivamente, además la presencia de tres nuevas señales simples correspondientes a los metilos de acetilo en 2.12, 2.05 y 1.99 ppm. Estos cambios en el espectro de RMN de ¹H indican la formación del 1,5,6-triacetoxi-*p*-ment-2-eno (**64**). **Figura 48**. En el espectro de RMN de ¹³C **Figura 49**, se observan 16 señales lo que sugiere la presencia del monoterpene triacetilado **64**; se observan las señales de los tres carbonilos de acetilo en 170.6, 170.1 y 169.6 ppm; además se observan las tres señales en 22.0, 20.9 y 20.9 ppm correspondientes a los metilos de acetilo respectivamente y por último un ligero desplazamiento de los carbonos 6, 5 y 1 de **59** que eran bases de alcohol de 74.3, 71.1 y 70.6 a 72.7, 69.4 y 79.8 ppm respectivamente.

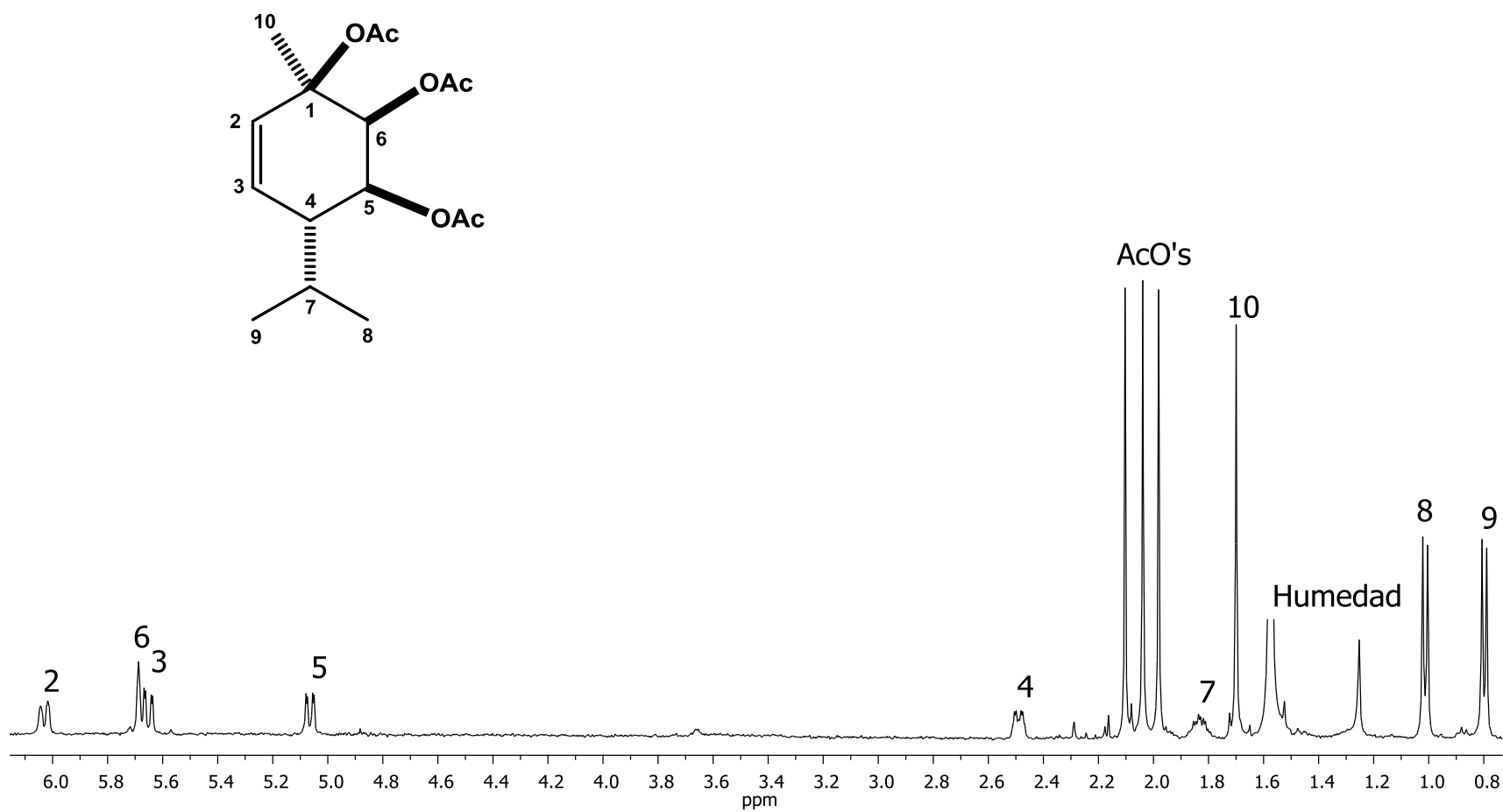
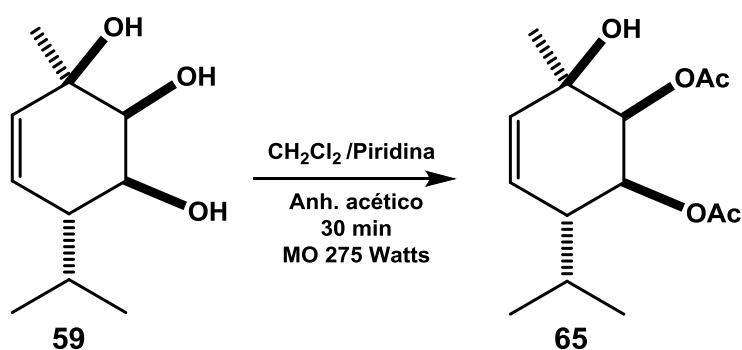


Figura 48. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del 1,5,6-triacetoxi-*p*-ment-2-eno (**64**) en CDCl_3 .

La diacetilación del *p*-ment-2-eno-1,5,6-triol (**59**) se realizó utilizando anhídrido acético con piridina y diclorometano la mezcla de reacción se dejó por un periodo de 30 min, 80 °C, 275 Watts, en un reactor de microondas (Discovery®) y se purificó en columna cromatográfica obteniendo en la polaridad 9:1 hexano-acetato de etilo un sólido blanco del derivado **65**. **Esquema 5**.



Esquema 5. Derivado diacetilado del *p*-ment-2-eno-1,5,6-triol (**59**)

En el espectro de RMN de ¹H se puede observar que la señal doble ancha del hidrógeno 6 base de alcohol de **59** se desplazó de 3.66 a 5.20 ppm ahora siendo base de acetilo con una señal doble de dobles para este hidrógeno de igual manera el hidrógeno 5 que era base de alcohol se desplazó de 3.92 a 5.11 ppm ahora base de acetilo, además la presencia de dos nuevas señales simples correspondientes a los metilos de acetilo en 2.15 y 2.05 ppm. Estos cambios en el espectro de RMN de ¹H indican la formación del 5,6-diacetoxi-1-hidroxi-*p*-ment-2-eno (**65**). **Figura 50**.

En el espectro de RMN de ¹³C **Figura 51**, se observan 14 señales lo que sugiere la presencia del monoterpeno diacetilado **65**; se observan las señales de los dos carbonilos de acetilo en 170.8 y 170.5 ppm; además se observan dos señales traslapadas en 21.1 ppm correspondientes a los metilos de acetilo respectivamente y por último un ligero desplazamiento del carbono 4 de **59** base de isopropilo de 47.8 a 43.0 ppm.

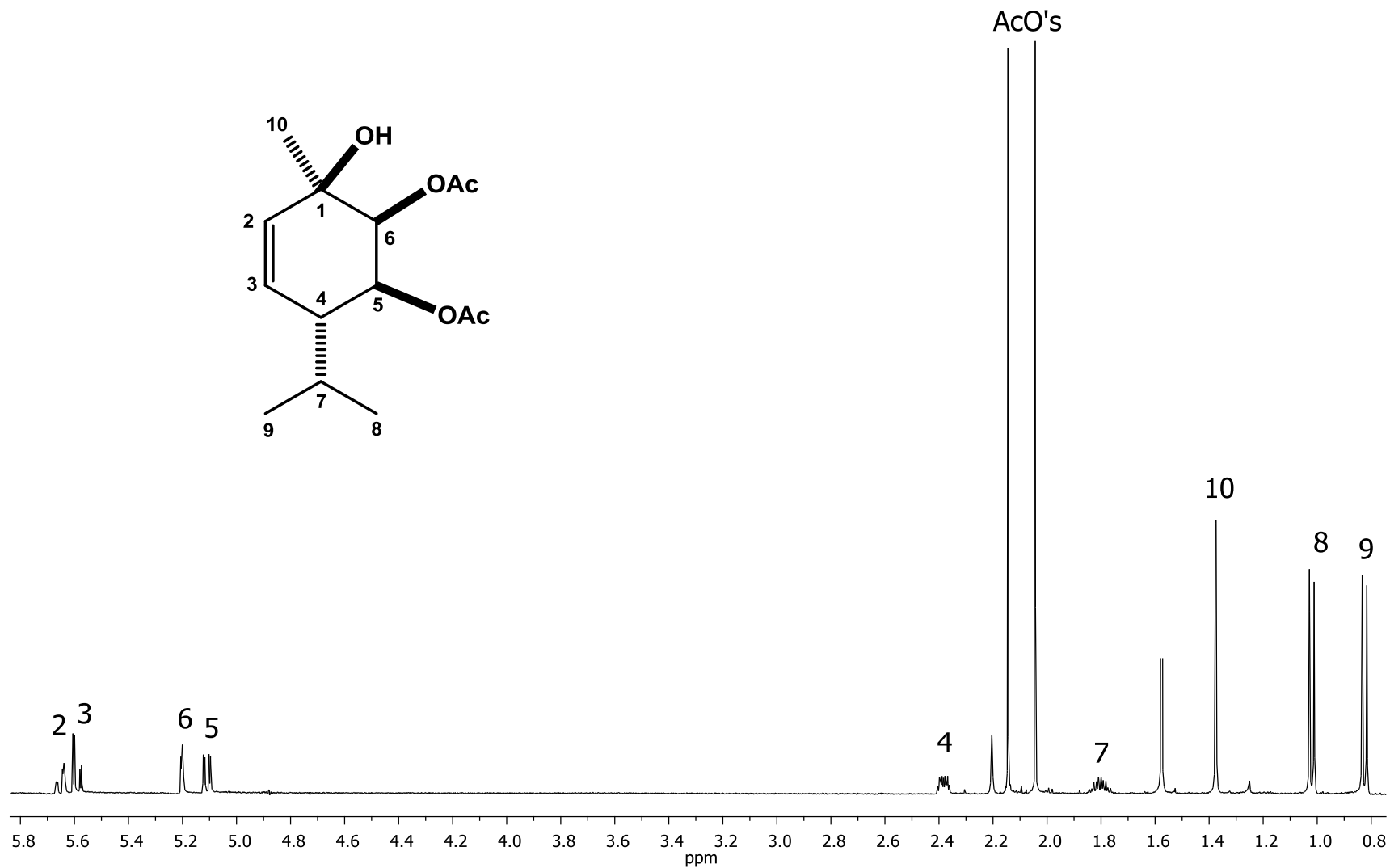


Figura 50. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del 5,6-diacetoxi-1-hidroxi-p-ment-2-eno (**65**) en CDCl_3 .

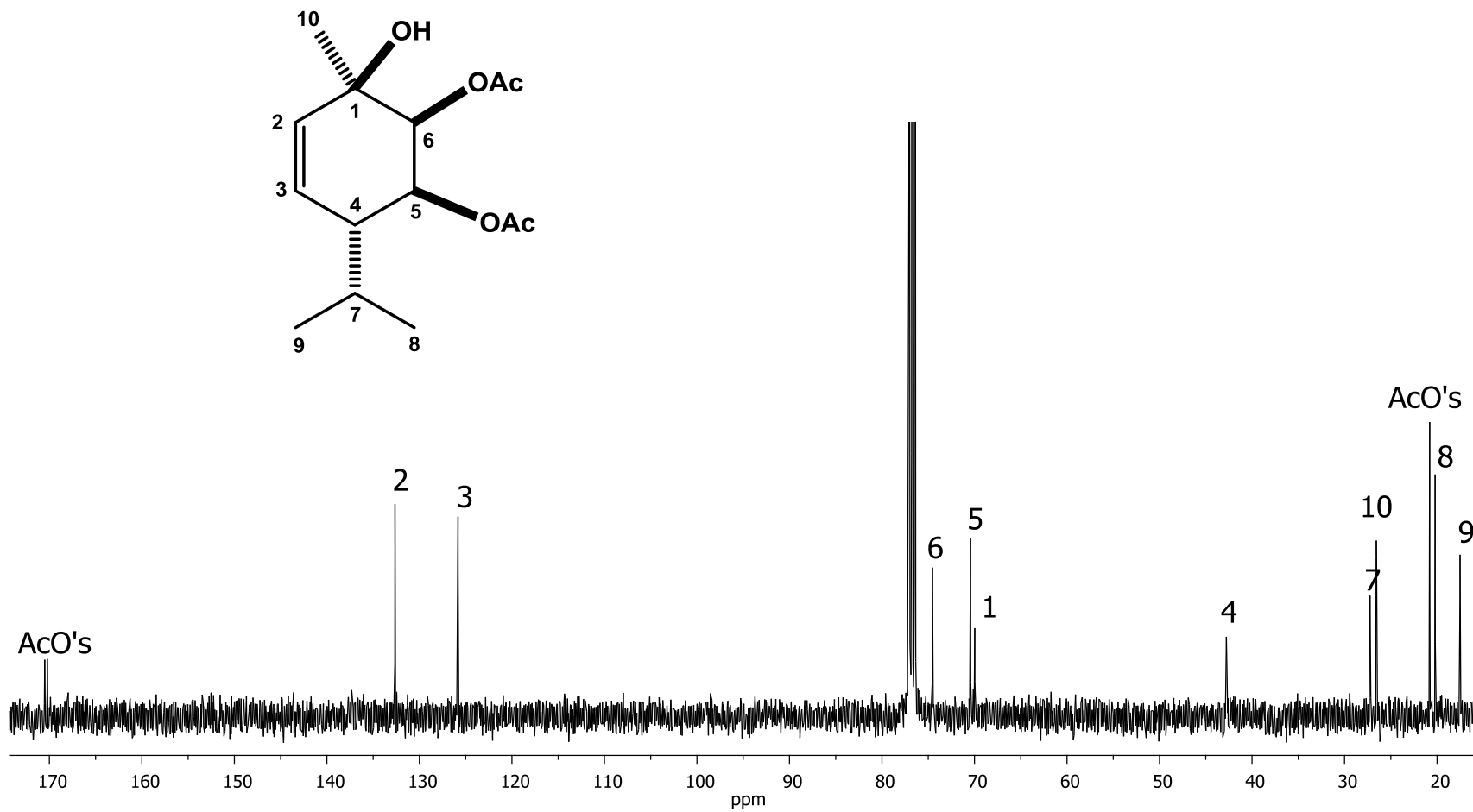
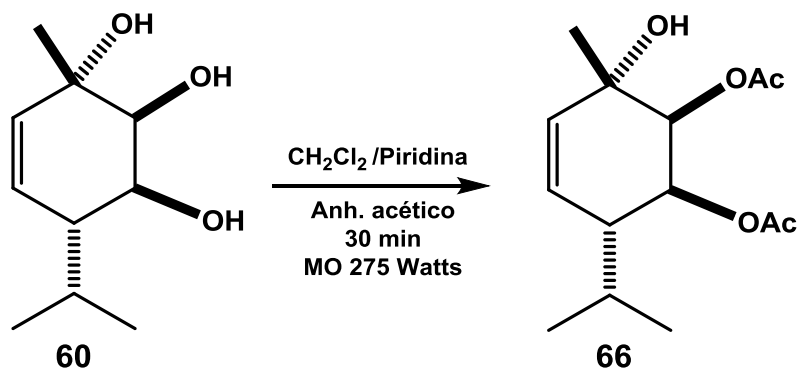


Figura 51. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del 5,6-diacetoxi-1-hidroxi-*p*-ment-2-eno (65) en CDCl_3 .

