



**UNIVERSIDAD MICHOACANA  
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
QUÍMICO BIOLÓGICAS**

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

**DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL DE DERIVADOS DE  
TIMOL DE *AGERATINA GLABRATA***

**TESIS**

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

**PRESENTA:**

**Q.F.B. HÉCTOR MANUEL ARREAGA GONZÁLEZ**

**DIRECTORES DE TESIS:**

**D.C. Rosa Elva Norma del Río Torres**

**D.Q. Mario Armando Gómez Hurtado**

*Morelia, Michoacán*

*Agosto de 2015*

## **DEDICATORIA**

A mis Padres: Héctor Manuel Arreaga (Don Memo) y María Apolinar González (Doña Polin) por darme la vida, sin ustedes nada de esto sería posible, por apoyarme en cada proyecto emprendido y en cada etapa de mi vida, las palabras y el espacio me son insuficientes para decirles cuanto los quiero y expresarles lo eternamente agradecido que estoy con ustedes por todo lo que dan de sí para su familia, porque ustedes siempre serán mi ejemplo de vida, trabajo, esfuerzo y dedicación. Gracias.

A mis hermanas: Verónica (Patito) y Guadalupe (China) y mi sobrina Ximena porque en cada momento bueno y en los no buenos, sé que siempre puedo contar con su respaldo, por sus palabras de apoyo y todo lo que representan para mí. Gracias.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por permitirme concluir este proyecto, por darme una gran familia que sigue creciendo y por poder compartir con ellos cada logro, cada meta y cada día. Gracias.

A mis asesores de tesis D.C. Rosa Elva Norma del Río Torres y D.Q. Mario Armando Gómez Hurtado por todos sus conocimientos transmitidos a lo largo de este proyecto, por el tiempo dedicado al mismo, por permitirme formar parte de este grupo de trabajo y motivarme con su ejemplo a recorrer el camino de la investigación. Gracias.

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y al Instituto de Investigaciones Químico Biológicas por brindarme la oportunidad de formarme académicamente y los medios necesarios para llevar a cabo este proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca 295638 otorgada para la realización de este proyecto.

A mis sinodales D.C. Yliana López Castro, D.Q. Gabriela Rodríguez García, D.C. Hugo Alejandro García Gutiérrez por el tiempo tomado en la revisión de este documento, así como por sus observaciones y aportaciones durante este proyecto. Gracias.

A los Doctores Pedro Joseph Nathan y Carlos M. Cerda García Rojas del departamento de Química del CINVESTAV por sus aportaciones en la realización de este proyecto, así como a su personal de apoyo: Q.F.B. Verónica Reyes Olivares, Q.F.B. Angelina Hernández Barragán, M.C. Alvina Bucio Vázquez, Q.F.B. Yolanda Mora Pérez, Q.F.B. Elvia Celina Álvarez Cisneros y Q.F.B. Nadia Azucena Pérez Rojas por las determinaciones espectroscópicas. Gracias.

A la M.C. Concepción Armenta Salinas y al Q.F.B. José Manuel Zaragoza Ríos por la obtención de los espectros de Resonancia Magnética Nuclear. Gracias.

Al M.C. Julio Cesar Pardo Novoa por tu amistad incondicional a lo largo de este y pasados proyectos, por tus aportaciones académicas y personales. Gracias.

Al M.C. Armando Talavera Alemán por el apoyo durante este proyecto. Gracias.

A mis compañeros y amigos del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas Juanca, May, Techy, Toño Rodríguez, Chava, Fercho Bedolla, Gali, Yessy, Karen, Emma, Toño Ferreira, Yuni, Angy, Lucero, Jorge, Saúl, por los muy buenos momentos y el tiempo compartido. Gracias.

A Moni Luna por permitirme ser parte de tu estudio químico, por cambiar mi tiempo y espacio, por tu cariño y todos los buenos momentos compartidos. Gracias.

Un agradecimiento especial a aquellos jóvenes estudiantes que realizaron estancias o servicio social en este instituto: discúlpenme por tantos viales sucios, solo espero poder haber transmitido el gusto por el trabajo en este campo de investigación. Gracias.

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Química de Productos Naturales del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo bajo la asesoría de la Doctora Rosa Elva Norma del Río Torres y del Doctor Mario Armando Gómez Hurtado. Con apoyo económico de los proyectos **CIC-UMSNH**.

# ÍNDICE

SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS.....	vi
RESUMEN .....	viii
ABSTRACT .....	ix
1 INTRODUCCIÓN.....	1
2 ANTECEDENTES .....	3
2.1 LA FAMILIA ASTERACEAE .....	3
2.2 GÉNERO <i>AGERATINA</i> .....	3
2.3 <i>AGERATINA GLABRATA</i> .....	8
2.4 ESTUDIOS QUÍMICOS DE <i>AGERATINA GLABRATA</i> .....	9
3 JUSTIFICACIÓN .....	13
4 OBJETIVOS.....	14
4.1 OBJETIVO GENERAL .....	14
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	14
5 METODOLOGÍA.....	15
6 DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	16
7 CONCLUSIONES.....	73
8 PARTE EXPERIMENTAL.....	75
8.1 GENERALIDADES.....	75
8.2 MATERIA VEGETAL.....	76
8.3 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS .....	76
8.4 ANÁLISIS QUÍMICO .....	76
9 BIBLIOGRAFÍA .....	80

## SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

$\delta$	Desplazamiento químico
$[\alpha]$	Rotación específica
$\lambda_{\text{máx}}$	Lambda máxima
$\mu\text{g}$	Microgramo
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{M}$	Micromolar
AB	Sistema AB
AcOEt	Acetato de etilo
CE <sub>50</sub>	Concentración efectiva
COSY	COrrrelation SpectroscopY
cm	Centímetros
d	Doble
dd	Doble de dobles
ddd	Doble de dobles de dobles
DMSO	Dimetilsulfóxido
Et <sub>2</sub> O	Éter etílico
g	Gramos
<i>gem</i>	Geminal
HETCOR	Heteronuclear Correlation Spectroscopy
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
Hz	Hertz
IR	Infrarrojo

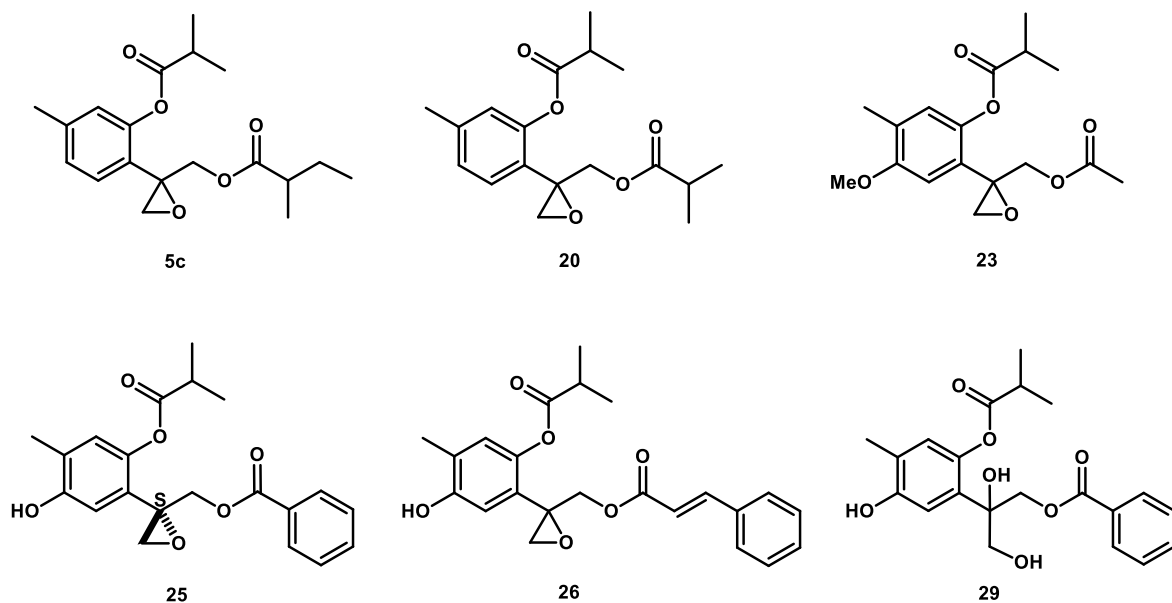
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
kg	Kilogramos
km	Kilómetro
MeOH	Metanol
mg	Miligramo
MHz	Megahertz
mL	Mililitro
m	Múltiple
min	Minutos
mm	Milímetros
mM	Milimolar
nm	Nanómetros
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
ppm	Partes por millón
$R_F$	Factor de retardo
RMN de 1D	Resonancia Magnética Nuclear de una dimensión
RMN de 2D	Resonancia Magnética Nuclear de dos dimensiones
RMN de $^1\text{H}$	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
RMN de $^{13}\text{C}$	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono
s	simple
sept	séptuple
t	triple
TMS	Tetrametilsilano
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
tt	Triple de triples



## RESUMEN

En el presente trabajo se realizó una reinvestigación del estudio químico de *Ageratina glabrata* para determinar la asignación estructural de los epoxitimoles que previamente habían sido reportados con algunas inconsistencias en su caracterización, así como establecer la configuración absoluta del centro estereogénico.

De las partes aéreas de *Ageratina glabrata* se aislaron por cromatografía en columna seis derivados de timol, con base en sus datos de RMN de 1D y 2D, IR, UV, rotación específica y difracción de rayos X, se determinaron sus estructuras: isobutirato de 10-(2-metilbutiriloxi)-8,9-epoxitimilo (**5c**) isobutirato de 10-isobutiriloxi-8,9-epoxitimilo (**20**), isobutirato de 10-acetoxi-6-metoxi-8,9-epoxitimilo (**23**), isobutirato de 10-cinamoiloxi-6-hidroxi-8,9-epoxitimilo (**26**), isobutirato de 10-benzoiloxi-6,8,9-trihidroxitimilo (**29**), y (+)-(8*S*)-isobutirato de 10-benzoiloxi-8,9-epoxi-6-hidroxitimilo (**25**), de este último se determinó su configuración absoluta por difracción de rayos X, mediante los parámetros de Flack y Hoofit.

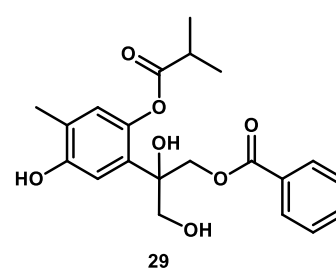
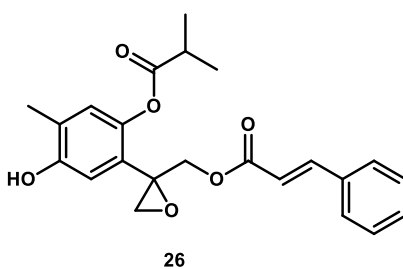
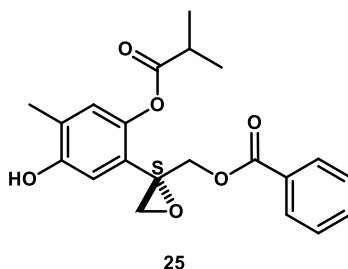
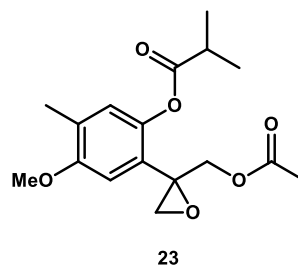
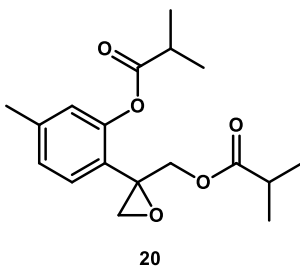
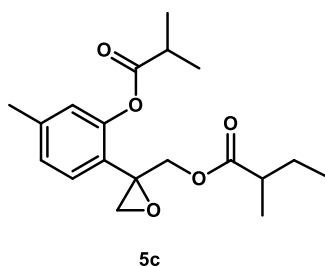


Palabras clave: *Ageratina glabrata*, epoxitimoles, configuración absoluta.

## ABSTRACT

The present work describes the reinvestigation of the chemical study of *Ageratina glabrata* in order to structural assignments to determine the stereostructures of epoxythymol derivatives previously reported with some structural inconsistencies, as well as to establish the absolute configuration of the stereogenic center.

from the aerial parts of *Ageratina glabrata* were isolated six thymol derivatives by column chromatography, their structures were determined on the basis of NMR 1D and 2D data, IR, UV, specific rotation and X-ray diffraction,,: 10-(2-methylbutyryloxy)-8,9-epoxythymol isobutyrate (**5c**), 10-isobutyryloxy-8,9-epoxythymol isobutyrate (**20**), 10-acetoxy-6-methoxy-8,9-epoxythymol isobutyrate (**23**), 10-cinnamoyloxy-6-hydroxy-8,9-epoxythymol isobutyrate (**26**), 9-benzoyloxy-6,8,10-trihydroxythymol isobutyrate (**29**), and (+)-(8*S*)-10-benzoyloxy-6-hydroxy-8,9-epoxythymol isobutyrate (**25**), the absolute configuration of **25** was determined by X-ray diffraction analysis by means of Flack and Hooft parameters.



Key words: *Ageratina glabrata*, epoxythymols, absolute configuration

# 1 INTRODUCCIÓN

Planta medicinal se le denomina a toda aquella que contenga en algunos de sus órganos principios activos, capaces de producir efectos curativos contra las enfermedades de los hombres y los animales en general. Se calcula que de las 260,000 especies de plantas que se conocen en la actualidad, el 10% son medicinales, es decir, se encuentran compiladas dentro de los tratados médicos de fitoterapia modernos y de épocas pasadas. El estudio de los componentes químicos de las plantas medicinales se centra en las sustancias que ejercen una acción farmacológica sobre el ser humano y los seres vivos; donde los principios activos de las plantas pueden ser sustancias puras o mezclas (Cozme, 2008).

El interés por el uso, el estudio y la descripción de la flora medicinal mexicana ha sido constante a lo largo de la historia de nuestro País. Antes de la llegada de los españoles a territorio mexicano, existía un gran conocimiento y uso de las plantas. Para la cultura azteca el mundo vegetal constituía una fuente importante de elementos que satisfacían sus actividades y creencias, como la alimentación, religión, medicina entre otros. La sabiduría e interés por el mundo vegetal se dejaba ver en la magnitud y variedad de sus jardines botánicos donde se podía encontrar un amplio número de plantas útiles para curar diferentes enfermedades (Zepeda & White, 2008).

Plasmado en el código De la Cruz Badiano se encuentra una amplia descripción del uso de las plantas antes y durante la conquista de México, usos que van desde analgésicos contra cefalea hasta curaciones del estado de ánimo. El código incluye también la descripción detallada de las plantas, su modo de preparación y su forma de uso (*Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis*, 1964).

Junto con Brasil, Colombia e Indonesia, México ocupa los primeros lugares en las listas de diversidad biológica que se han elaborado en el mundo, por lo cual nuestro País es considerado megadiverso, cuyo concepto se aplica a aquellos países que contienen un alto porcentaje de la biodiversidad del planeta. La ubicación geográfica, distribución orográfica y el hecho de que se extiende dentro de las regiones biogeográficas neártica y neotropical le han dado a México este

título. Aquí se alberga del 10 al 12% de las especies descritas en el mundo, lo cual equivale a entre 180,000 y 216,000, presentando también un alto grado de endemismo (Beltrán *et al*, 2011). En México, la familia Asteraceae está representada por especies de la tribu Heliantheae, seguidas por Astereae y Eupatorieae (Villareal *et al*, 2006), dentro de esta última tribu, se pueden encontrar una gran cantidad de especies endémicas de México siendo las más numerosas las pertenecientes a los géneros *Ageratina*, *Stevia* y *Verbesina* (Suarez-Mota & Villaseñor, 2011).

En el presente trabajo se llevó a cabo el estudio de la determinación estructural de derivados de epoxitimol de *Ageratina glabrata*.

## 2 ANTECEDENTES

### 2.1 LA FAMILIA ASTERACEAE

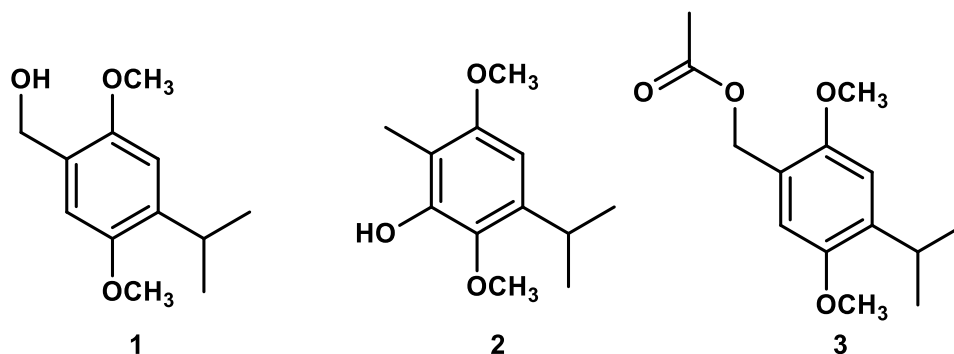
La familia de las asteráceas representa a la mayoría de las plantas con flor conocidas, ya que presentan una gran capacidad de adaptación, por lo que se les puede encontrar en casi todas las zonas altitudinales en gran parte del mundo, esta capacidad de adaptación también las ha hecho prosperar en lugares donde el hombre ha causado degradación del ecosistema, incluso son consideradas en algunos casos como una amenaza para los cultivos, malezas o plantas invasoras en ciertas regiones (Redonda & Villaseñor, 2011). Pueden presentar una gran variedad de formas y tamaños que van desde pequeñas plantas herbáceas, arbustos hasta árboles, pero la disposición de su inflorescencia las hace inconfundibles debido a la forma de sus flores que asemejan la forma de una estrella (*aster* = estrella), presentan una serie de flores estériles o unisexuales llamadas zigomorfos, las cuales sirven de protección a las decenas e incluso cientos de pequeñas flores que están insertadas en la base carnosa del centro (Tapia, 2010). Algunas han sido domesticadas y cultivadas desde la antigüedad y otras conforman vastas extensiones de vegetación natural; unos 40 géneros de asteráceas son relevantes en la alimentación humana y animal, fuentes de aceites fijos, aceites esenciales, forraje, miel, polen, especias y colorantes. (Del Vitto & Petenatti, 2009).