La preparación del derivado diacetilado del 1-*epi-p*-ment-2-eno-1,5,6-triol (**60**), se llevó a cabo bajo las mismas condiciones descritas para la obtención del compuesto diacetilado **65**, utilizando anhídrido acético con piridina y diclorometano la mezcla de reacción se dejó por un periodo de 30 min, 80 °C, 275 Watts, en un reactor de microondas y se purificó en columna cromatográfica obteniendo en la polaridad 4:1 hexano-acetato de etilo una miel color amarilla del derivado **66**.

Esquema 6.



Esquema 6. Derivado diacetilado del 1-*epi-p*-ment-2-eno-1,5,6-triol (**60**).

En el espectro de RMN de ^1H se puede observar que la señal del hidrógeno 5 que da una señal simple ancha base de alcohol de **60** se desplazó de 3.97 a 5.29 ppm ahora como una señal doble de dobles correspondiente a un hidrógeno base de acetilo de igual manera el hidrógeno 6 que era base de alcohol se desplazó de 3.73 a 5.21 ppm ahora base de acetilo, además la presencia de dos nuevas señales simples correspondiendo a los metilos de acetilo en 2.09 y 2.02 ppm. Estos cambios en el espectro de RMN- ^1H indican la formación del 5,6-diacetoxi-1-hidroxi-1-*epi-p*-ment-2-eno (**66**). **Figura 52.**

En el espectro de RMN de ^{13}C **Figura 53**, se observan 14 señales lo que sugiere la presencia del monoterpene diacetilado **66**; se observan las señales de los dos carbonilos de acetilo traslapados en 170.6 ppm; además se observa la señal del carbono 6 de **60** que aparece en 74.7 ppm ahora aparece en 77.1 ppm, por último las dos señales casi traslapadas en 21.0 ppm correspondientes a los metilos de acetilo respectivamente.

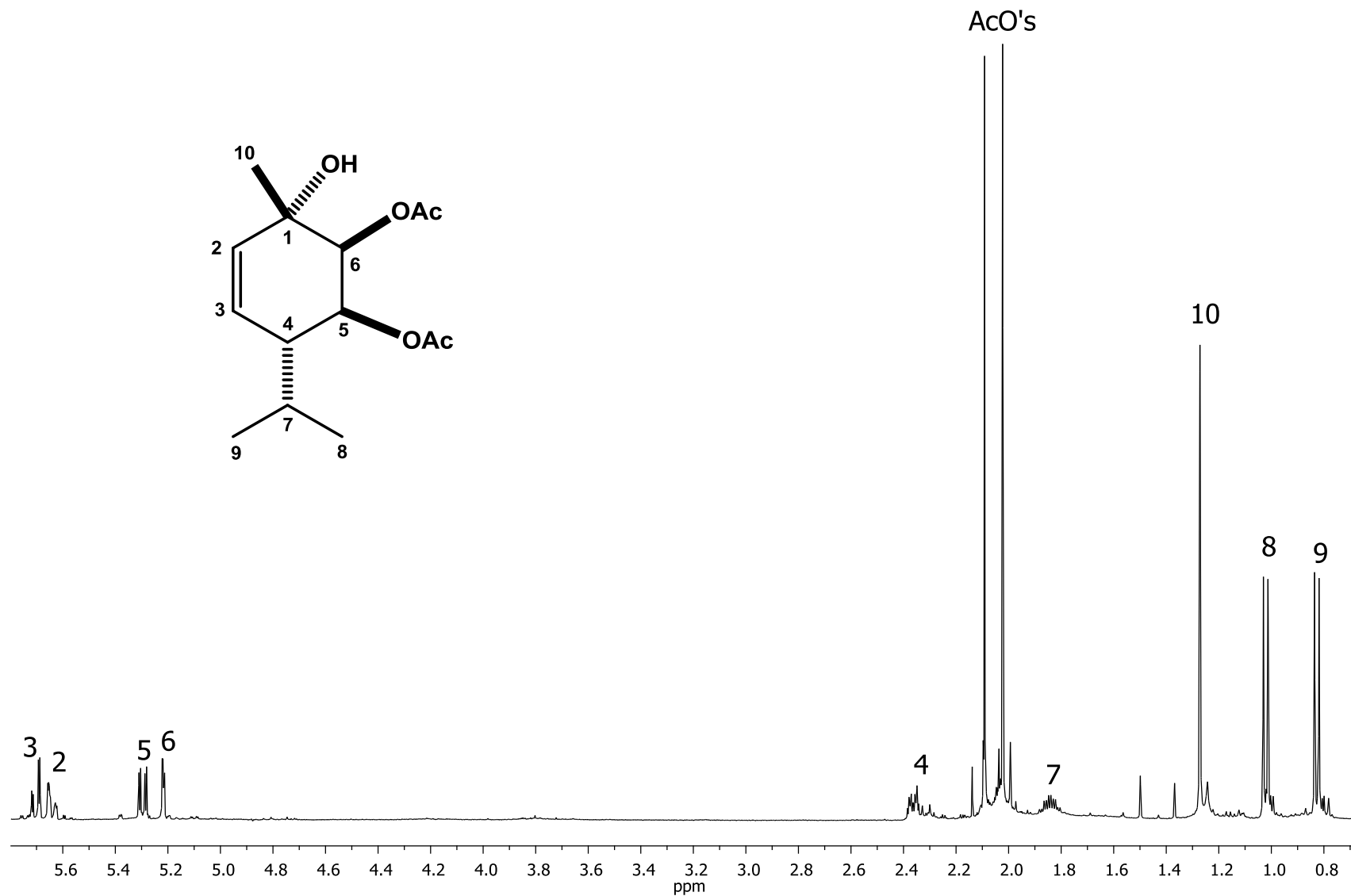


Figura 52. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del 5,6-diacetoxi-1-hidroxi-1-*epi-p*-ment-2-eno (**66**) en CDCl_3 .

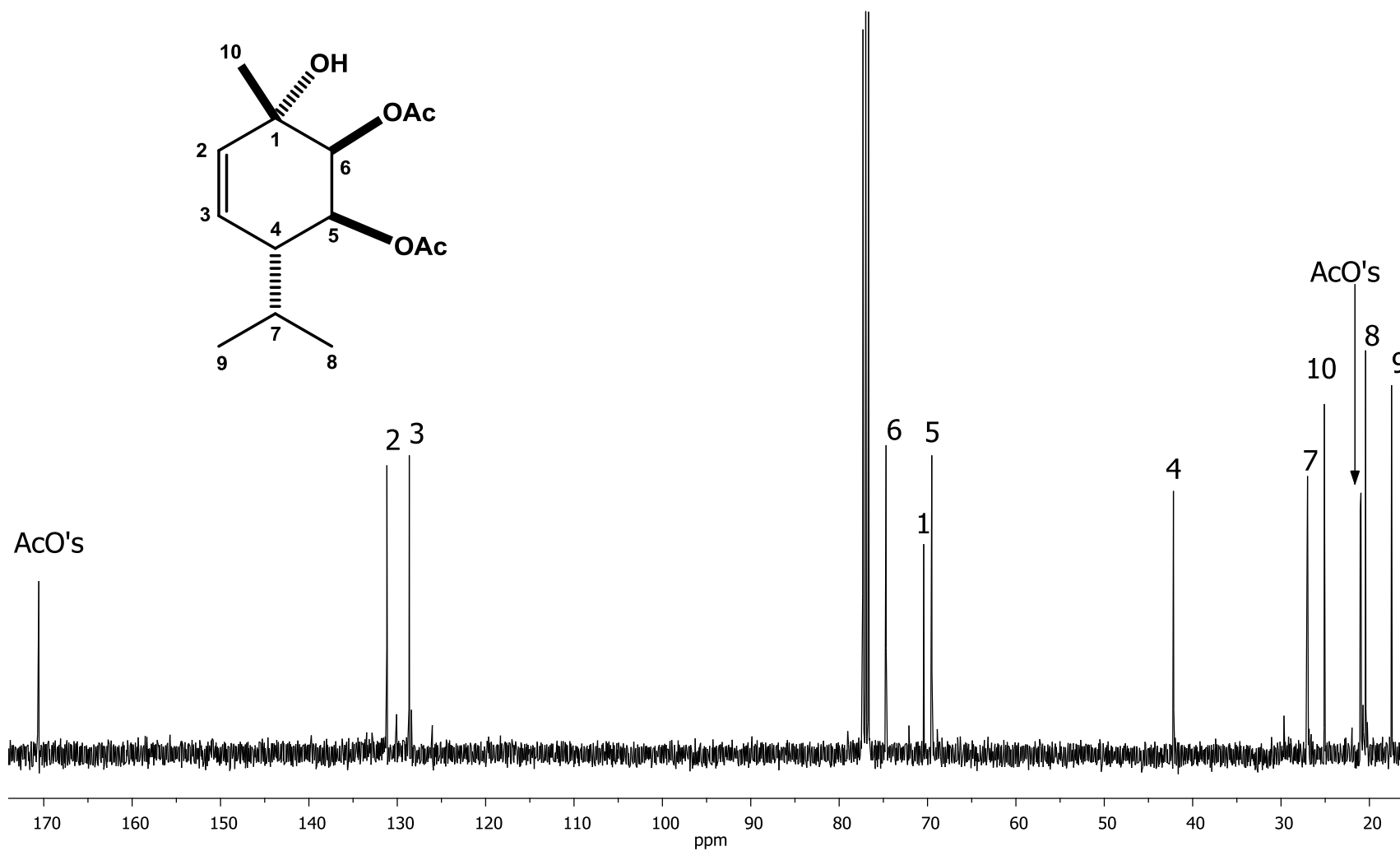
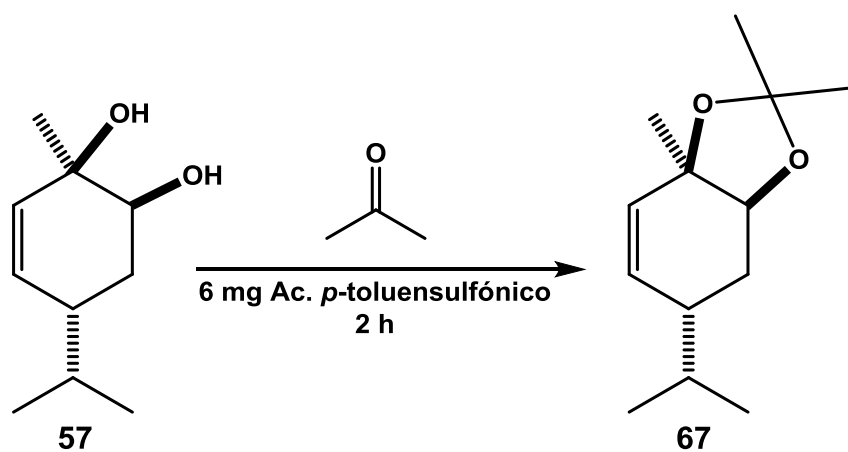


Figura 53. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del 5,6-diacetoxi-1-hidroxi-1-epi-p-ment-2-eno (66) en CDCl_3 .

La asignación de los espectros de RMN de ^1H se llevaron a cabo mediante el experimento COSY y la asignación de los espectros de ^{13}C fueron llevados a cabo mediante el experimento HETCOR. Cabe resaltar que fue posible la acetilación de los alcoholes terciarios en los compuestos **57** y **59** con ayuda del reactor de MO; sin embargo, estas condiciones no permitieron generar las peracetilaciones en los otros derivados de *p*-menteno.

Analizando las estructuras obtenidas del extracto metanólico de hoja de *A. glabrata* se decidió llevar a cabo la preparación de acetónidos esto con la finalidad de comprobar la presencia de dioles *cis*. A continuación se muestran los resultados obtenidos.

La preparación del acetónido **67** se llevó a cabo con acetona y ácido *p*-toluensulfónico mediante agitación a temperatura ambiente obteniendo una miel color café. **Esquema 7**.



Esquema 7. Derivado acetónido del *p*-ment-2-eno-1,6-diol (**57**).

En el espectro de RMN de ^1H se puede observar que la señal del hidrógeno 6 base de alcohol de **57** se desplazó de 3.76 a 4.05 ppm ahora siendo base de acetónido, también el hidrógeno del metileno 5eq que da una señal doble de triple de dobles se desplazó de 1.88 a 2.07 ppm ahora como una señal doble de doble de dobles, de igual manera el hidrógeno 5ax que da una señal triple se desplazó de 1.63 a 1.42 ppm ahora como una señal doble de doble de dobles,

además la presencia de las dos nuevas señales dobles correspondiendo a los metilos del acetónido en 1.38 y 1.36 ppm. Estos cambios en el espectro de RMN-¹H indican la formación del *p*-ment-2-eno-1,6-acetónido (**67**). **Figura 54**.

En el espectro de RMN de ¹³C **Figura 55**, se observan 13 señales lo que sugiere la formación del acetónido **67**; se observa la señal del carbono cuaternario de acetónido en 107.3 ppm; además se observa la señal del carbono 6 base de alcohol de **57** que aparece en 72.7 ppm ahora aparece en 78.5 ppm base de acetónido y la señal para el carbono cuaternario 1 base de alcohol que aparece en 70.2 ppm ahora aparece en 77.4 ppm base de acetónido, por último las dos señales casi traslapadas en 27.6 y 27.5 ppm correspondientes a los metilos de acetónido respectivamente.

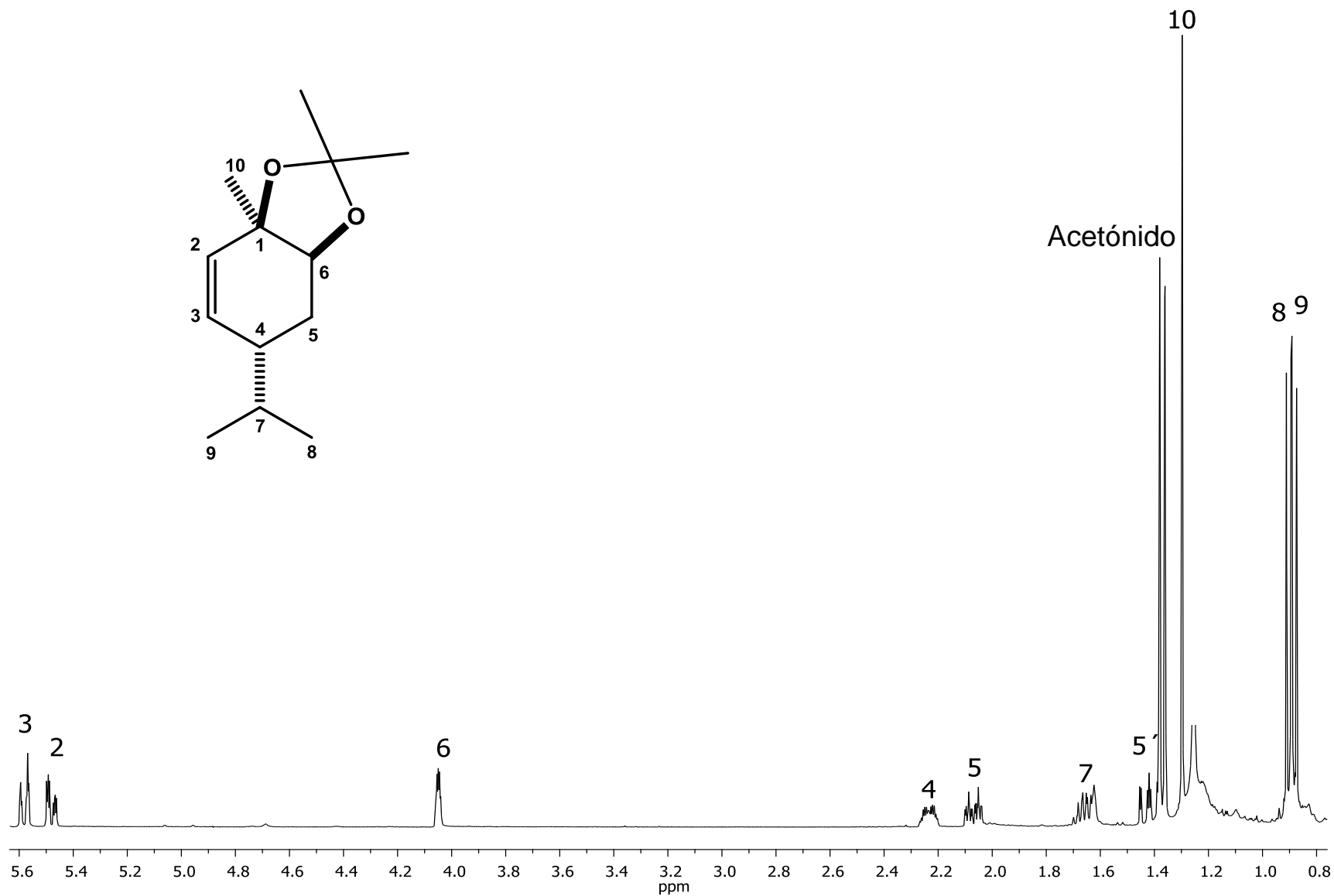


Figura 54. Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz del *p*-ment-2-eno-1,6-acetonido (67) en CDCl₃.

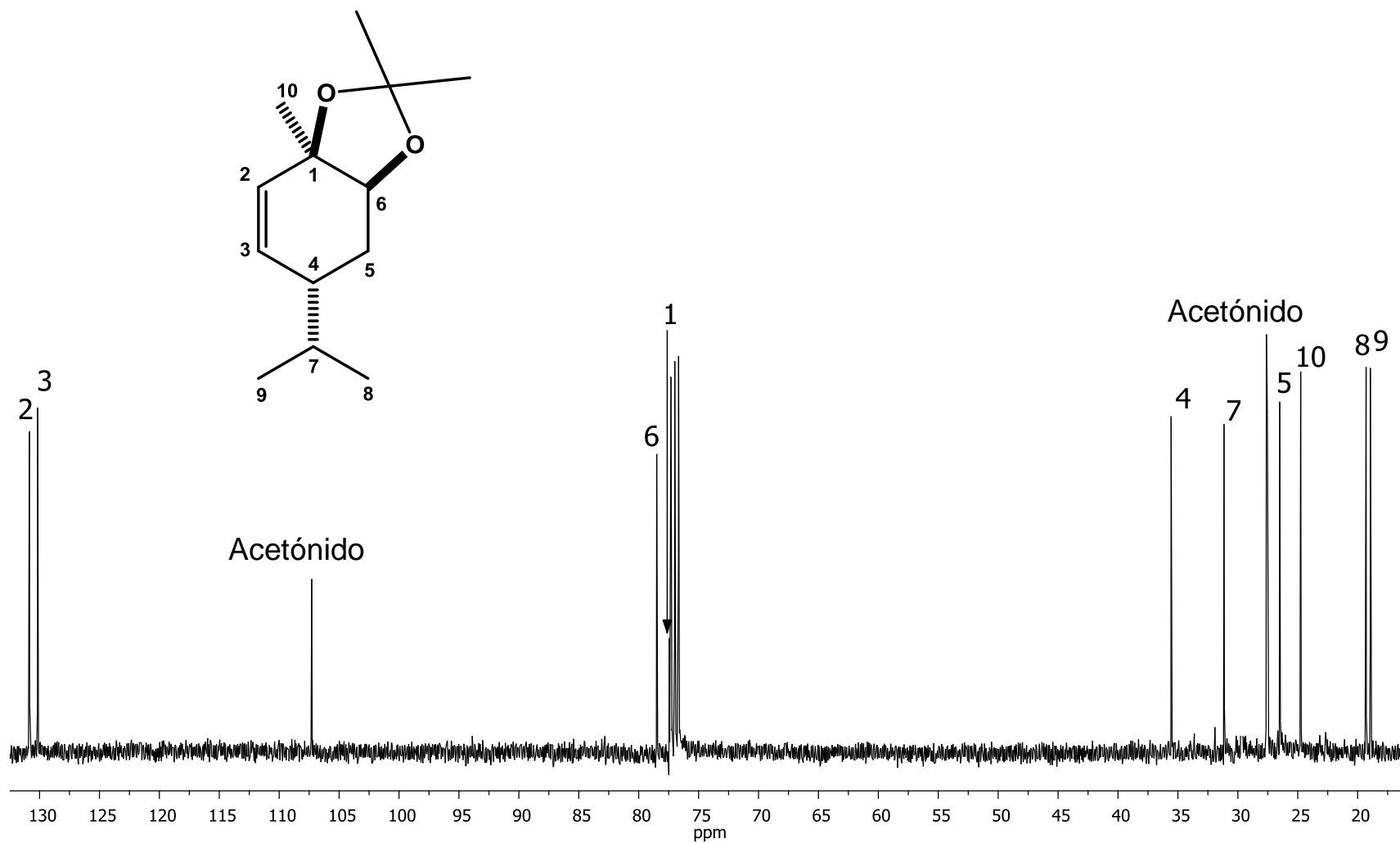
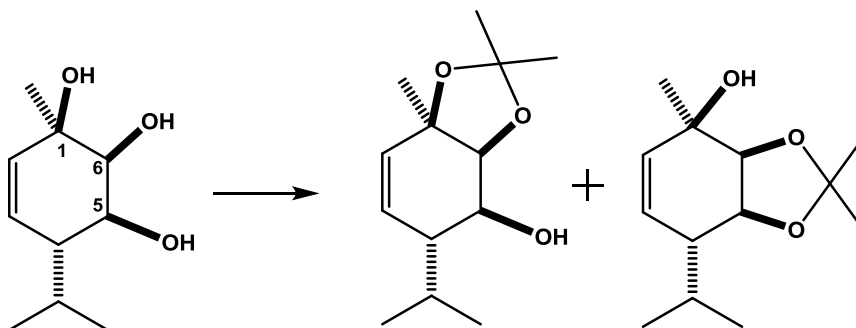


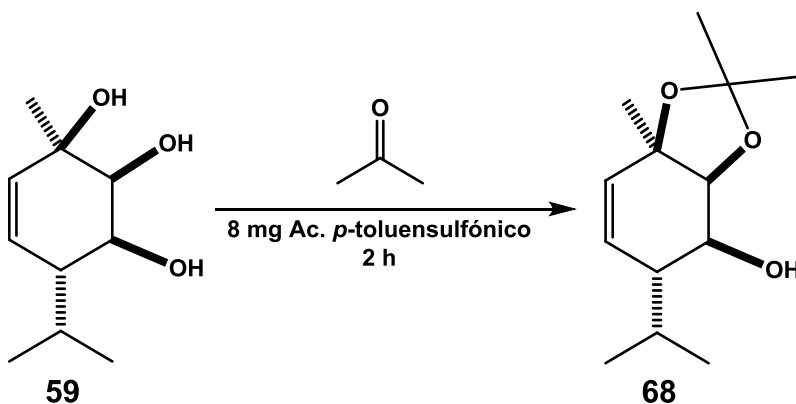
Figura 55. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del *p*-ment-2-eno-1,6-acetonido (67) en CDCl_3 .

Continuando con la preparación de derivados acetónidos se decidió ensayar ahora la reacción con el *p*-ment-2-eno-1,5,6-triol (**59**) analizando la estructura se puede observar que se pueden obtener dos posibles acetónidos, el acetónido 1,6 y el acetónido en 5,6. **Esquema 8**.



Esquema 8. Posibles acetónidos de **59**

Se procedió a realizar la reacción en las condiciones ya descritas para el compuesto **67**, con acetona y ácido *p*-toluensulfónico mediante agitación a temperatura ambiente obteniendo una miel color amarillo para el derivado **68**, como único producto. **Esquema 9**.



Esquema 9. Derivado acetónido del *p*-ment-2-eno-1,5,6-triol (**59**).

En el espectro de RMN de ^1H se puede observar que la señal del hidrógeno 5 base de alcohol de **59** se desplazó de 3.92 a 3.60 de igual forma base de alcohol, también el hidrógeno 6 base de alcohol que da una señal doble ancha se desplazó de 3.66 a 4.12 ppm ahora como una señal triple correspondiente a un

hidrógeno base de acetónido, de igual manera el hidrógeno 7 de isopropilo se desplazó de 1.83 a 2.20 ppm, además la presencia de las dos nuevas señales simples correspondiendo a los metilos del acetónido en 1.41 y 1.38 ppm. Estos cambios en el espectro de RMN-¹H indican la formación del 5-hidroxi-*p*-ment-2-eno-1,6-acetónido (**68**). **Figura 56**.

En el espectro de RMN de ¹³C **Figura 57**, se observan 13 señales lo que sugiere la formación del acetónido **68**; se observa la señal del carbono cuaternario de acetónido en 108.6 ppm; además se observan la señal del carbono 6 que aparece para **59** en 74.3 ppm ahora aparece en 82.4 ppm y la señal para el carbono cuaternario 1 que aparece en 70.6 ppm ahora aparece en 79.9 ppm, por último las dos señales casi traslapadas en 27.6 y 27.5 ppm correspondientes a los metilos de acetónido respectivamente.

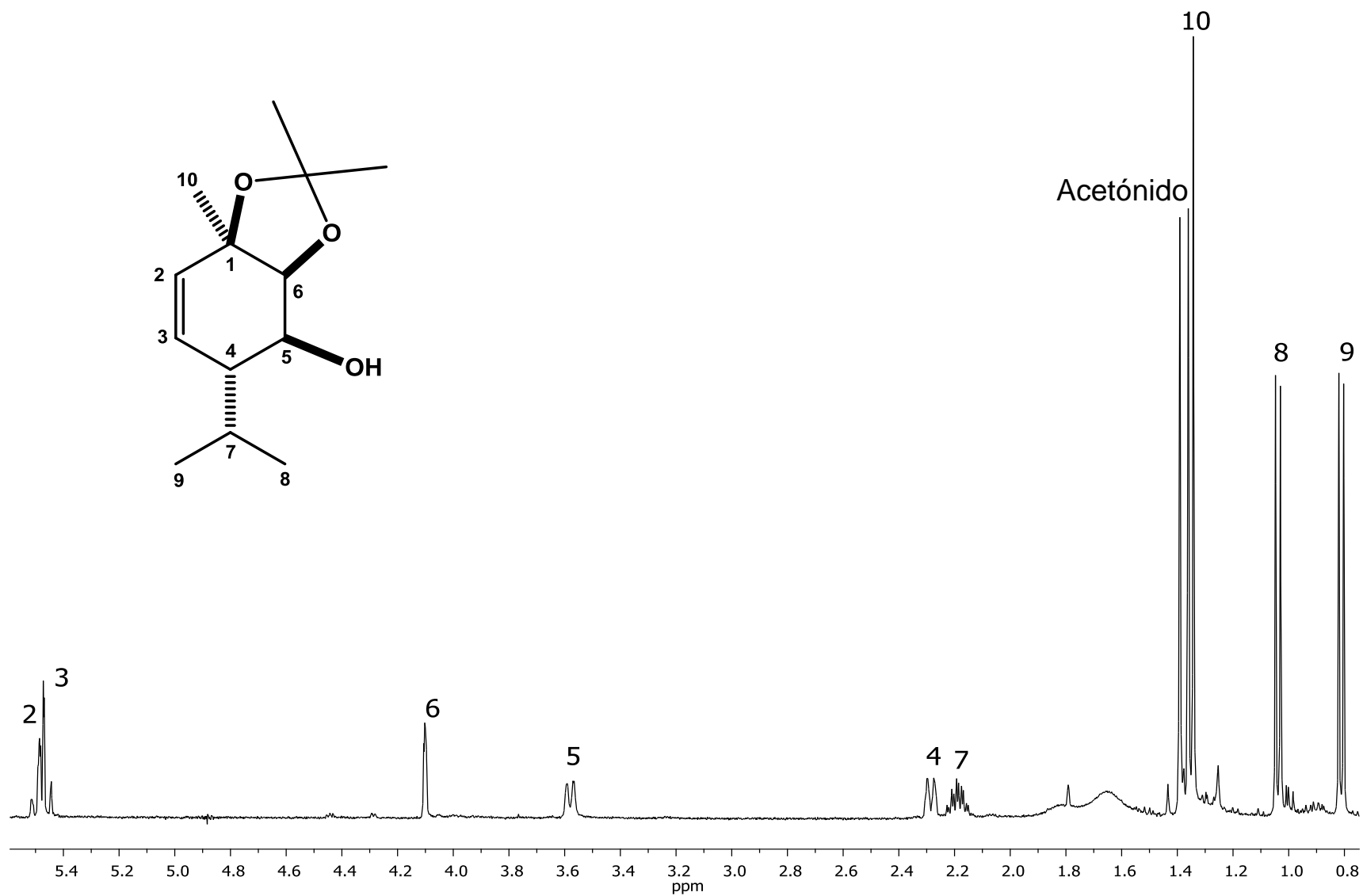


Figura 56. Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz del 5-hidroxi-*p*-ment-2-eno-1,6-acetonido (**68**) en CDCl₃.