### 2.2 GÉNERO *AGERATINA*

Las plantas incluidas en el género *Ageratina* van desde hierbas hasta árboles que tienen hojas simples, generalmente opuestas, de márgenes enteros o dentados, y superficies con o sin pelos; las inflorescencias son terminales y generalmente tienen flores de blanco a lila. Se distribuyen en todos los continentes, excepto en Oceanía; en el continente Americano pueden encontrarse desde el norte hasta el sur, incluyendo el Caribe (King & Robinson, 1970); y es posiblemente el género más distribuido de la familia Asteraceae en México, el

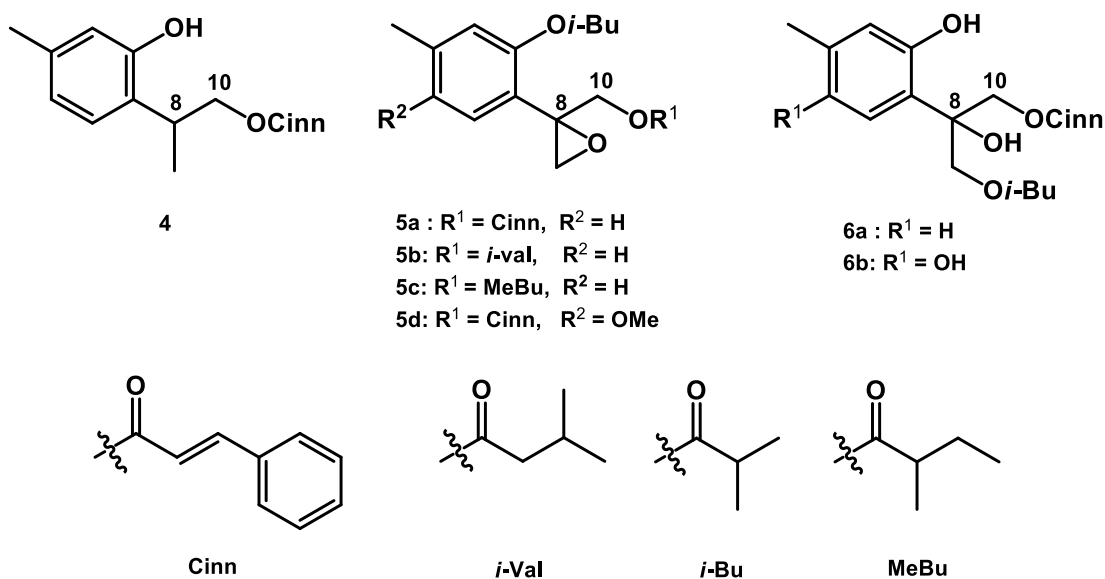
cual posee 149 especies. Las últimas especies registradas del género *Ageratina* en México se localizaron en el Estado de Oaxaca: *A. hasegawana*, *A. huahuapana*, *A. megacephala* y *A. ozolotepecana* (Turner, 2010).

Derivados de timol se encuentran frecuentemente en el género *Ageratina*, así podemos encontrar que Bohlmann *et al*, en 1977 reportaron tres derivados de timol de la raíz de *Ageratina espinosara* (Figura 1).



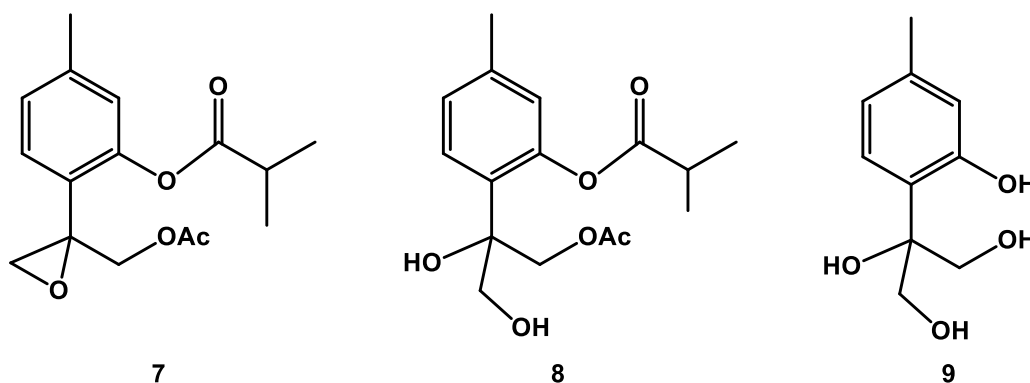
**Figura 1.** Derivados de timol aislados de *A. espinosara*.

De las partes aéreas de *A. anisochroma* aislaron siete derivados de timol, como se puede observar en la figura 2 estos derivados poseen un centro quiral en el C-8 y se encuentran esterificados en el C-10 (Tamayo-Castillo *et al*, 1988).



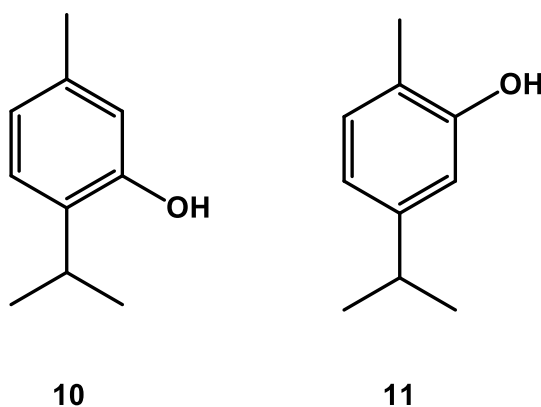
**Figura 2.** Derivados de timol de *A. anisochroma*.

Del extracto etanólico de tallos de *Ageratina glechonophylla* aislaron los derivados de timol **7-9** (Delle Monache *et al*, 1984), los autores sugirieron que el derivado **8** podría ser un artefacto de **7** producto de la apertura del epóxido presente en su estructura (Figura 3).



**Figura 3.** Derivados de timol de *A. glechonophylla*.

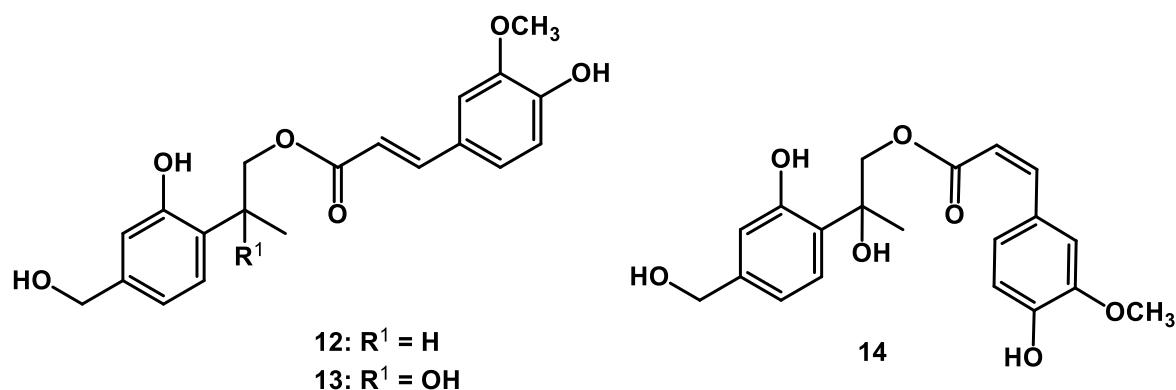
Del extracto etanólico de *Ageratina ibanguensis* aislaron al timol (**10**) y carvacrol (**11**) (Figura 4); los cuales fueron probados contra bacterias Gram positivas, Gram negativas, hongos filamentosos y levaduras, demostrando que estos compuestos son los responsables de la actividad antimicrobiana en los extractos de hojas y flor (Sanabria *et al*, 1999).



**Figura 4.** Timol y carvacrol.

Se sabe que el timol (**10**) es un antioxidante de origen vegetal incluido en el grupo de los denominados aceites esenciales, se encuentra de forma natural en muchas plantas sobre todo en la familia de las labiadas: albahaca, tomillo, salvia, orégano, ajedrea, menta, melisa (Carmona *et al*, 2002). Las aplicaciones de los derivados del timol son variadas ya que presentan actividad antitumoral (Zee *et al*, 2001), anti-inflamatoria (Chen *et al*, 2011), así como propiedades antibacterianas (Liang *et al*, 2007) e insecticidas (Karpouhtsis *et al*, 1998).

De *Ageratina adenophora* aislaron tres derivados de timol **12-14** los cuales presentaron actividad biológica, afectando la germinación y el crecimiento de *Arabidopsis thaliana* (Zhou *et al*, 2013) (Figura 5).



**Figura 5.** Derivados de timol aislados de *Ageratina adenophora*.

Derivados de timol que contienen una función epóxido en el C-8 han sido aislados de *Piptotrix areolare*, *Eupatorium fortunei*, *Ageratina cylindrica* y *Gaillardia aristata* (Figura 6), los valores reportados para las mediciones de rotación específica resultaron interesantes, ya que poseen solo un centro estereogénico en la posición base de epóxido y sus diferencias radican en sus sustituyentes, se consideró que el compuesto **15** existe en mezcla racémica dado que la rotación específica fue de 0 (Hernández *et al*, 1986), mientras que para **16** y **17** (Tori *et al*, 2001), **19** y **20** (Bolhmann *et al*, 1969) reportaron valores negativos, la medición para **18** (Brito-Bustos *et al*, 2014) arrojó un valor positivo. En la tabla 1 se resumen los valores de rotación específica de los compuestos mencionados anteriormente.

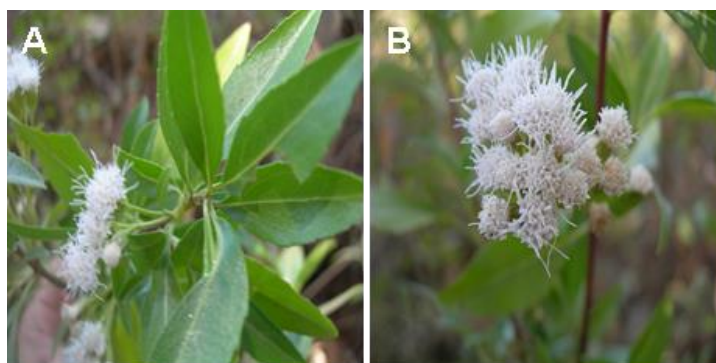




## 2.3 AGERATINA GLABRATA

Es un arbusto de hasta 2.5 m de altura; tallos leñosos, cilíndricos, de 2 a 3 mm de diámetro hacia la parte superior, estriados, amarillentos, glabros, a veces algo resinoso-lustrosos; hojas opuestas, peciolo de 0.5 a 2 cm de largo, glabro, lámina oblonga, de 1.5 a 8 cm de largo por 0.5 a 4 cm de ancho, ápice agudo u obtuso, borde aserrado o subentero, base cuneada, haz y envés glabros y glanduloso-punteado, frecuentemente resinoso-lustroso, a veces algo blanquecino, uninerve desde la base, membranácea o algo subcoriácea; numerosos capítulos de 7 a 15 mm de largo dispuestos en corimbos compuestos terminales, pedicelos glabros, resinoso-lustrosos; involucro campanulado, de 5 mm de largo por 4 mm de ancho, cubriendo menos de la mitad del largo de las corolas, sus brácteas dispuestas en 3 series algo desiguales, oblongas u ovado-lanceoladas, agudas u obtusas, verdes, a veces algo oscuras o con tinte rojizo en el ápice, glabras, estriadas y algo resinoso-lustrosas; flores de 15 a 18; corola de 7 mm de largo, blanca, a veces con tinte rosado en los lóbulos, glabra; aquenio de 3 mm de largo, algo piloso especialmente hacia el ápice, vilano casi del largo de la corola, cerdas blancas (Calderón de Rzedowski & Rzedowski, 2005).

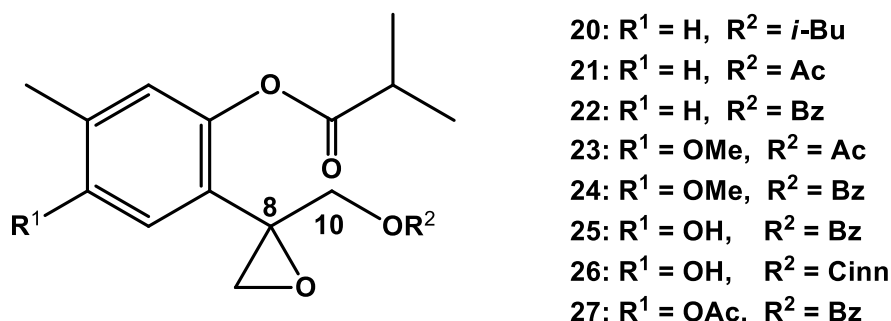
En la medicina tradicional *Ageratina glabrata* (Figura 7) es conocida como “Chamizo blanco”, “Hierba del golpe” y/o “Hierba de la mula” (Sánchez-González & Granados-Sánchez, 2008), se utiliza como analgésico para el tratamiento de golpes y fracturas (Bello & Salgado, 2007).



**Figura 7.** *Ageratina glabrata*; A) Hojas B) Flores.

## 2.4 ESTUDIOS QUÍMICOS DE *AGERATINA GLABRATA*

En 1977, Bohlmann *et al*, aislaron de los extractos de éter de petróleo de las partes aéreas y raíces de *Ageratina glabrata* ocho derivados de timol con un grupo epóxido en el C-8 (Figura 8), la elucidación estructural la establecieron únicamente con base en los datos de RMN de  $^1\text{H}$  (Tabla 2). Seis de estos derivados correspondieron a estructuras nuevas, mientras que el compuesto **21** lo reportaron por primera vez de *Wedelia forsteriana* (Bohlmann *et al*, 1976) y el derivado **22** se encontró en las raíces de *Helenium mexicanum* (Bohlmann & Zdero, 1969).



**Figura 8.** Derivados de timol aislados de *Ageratina glabrata*.

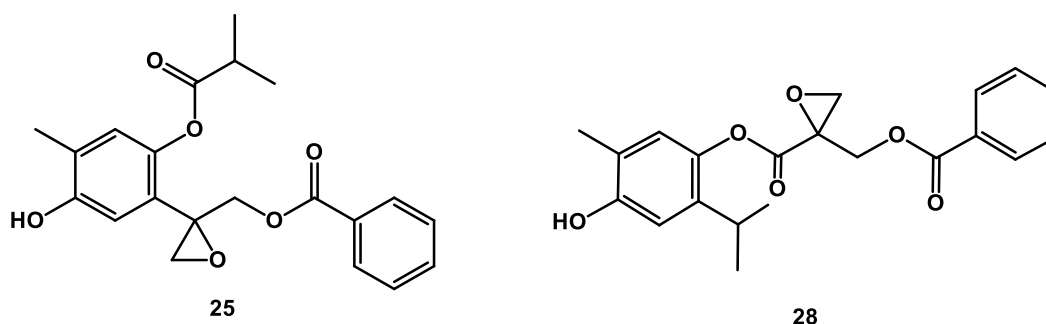
Realizando un análisis de los desplazamientos químicos reportados para **22-27**, se observó que los protones H-9a y H-9b de los derivados **23**, **24** y **25** se asignaron a señales con desplazamientos de 5.08 a 5.33 ppm; considerando que estas estructuras presentan en esas posiciones protones base de epóxido que normalmente se encuentran entre 2.00 y 3.00 ppm, estos datos de RMN de  $^1\text{H}$  no corresponden a esas estructuras y deben ser revisadas.

**Tabla 2.** Datos de RMN de  $^1\text{H}$  de epoxitimoles **22-27**.

	<b>22</b>	<b>23</b>	<b>24</b>	<b>25</b>	<b>26</b>	<b>27</b>
2-H	6.79 (d)	6.75 (d)	6.75 (d)	6.65 (s)	6.70 (sa)	6.73 (sa)
5-H	7.35 (d)	7.10 (d)	7.10 (d)	6.56 (s)	6.83 (s)	s 6.90 (s)
6-H	6.97 (dd)	-	-	-	-	-
7-H	2.34 (s)	2.34 (s)	2.34 (s)	2.13 (s)	2.18 (s)	2.18 (s)
9-H	2.68 (d)	5.27* (sa)	5.27* (sa)	5.33* (sa)	2.67 (d)	2.71 (d)
9'-H	2.97 (d)	5.08* (sa)	5.08* (sa)	5.12* (sa)	2.88 (d)	2.99 (d)
10-H	4.45 (d)	4.71* (sa)	4.71* (sa)	4.90* (sa)	4.18 (d)	4.48 (d)
10'-H	4.62 (d)	4.71*(sa)	4.71* (sa)	4.90* (sa)	4.30 (d)	4.65 (d)
RCO	7.94 (dd)	1.10 (d)	1.08 (d)	7.98 (dd)	1.96* (s)	7.97 (dd)
	7.40 (m)	2.30 (m)	0.84 (t)	7.40 (m)	1.96* (s)	7.42 (m)
			1.56 (m)			
			2.28 (m)			
OCH <sub>3</sub>	-	3.82 (s)	3.82 (s)	-	-	-

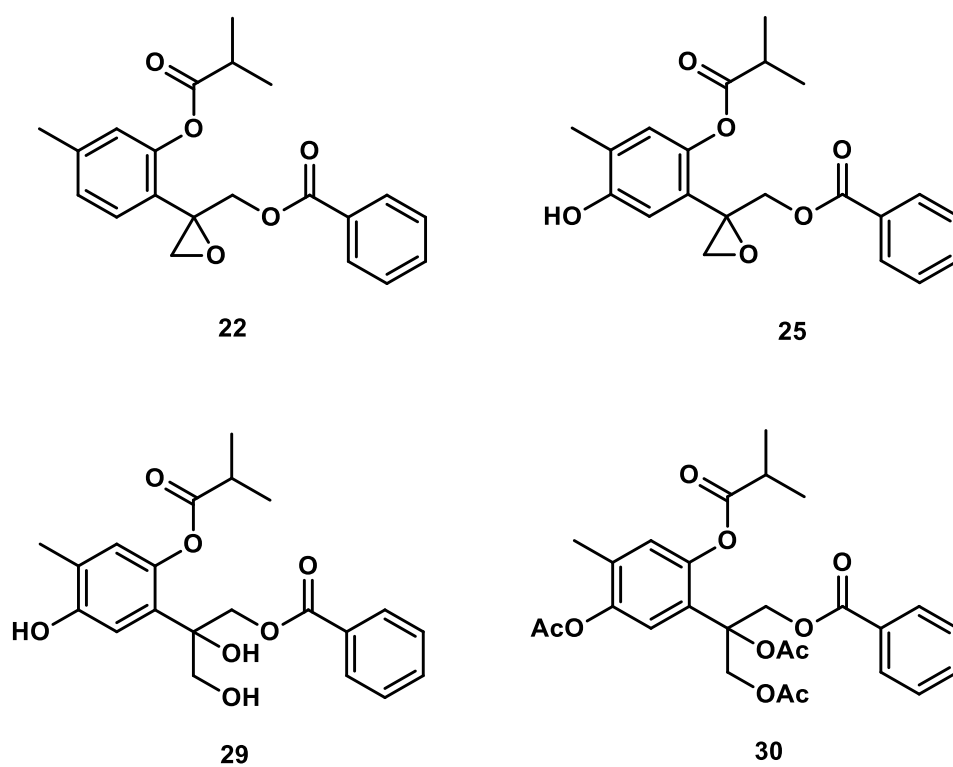
\*Datos que no corresponden a los desplazamientos típicos para este tipo de grupos funcionales.