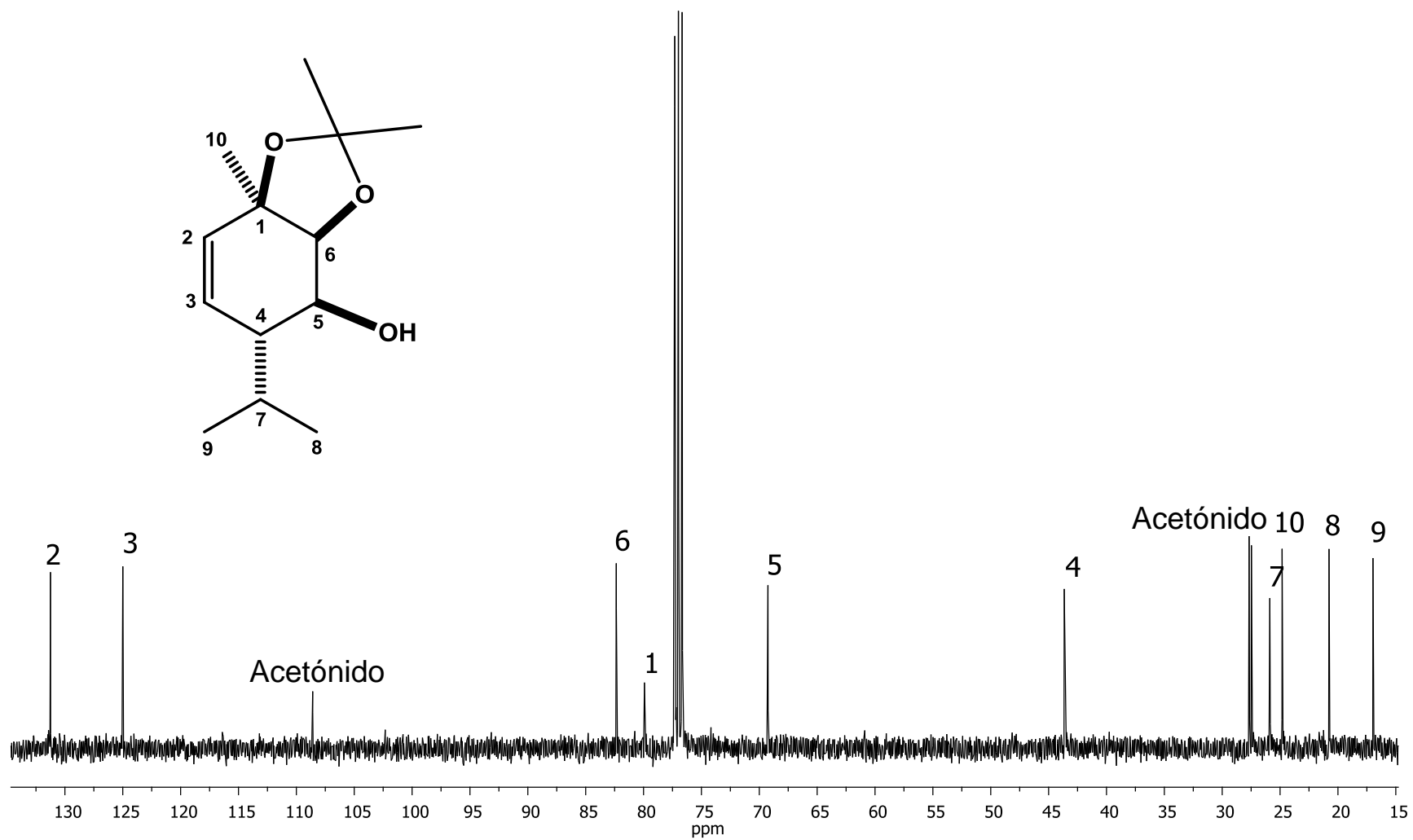
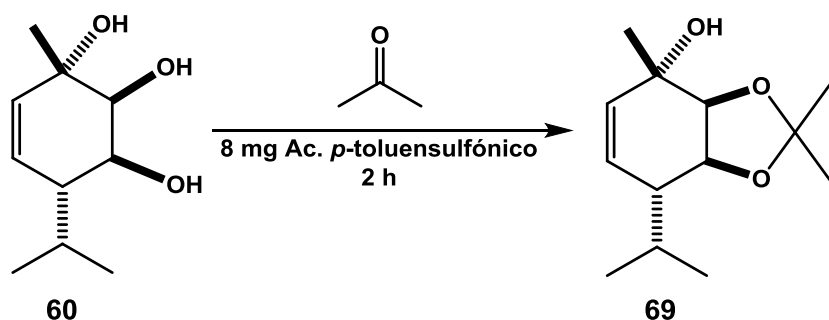


Figura 57. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del 5-hidroxi-*p*-ment-2-eno-1,6-acetonido (**68**) en CDCl_3 .

La preparación del derivado de acetónido del 1-*epi-p*-ment-2-eno-1,5,6-triol (**60**), se realizó bajo las mismas condiciones de reacción descritas para el compuesto **68**. Si analizamos la estructura del triol 1,5,6 podemos observar que solo existe una posibilidad de que se forme el acetónido en las posiciones 5,6 ya que estos hidroxilos guardan una relación *cis*, mientras que el diol 1,6 presenta una configuración *trans*. La reacción se llevó a cabo con acetona y ácido *p*-toluensulfónico mediante agitación a temperatura ambiente obteniendo una miel color canela del derivado **69**. **Esquema 10**.



Esquema 10. Derivado acetónido del 1-*epi-p*-ment-2-eno-1,5,6-triol (**60**).

En el espectro de RMN de ^1H se puede observar que la señal de los hidrógenos vinílicos 2 y 3 de **60** se desplazan de 5.62 y 5.68 a 5.79 y 5.56 ppm respectivamente ahora observando un intercambio de señales, también los hidrógenos 5 y 6 bases de alcohol se desplazan de 3.97 y 3.73 a 4.12 y 4.02 ppm ahora siendo señales base de acetónido, además la presencia de las dos nuevas señales dobles correspondiendo a los metilos del acetónido en 1.48 y 1.37 ppm. Estos cambios en el espectro de RMN- ^1H indican la formación del 1-hidroxi-1-*epi-p*-ment-2-eno-5,6-acetónido (**69**). **Figura 58**. En el espectro de RMN de ^{13}C **Figura 59**, se observan 13 señales lo que sugiere la formación del acetónido **69**; se observa la señal del carbono cuaternario de acetónido en 107.9 ppm; además se observan la señal del carbono 6 base de alcohol de **60** que aparece en 77.1 ppm ahora aparece en 82.0 ppm base de acetónido y la señal para el carbono cuaternario 5 base de alcohol que aparece en 68.4 ppm ahora aparece en 74.1 ppm base de acetónido, por último las dos señales en 26.5 y 24.7 ppm correspondientes a los metilos de acetónido respectivamente.

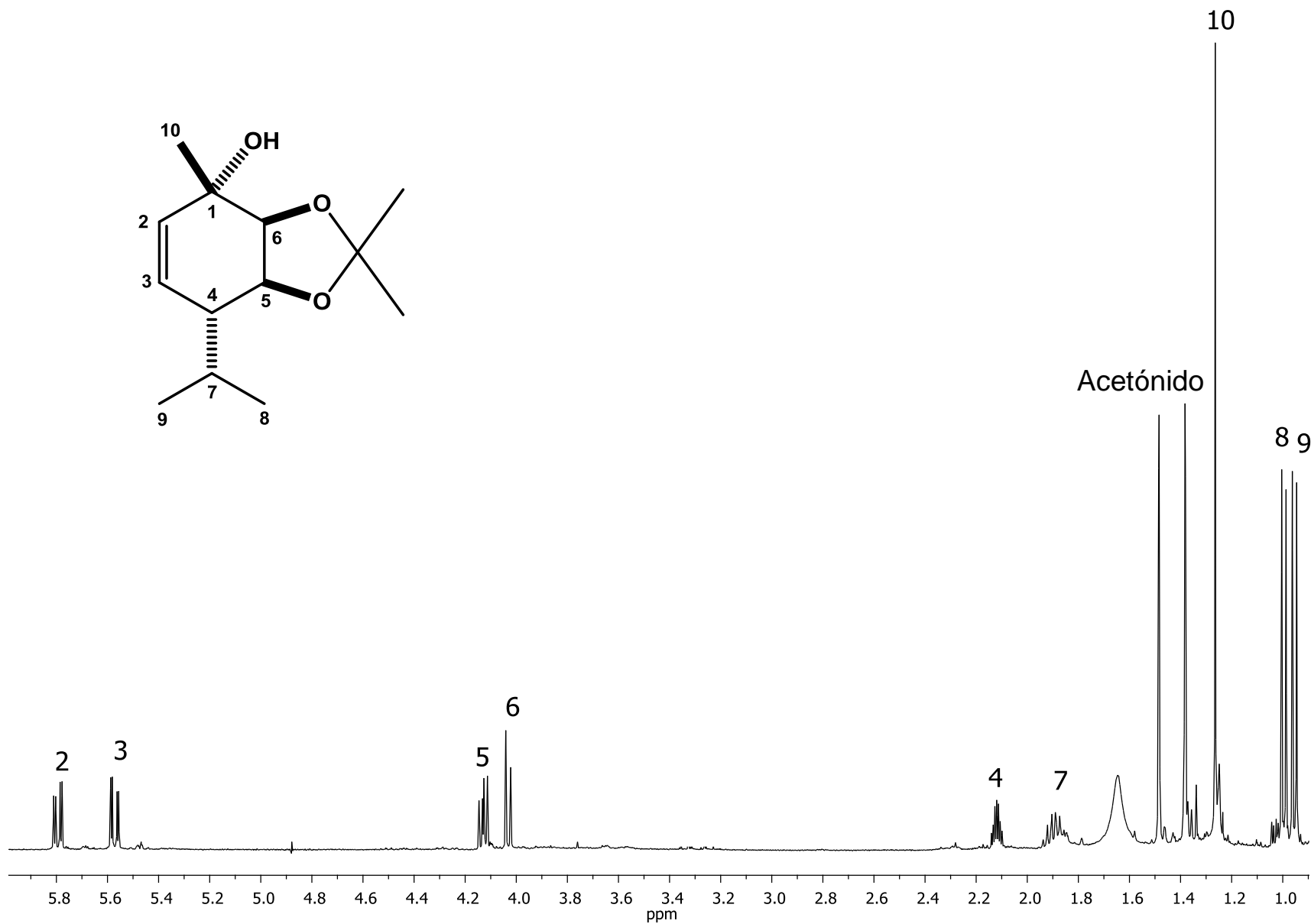


Figura 58. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del 1-hidroxi-1-*epi-p*-ment-2-eno-5,6-acetonido (**69**) en CDCl_3 .

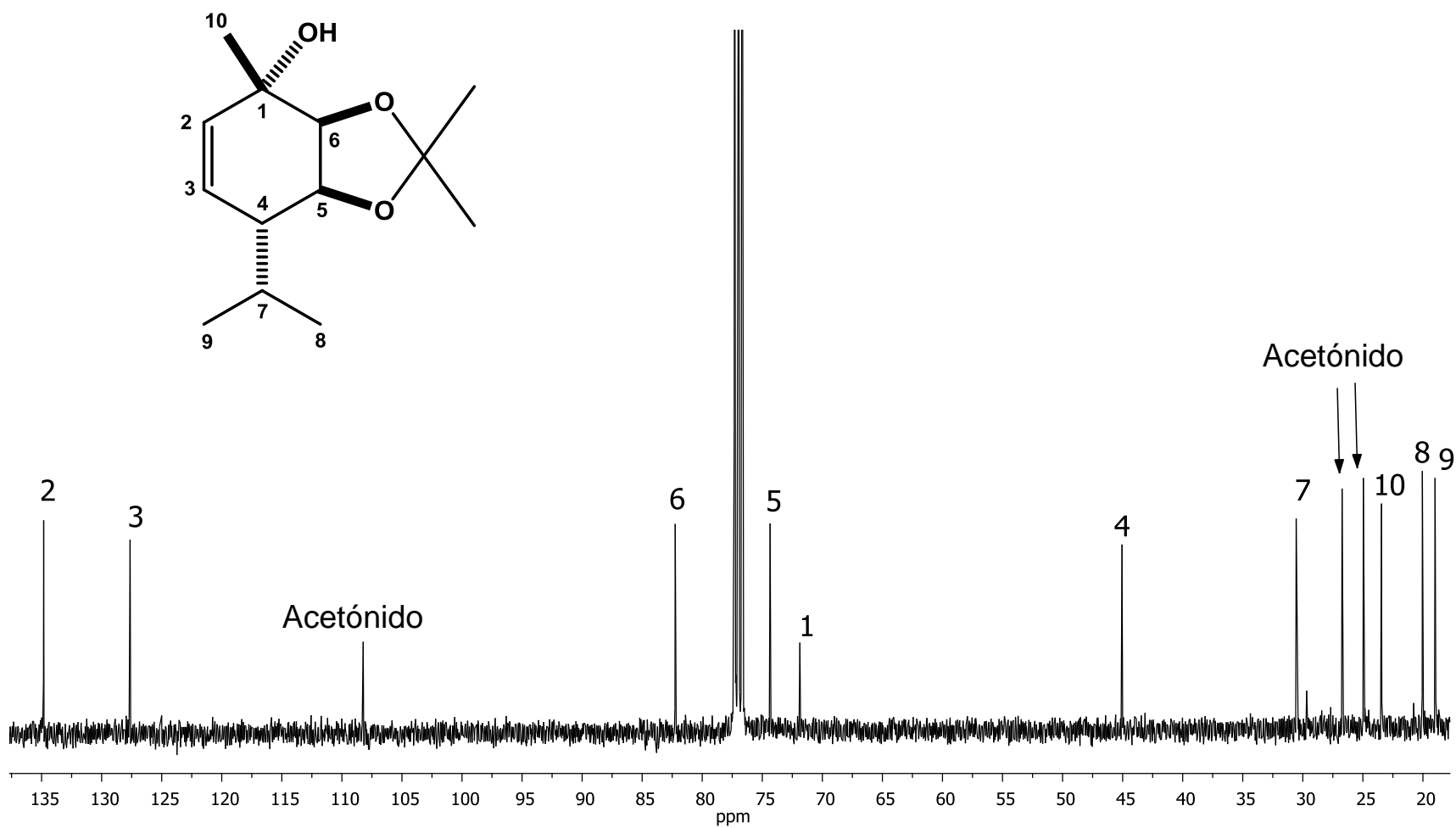


Figura 59. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del 1-hidroxi-1-*epi-p*-ment-2-eno-5,6-acetonido (69) en CDCl_3 .

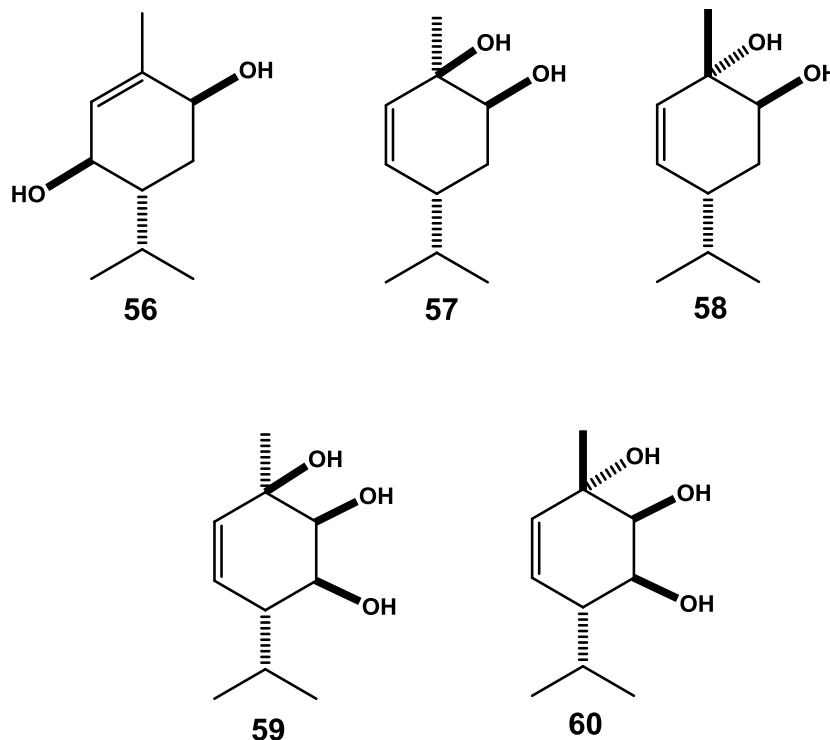
La asignación de los espectros de RMN de ^1H se llevaron a cabo mediante el experimento COSY y la asignación de los espectros de ^{13}C fueron llevados a cabo mediante el experimento HETCOR.

El tratamiento ácido del extracto metanólico de hojas de *A. glabrata* facilitó la obtención de cinco derivados del *p*-menteno **57-60**.

Hasta el momento se describen configuraciones relativas de los derivados del *p*-menteno; **57**, **58**, **59** y **60** en base al experimento NOESY y del compuesto **56** del cual se conoce su configuración absoluta, además llevando a cabo la preparación de derivados acetilados; **61-66** los cuales ayudaron a confirmar la presencia de grupos hidroxilo presentes en cada derivado del *p*-menteno. Por otro lado la preparación de derivados de acetónido; **67-69** confirmó la presencia de hidroxilos en posición *cis*.

6. CONCLUSIONES

Del extracto metanólico de las hojas de *A. glabrata* se lograron aislar e identificar cinco derivados del *p*-menteno: *p*-ment-1-eno-3,6-diol (**56**), *p*-ment-2-eno-1,6-diol (**57**), 1-*epi-p*-ment-2-eno-1,6-diol (**58**), *p*-ment-2-eno-1,5,6-triol (**59**) y 1-*epi-p*-ment-2-eno-1,5,6-triol (**60**) los cuales fueron caracterizados mediante resonancia magnética nuclear de 1D y 2D.



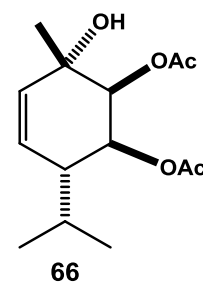
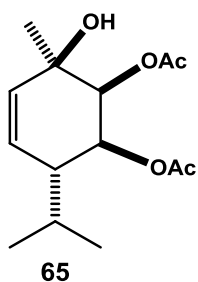
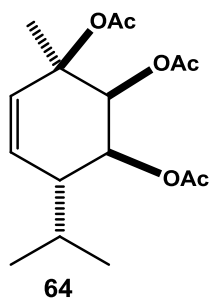
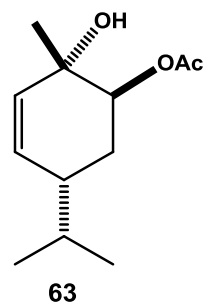
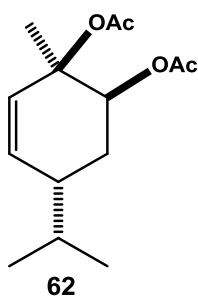
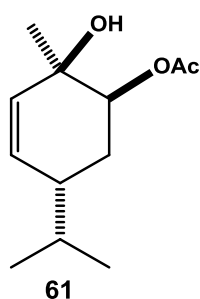
Del compuesto **56** se lograron obtener cristales adecuados para su análisis mediante difracción de rayos X; de esta manera se logró definir la configuración absoluta de este compuesto y con la comparación en la literatura.

Aunque ya son conocidos los compuestos **56**, **57** y **58**, en el caso particular de este último existe ambigüedad sobre la rotación específica reportada para este derivado. Este es el primer reporte en el que se describen dichos compuestos en el género *Ageratina*.

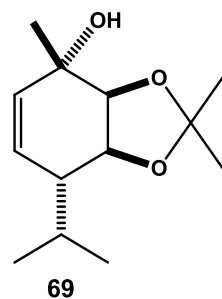
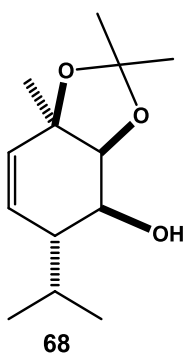
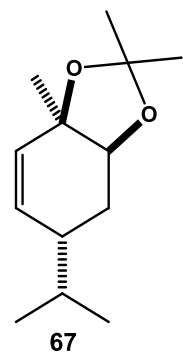
La configuración relativa de los compuestos **57-60** fue determinada mediante experimentos bidimensionales NOESY.

Los compuestos **59-60** corresponden a estructuras nuevas, ya que no existen datos en la literatura donde se describan estas sustancias.

Se lograron preparar los siguientes derivados acetilados; **61, 62, 63, 64, 65** y **66** los cuales permitieron confirmar la presencia de grupos hidroxilo presentes en los derivados del *p*-menteno **57-60**;



Se lograron preparar los derivados de acetónido correspondientes a los compuestos; **57, 59** y **60**, derivados que nos indican la presencia de dioles en posición *cis*.



7. PARTE EXPERIMENTAL

7.1. Generalidades

Los espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H a 400 MHz y de ^{13}C a 100 MHz, así como los espectros bi-dimensionales de correlación $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ (HETCOR), $^1\text{H}/^1\text{H}$ (COSY) y $^1\text{H}/^1\text{H}$ (NOESY) se determinaron en un espectrómetro Varian Mercury Plus-400. Se utilizó como disolvente cloroformo deuterado (CDCl_3) o metanol deuterado (CD_3OD) y como referencia interna se utilizó tetrametilsilano (TMS). Los espectros fueron procesados mediante el programa MestRenova.

El análisis de rayos X se llevó a cabo en un difractómetro Bruker-Nonius CAD4 con radiación de Cu K_α .

Los espectros de IR se midieron en solución de cloroformo empleando un espectrofotómetro marca Buck 500.

La rotación óptica se midió a cinco longitudes de onda: 589, 578, 546, 436 y 365 nm, utilizando un polarímetro Perkin Elmer modelo 341 y empleando soluciones clorofórmicas filtradas.

Los espectros de masa de baja resolución se midieron en un equipo Varian Saturn 2000 mediante impacto electrónico.

Para las separaciones cromatográficas se utilizó gel de sílice Merck 230-400 mallas.

La planta fue autenticada taxonómicamente por el Dr. Jerzy Rzendowski conservándose un ejemplar en del Instituto de Ecología A.C. en Pátzcuaro, Mich.

7.2. Material vegetal

Ageratina glabrata fue colectada el 10 de febrero del 2010 en el km 202 de la carretera México-Morelia, vía Mil Cumbres. Se dejaron secar a la sombra por un

periodo de diez días trascurrido este periodo se llevó a cabo la separación en sus distintas partes; flor, hoja, tallo y raíz.

7.3. Obtención de extractos

Un lote de 500 g de hojas de *A. glabrata* se pusieron a macerar con 2 L hexano a temperatura ambiente durante tres días, transcurrido este tiempo se concentró en un rotavapor repitiendo este proceso tres veces; obteniendo 11 g (2.2% de rendimiento) del extracto hexánico. Se continuó la maceración utilizando diclorometano como segundo disolvente obteniendo 39 g (7.8% de rendimiento) de este extracto, por último se utilizó metanol como disolvente, repitiendo el procedimiento anteriormente descrito obteniendo 80 g (16% de rendimiento) del extracto metanólico.

7.4. Tratamiento ácido

40 g de extracto metanólico de hoja se resuspendieron en 500 mL de agua destilada, después se filtró y al filtrado se le realizaron particiones liquido-liquido con 500 mL de diclorometano por tres ocasiones separando la fase orgánica de la fase acuosa. La fase acuosa fue colocada en un matraz Erlenmeyer de 1000 mL adicionando lentamente 15 mL de ácido clorhídrico, se dejó en agitación durante 2 h a temperatura ambiente; posteriormente se realizó una extracción con 500 mL de diclorometano por tres ocasiones, la fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y concentró en el rotavapor de la cual se obtuvieron 800 mg de una miel color marrón.

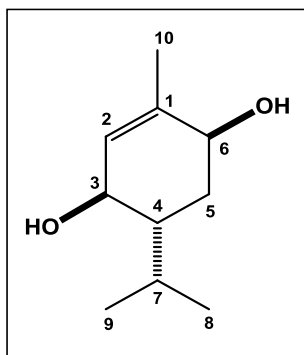
7.5. Cromatografía en columna

Un lote de 2 g de miel obtenida por tratamiento ácido fue sometida a separación cromatográfica empleando una columna de cristal de 2 cm de diámetro y 30 cm de altura empacada con gel de sílice 230-400 mallas y como fase móvil

mezclas de diclorometano-metanol (CH₂Cl₂-MeOH) en orden de polaridad creciente, colectando fracciones de 5 mL. Después de varias recromatografías sucesivas se obtuvieron los siguientes derivados: *p*-ment-1-eno-3,6-diol (**56**), *p*-ment-2-eno-1,6-diol (**57**), 1-*epi-p*-ment-2-eno-1,6-diol (**58**), *p*-ment-2-eno-1,5,6-triol (**59**) y 1-*epi-p*-ment-2-eno-1,5,6-triol (**60**).

***p*-ment-1-eno-3,6-diol (56)**

De las fracciones eluidas con la polaridad diclorometano-metanol (49:1) se obtuvieron 50 mg (2.5% de rendimiento) de cristales incoloros en forma de aguja de 205-207 °C para el diol **56**.



$$[\alpha]_D^{20} = + 10 \text{ (c 0.54, CH}_3\text{OH)}.$$

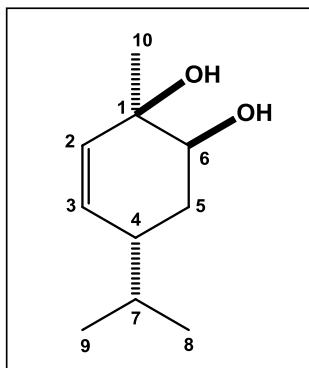
EMIE 70 eV *m/z* (Int. Rel.) [M-CH₃]⁺ 155 (5), 142 (1), 127 (18), 110 (9), 93 (8), 78 (3), 71 (100), 55 (34) y 42 (12).

RMN de ¹H (400 MHz, CD₃OD) δ ppm 5.44 (1H, sa, H-2), 3.89 (1H, ta, *J* = 4.1 Hz, H-6), 3.82 (1H, da, *J* = 9.2 Hz, H-3), 2.09 (1H, septd, *J* = 6.8, 2.8 Hz, H-7), 1.74 (3H, s, CH₃-10), 1.69 (1H, ddd, *J* = 13.5, 2.8, 2.8 Hz, H-5_{eq}), 1.56 (1H, dddd, *J* = 13.1, 9.2, 2.8, 2.8 Hz, H-4), 1.36 (1H, ddd, *J* = 13.5, 13.1, 4.1 Hz, H-5_{ax}), 0.95 (1H, d, *J* = 6.8 Hz, CH₃-8), 0.80 (1H, d, *J* = 6.8 Hz, CH₃-9).

RMN de ¹³C (100 MHz, CD₃OD) δ ppm 137.3 (C, C-1), 130.9 (CH, C-2), 69.8 (CH, C-3), 68.3 (CH, C-6), 42.7 (CH, C-4), 30.7 (CH₂, C-5), 26.8 (CH, C-7), 21.3 (CH₃, C-8), 20.7 (CH₃, C-10), 17.0 (CH₃, C-9).

***p*-ment-2-eno-1,6-diol (57)**

De las fracciones eluidas con la polaridad diclorometano-metanol (49:1) se obtuvieron 45 mg (2.2% de rendimiento) de una miel color marrón correspondiente al diol **57**.



$$[\alpha]^{20} = \frac{+43}{589} + \frac{+45}{578} + \frac{+52}{546} \frac{\text{B.E}}{436} \frac{\text{B.E}}{365} (c\ 0.65, \text{CHCl}_3).$$

IR (CHCl₃) ν_{max} 3590, 2963, 2876, 1653 cm⁻¹.

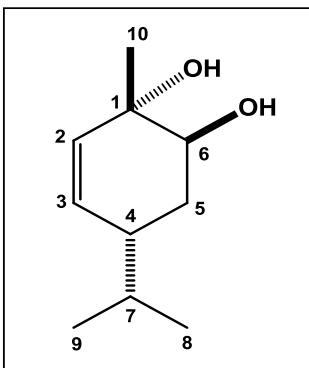
EMIE 70 eV m/z (Int. Rel.) [M-OH]⁺ 153 (2), 135 (90), 111 (100), 93 (37) y 43 (39).