En otro estudio químico de *A. glabrata* realizado por Romo de Vivar *et al* 1971, reportaron del extracto etanólico de la planta completa un derivado de timol al que denominaron eupaglabrina (**28**), cuya estructura también fue establecida solamente con base en los desplazamientos de RMN de  $^1\text{H}$ . Realizando una comparación entre el derivado **28** reportado por Romo de Vivar y el derivado **25** reportado por Bohlmann en 1977, es evidente que la conectividad de las mismas es diferente y en ambos reportes estos compuestos son considerados el componente mayoritario (Figura 9).



**Figura 9.** Derivados de timol **25** y **28** reportados de *A. glabrata*.

En nuestro grupo de trabajo se han llevado a cabo estudios farmacológicos preliminares en *A. glabrata*, encontrando capacidad analgésica de los extractos de cloruro de metileno (García *et al*, 2011) y microbicida del extracto metanólico de la hojas (Pardo, 2011), comprobando dichos efectos según su aplicación etnofarmacológica. De los estudios químicos se han aislado del extracto de cloruro de metileno de las hojas de *A. glabrata* los derivados de timol **22** y **25** (Talavera, 2012); y del extracto metanólico de hojas se aisló al derivado de timol **29** (Pardo, 2011), cuyo derivado *per*-acetilado **30** se obtuvo al tratar dicho extracto con anhídrido acético y piridina (Arreaga, 2013) (Figura 10).



**Figura 10.** Compuestos aislados de hojas de *A. glabrata*.

De estos derivados de timol aislados de *A. glabrata*, a la fecha, no ha sido determinada su configuración absoluta.

### 3 JUSTIFICACIÓN

Las estructuras de derivados de timol descritas de *Ageratina glabrata* se establecieron únicamente por RMN de  $^1\text{H}$  y fueron detectadas algunas discrepancias, por lo que es necesario realizar una reinvestigación en cuanto al estudio químico para determinar la asignación posicional de los ésteres presentes en los derivados de timol y establecer la configuración absoluta del centro estereogénico.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la asignación posicional y la configuración absoluta de los derivados de timol presentes en *Ageratina glabrata*.

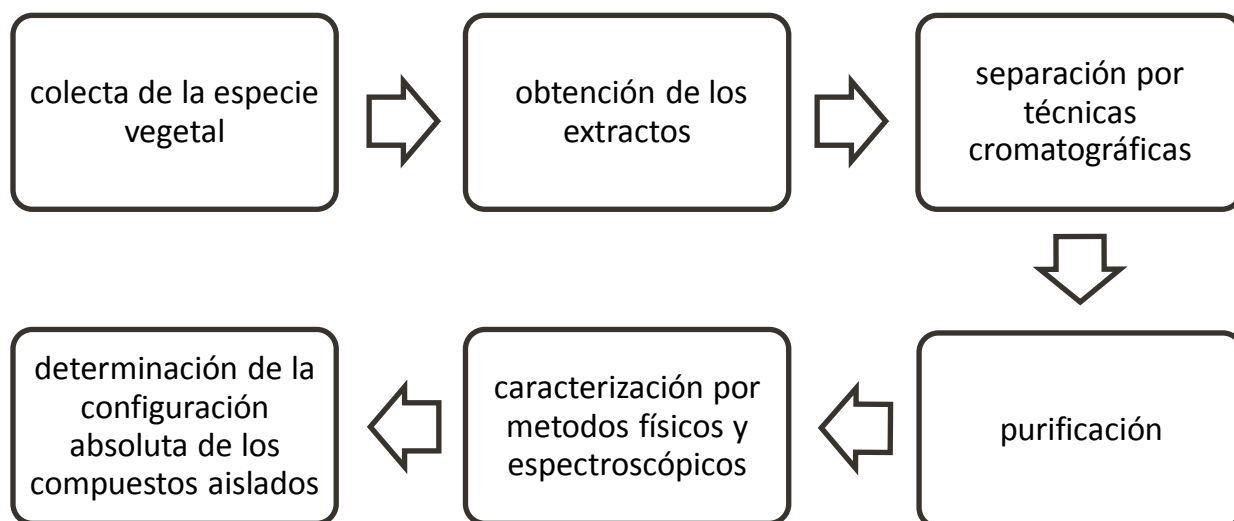
### 4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Obtener los extractos de hexanos, cloruro de metileno, acetato de etilo y metanol de cada una de las partes de la planta.
2. Aislar mediante técnicas cromatográficas derivados de timol.
3. Determinar las estructuras mediante métodos físicos y espectroscópicos.
4. Determinar la configuración absoluta de los derivados de timol.



## 5 METODOLOGÍA

La metodología se resume en el esquema 1.



**Esquema 1.** Diagrama de la metodología empleada.

## 6 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Para iniciar la búsqueda y caracterización de los derivados de timol de *Ageratina glabrata*, se realizaron cuatro colectas de la planta cerca de las localidades de Pátzcuaro, Cuanajo, San José la Cumbre (Mil Cumbres) y Quiroga. La planta se separó en sus diferentes partes: raíz, hoja, tallo y flor, se secó a la sombra por dos semanas. Transcurrido este tiempo, cada una de las partes se maceraron a temperatura ambiente de manera secuencial con hexanos, cloruro de metileno, acetato de etilo y metanol (Tabla 3).

**Tabla 3.** Rendimientos de los extractos de *A. glabrata*.

COLECTA					
Parte de la planta	Disolvente	Pátzcuaro	Quiroga	Mil Cumbres	Cuanajo
<b>Peso</b>			435 g		
<b>Raíz</b>	Hexanos	-	2 g	-	-
	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	-	1 g	-	-
	MeOH	-	16 g	-	-
<b>Peso</b>		500 g		100 g	215 g
<b>Hoja</b>	Hexanos	36 g	-	4 g	18 g
	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	44 g	-	6 g	5 g
	AcOEt	11 g	-	2 g	-
	MeOH	53 g	-	-	-
<b>Peso</b>		100 g	470 g	100 g	365 g
<b>Tallo</b>	Hexanos	2 g	13 g	1 g	13 g
	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1 g	6 g	3 g	8 g
	AcOEt	1 g	3 g	1 g	-
	MeOH	3 g	38 g	1 g	-
<b>Peso</b>			460 g		230 g
<b>Flor</b>	Hexanos	-	16 g	-	18 g
	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	-	-	-	5 g
	AcOEt	-	35 g	-	-
	MeOH	-	83 g	-	39 g

Los extractos totales se analizaron preliminarmente por RMN de <sup>1</sup>H con la finalidad de identificar señales características de derivados de epoxitimol. En las siguientes figuras se muestra de manera representativa los espectros de

RMN de  $^1\text{H}$  de aquellos extractos (Figuras 11-16) que mostraron señales características de derivados de timol con una funcionalización de epóxido, entre 8.00 y 6.50 ppm se observaron señales de protones aromáticos, entre 4.80 y 4.40 ppm aparecieron señales que correspondieron a los protones base de oxígeno del sistema AB de la posición 10. Entre 3.80 y 3.20 ppm se observaron dos señales dobles pertenecientes a los protones base de epóxido de la posición 9. Como se observó que los derivados de timol se encuentran como componentes mayoritarios en los extractos totales de cloruro de metileno de hojas de Cuanajo (Figura 11), hexánico de tallos (Figura 12) y flores (Figura 13) de Cuanajo, hexánico de tallos de Quiroga (Figura 14), hexánico de tallos (Figura 15) y de diclorometano de hojas de Pátzcuaro (Figura 16). De igual manera en base al análisis de los datos de RMN de  $^1\text{H}$  obtenidos se pudo notar que las colectas que se encuentran en una región geográfica cercana como lo son Pátzcuaro, Quiroga y Cuanajo presentaron señales de epoxitimoles, comparados con los obtenidos de la colecta de Mil Cumbres, que mostraron señales de baja intensidad en la región de los protones base de epóxido esperadas para los timoles (Figura 17).

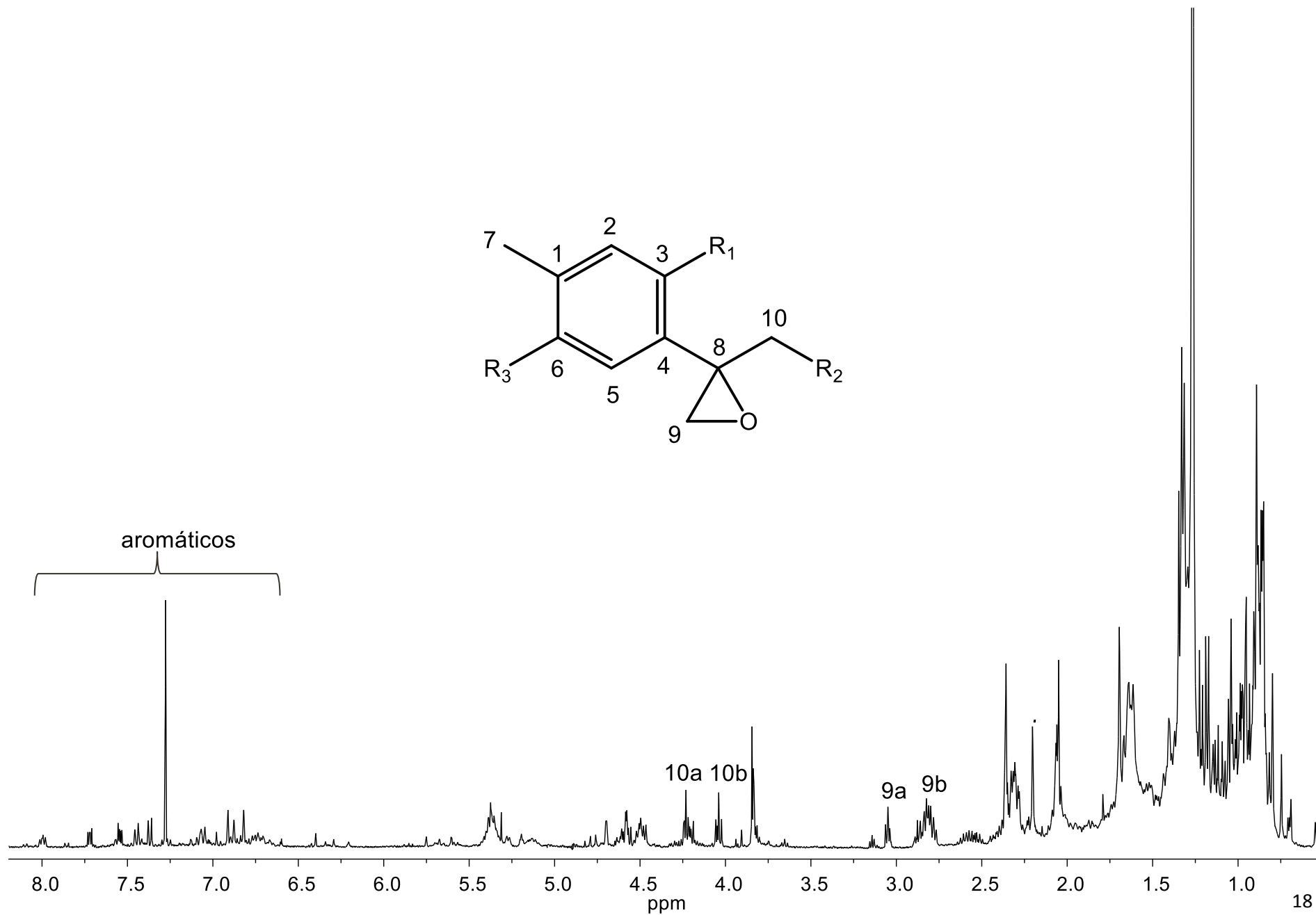


Figura 11. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  a 400 MHz en  $\text{CDCl}_3$  del extracto total de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  de hojas de Cuanajo de *A. glabrata*.

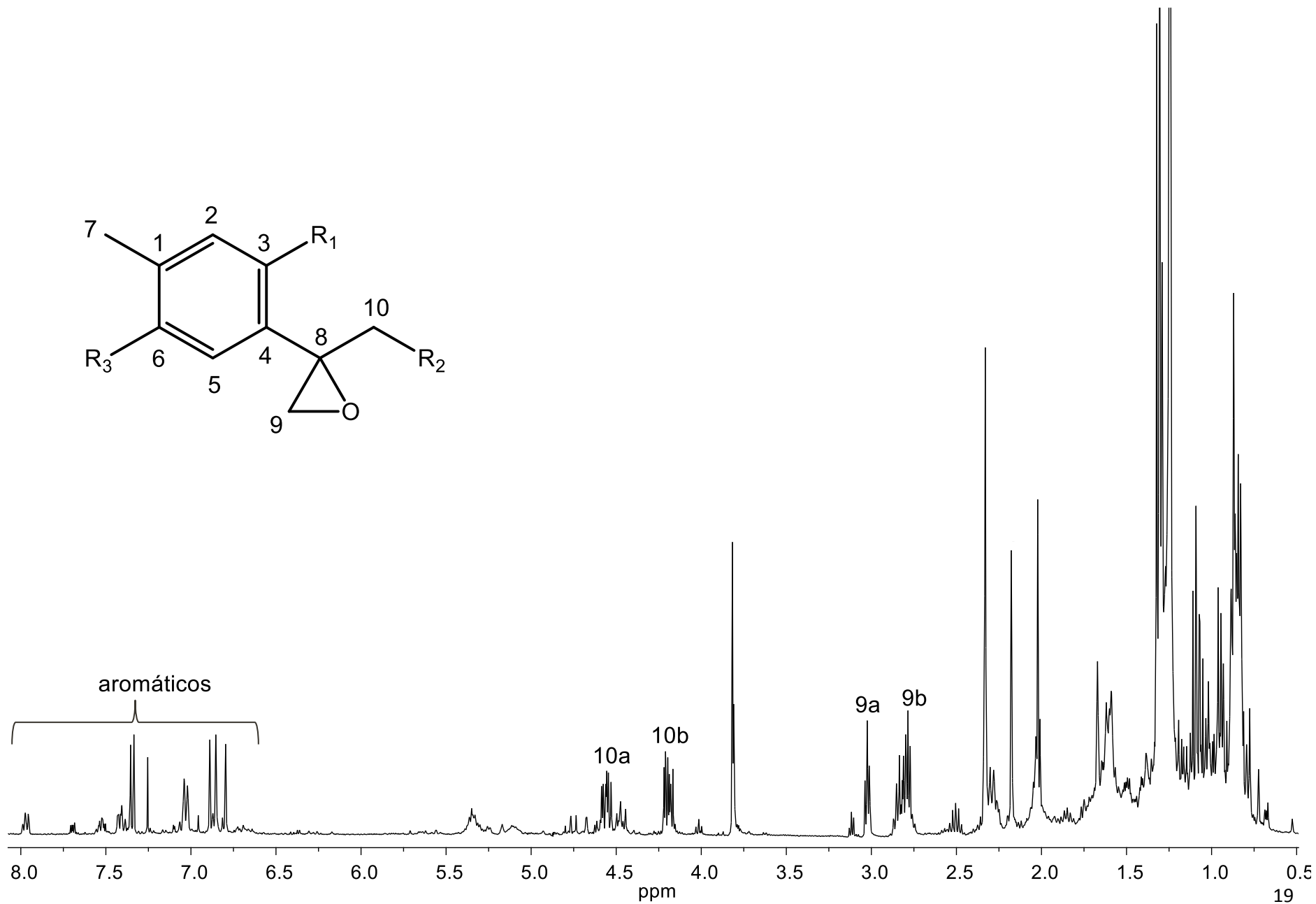
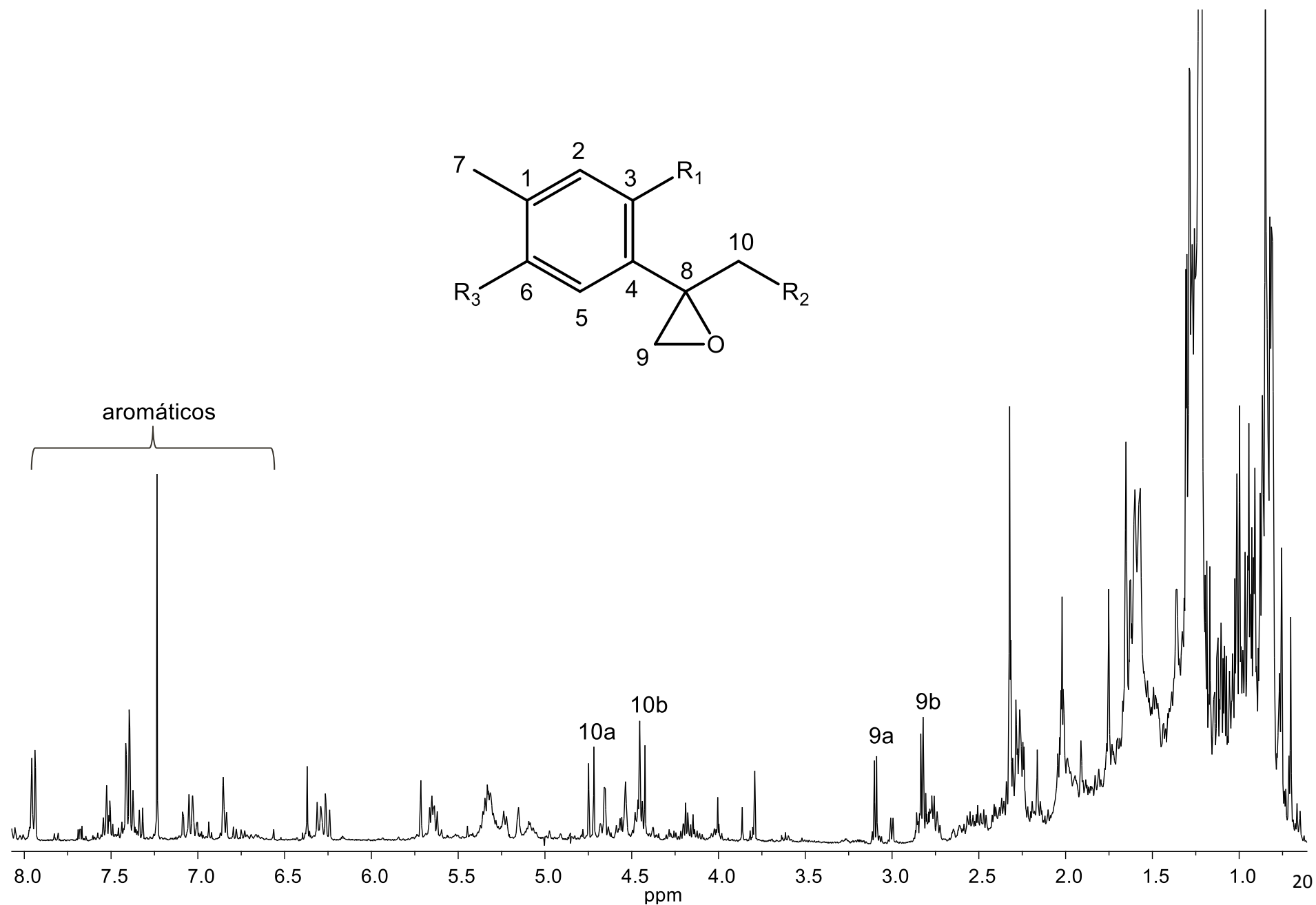


Figura 12. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  a 400 MHz en  $\text{CDCl}_3$  del extracto hexánico total de tallos de Cuanajo de *A. glabrata*.