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 5.65 (1H, ddd, $J = 10.4, 2.8, 1.0$ Hz, H-3), 5.55 (1H, ddd, $J = 10.4, 2.8, 1.6$ Hz, H-2), 3.76 (1H, dt, $J = 5.6, 1.6, 1.6$ Hz, H-6), 2.19 (1H, ddt, $J = 14.4, 5.6, 2.8$ Hz, H-4), 1.88 (1H, dtd, $J = 14.2, 5.8, 1.0$ Hz, H-5_{eq}), 1.63 (1H, t, $J = 14.2$ Hz, H-5_{ax}), 1.62 (1H, m, H-7), 1.26 (3H, s, CH₃-10), 0.88 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, CH₃-8), 0.87 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, CH₃-9).

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 132.0 (CH, C-2), 131.0 (CH, C-3), 72.7 (CH, C-6), 70.2 (C, C-1), 37.4 (CH, C-4), 31.4 (CH, C-7), 29.3 (CH₂, C-5), 27.0 (CH₃, C-10), 19.6 (CH₃, C-8), 19.3 (CH₃, C-9).

1-*epi-p*-ment-2-eno-1,6-diol (58)

De las fracciones eluidas con la polaridad diclorometano-metanol (49:1) se obtuvieron 20 mg (1.0% de rendimiento) de una miel cerosa color blanco para el diol **58**.



$$[\alpha]^{20} = \frac{+58}{589} + \frac{+61}{578} + \frac{+69}{546} + \frac{+122}{436} \frac{\text{B.E}}{365} (c\ 0.9, \text{CHCl}_3).$$

IR (CHCl₃) ν_{max} 3600, 2961, 2874 cm⁻¹.

EMIE 70 eV m/z (Int. Rel.) [M-OH]⁺ 153 (0.4), 135 (100), 111 (66), 93 (17) y 43 (8).

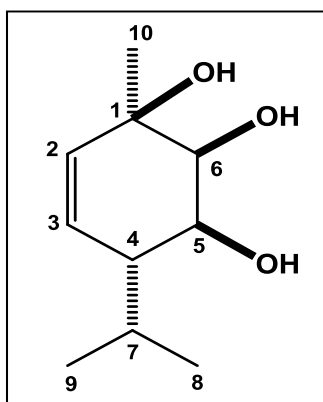
RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 5.71 (1H, dd, $J = 10.0, 3.0$ Hz, H-3), 5.62 (1H, ddd, $J = 10.0, 2.4, 0.8$ Hz, H-2), 3.80 (1H, dd, $J = 7.6, 3.2$ Hz, H-6), 2.14 (1H, ddt, $J = 12.4, 6.8, 3.0$ Hz, H-4), 1.83 (1H, ddd, $J = 13.6, 6.8, 3.2$ Hz, H-5_{eq}), 1.73 (1H, td, $J = 13.6, 7.6$ Hz, H-5_{ax}), 1.70 (1H, sept, $J = 7.0$ Hz,

H-7), 1.30 (3H, s, CH₃-10), 0.93 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, CH₃-8), 0.92 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, CH₃-9).

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 132.1 (CH, C-3), 131.9 (CH, C-2), 73.4 (CH, C-6), 71.0 (C, C-1), 38.4 (CH, C-4), 31.9 (CH, C-7), 28.7 (CH₂, C-5), 23.6 (CH₃, C-10), 19.9 (CH₃, C-8), 19.8 (CH₃, C-9).

***p*-ment-2-eno-1,5,6-triol (59)**

De las fracciones eluidas con la polaridad diclorometano-metanol (24:1) se obtuvieron 40 mg (2% de rendimiento) de una miel amarilla para el triol **59**.



$$[\alpha]^{20} = \frac{+64}{589} + \frac{+66}{578} + \frac{+75}{546} \frac{\text{B.E}}{436} \frac{\text{B.E}}{365} \quad (c\ 0.65, \text{CHCl}_3).$$

IR (CHCl₃) ν_{max} 3416, 2963, 2875, 1625 cm⁻¹.

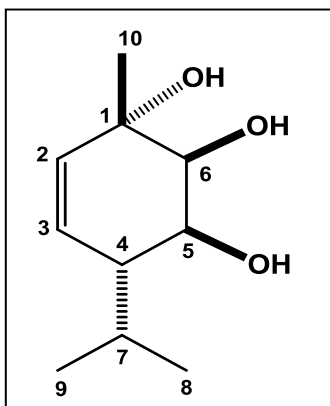
EMIE 70 eV m/z (Int. Rel.) [M]⁺ 186 (3), 169 (100), 152 (3), 135 (30), 93 (35) y 43 (57).

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 5.65 (1H, dd, $J = 10.4, 1.2$ Hz, H-2), 5.62 (1H, dd, $J = 10.4, 2.8$ Hz, H-3), 3.92 (1H, dd, $J = 5.6, 2.4$ Hz, H-5), 3.66 (1H, da, $J = 2.4$ Hz, H-6), 2.19 (1H, m, H-4), 1.83 (1H, septd, $J = 6.8$ y 1.2 Hz, H-7), 1.29 (3H, s, CH₃-10), 1.00 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, CH₃-8), 0.89 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, CH₃-9).

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 132.2 (CH, C-2), 127.2 (CH, C-3), 74.3 (CH, C-6), 71.1 (CH, C-5), 70.6 (C, C-1), 47.8 (CH, C-4), 29.0 (CH, C-7), 26.4 (CH₃, C-10), 21.0 (CH₃, C-8), 19.0 (CH₃, C-9).

1-*epi-p*-ment-2-eno-1,5,6-triol (60)

De las fracciones eluidas con la polaridad diclorometano-metanol (24:1) se obtuvieron 20 mg (1% de rendimiento) de una miel color blanco para el triol **60**.



$$[\alpha]^{20} = \frac{+33}{589} + \frac{+34}{578} + \frac{+38}{546} + \frac{+64}{436} \frac{\text{B.E}}{365} (c 0.31, \text{CHCl}_3).$$

IR (CHCl₃) ν_{max} 3605, 2964, 2875, 1635, 1051 cm⁻¹.

EMIE 70 eV m/z (Int. Rel.) [M-OH]⁺ 169 (13), 152 (2), 135 (23), 111 (100), 93 (32) y 43 (71).

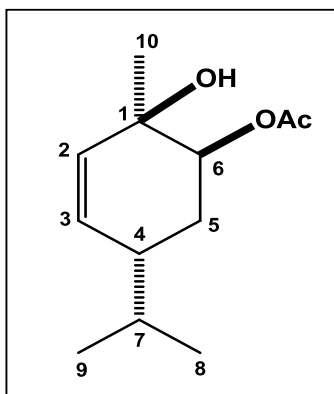
RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 5.68 (1H, dd, $J = 10.1, 2.1$ Hz, H-3), 5.62 (1H, ddd, $J = 10.1, 2.1, 1.3$ Hz, H-2), 3.97 (1H, dd, $J = 8.2, 2.6$ Hz, H-5), 3.73 (1H, dd, $J = 2.6, 1.3$ Hz, H-6), 2.16 (1H, m, H-4), 2.11 (1H, septd, $J = 6.8, 3.3$ Hz, H-7), 1.40 (3H, s, CH₃-10), 1.04 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, CH₃-8), 0.85 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, CH₃-9).

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 130.9 (CH, C-2), 129.4 (CH, C-3), 77.1 (CH, C-6), 71.3 (CH, C-1), 68.4 (CH, C-5), 44.6 (CH, C-4), 27.0 (CH, C-7), 25.5 (CH₃, C-10), 20.8 (CH₃, C-8), 17.6 (CH₃, C-9).

6-acetoxi-1-hidroxi-*p*-ment-2-eno (61)

A una solución de 20 mg del *p*-ment-2-eno-1,6-diol (**57**) en 1 mL de diclorometano, se le adicionaron 1 mL de piridina y 1 mL de anhídrido acético, la mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 4 h. Transcurrido este tiempo se vertió sobre hielo, se extrajo con diclorometano, la fase orgánica se lavó tres veces con ácido clorhídrico al 5%, dos veces con agua, tres con solución saturada de bicarbonato de sodio y dos con agua, se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró en rotavapor, obteniéndose 15 mg del crudo de reacción como una miel verde obscuro. El crudo de reacción fue purificado por cromatografía con gel de sílice y como fase móvil mezclas de

hexano-acetato de etilo (Hex-AcOEt) de la cual se obtuvieron 10 mg (40% de rendimiento) de una miel color verde.

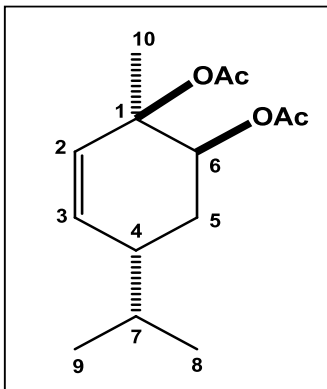


RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 5.67 (1H, ddd, $J = 10.4, 2.8, 1.2$ Hz, H-3), 5.59 (1H, ddd, $J = 10.4, 2.4, 1.2$ Hz, H-2), 4.94 (1H, ddd, $J = 6.4, 2.4, 1.2$ Hz, H-6), 2.10 (3H, s, AcO), 2.10 (1H, m, H-4), 2.02 (1H, tdd, $J = 13.0, 6.0, 1.2$ Hz, H-5_{ax}), 1.64 (1H, m, H-7), 1.58 (1H, ddd, $J = 13.0, 8.8, 2.4$ Hz, H-5_{eq}), 1.29 (3H, s, CH_3 -10), 0.89 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, CH_3 -8), 0.88 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, CH_3 -9).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 170.8 (C, AcO), 131.9 (CH, C-2), 131.2 (CH, C-3), 75.8 (CH, C-6), 69.0 (C, C-1), 38.1 (CH, C-4), 31.4 (CH_2 , C-7), 26.9 (CH_2 , C-5), 21.3 (CH_3 , AcO) 27.0 (CH_3 , C-10), 19.5 (CH_3 , C-8), 19.4 (CH_3 , C-9).

1,6-diacetoxi-*p*-ment-2-eno (62)

A una solución de 20 mg de *p*-ment-2-eno-1,6-diol (**57**) en 1 mL de diclorometano, se le adicionaron 1 mL de piridina y 1 mL de anhídrido acético, la mezcla de reacción se dejó reaccionar por un periodo de 30 min, 80°C, 250 Watts en reactor de microondas (Discovery®). Transcurrido este tiempo la mezcla se vertió sobre hielo y se extrajo con diclorometano. La fase orgánica se lavó tres veces con ácido clorhídrico al 5%, dos veces con agua, tres con solución saturada de bicarbonato de sodio y dos con agua, se secó sobre sulfato de sodio anhidro se filtró; se concentró en rotavapor. Obteniéndose 18 mg del crudo de reacción, el cual fue purificado por cromatografía con gel de sílice y como fase móvil mezclas de Hex-AcOEt de la cual se obtuvieron 7 mg (23% de rendimiento) de una miel color blanco.

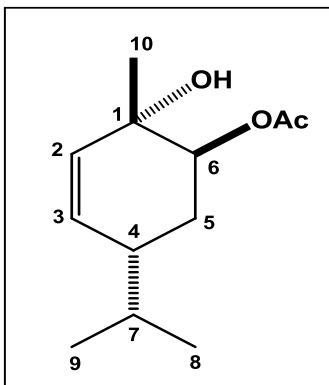


RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 6.01 (1H, ddd, $J = 10.0, 2.4, 0.7$ Hz, H-2), 5.73 (1H, dd, $J = 10.0, 2.8$ Hz, H-3), 5.23 (1H, dd, $J = 8.0, 2.8$ Hz, H-6), 2.16 (1H, m, H-4), 2.10 (3H, s, AcO), 2.03 (1H, m, H-5 $_{ax}$), 2.01 (3H, s, AcO), 1.71 (1H, m, H-7), 1.65 (3H, s, CH_3 -10), 1.64 (1H, m, H-5 $_{eq}$), 0.92 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, CH_3 -8), 0.91 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, CH_3 -9).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 170.5 (C, AcO), 170.1 (C, AcO), 132.5 (CH, C-3), 128.8 (CH, C-2), 78.3 (C, C-1), 73.4 (CH, C-6), 38.8 (CH, C-4), 31.7 (CH, C-7), 25.9 (CH_2 , C-5), 23.3 (CH_3 , C-10), 22.1 (CH_3 , AcO), 21.2 (CH_3 , AcO), 19.7 (CH_3 , C-9), 19.5 (CH_3 , C-8).

6-acetoxy-1-hidroxi-1-epi-p-ment-2-eno (63)

A una solución de 20 mg del 1-epi-p-ment-2-eno-1,6-diol (**58**) en 1 mL de diclorometano, se le adicionaron 1 mL de piridina y 1 mL de anhídrido acético, la mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 4 h. Transcurrido este tiempo se vertió sobre hielo, se extrajo con diclorometano, la fase orgánica se lavó tres veces con ácido clorhídrico al 5%, dos veces con agua, tres con solución saturada de bicarbonato de sodio y dos con agua, se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró en rotavapor, obteniéndose 14 mg del crudo de reacción como una miel verde obscuro. El crudo de reacción fue purificado por cromatografía con gel de sílice y como fase móvil mezclas de Hex-AcOEt de la cual se obtuvieron 8 mg (32% de rendimiento) de una miel color blanco.

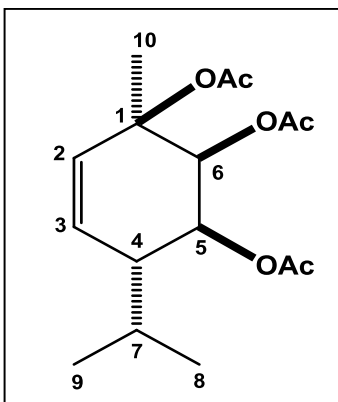


RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 5.74 (1H, dd, $J = 10.2$ y 2.7 Hz, H-2), 5.61 (1H, ddd, $J = 10.2$, 2.3 y 1.0 Hz, H-3), 4.97 (1H, dd, $J = 6.0$, 3.8 Hz, H-6), 2.08 (3H, s, AcO), 2.06 (1H, m, H-4), 1.81 (1H, m, H-7), 1.79 (1H, m, H-5eq), 1.68 (1H, m, H-5ax), 1.27 (3H, s, CH3-10), 0.94 (3H, s, CH3-8), 0.92 (3H, s, CH3-9).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 171.0 (C, AcO), 132.4 (CH, C-2), 131.6 (CH, C-3), 75.6 (CH, C-6), 69.3 (C, C-1), 38.4 (CH, C-4), 31.6 (CH_2 , C-7), 26.4 (CH_2 , C-5), 24.3 (CH_3 , C-10), 21.3 (CH_3 , AcO), 19.8 (CH_3 , C-8), 19.7 (CH_3 , C-9).