**Figura 13.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  a 400 MHz en  $\text{CDCl}_3$  del extracto hexánico total de flores de Cuanajo de *A. glabrata*.

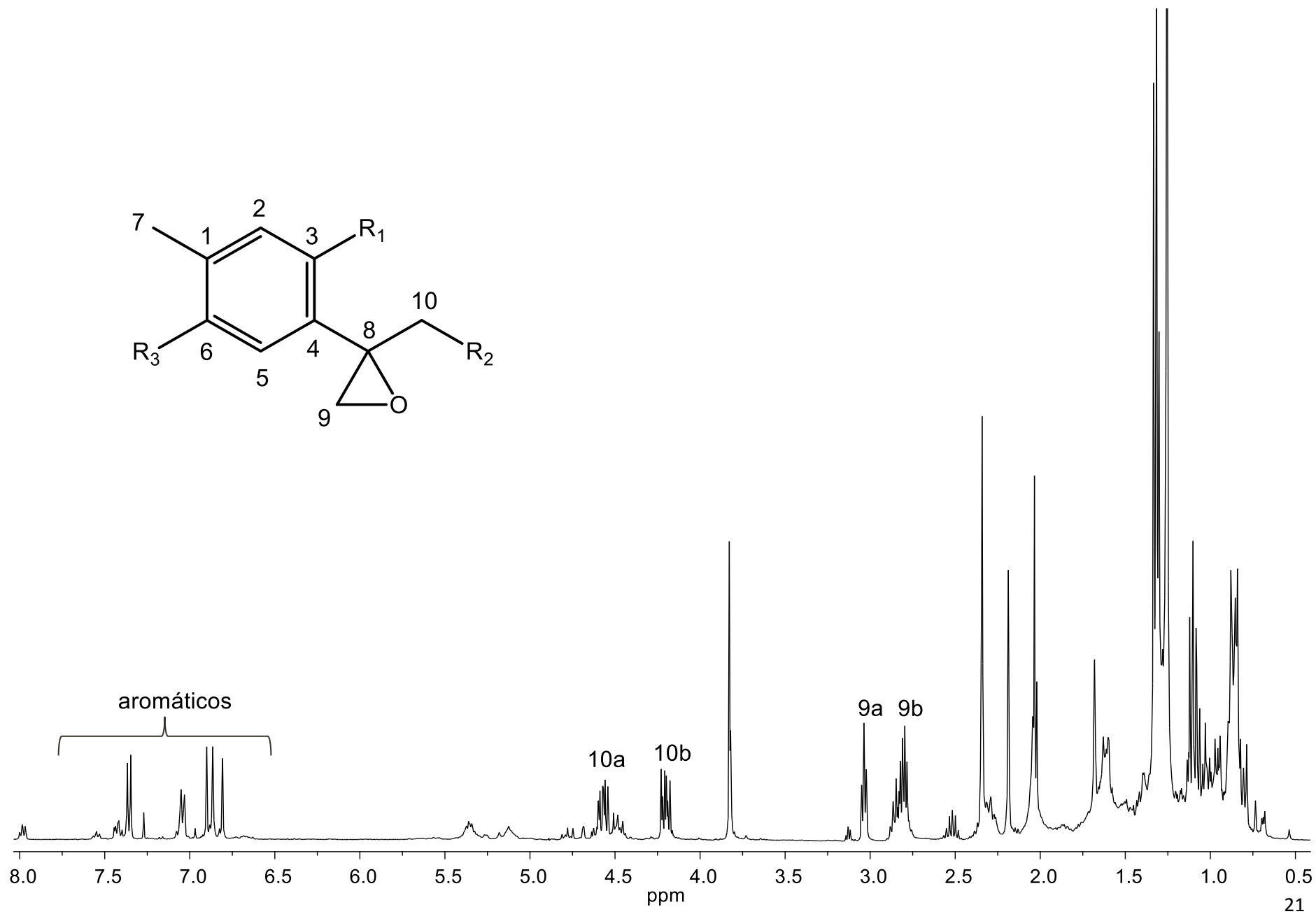


Figura 14. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  a 400 MHz en  $\text{CDCl}_3$  del extracto hexánico total de tallos de Quiroga de *A. glabrata*.

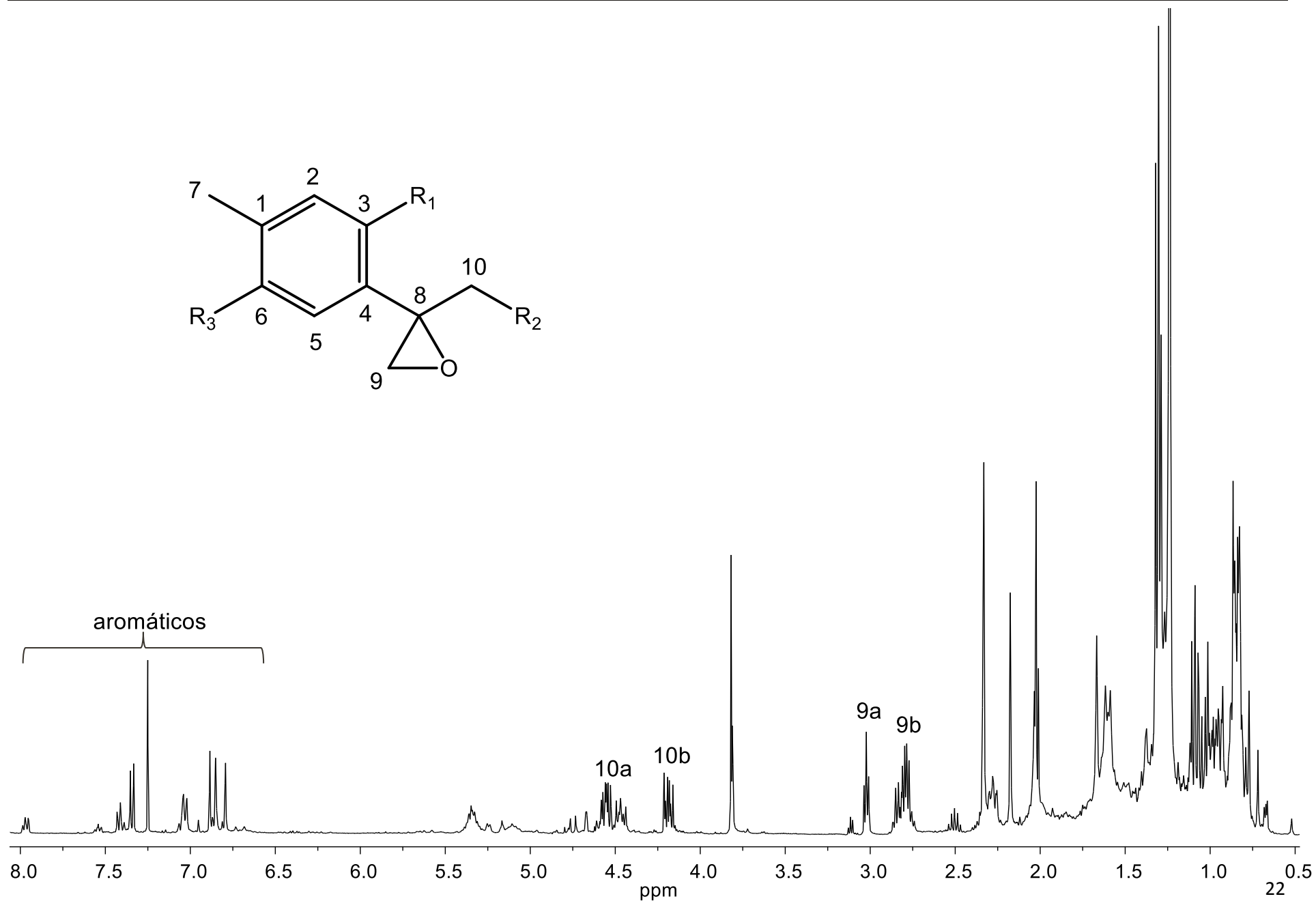
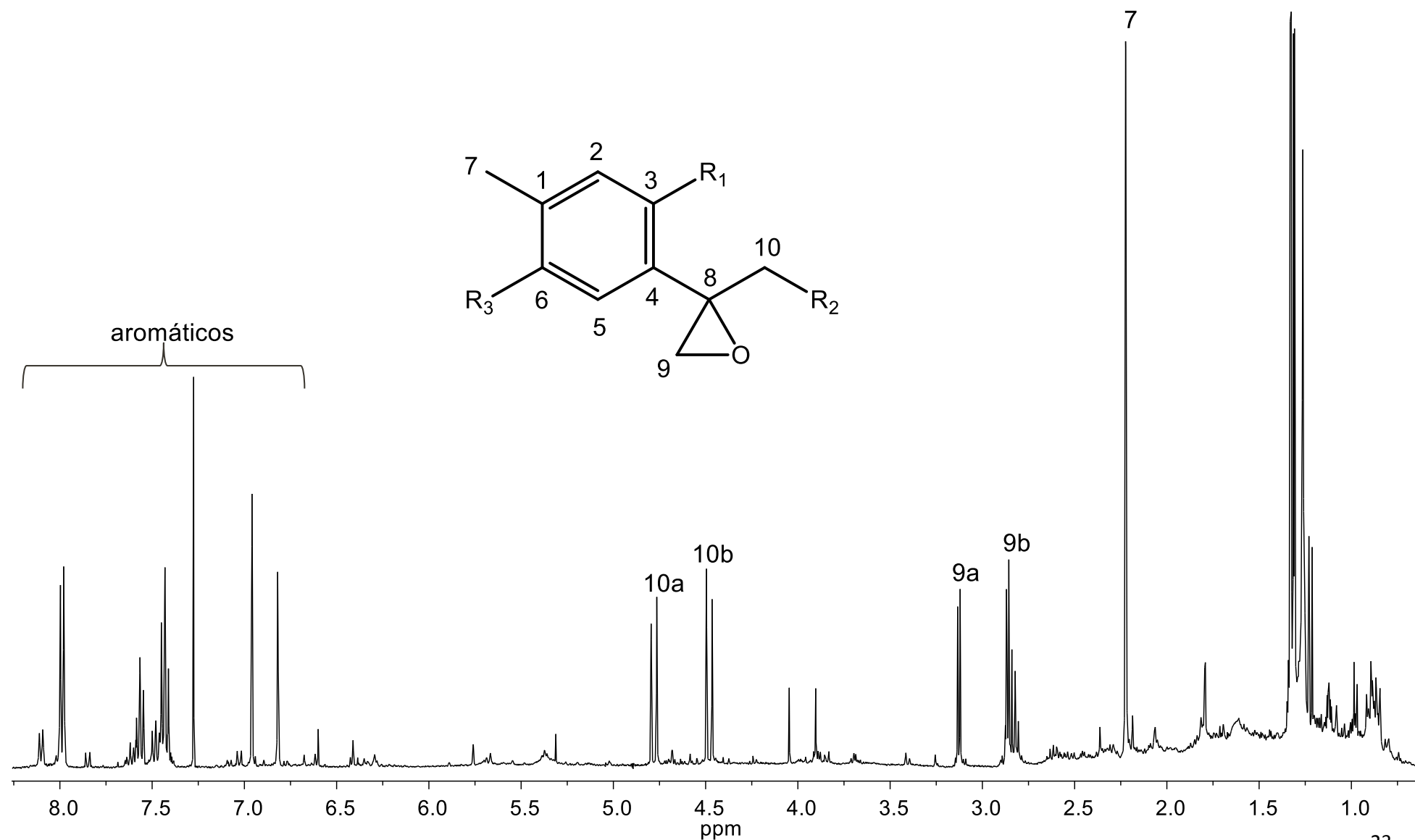
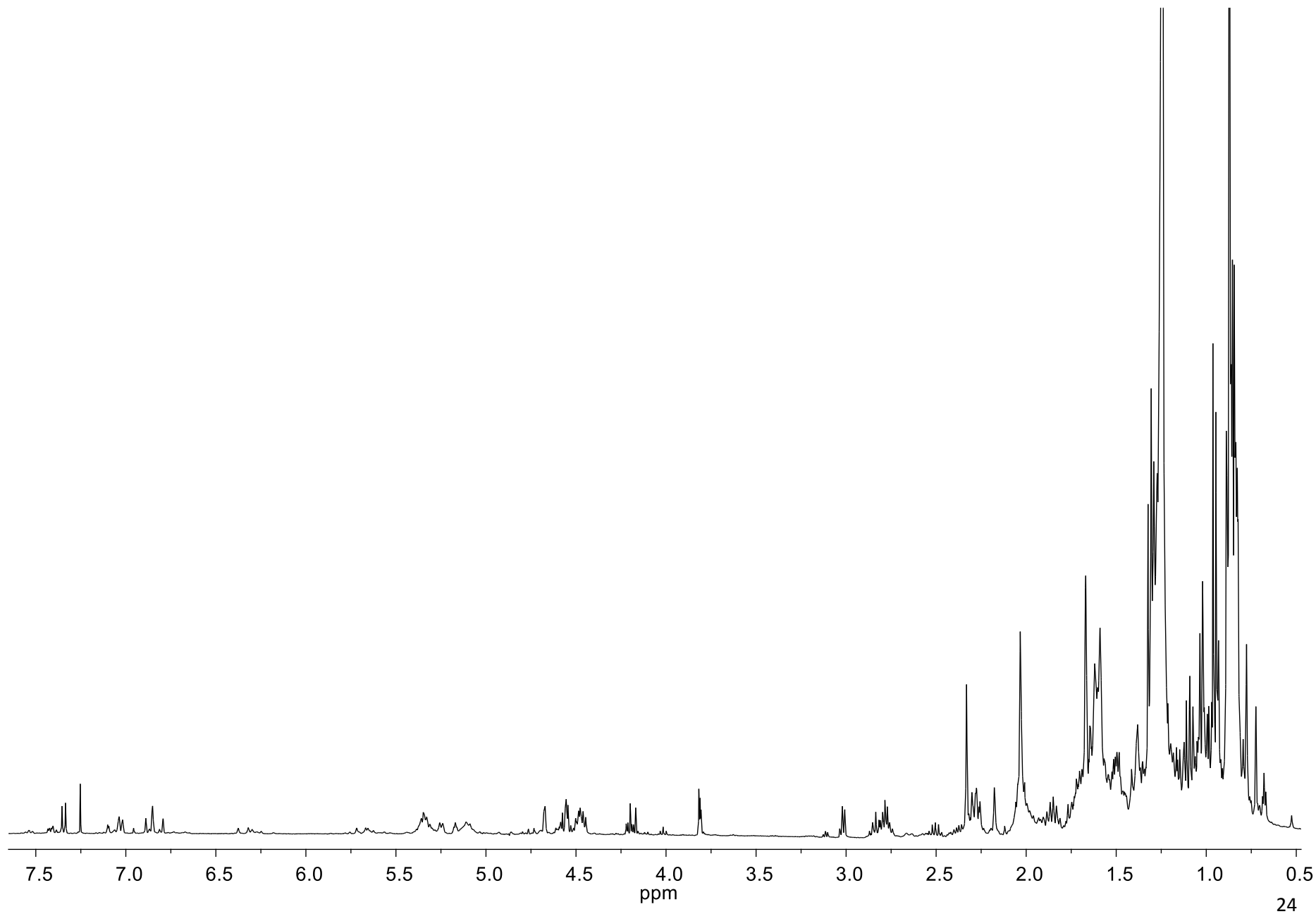


Figura 15. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H a 400 MHz en CDCl<sub>3</sub> del extracto hexánico total de tallos de Pátzcuaro de *A. glabrata*.





**Figura 16.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  a 400 MHz en  $\text{CDCl}_3$  del extracto total de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  de hojas de Pátzcuaro.



**Figura 17.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  a 400 MHz en  $\text{CDCl}_3$  del extracto total de hexanos de tallos de Mil Cumbres.

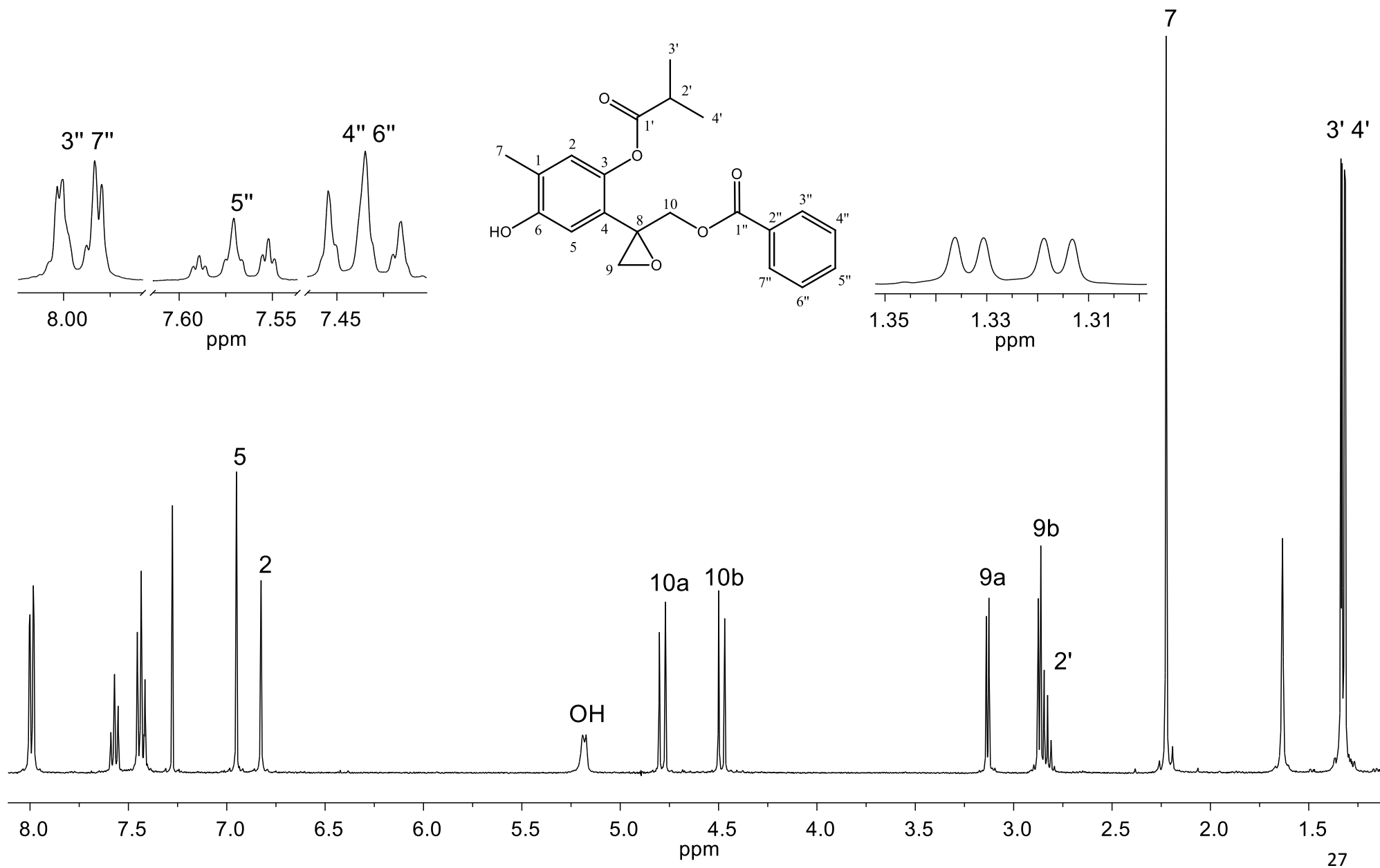
En base al análisis de RMN de  $^1\text{H}$  de los extractos totales se inició el aislamiento de los derivados de timol con el extracto de diclorometano de las hojas de la colecta de Pátzcuaro, por ser este en el cual las señales características de derivados de timol epoxidados se observaron de forma mayoritaria. Un lote de 5 g de extracto se llevó a cromatografía en columna usando gel de sílice como fase estacionaria, hexanos y mezcla de hexanos- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  en orden de polaridad ascendente como fase móvil, se obtuvieron 100 fracciones de 10 mL. En la polaridad hexanos- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (4:1) se obtuvieron cristales en forma de agujas con punto de fusión de 112-114 °C. En el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 18) se observó en 7.97 ppm una señal doble de dobles con  $J = 7.8$  y 1.5 Hz que integró para dos protones, correspondiente a los protones aromáticos H-3'' y H-7'', en 7.55 ppm se observó una señal triple de triples con  $J = 7.8$  y 1.5 Hz para el protón aromático H-5'', en 7.41 ppm se encontró la señal triple con  $J = 7.8$  Hz de los protones aromáticos H-4'' y H-6'', en 6.93 y 6.81 ppm, se observaron dos señales simples para los protones H-5 y H-2 en posición *para* del anillo aromático. En 4.76 y 4.47 ppm se observaron dos señales dobles con  $J = 12.3$  Hz para los protones H-10a y H-10b, mientras que en 3.10 y 2.85 ppm se observaron dos señales dobles con  $J = 5.3$  Hz, para los protones base de epóxido H-9a y H-9b, en 2.82 ppm se observó una señal séptuple con  $J = 6.8$  Hz para el protón metínico H-2' de isopropilo, en 2.21 ppm apareció la señal simple de los protones del metilo de la posición H-7, en 1.30 y 1.29 ppm se observaron dos señales dobles con  $J = 6.8$  Hz correspondientes a los metilos de isopropilo de las posiciones H-3' y H-4'.

En el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 19) se observaron, en 175.0 y 166.0 ppm las señales de carbonilo de ésteres C-1' y C-1'' respectivamente, en 151.7 y 141.7 ppm se observaron dos señales para los carbonos cuaternarios base de oxígeno de las posiciones C-6 y C-3 respectivamente; en 133.2 ppm se observó la señal del carbono C-5'', los carbonos C-3'' y C-7'' se encontraron en 129.7 ppm, en 129.5 ppm se observó la señal para el carbono C-4. En 128.4 ppm se localizaron las señales para carbonos C-4'' y C-6'', en 127.1, 125.8, 124.7 y 114.7 ppm se observaron las señales para los carbonos C-2'', C-1, C-2 y C-5 respectivamente, en 65.5 ppm se observó la señal para el carbono C-10 base de benzoato, mientras que en 57.0 ppm se encontró la señal para el

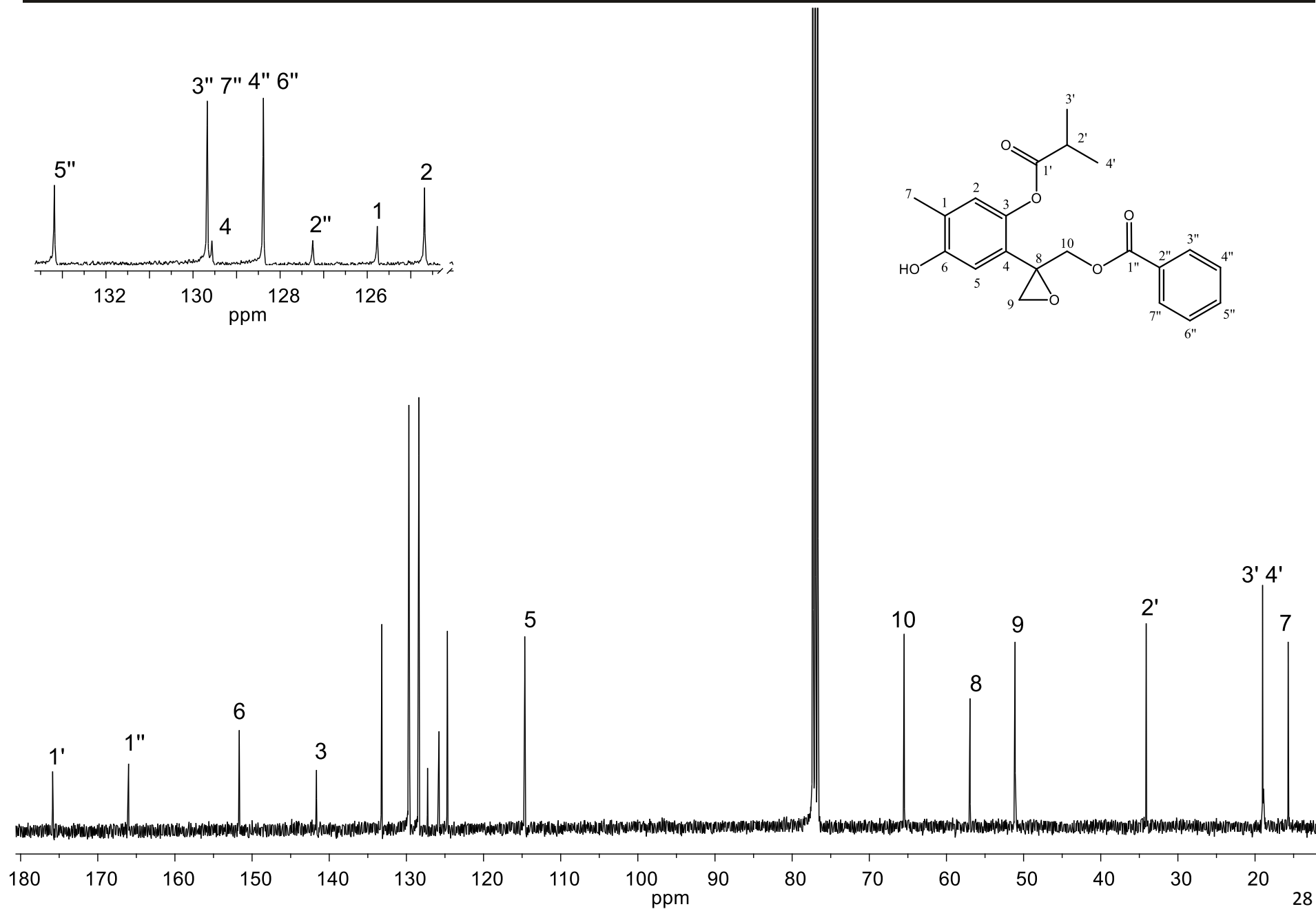
carbono cuaternario C-8 base de epóxido, en 51.0 ppm se localizó la señal para C-9 base de epóxido, en 34.1 ppm se observó la señal para el carbono C-2' base de isopropilo. En 19.0 ppm se localizó la señal para los carbonos pertenecientes a los metilos de isopropilo 3' y 4', en 15.7 ppm se encontró la señal que corresponde al carbono de metilo de la posición C-7.

En el experimento COSY (Figura 20) se observó la correlación del metilo H-7 en 2.21 ppm con el hidrógeno H-2 en 6.81 ppm y se confirmó este acoplamiento al observar que la señal de H-8 es mas pequeña que la de H-5 en 6.93 ppm, además de las correlaciones correspondientes a los metilenos H-9 y H-10. En 2.82 ppm se localizó una señal séptuple para el protón metínico base de isopropilo H-2' que presentó una correlación con los protones de los metilos de isopropilo en 1.30 y 1.29 ppm.

En el experimento *g*-HSQC (Figura 21) se observó la correlación de H-5 en 6.93 ppm con C-5 en 114.7 ppm, mientras que la señal del H-2 en 6.81 ppm correlacionó con la señal del carbono C-2 en 124.7 ppm, las señales de los hidrógenos H-9 y H-9a en 3.10 y 2.85 ppm correlacionaron con la señal del C-9 en 51.0 ppm.



**Figura 18.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  a 400 MHz en  $\text{CDCl}_3$  del (+)-(8S)-isobutirato de 10-benzoiloxy-8,9-epoxi-6-hidroxitimilo (**25**).



**Figura 19.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  a 100 MHz en  $\text{CDCl}_3$  del (+)-(8S)-isobutirato de 10-benzoiloxi-8,9-epoxi-6-hidroxitimilo (25).

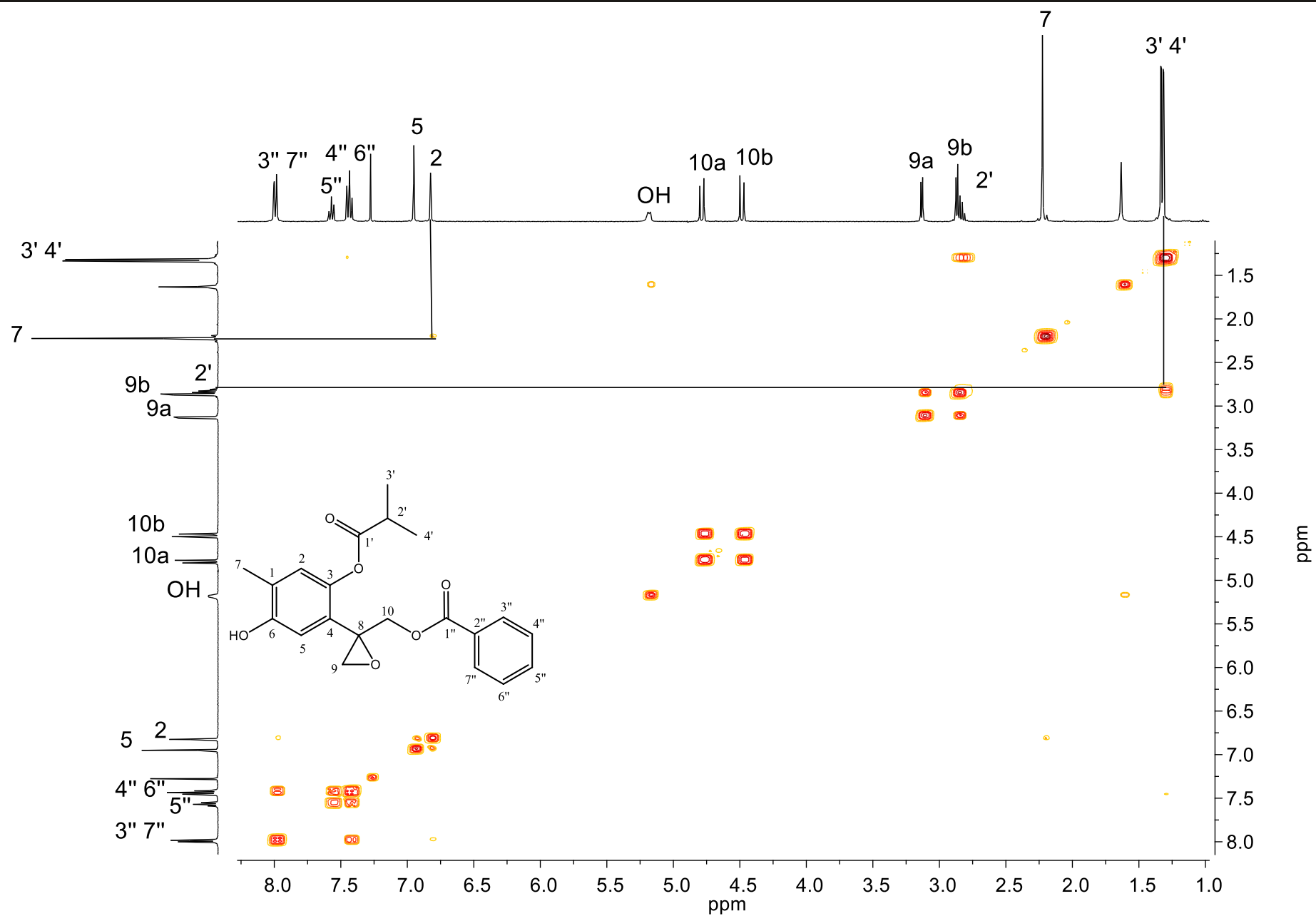


Figura 20. Experimento COSY del (+)-(8S)-isobutirato de 10-benzoiloxy-8,9-epoxitimo (25).

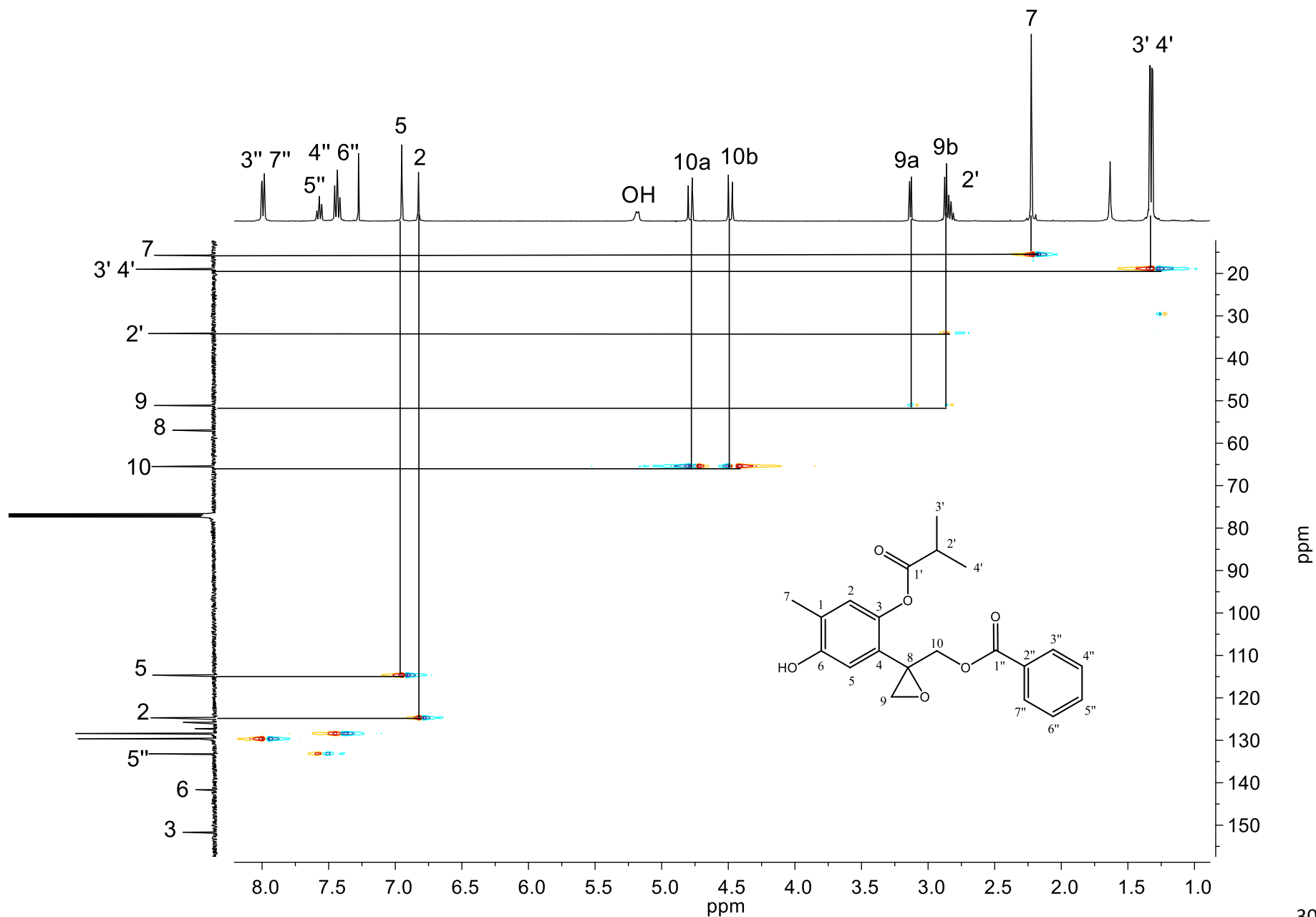
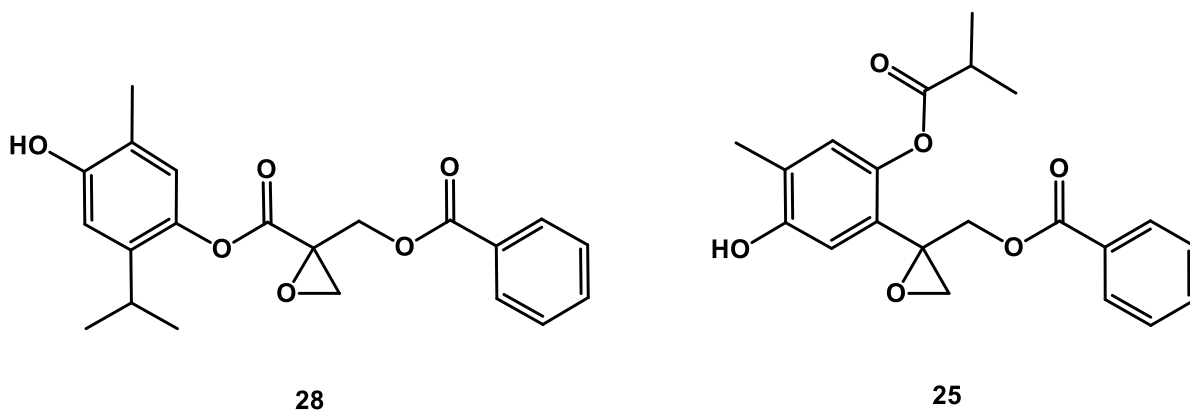


Figura 21. Experimento *g*-HSQC del (+)-(8*S*)-isobutirato de 10-benzoiloxi-8,9-epoxi-6-hidroxitimilo (**25**).



El experimento *g*-HMBC (Figura 23) fue de gran utilidad ya que nos permitió realizar la asignación posicional de los ésteres sobre el anillo de timol. Se observó la correlación del carbonilo C-1' en 175.0 ppm con el protón H-2' base de isopropilo en 2.82 ppm y con los protones de los metilos de isopropilo en 1.30 y 1.29 ppm. Por otro lado, la señal del carbonilo C-1'' en 166.0 ppm correlacionó con las señales de H-3'' y H-7'' en 7.97 ppm y con las señales en 4.76 y 4.47 ppm correspondientes a H-10a y H-10b. Adicionalmente, las señales de los protones de metileno en la posición H-10 en 4.47 y 4.76 ppm correlacionaron con los carbonos C-8 y C-9 del epóxido. El carbono cuaternario C-8 en 57.0 ppm mostró una correlación con H-5 en 6.93 ppm. En la tabla 4 se resumen las correlaciones encontradas en el experimento *g*-HMBC. Algunas correlaciones se muestran de manera gráfica en la figura 24. Con el análisis de la ubicación de estos carbonilos pudimos descartar la estructura de la eupaglabrina (**28**) reportada por Romo de Vivar y proponer al isobutirato de 10-benzoiloxi-8,9-epoxi-6-hidroxitimilo (**25**) (Figura 22).