1,5,6-triacetoxi-*p*-ment-2-eno (64)

A una solución de 30 mg de *p*-ment-2-eno-1,5,6-triol (**59**) en 1 mL de diclorometano, se le adicionaron 1.5 mL de piridina y 1.5 mL de anhídrido acético. La mezcla de reacción se dejó por un periodo de 45 min, 80°C , 275 Watts en un reactor de microondas. Transcurrido este tiempo la mezcla de reacción se vertió sobre hielo y se extrajo con diclorometano, se lavó dos veces con agua, tres veces con ácido clorhídrico al 5%, dos con agua, tres veces con solución saturada de bicarbonato de sodio y dos lavados con agua, se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró en rotavapor. Obteniéndose 25 mg del crudo de reacción, el cual fue purificado por cromatografía con gel de sílice y como fase móvil mezclas de Hex-AcOEt de la cual se obtuvieron 7 mg (14% de rendimiento) de un sólido color blanco.

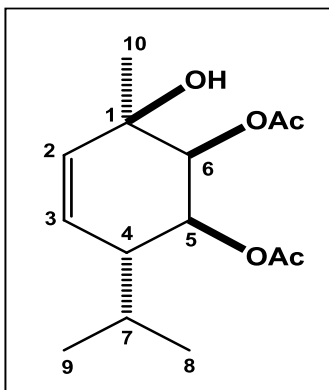


RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 6.04 (1H, ddd, $J = 10.4, 2.5, 1.6$ Hz, H-2), 5.70 (1H, t, $J = 2.0$ Hz, H-6), 5.66 (1H, dd, $J = 10.4, 2.2$ Hz, H-3), 5.08 (1H, dd, $J = 9.6, 2.0$ Hz, H-5), 2.50 (1H, dq, $J = 9.6, 2.9$ Hz, H-4), 2.12 (3H, s, AcO), 2.05 (3H, s, AcO), 1.99 (3H, s, AcO), 1.84 (1H, septd, $J = 6.8, 2.9$ Hz, H-7), 1.71 (3H, s, CH_3 -10), 1.02 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, CH_3 -8), 0.81 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, CH_3 -9).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 170.6 (C, AcO), 170.1 (C, AcO), 169.6 (C, AcO), 129.2 (CH, C-2), 126.9 (CH, C-3), 79.8 (C, C-1), 72.7 (CH, C-6), 69.4 (CH, C-5), 42.0 (CH, C-4), 26.7 (CH, C-7), 24.7 (CH_3 , C-10), 22.0 (CH_3 , AcO), 20.9 (CH_3 , AcO), 20.9 (CH_3 , AcO), 20.3 (CH_3 , C-8), 19.3 (CH_3 , C-9).

5,6-diacetoxi-1-hidroxi-*p*-ment-2-eno (65)

A una solución de 30 mg de *p*-ment-2-eno-1,5,6-triol (**59**) en 1 mL diclorometano, se le adicionaron 1.5 mL de piridina y 1.5 mL de anhídrido acético. La mezcla de reacción se dejó por un periodo de 30 min, 80 °C, 275 Watts, en un reactor de microondas. Transcurrido este tiempo la mezcla se vertió sobre hielo y se extrajo con diclorometano, la fase orgánica se lavó tres veces con ácido clorhídrico al 5%, dos veces con agua, tres veces con solución saturada de bicarbonato de sodio y dos lavados con agua, se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró en rotavapor, obteniéndose 25 mg del crudo de reacción, el cual fue purificado por cromatografía con gel de sílice y como fase móvil mezclas de Hex-AcOEt de la cual se obtuvieron 10 mg (23% de rendimiento) de un sólido color blanco.



$$[\alpha]^{20} = \frac{+113}{589} + \frac{+118}{578} + \frac{+134}{546} + \frac{+234}{436} + \frac{+379}{365} \quad (c\ 0.14, \text{CHCl}_3).$$

Sólido blanco, p.f. 75-80 °C.

IR (CHCl₃) ν_{max} 3584, 2963, 2875, 1743, 1371 cm⁻¹.

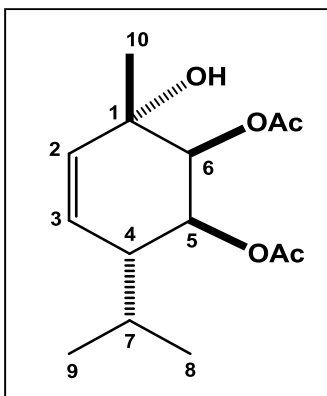
EMIE 70 eV m/z (Int. Rel.) [M-OH]⁺ 253 (2), 193 (15), 151 (69), 135 (30), 107 (100), 93 (1) y 43 (16).

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 5.65 (1H, ddd, $J = 10.4, 2.3, 1.1$ Hz, H-2), 5.59 (1H, dd, $J = 10.4, 2.5$ Hz, H-3), 5.20 (1H, dd, $J = 2.2, 1.1$ Hz, H-6), 5.11 (1H, dd, $J = 8.3, 2.2$ Hz, H-5), 2.38 (1H, dddd, $J = 8.4, 3.6, 2.5, 2.5$ Hz, H-4), 2.15 (3H, s, AcO), 2.05 (3H, s, AcO), 1.80 (1H, septd, $J = 6.8, 3.6$ Hz, H-7), 1.38 (3H, d, $J = 1.0$ Hz CH₃-10), 1.02 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, CH₃-8), 0.83 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, CH₃-9).

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 170.8 (C, AcO), 170.5 (C, AcO) 132.9 (CH, C-2), 126.1 (CH, C-3), 74.8 (CH, C-6), 70.7 (CH, C-5), 70.2 (C, C-1), 43.0 (CH, C-4), 27.5 (CH, C-7), 26.8 (CH₃, C-10), 21.1 (C, AcO), 21.1 (C, AcO), 20.5 (CH₃, C-8), 17.8 (CH₃, C-9).

5,6-diacetoxi-1-hidroxi-1-epi-p-ment-2-eno (66)

A una solución de 30 mg de 1-epi-p-ment-2-eno-1,5,6-triol (**60**) en 1mL diclorometano, se le adicionaron 1.5 mL de piridina y 1.5 mL de anhídrido acético. La mezcla de reacción se dejó en un reactor de microondas por un periodo de 30 min a 80 °C, 275 Watts. Transcurrido este tiempo la mezcla se vertió sobre hielo y se extrajo con diclorometano, la fase orgánica se lavó dos veces con agua, tres veces con ácido clorhídrico al 5%, dos con agua, tres veces con solución saturada de bicarbonato de sodio y dos lavados con agua, se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró en rotavapor, obteniéndose 25 mg del crudo de reacción. El residuo fue purificado por cromatografía en columna con gel de sílice y como fase móvil mezclas de Hex-AcOEt de la cual se obtuvieron 9 mg (20% de rendimiento) de una miel color amarilla.



$$[\alpha]^{20} = \frac{+47}{589} + \frac{+49}{578} + \frac{+56}{546} + \frac{+97}{436} - \frac{B.E}{365} \quad (c \ 1.22, \text{CHCl}_3).$$

IR (CHCl₃) ν_{max} 3594, 2964, 2875, 1734, 1600, 1370 cm⁻¹.

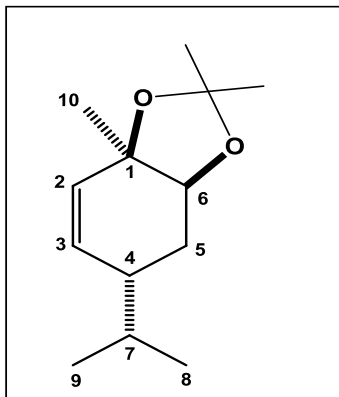
EMIE 70 eV m/z (Int. Rel.) [M-OH]⁺ 253 (1), 193 (10), 151 (77), 135 (28), 107 (100), 93 (5) y 43 (22).

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 5.70 (1H, dd, $J = 10.3, 2.2$ Hz, H-3), 5.63 (1H, ddd, $J = 10.3, 2.2, 1.3$ Hz, H-2), 5.29 (1H, dd, $J = 9.0, 2.5$ Hz, H-5), 5.21 (1H, dd, $J = 2.5, 1.3$ Hz, H-6), 2.36 (1H, m, H-4), 2.09 (3H, s, AcO), 2.02 (3H, s, AcO), 1.84 (1H, septd, $J = 7.0, 3.6$ Hz, H-7), 1.27 (3H, s, CH₃-10), 1.02 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, CH₃-8), 0.82 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, CH₃-9).

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 170.6 (C, AcO), 170.6 (C, AcO) 131.2 (CH, C-2), 128.7 (CH, C-3), 74.7 (CH, C-6), 70.4 (C, C-1), 69.5 (CH, C-5), 42.2 (CH, C-4), 27.0 (CH, C-7), 25.1 (CH₃, C-10), 21.0 (CH₃, AcO), 21.0 (CH₃, AcO), 20.4 (CH₃, C-8), 17.5 (CH₃, C-9).

***p*-ment-2-eno-1,6-acetónido (67)**

A una solución de 20 mg de *p*-ment-2-eno-1,6-diol (**57**) en 2 mL de acetona, se le adicionaron 6 mg de ácido *p*-toluensulfónico la mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente por un periodo de 2 h. Transcurrido este tiempo la mezcla se vertió sobre hielo y se extrajo con diclorometano, la fase orgánica se lavó tres veces con agua destilada, se secó la muestra con Na₂SO₄ anhidro; se filtró, se concentró en rotavapor, obteniéndose 16 mg (65% de rendimiento) del crudo de reacción como una miel color café.

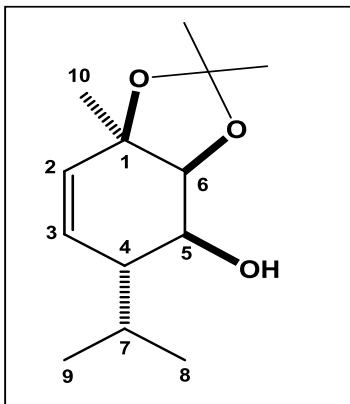


RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 5.58 (1H, ddd, $J = 10.0, 2.0, 2.0$ Hz, H-3), 5.48 (1H, ddd, $J = 10.0, 2.8, 2.0$ Hz, H-2), 4.05 (1H, dt, $J = 3.6, 3.6, 2.0$ Hz, H-6), 2.23 (1H, m, H-4), 2.07 (1H, dddd, $J = 14.0, 5.2, 3.6, 2.0$ Hz, H-5_{eq}), 1.66 (1H, septd, $J = 7.0, 2.0$ Hz, H-7), 1.42 (1H, ddd, $J = 14.0, 11.2, 2.0$ Hz, H-5_{ax}), 1.38 (3H, d, $J = 0.4$ Hz, CH_3 -Acetónido), 1.36 (3H, d, $J = 0.4$ Hz, CH_3 -Acetónido), 1.29 (3H, s, CH_3 -10), 0.90 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, CH_3 -8), 0.88 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, CH_3 -9).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 130.9 (CH, C-2), 130.2 (CH, C-3), 107.3 (C, Acetónido), 78.5 (CH, C-6), 77.4 (C, C-1), 35.6 (CH, C-4), 31.2 (CH, C-7), 27.6 (CH_3 , Acetónido), 27.5 (CH_3 , Acetónido), 26.5 (CH_2 , C-5), 24.8 (CH_3 , C-10), 19.3 (CH_3 , C-8), 18.9 (CH_3 , C-9).

5-hidroxi-*p*-ment-2-eno-1,6-acetónido (68)

A una solución de 25 mg de *p*-ment-2-eno-1,5,6-triol (**59**) en 2 mL de acetona, se adicionaron 8 mg de ácido *p*-toluensulfónico. La mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 2 h. Transcurrido este tiempo la mezcla de reacción se vertió sobre hielo y se extrajo con diclorometano, la fase orgánica se lavó tres veces con agua destilada, posteriormente se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró en rotavapor, obteniéndose 19 mg (62% de rendimiento) de una miel color amarillo.



$$[\alpha]^{20} = \frac{+34}{589} + \frac{+35}{578} + \frac{+38}{546} + \frac{+69}{436} - \frac{B.E}{365} \quad (c\ 0.1, \text{CHCl}_3).$$

IR (CHCl₃) ν_{max} 3585, 2958, 2854, 1098, 1003 cm⁻¹.

EMIE 70 eV m/z (Int. Rel.) [M-OH]⁺ 209 (0.1), 168 (1), 151 (20), 135 (2), 123 (9), 109 (100), 93 (2) y 43 (13).

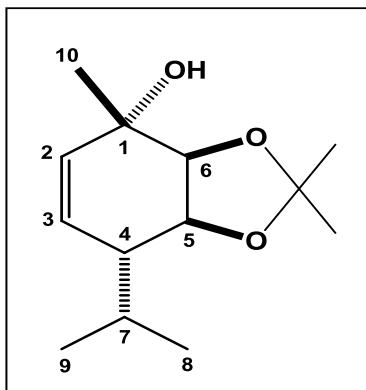
RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 5.51 (1H, dt, $J = 10.4, 2.0$ Hz, H-2), 5.47 (1H, dd, $J = 10.4, 1.2$ Hz, H-3),

4.12 (1H, t, $J = 2.0$ Hz, H-6), 3.60 (1H, dd, $J = 9.6, 2.0$ Hz, H-5), 2.30 (1H, dq, $J = 9.6, 2.0$ Hz, H-4), 2.20 (1H, septd, $J = 6.8, 2.0$ Hz, H-7), 1.41 (3H, s, CH₃-Acetónido), 1.38 (3H, s, CH₃-Acetónido), 1.36 (3H, s, CH₃-10), 1.05 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, CH₃-8), 0.83 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, CH₃-9).

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 131.3 (CH, C-2), 125.0 (CH, C-3), 108.6 (C, Acetónido), 82.4 (CH, C-6), 79.9 (C, C-1), 69.3 (CH, C-5), 43.7 (CH, C-4), 27.6 (CH₃, Acetónido), 27.5 (CH₃, Acetónido), 25.9 (CH, C-7), 24.8 (CH₃, C-10), 20.8 (CH₃, C-8), 17.0 (CH₃, C-9).