**Figura 22.** Eupaglabrina, reportada por Romo de Vivar.

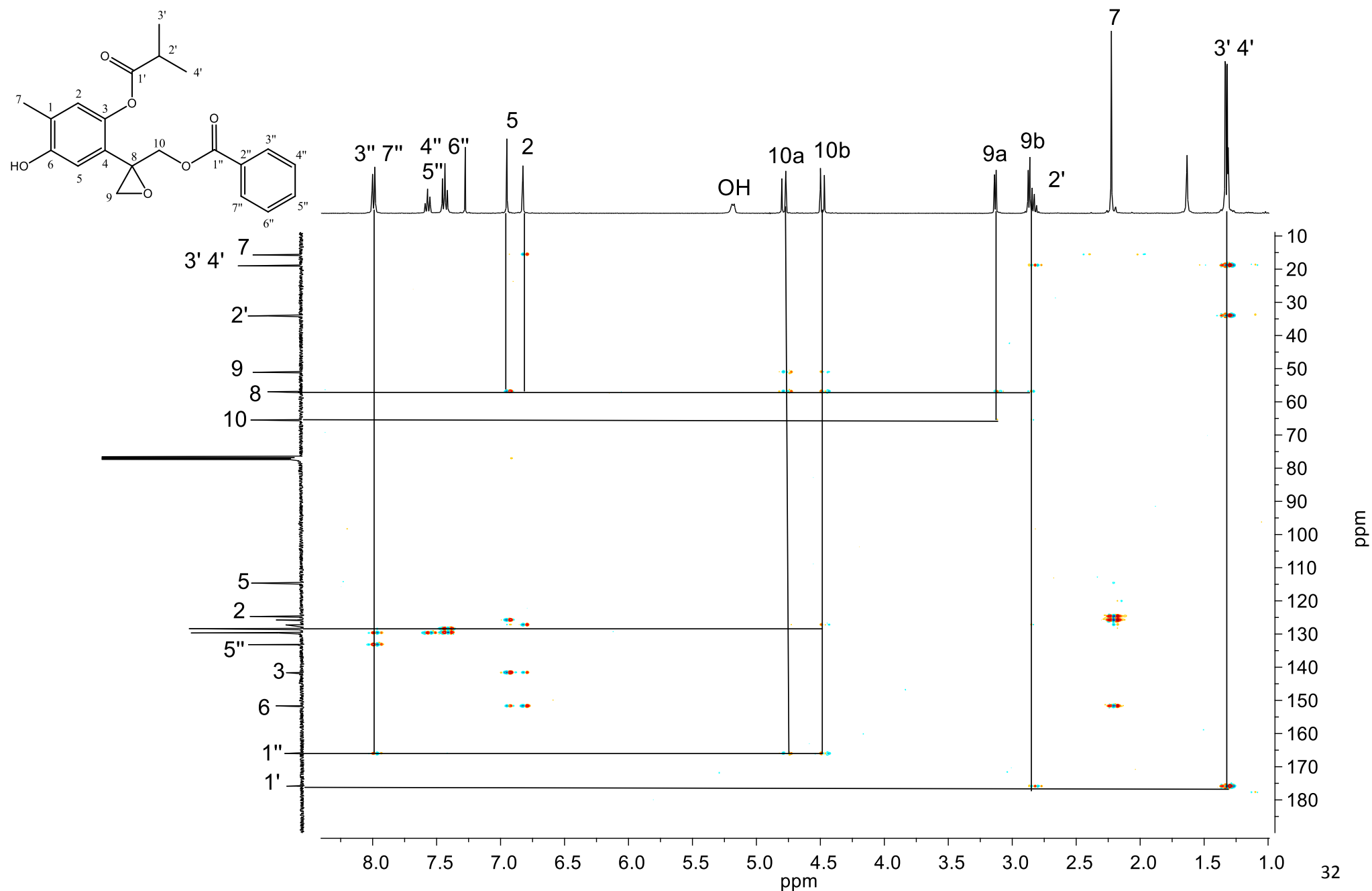


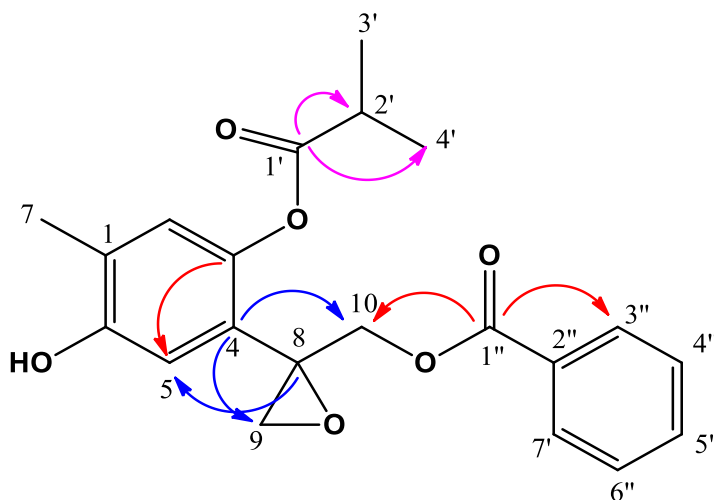
Figura 23. Experimento g-HMBC del (+)-(8S)-isobutirato de 10-benzoiloxy-8,9-epoxy-6-hidroxitimilo (**25**).

**Tabla 4.** Desplazamientos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ .

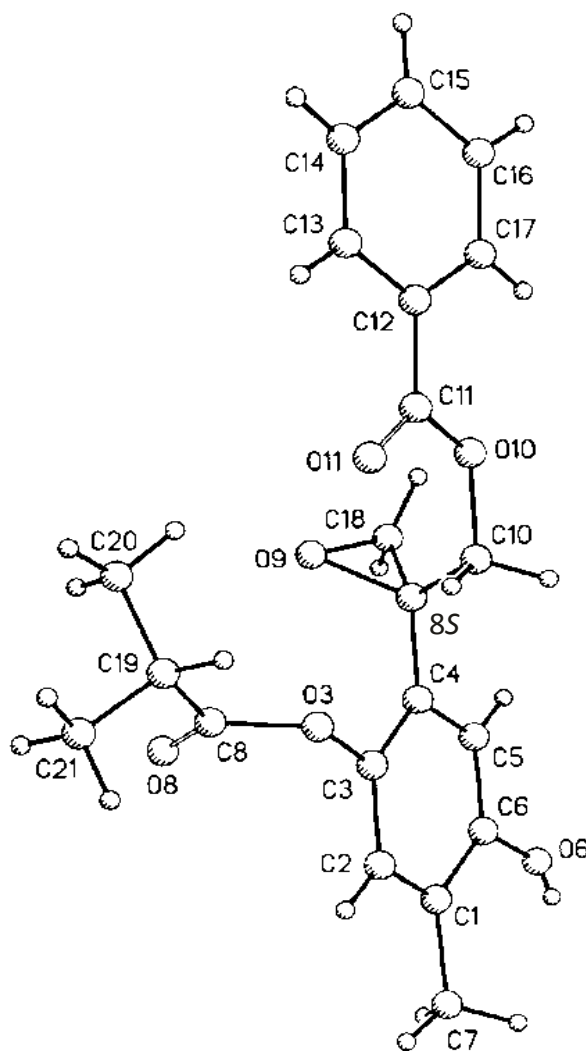
Posición	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$g\text{-HMBC}$
1	125.8		/
2	124.7	6.81	15.7, 151.7, 141.7
3	141.7		/
4	129.5		/
5	114.7	6.93	151.7, 141.7, 125.8, 57.0
6	157.1		/
7	15.7	2.21	151.7, 125.8, 124.7
8	57.0		/
9	51.0	2.85 y 3.10	65.5, 57.0
10	65.5	4.47 y 4.76	166.0, 127.1, 57.0 51.1,
1'	175.0		/
2'	34.1	2.82	175.0, 19.0
3' 4'	19.0	1.30 y 1.29	175.0
1''	166.0		/
2''	127.1		/
3'', 7''	129.7	7.97	129.7, 133.2, 166.0
4'', 6''	128.4	7.41	129.7, 128.4
5''	133.2	7.55	129.7

Mediante recristalizaciones con hexanos-acetona se obtuvieron cristales adecuados que fueron analizados por difracción de rayos X de monocristal, confirmando la estructura propuesta por RMN de 1D y 2D para el compuesto **25**. Por lo que los datos de RMN de  $^1\text{H}$  descritos por Bohlmann y colaboradores deben ser revisados. La estructura molecular fue resuelta por métodos directos y refinada a un índice de discrepancia del 8.6%. El análisis de los parámetros Flack y Hooft (Flack, 2008; Flack & Bernardinelli 2008) permitió definir la

configuración absoluta (8*S*) del compuesto **25**, como se muestra en la Figura 25, resultando el valor del parámetro Flack  $x = 0.0(9)$  y Hooft  $y = 0.3(8)$  para la configuración correcta y los valores para la configuración opuesta fueron  $x = 1(9)$  y  $y = 0.5(8)$ . Estos parámetros fueron calculados con el programa Olex2 v1.1.5 (Dolomanov *et al*, 2009).



**Figura 24.** Correlaciones observadas del g-HMBC del (+)-(8*S*)-isobutirato de 10-benzoiloxi-8,9-epoxi-6-hidroxitimilo (**25**).



**Figura 25.** Estructura de rayos X del (+)-(8S)-isobutirato de 10-benzoiloxi-8,9-epoxi-6-hidroxitimilo (**25**).

Continuando con el análisis, el extracto de hexanos de los tallos de la colecta de Pátzcuaro se sometió a purificación. Un lote de 30 g se eluyó en una columna cromatográfica de 4.5 cm de diámetro en 6 pulgadas de gel de sílice como fase estacionaria y mezclas de hexanos-AcOEt (49:1, 23:2, 9:1 y 22:3), se obtuvieron 92 fracciones que se monitorearon por cromatografía en placa fina y RMN de  $^1\text{H}$ . Las fracciones eluidas en la polaridad hexanos-AcOEt (49:1) se recromatografiaron en una columna cromatográfica de 4.5 cm de diámetro en 6 pulgadas de gel de sílice como fase estacionaria y como fase móvil hexanos y mezclas de hexanos-acetona (4:1 y 7:3), como fase móvil obteniendo un total de 190 fracciones. En base al análisis por cromatografía en capa fina se realizó una recromatografía de las fracciones 50 a 70 en una

columna de 2 cm de diámetro con 6 pulgadas de gel de sílice como fase estacionaria y una mezcla de hexanos-AcOEt (4:1) de la que se obtuvieron 235 mg de una miel amarilla, la cual se analizó por RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 26). En 6.88 ppm se observó una señal simple que integró para el protón de la posición H-5 del anillo aromático de timol, en 6.79 ppm se localizó una señal simple para el protón del anillo aromático H-2, en 4.54 y 4.19 ppm se encontró un par de señales dobles con  $J = 12.0$  Hz, para los protones de H-10, en 3.81 ppm se localizó una señal simple que integró para los tres protones del grupo OMe, en 3.03 y 2.80 ppm se observaron dos señales dobles con  $J = 5.6$  Hz, correspondiente a los protones base de epóxido de la posición H-9; mientras que en 2.80 ppm se localizó una señal séptuple con  $J = 7.2$  Hz, la cual se asignó al protón metínico de la posición H-2', en 2.17 ppm se observó la señal simple característica para el metilo aromático de la posición H-7, en 2.02 ppm se encontró la señal simple que integró para tres protones del acetato H-2'', en 1.31 y 1.30 ppm se localizaron dos señales dobles con  $J = 7.2$  Hz para los metilos de isopropilo H-3' y H-4'.

En el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 27) se observó en 175.6 ppm la señal para el carbonilo del éster C-1', en 170.3 ppm se observó la señal para el C-1'', en 155.3 ppm se localizó la señal para el carbono base de oxígeno de la posición C-3, en 141.3 ppm se ubicó la señal para el carbono base de metoxilo C-6, en 128.2 y 126.6 ppm se observaron las señales para C-4 y C-1 respectivamente, en 124.3 y 109.5 ppm se encontraron las señales para los carbonos metínicos C-2 y C-5 respectivamente; en 65.1 ppm se observó la señal para el carbono C-10 base de benzoato, en 56.7 ppm se observó la señal para el carbono cuaternario base de epóxido C-8, en 55.6 ppm se ubicó la señal del carbono C-9 base de epóxido, en 55.6 ppm se localizó la señal para el carbono del OMe, en 34.0 ppm se encontró la señal del carbono C-2' base de isopropilo, en 20.6 ppm se ubicó al carbono del metilo C-2''. En 18.9 ppm se encontró la señal para los carbonos 3' y 4', por último en 16.0 ppm se localizó la señal para el carbono del metilo en posición C-7.

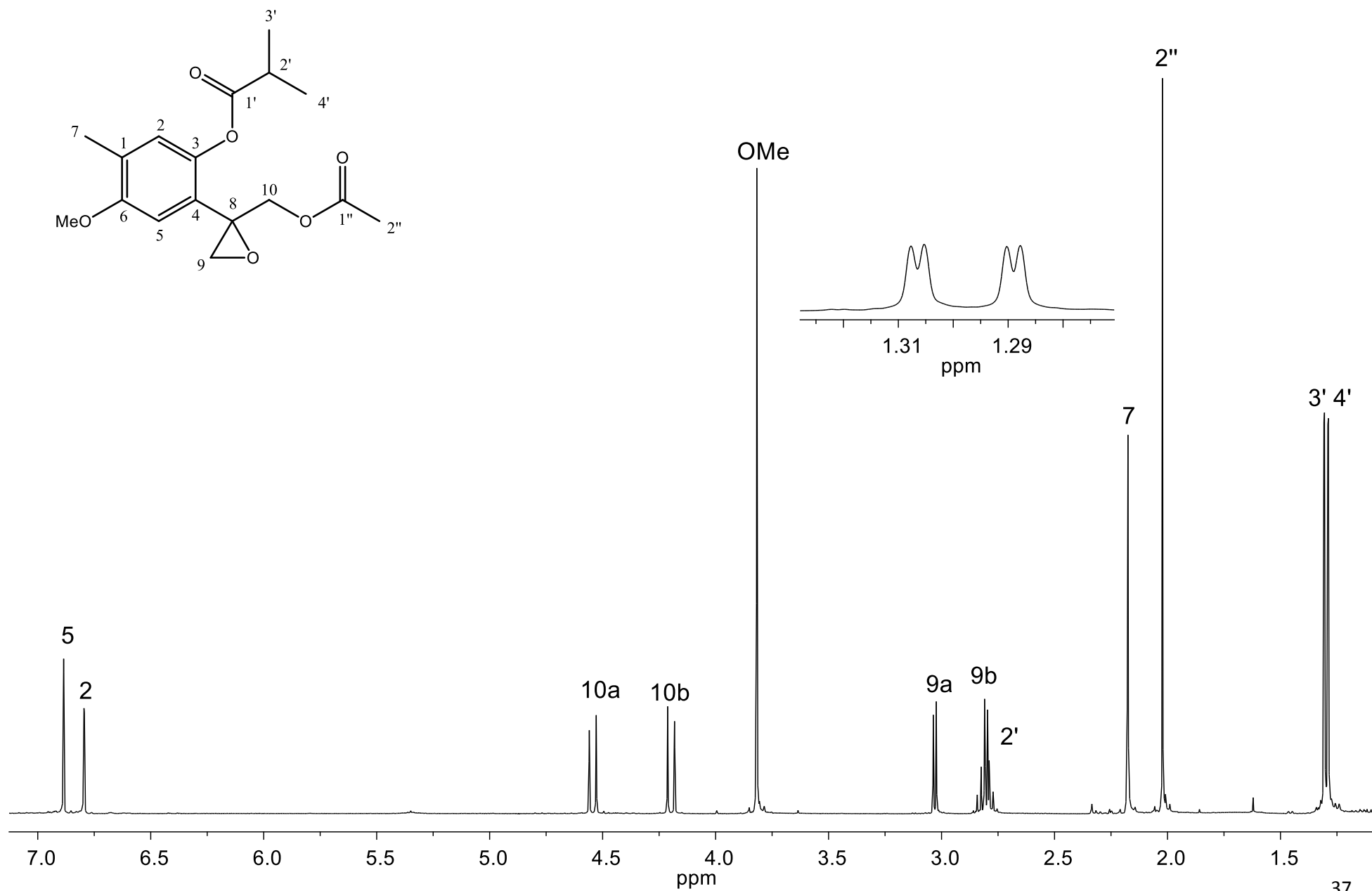


Figura 26. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  a 400 MHz en  $\text{CDCl}_3$  del isobutirato de 10-acetoxi-6-metoxi-8,9-epoxitimilo (23).

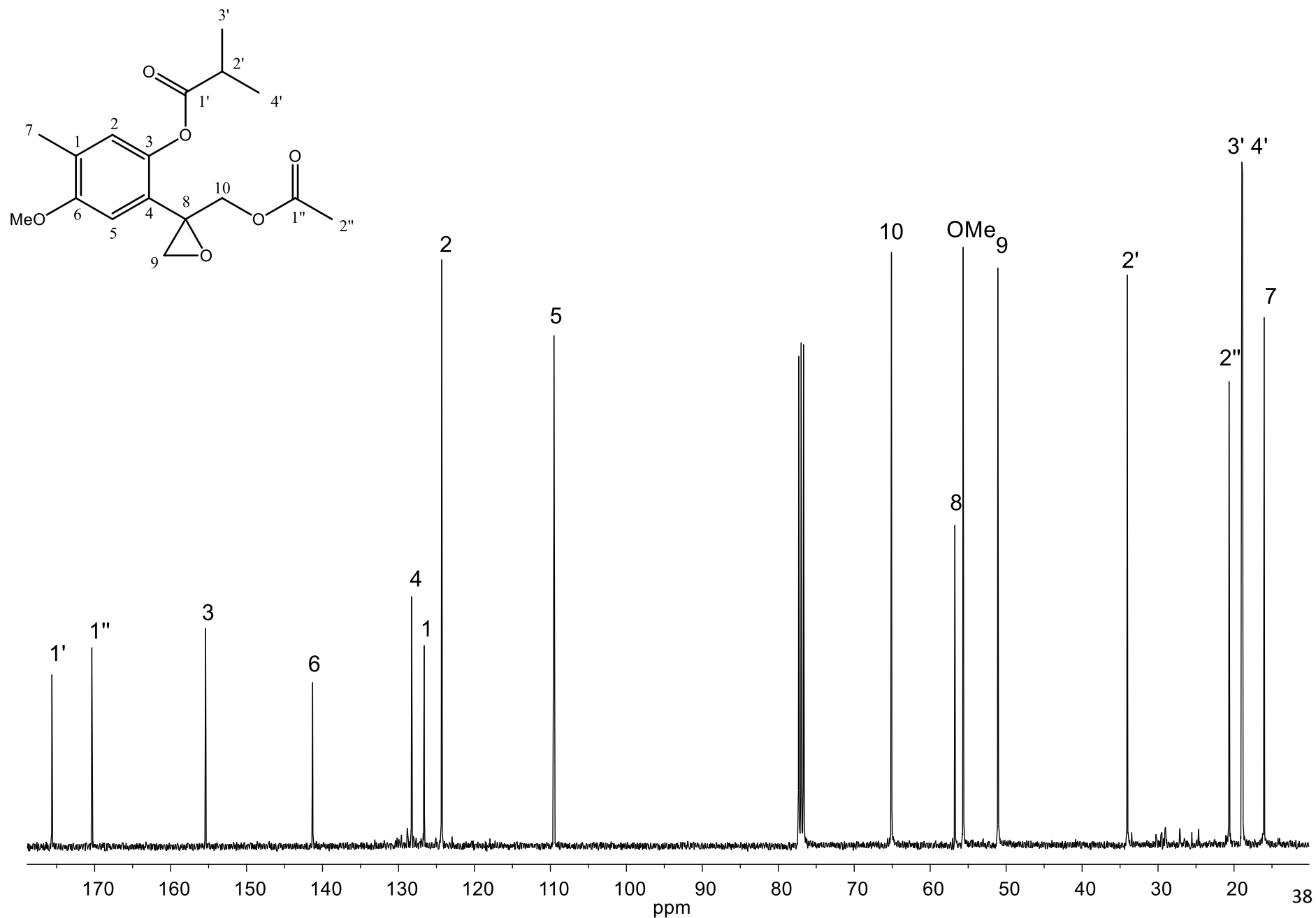


Figura 27. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  a 100 MHz en  $\text{CDCl}_3$  del isobutirato de 10-acetoxy-6-metoxi-8,9-epoxitimo (**23**).



En el experimento COSY (Figura 28) se observó la correlación del metilo H-7 en 2.17 ppm con el H-2 en 6.79 ppm. En 2.80 ppm se localizó la señal séptuple correspondiente al protón metínico base de isopropilo H-2' el cual presentó una correlación con los protones de los metilos en 1.31 y 1.30 ppm. En 3.81 ppm se localizó la señal simple que para el metilo de metoxilo la cual mostró una correlación con los hidrógenos H-2 y H-5 en 6.79 y 6.88 ppm respectivamente.

En el experimento de correlación heteronuclear HETCOR (Figura 29) se observó la correlación entre los metilos H-3' y H-4' en 1.20 y 1.29 ppm con los carbonos de metilos de isopropilo C-3' y C-4' en 18.9 ppm. En 2.02 ppm se ubicó la señal simple que corresponde al metilo del grupo acetato que presentó una correlación con el carbono C-2'' en 20.6 ppm, la señal séptuple en 2.80 ppm mostró una correlación con el carbono base de isopropilo C-2' en 34.0 ppm, las señales simples en 6.88 y 6.79 ppm mostraron correlaciones con las señales en carbono C-5 y C-2 en 109.5 y 124.0 ppm.

En el experimento TOCSY (Figura 30) se observó la correlación entre la señal simple del metilo aromático en posición H-7 en 2.17 ppm y las señales simples correspondientes a los hidrógenos H-5 y H-2 en 6.88 y 6.79 ppm respectivamente, mientras que las señales dobles de los protones H-10a y H-10b mostraron correlación con la señal simple en 2.02 ppm para el metilo del grupo acetilo con lo cual se pudo demostrar la conectividad en esta parte de la estructura.



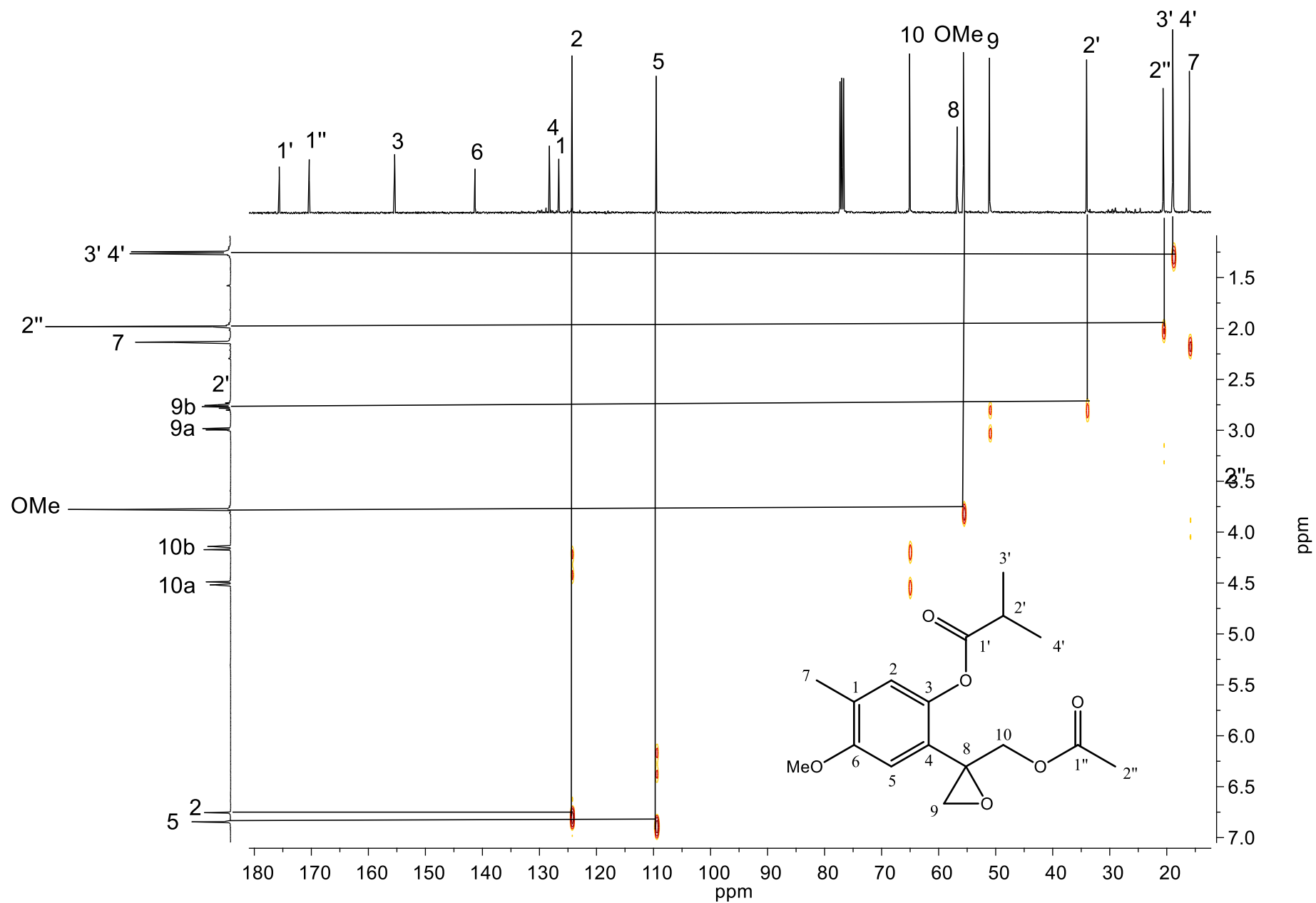


Figura 29. Experimento HETCOR del isobutirato de 10-acetoxi-6-metoxi-8,9-epoxitimilo (23).

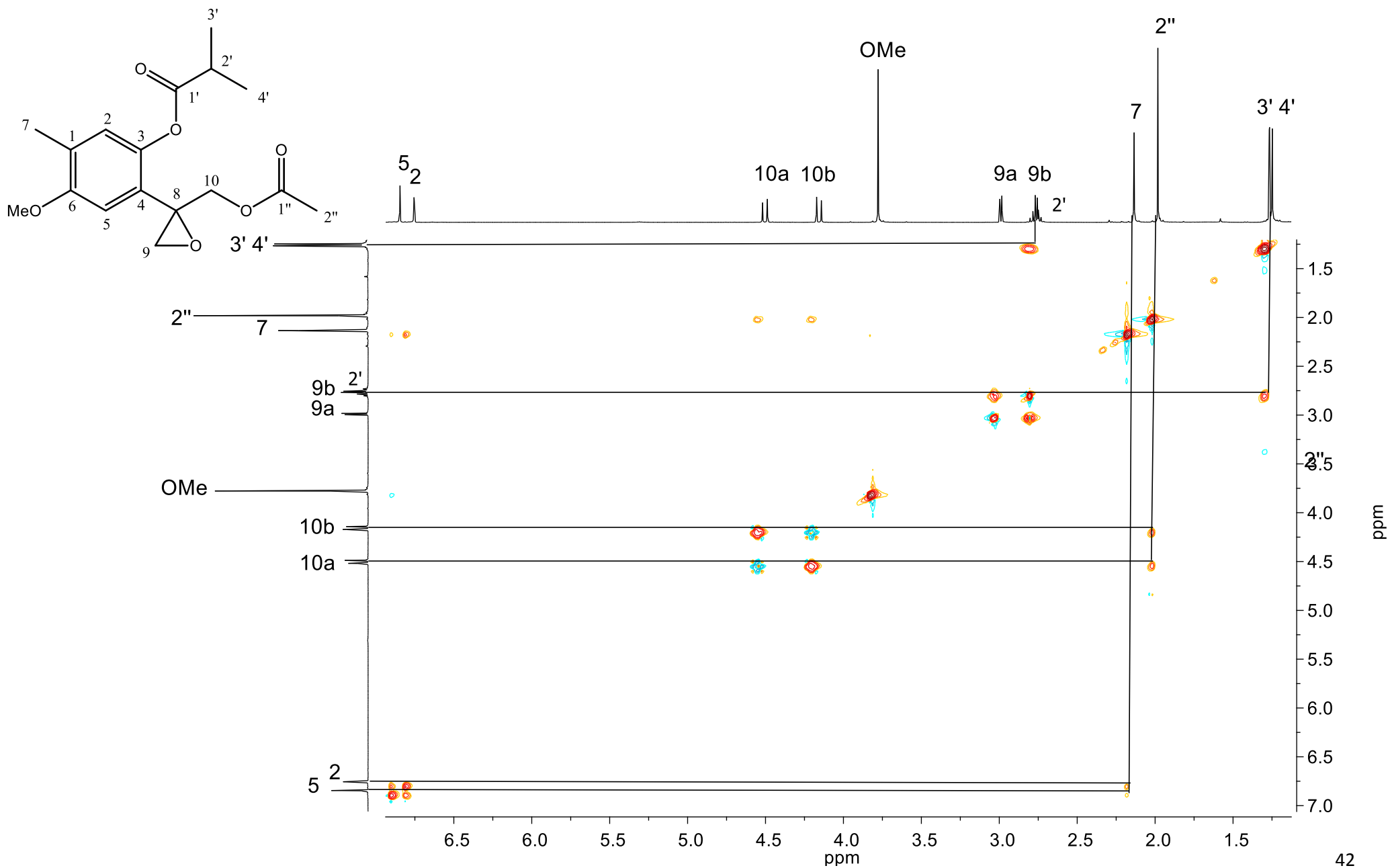


Figura 30. Experimento TOCSY del isobutirato de 10-acetoxi-6-metoxi-8,9-epoxitimilo (23).

Realizando una búsqueda bibliográfica se encontró que este compuesto había sido reportado anteriormente (Bohlmann *et al*, 1977) llamado: isobutirato de 10-acetoxi-6-metoxi-8,9-epoxitimilo (**23**). Aponte y colaboradores en el 2011 lo aislaron del extracto etanólico de la raíz de la planta *Mikania decora*, el cual en un ensayo biológico presentó actividad antiproliferativa frente a células de fibroblastos de ratón Balb/c 3T3, células de cáncer de pulmón humano H460, carcinoma de próstata humano DU145, adenocarcinoma de mama humano MCF-7; melanoma humano M-14; adenocarcinoma de colon humano HT-29, leucemia mielógena crónica humana K562, células epiteliales de riñón normales de mono verde africano VERO; de igual manera, mostró actividad moderada frente a amastigotes axénicos de *Leishmania amazonensis*. Cabe resaltar que en este trabajo se hizo referencia a que la actividad antiproliferativa de los derivados de timol pudo deberse a la presencia de los grupos 8,9-epoxi y acetoxi lo cual puede abrir la puerta a futuros ensayos biológicos.

Se realizó una comparación entre los desplazamientos de RMN de  $^1\text{H}$  reportados por Bohlmann y colaboradores, en 1977 y los obtenidos experimentalmente para el compuesto **23** los cuales se resumieron en la tabla 5, donde puede observarse que varios de los desplazamientos mostraron diferencias significativas entre ambos compuestos. Por lo tanto, los desplazamientos y la estructura reportados por Bohlmann deben ser corregidos.

**Tabla 5** . Desplazamientos de RMN de  $^1\text{H}$  para el 10-acetoxi-6-metoxi-8,9-epoxitimilo (**23**).

posición	<i>A. glabrata</i> 1977	Experimental
<b>2</b>	6.75	6.79
<b>5</b>	7.10	6.88
<b>7</b>	2.34	2.17
<b>9a</b>	5.27*	3.03*
<b>9b</b>	5.07*	2.80*
<b>10a</b>	4.71*	4.54*
<b>10b</b>	4.71*	4.19*
<b>2'</b>	2.30*	2.80*
<b>3'</b>	1.10	1.31
<b>4'</b>	1.10	1.30
<b>2''</b>		2.02
<b>OMe</b>	3.82	3.81

En la misma polaridad hexanos-AcOEt (4:1) se obtuvieron 200 mg de una miel amarilla la cual en su espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 31) se localizó en 7.33 ppm una señal doble ancha con  $J = 7.5$  Hz, para el protón de la posición H-5; en 7.02 ppm se observó una señal doble ancha que presentó  $J = 7.5$  Hz, para el protón H-6; mientras que en 6.84 ppm se observó una señal simple asignada al protón de la posición H-2, en 4.56 y 4.18 ppm se localizaron dos señales dobles con  $J = 12.4$  Hz, que integraron para un protón cada una, correspondientes al H-10, en 3.01 ppm se ubicó una señal doble con  $J = 5.4$  Hz para el protón de la posición H-9a, en 2.82 ppm se localizó una señal séptuple con  $J = 6.8$  Hz para el protón H-2' característica de un metino de isopropilo, en 2.76 ppm se ubicó una señal doble con  $J = 5.4$  Hz para el protón de la posición H-9b, en 2.34 ppm se observó una señal múltiple de H-2'' traslapada con la señal simple correspondiente al metilo aromático H-7, en 1.60 y 1.42 ppm se

localizaron dos señales múltiples correspondientes a los hidrógenos diasterotópicos H-3a'' y H-3b''. En 1.33 ppm se observó una señal doble con  $J = 6.8$  Hz que integró para 6 protones correspondiente a los metilos de isopropilo de las posiciones H-3' y H-4'; en 1.07 ppm se observó una señal doble con  $J = 6.8$  Hz, que integró para 3 protones perteneciente al metilo H-4''; finalmente, en 0.82 ppm se localizó una señal triple con  $J = 7.6$  Hz que integró para 3 protones atribuida al metilo H-5''.

En su espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 32) se observaron, en 175.8 y 175.1 ppm las señales para los carbonilos de los ésteres C-1' y C-1'' respectivamente, en 148.5 ppm se observó la señal para el carbono cuaternario base de oxígeno C-3, en 139.9 ppm se localizó la señal para el carbono cuaternario C-4, en 128.8, 126.6, 125.9 y 122.8 ppm se ubicaron las señales de los carbonos del anillo aromático C-5, C-6, C-1 y C-2, respectivamente, en 64.9 ppm se localizó la señal para el carbono base de 2-metilbutirato C-10, en 56.8 y 50.5 ppm se ubicaron las señales para los carbonos base de epóxido C-8 y C-9 respectivamente, en 40.8 ppm se localizó la señal para el carbono C-2'', en 34.1 ppm se observó la señal para el carbono base de isopropilo C-2', en 26.5 ppm se ubicó la señal del carbono de metileno C-3'', en 21.0 ppm se localizó la señal de carbono del metilo aromático de la posición C-7, en 18.9 ppm se localizó la señal perteneciente a los carbonos de los metilos de isopropilo C-3' y C-4', por último en 16.4 y 11.4 ppm se ubicaron dos señales para los carbonos de los metilos C4'' y C-5'', respectivamente.

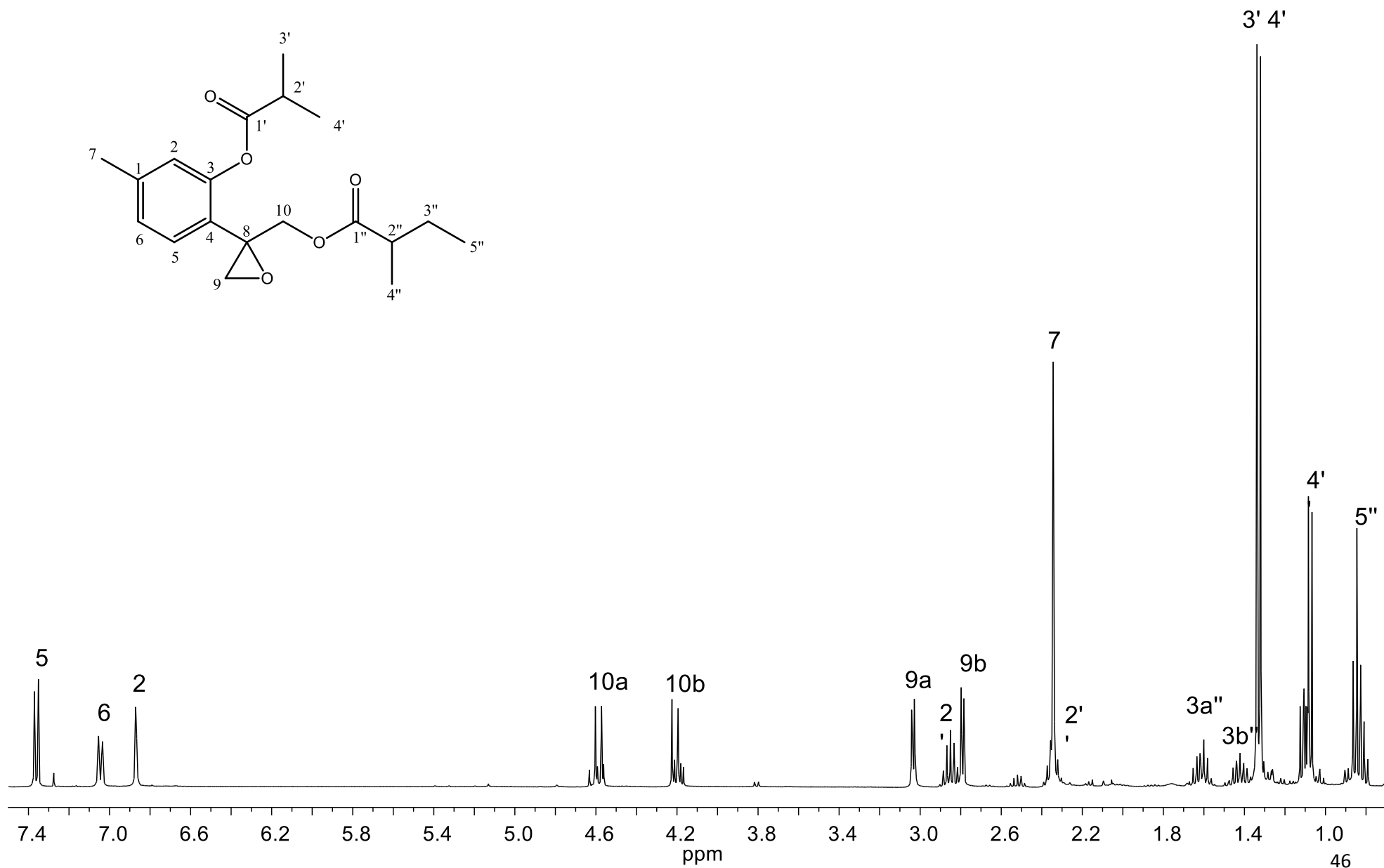


Figura 31. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H a 400 MHz en CDCl<sub>3</sub> del isobutirato de 10-(2-metilbutiriloxi)-8,9-epoxitimilo (5c).