1-hidroxi-1-*epi-p*-ment-2-eno-5,6-acetonido (69)

A una solución de 25 mg de 1-*epi-p*-ment-2-eno-1,5,6-triol (**60**) en 2 mL de acetona, se agregaron 8 mg de ácido *p*-toluensulfónico para después ser llevada a reacción por un periodo de 2 h en agitación a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se vertió sobre hielo y se extrajo con diclorometano en un embudo de separación, se realizaron tres lavados con agua destilada, posteriormente se secó la muestra con Na₂SO₄ anhidro; se concentró en rotavapor, obteniéndose 20 mg (65% de rendimiento) de una miel color rojo.



$$[\alpha]^{20} = \frac{+15}{589} + \frac{+16}{578} + \frac{+18}{546} \frac{\text{B.E}}{436} \frac{\text{B.E}}{365} (c 0.29, \text{CHCl}_3).$$

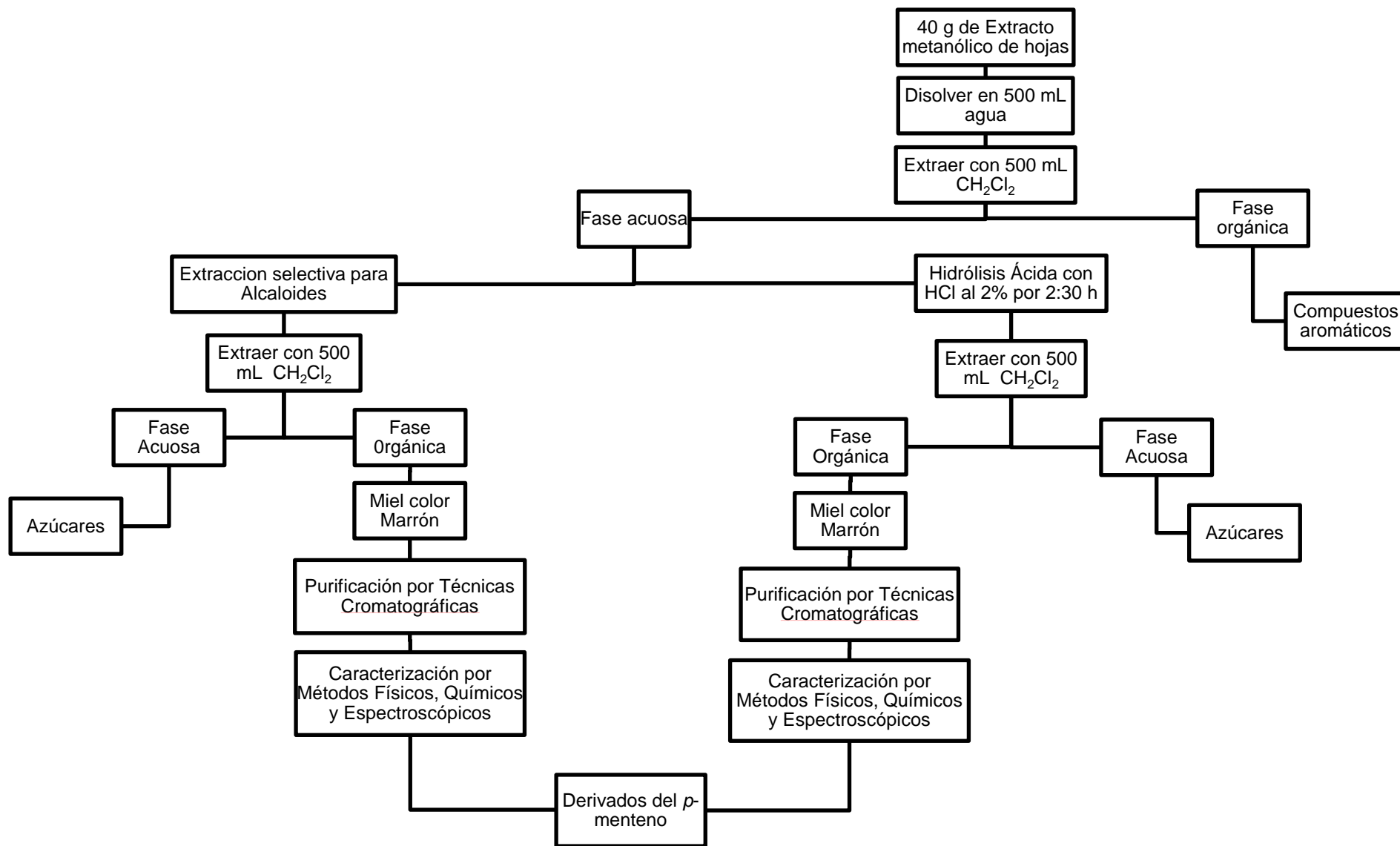
IR (CHCl₃) ν_{max} 3596, 2962, 2876, 1655, 1060 cm⁻¹.

EMIE 70 eV m/z (Int. Rel.) [M-OH]⁺ 209 (10), 169 (2), 151 (25), 135 (8), 107 (100), 93 (20) y 43 (73).

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 5.79 (1H, dd, $J = 10.0, 3.1$ Hz, H-2), 5.56 (1H, dd, $J = 10.0, 2.5$ Hz, H-3), 4.12 (1H, dd, $J = 7.6, 5.6$ Hz, H-5), 4.02 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-6), 2.11 (1H, m, H-4), 1.88 (1H, sept, $J = 6.8$ Hz, H-7), 1.48 (3H, d, $J = 0.6$ Hz, CH₃-Acetónido), 1.37 (3H, d, $J = 0.6$ Hz, CH₃-Acetónido), 1.26 (3H, s, CH₃-10), 0.99 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, CH₃-8), 0.95 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, CH₃-9).

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 134.5 (CH, C-2), 127.4 (CH, C-3), 107.9 (C, Acetónido), 82.0 (CH, C-6), 74.1 (CH, C-5), 71.6 (C, C-1), 44.8 (CH, C-4), 30.3 (CH, C-7), 26.5 (CH₃, Acetónido), 24.7 (CH₃, Acetónido), 23.2 (CH₃, C-10), 19.8 (CH₃, C-8), 18.7 (CH₃, C-9).

8. MARCHA FITOQUÍMICA



9. BIBLIOGRAFÍA

1. García A., Pérez U. Metabolismo secundario de plantas. *Serie fisiología vegetal*. **2009**, 3: 119-145.
2. Anaya L. A., Espinosa F. L. La química que entreteje a los seres vivos. *Ciencias*. **2006**, 83: 4-13.
3. Trejo T. G., Rodríguez Z. M. La agregación celular en la producción de metabolitos secundarios en cultivos vegetales *in vitro*. *Interciencia*. **2007**, 32: 669-674.
4. Martínez M. A. Aceites esenciales. Universidad de Antioquia. Medellín. **2003**, 34.
5. Silvia A. G., González R. H., Casals P. Control de *Sitophilus zeamais* Motschulsky con polvos inertes. *Agrociencia*. **2004**, 38: 529-536.
6. Villaseñor J. L., Los géneros de plantas vasculares de la flora de México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. **2004**, 75: 105-135.
7. Villaseñor J. L. Diversidad y distribución de las Magnoliophyta de México. *Interciencia*. **2003**, 28: 160-167.
8. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Estrategia Mexicana para la Conservación Vegetal, 2012-2030. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. **2012**. México.
9. Katinas L., Gutiérrez D. G., Grossi M. A., Crisci J. V. Panorama de la Familia Asteraceae (= Compositae) en la República Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*. **2007**, 42: 113-129.
10. Villaseñor J. L. La familia Asteraceae en México. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural*. **1993**, 117-124.
11. King R. M., Robinson H. Studies in the Eupatorieae (Compositae) new combinations in *Ageratina*. *Phytologia*. **1970**, 19: 208-229.
12. Rzedowski C. G., Rzedowski J. E. Flora Fanerógamica del Valle de México. Instituto de Ecología A. C. Conocimiento y el uso de la biodiversidad. **2005**. Pátzcuaro, Michoacán.
13. Li Z., Wua M. Z. Jian G. Y., When S. Q. Chemical constituents of Plants from the Genus *Eupatorium*. *Chemistry & Biodiversity*. **2008**, 5: 40-55.

14. Monache G., Monache F., Becerra J., Silva M., Menichini F. thymol derivatives from *Eupatorium glechonophyllum*. *Phytochemistry*. **1984**, 23: 1947.
15. González A.G., Yanes Hernández C., Bermejo Barrera J. Thymol derivates and a chromene from *Ageratina glechonophylla*. *Phytochemistry*. **1992**, 31: 714-716.
16. Torrenegra R., Robles J., Pedrozo J., Pescador B. A New Diglycoside of Diterpene from *Ageratina vacciniaefolia*. *Molecules*. **1999**, 4: M94.
17. Espitia de Pérez C., Villegas Molina E. Flavonoides Glicosídicos de *Ageratina arbutifolia*. *Revista Colombiana de Química*. **1995**, 24: 39-45.
18. Torrenegra C. R., Robles C. J., Pedrozo P. J. Terpenos y Flavonoides de *Ageratina fastigiata* (H.B.K.) King & Robinson. *Revista Colombiana de Química*. **1995**, 24: 9-16.
19. Sanabria-Galindo A., Arciniegas N., Suárez I. Timol y Carvacrol como sustancias responsables de la actividad antimicrobiana de *Ageratina ibaguensis*. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*. **1999**, 281: 83-88.
20. Del Barrio G., Spengler I., García T., Roque A., Álvarez L. A., Calderón J. S., Parra F. Antiviral activity of *Ageratina havanensis* and major chemical compounds from the most active fraction. *Revista Brasileira de farmacognosia*, **2011**, 21: 915-920.
21. Aguilar-Guadarrama B., Navarro V., Leon-Rivera I., Rios M. Y. Active compounds against tinea pedis dermatophytes from *Ageratina pichinchensis* var. *bustamenta*. *Natural Product Research Part A*. **2009**, 16: 1559-1565.
22. León S., Narciso Felix V., Chávez L. F. Estudio preliminar de la actividad antiinflamatoria del extracto etanólico de los tallos de *Ageratina Sternbergiana* (DC.) R.M. King & H. Rob "Zun Zun". *Encuentro Científico Internacional Perú*, **2011**, 2: 245-252.
23. Linding C. R., Galindo V. S., Lara C. S. Vegetation of tepha deposits 50 years after the end of the eruption of the Paricutin volcano, Mexico. *The southwestern naturalist*. **2006**, 51: 455-461.
24. Gómez, R. M., Linding C. R., Galindo S. Effect of tephra deph on vegetation development in áreas affected by volcanism. *Plant Ecology*. **2006**, 183: 207-213.

25. King R. M., Robinson H. Studies in the *Eupatorieae* (Compositae) new combinations in *Ageratina*. *Phytologia*. **1970**, 19: 214.
26. Sánchez-González A., Granados-Sánchez D., Simón-Nabor R. Uso medicinal de las plantas por los otomíes del municipio de Nicolás Flores, Hidalgo, México. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. **2008**, 14: 271-279.
27. García R. A. Geoecología del paisaje vegetal en el occidente de la ciudad de México. *Anales de Geografía de la Universidad Complutense*. **1998**, 18: 115-137.
28. Bohlmann F., Jasmin J., Michael L. UberInhaltsstoffe der Eupatorium-Gruppe, *Chemische Berichte*. **1977**, 110: 301-314.
29. Guerrero C., Silva M., Maldonado E., Martínez M. Ácido eupaglábriico un nuevo compuesto aislado de *Eupatorium glabratum* H.B.K. *Revista Latinoamericana de Química*. **1978**, 9: 71-75.
30. Pardo Novoa J. C. Escrutinio fitoquímico y antimicrobiano de *Eupatorium glabratum* H.B.K. **2010**. Tesis de licenciatura presentada a la Facultad de Químico Farmacobiología de la UMSNH.
31. García P. G., del Río R. E., Guzmán M., Martínez G. I., Thomas R. F. Estudios preliminares sobre el efecto analgésico del extracto de hojas de *Ageratina glabrata* en dos modelos térmicos de dolor agudo. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. **2011**, 42: 45-51.
32. Talavera Alemán A. Componentes minoritarios de *Ageratina glabrata*. **2012**. Tesis de licenciatura presentada a la Facultad de Químico Farmacobiología de la UMSNH.
33. Galeotti N., Mannelli L., Mazzantib G., Bartolini A., Ghelardini C. Menthol: a natural analgesic compound. *Neuroscience Letters*. **2002**, 322: 145-148.
34. Yamamoto T. Method for Purifying (-)-N-Isopulegol and Citrus Perfume Composition Containing (-)-N-Isopulegol Obtained by the Method, *US5773410* (Takasago International Corp.). **1998**.
35. Kenmochi H., Akiyama T., Yuasa Y., Kobayashi T., Tachikawa A. Method for Producing para-Menthane-3, 8-diol, *US5959161* (Takasago International Corp.). **1999**.
36. Shiroyama K., Sawano K., Ohta H. Cool Feeling Composition, *US6328982* (Takasago International Corp.). **2001**.
37. Calixto, J. B., Kassuya C., Andre E., Ferreira J. Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels

- family and their functions. *Pharmacology & Therapeutics*. **2005**, 106: 179–208.
38. Sassa T., Kenmoku H., Sato-Murayama T., Kato N. (+)-Menthol and its hydroxy derivatives, novel fungal monoterpenols from the fusicoccin-producing fungi, *Phomopsis amygdali* F6a and Niigata 2. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. **2003**, 67: 475–479.
39. De Pascual Teresa J., Torres C., González M., Grande M., Bellido I. Δ^5 -Dehydro-1-hydroxycarvomenthols from the essential oil of *Chenopodium multifidum*. *Phytochemistry*. **1983**, 22: 2749–2751.
40. Cao Y., Wei X., Xu H., Tang W. Antifungal properties of methanol extract and its active compounds from *Brickellia rosmarinifolia* Vent. *Fitoterapia* **2010**, 81: 1176–1179.
41. Miyazawa M., Kawazoe H., Hyakumachi M. Biotransformation of *l*-menthol by soil-borne plant pathogenic fungi (*Rhizoctonia solani*). *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. **2001**, 7: 21-24.
42. Miyazawa M., Hideki K., Yuji S., Mitsuro H. Lytic Activity of *l*-Menthol Derivatives against the Snow Blight Disease Fungus, *Micronectriella nivalis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2003**, 51: 1880-1883.
43. Wolf-R. A., Burghard S., Klaus K. Microbial transformations of terpenoids with 1-p-menthene skeleton. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **1986**, 24: 24-30.
44. Pérez-Castorena, A. L., Arciniegas, A., Castro, A., Villaseñor, J. L., Toscano, R. A., Romo de Vivar A. Pyrrolizidine alkaloids from *Senecio roseus* and *Senecio helodes*. *Journal of Natural Products*. **1997**, 60: 1322-1325.
45. Li X. Q., Gao K., Jia Z. J. Eremophilenolides and other constituents from the roots of *Ligularia sagitta*. *Planta Medica*. **2003**, 4: 356–60.
46. Blumann A., Della E. W., Henrick C. A., Hodgkin J., Jefferies P. R. Stereochemistry of Cyclohexane Derivatives. VIII. Structures of Some *p*-Menth-1-ene-3,6-diols. *Australian Journal of Chemistry*. **1962**, 15: 290.