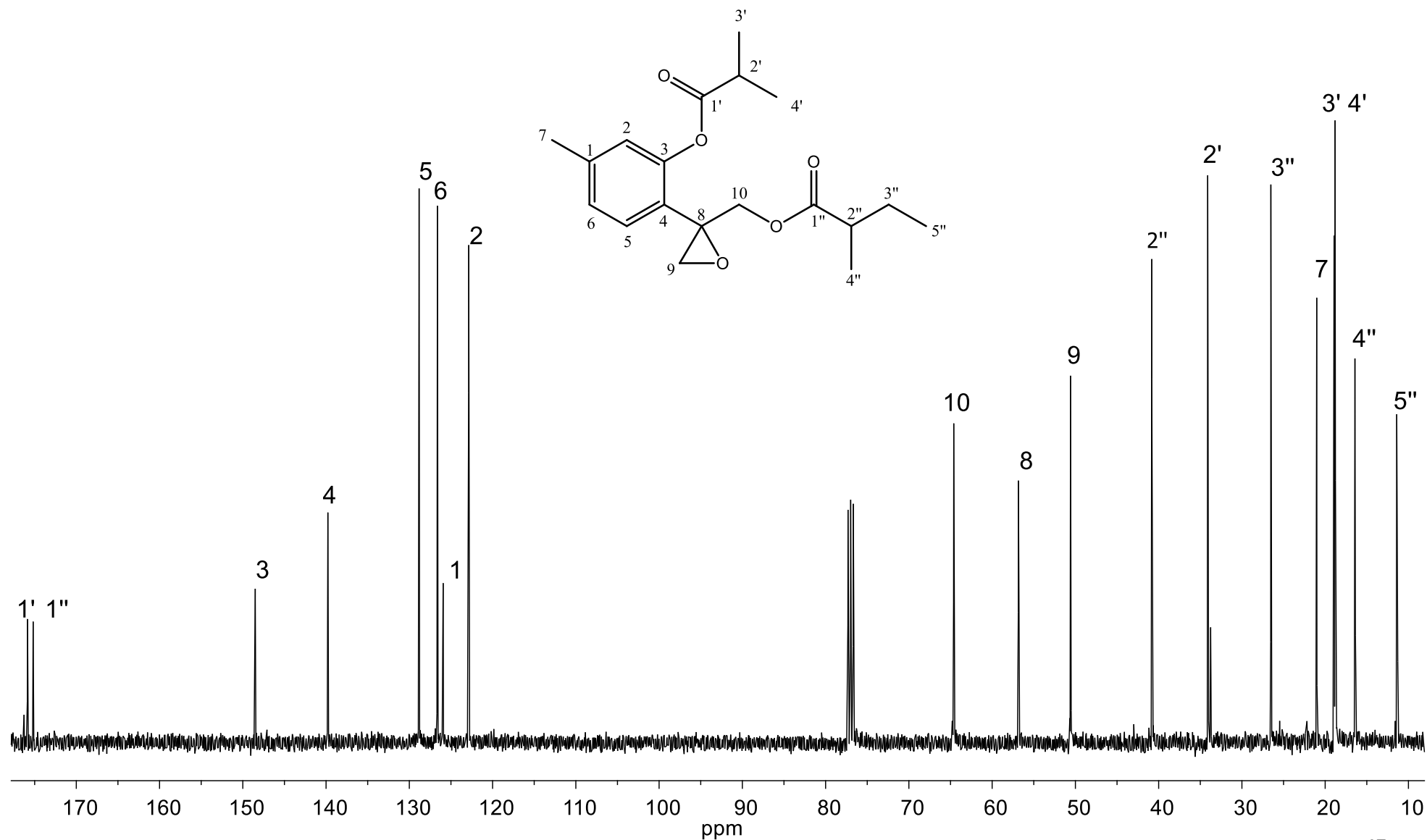


Figura 32. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  a 100 MHz en  $\text{CDCl}_3$  del isobutirato de 10-(2-metilbutiriloxi)-8,9-epoxitimo (5c).

En el experimento COSY (Figura 33) se observó la correlación entre la señal doble de doble de dobles perteneciente al protón H-6 en 7.02 ppm con la señal doble en 7.33 ppm que corresponde al protón H-5 con lo cual se pudo demostrar el tipo de sustitución del anillo aromático de timol, la señal doble en 1.07 ppm de H-4'' mostró una correlación con la señal múltiple en 2.34 ppm del protón de la posición H-2'', finalmente se observó la correlación entre la señal múltiple en 0.82 ppm para H-5'' con las señales presentes en 1.60 y 1.42 ppm de los protones diasterotópicos de las posiciones H-3a'' y H-3b'', además de las correlaciones típicas de los sistemas AB de las posiciones H-9 y H-10, así como las correlaciones correspondientes al sistema de isopropilo.

En base al experimento HETCOR fue posible realizar la asignación del espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 34). Se observó la correlación entre las señales en 7.33, 7.02 y 6.84 ppm correspondientes a los protones del anillo aromático de timol con las señales de carbonos en 128.8, 126.6 y 122.8 ppm para los carbonos de las posiciones C-5, C-6 y C-2, respectivamente, con lo que se pudo demostrar la trisustitución de dicho anillo aromático, la señal en 2.34 ppm para la señal múltiple de H-2'' presentó una correlación con la señal en 40.8 ppm perteneciente al carbono de la posición C-2'', las señales en 1.60 y 1.42 ppm de H-3a'' y H-3b'' mostraron correlación con la señal de carbono que se encontró en 26.5 ppm de la posición C-3'', la señal doble en 1.07 ppm mostró una correlación con la señal en 16.4 ppm para C-4'', finalmente en 0.82 ppm se localizó una señal múltiple correspondiente a los protones del metilo H-5'' que presentó acoplamiento con la señal del carbono en 11.4 ppm para C-5''.

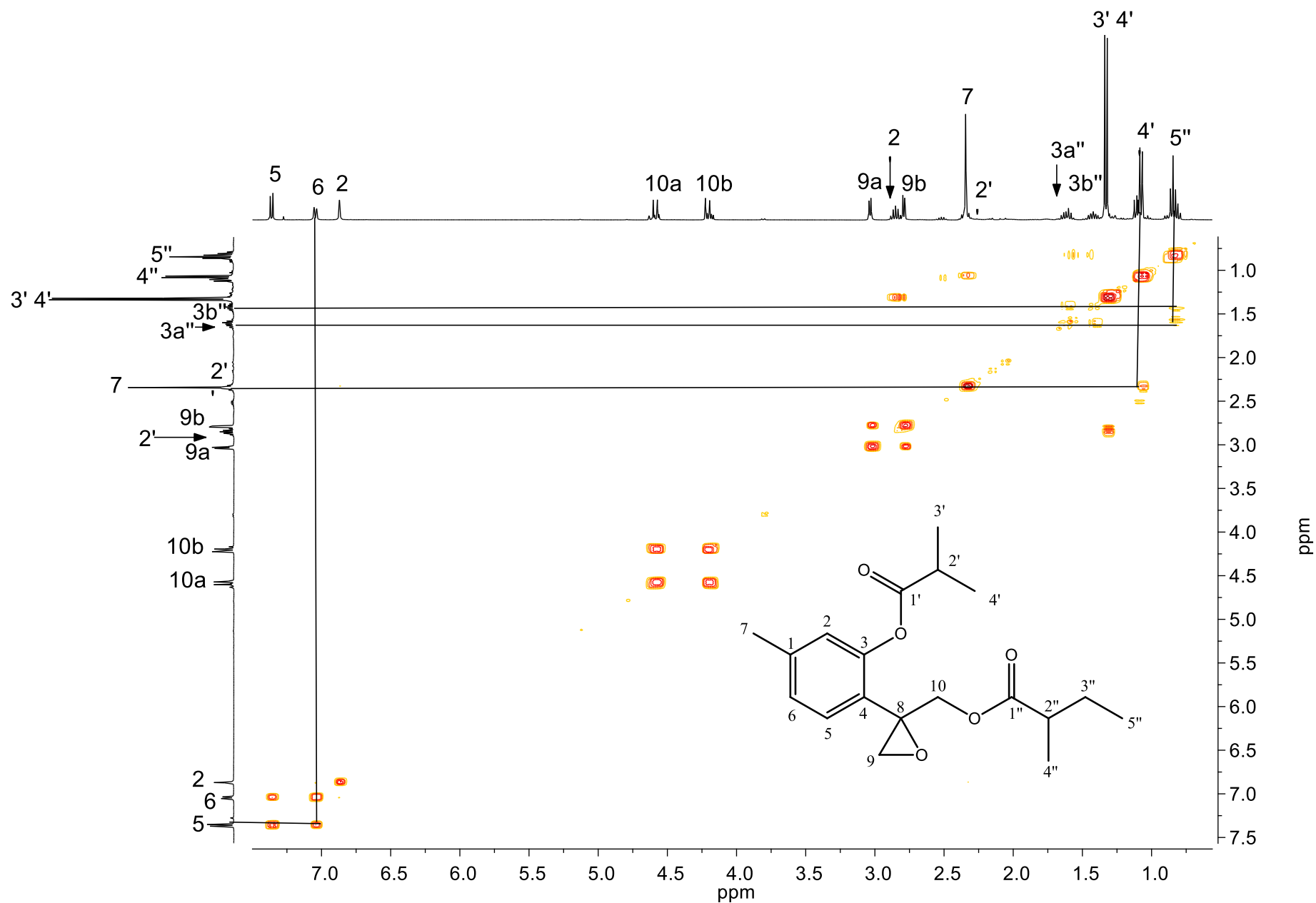


Figura 33. Experimento COSY del isobutirato de 10-(2-metilbutiriloxy)-8,9-epoxitimilo (5c).



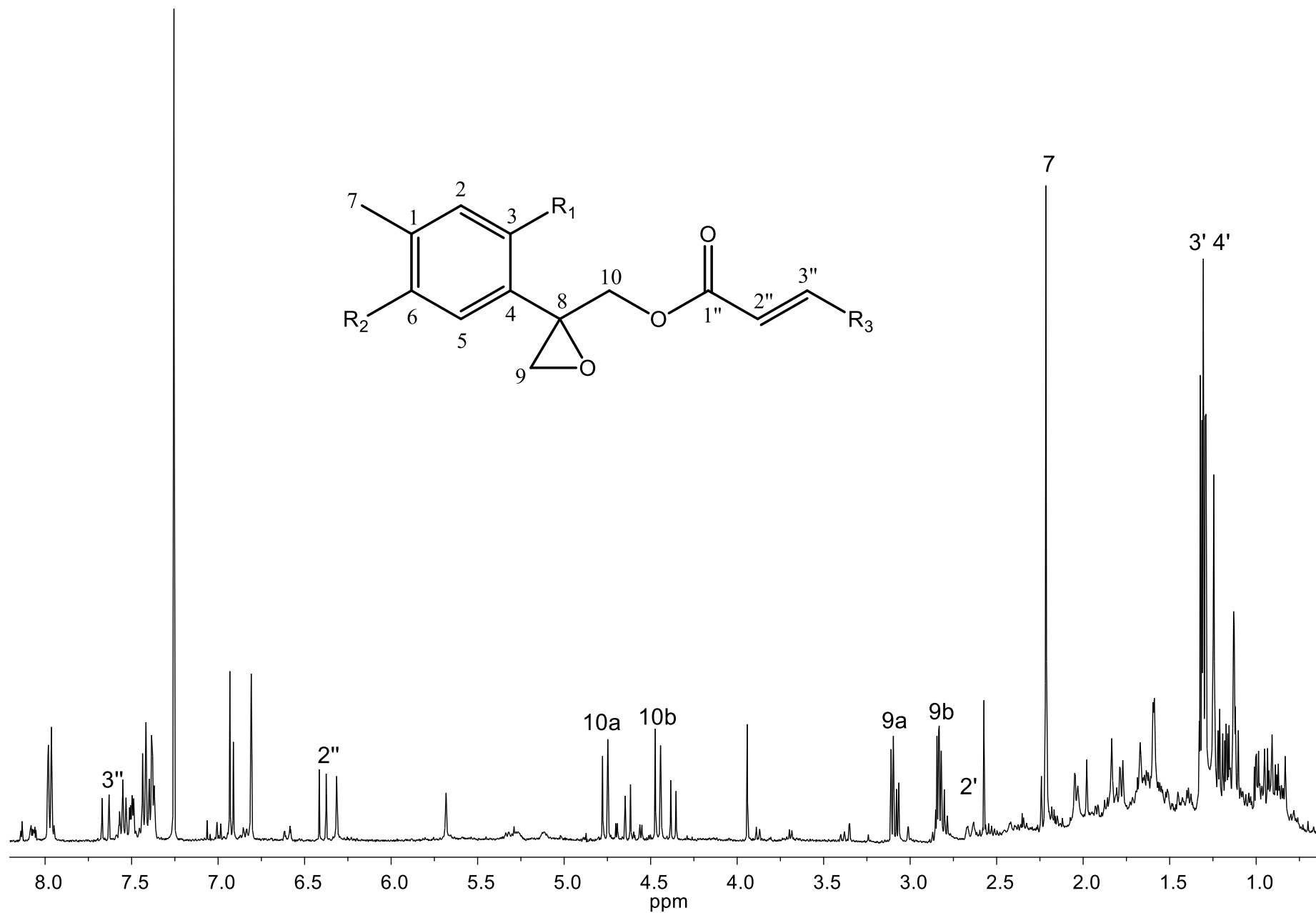
Realizando una búsqueda bibliográfica se encontró que este compuesto fue reportado por Bolhmann y colaboradores en 1969 como isobutirato de 10-(2-metilbutiriloxi)-8,9-epoxitimilo (**5c**), posteriormente se aisló de los aceites esenciales de la raíz de la planta *Inula helenium* (Stojakwska *et al*, 2006), así como del extracto metanólico de la raíz de *Arnica montana* (Weremczuk *et al*, 2006), es importante mencionar que los datos de RMN de  $^1\text{H}$  para este compuesto fueron descritos solamente por Bolhmann y colaboradores; sin embargo, no se ha podido establecer una comparación con los datos obtenidos experimentalmente debido la diferencia de los disolventes empleados para su análisis por RMN.

**Tabla 6.** Datos de RMN de  $^1\text{H}$  para el compuesto **5c**.

Posición	<i>A. glabrata</i> (CCl <sub>4</sub> )	Experimental (CDCl <sub>3</sub> )
<b>2</b>	6.78	6.84
<b>5</b>	7.29	7.33
<b>6</b>	6.96	7.02
<b>7</b>	2.34	2.34
<b>9a</b>	2.87	3.01
<b>9b</b>	2.79	2.76
<b>10a</b>	4.45	4.56
<b>10b</b>	4.11	4.18
<b>2'</b>	2.79	2.82
<b>3'</b>	1.29	1.33
<b>4'</b>	1.29	1.33
<b>2''</b>	2.35	2.34
<b>3a''</b>	1.50	1.60
<b>3b''</b>	1.50	1.42
<b>4''</b>	1.08	1.07
<b>5''</b>	0.81	0.82

Por otro lado, un lote de 20.4 g de extracto hexánico de las hojas de *A. glabrata* de la colecta de Pátzcuaro se sometió a separación cromatográfica en

una columna de 4 cm de diámetro con 6 pulgadas de gel de sílice como fase estacionaria y con mezclas de hexanos-AcOEt (19:1, 9:1, 17:3 y 4:1) de la cual se obtuvieron 77 fracciones que se monitorearon por cromatografía en capa fina y RMN de  $^1\text{H}$ . En la fracción 40 se obtuvieron 50 mg de una miel verde compuesta por una mezcla de timoles (Figura 35), por lo que se sometió a cromatografía en placa preparativa con una mezcla hexanos-acetona (7:3), se obtuvieron 20 mg de una miel verde en la banda principal con un  $R_F = 0.42$  en cuyo espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 36) se observó una mezcla de epoxitimoles observándose señales de un doble enlace *trans* que sugirió la presencia de un grupo cinamato, por lo cual se sometió a una segunda cromatografía en placa preparativa con la polaridad hexanos-acetona (4:1), se obtuvieron dos bandas las cuales se analizaron por RMN de  $^1\text{H}$ , la banda menos polar correspondió al compuesto **25**, mientras que en el espectro de la segunda banda (Figura 37) se observó en 7.67 ppm una señal doble con  $J = 16.0$  Hz para el protón de la posición H-3'', en 7.50 ppm se apreció una señal múltiple para los protones de las posiciones H-6'' y H-8'' del anillo de cinamato, de 7.41-7.38 ppm se localizó una señal múltiple que integró para tres protones correspondiente a H-7'', H-9'' y H-5'', en 6.90 ppm se localizó una señal simple para el protón H-5 del anillo aromático, en 6.81 ppm se observó una señal simple para el protón H-2 del anillo aromático, en 4.63 y 4.36 ppm se localizaron dos señales dobles con  $J = 12.0$  Hz para los protones del metileno H-10, en 6.41 ppm se observó una señal doble con  $J = 16.0$  Hz para el protón vinílico de cinamato H-2'', mientras que en 3.07 ppm se localizó la señal doble con  $J = 5.2$  Hz del protón H-9a. En 2.83 ppm se observó una señal séptuple con  $J = 7.2$  Hz para el protón metínico de isopropilo de H-2', en 2.82 ppm se localizó la señal doble con  $J = 5.2$  Hz del protón H-9b, en 2.21 ppm se observó una señal simple que integró para tres protones pertenecientes al metilo de la posición H-7, en 1.31 ppm se localizó una señal doble con  $J = 7.2$  Hz para seis protones correspondiente a los metilos de isopropilo H-3' y H-4'.



**Figura 35.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  a 400 MHz en  $\text{CDCl}_3$  de la fracción 40.

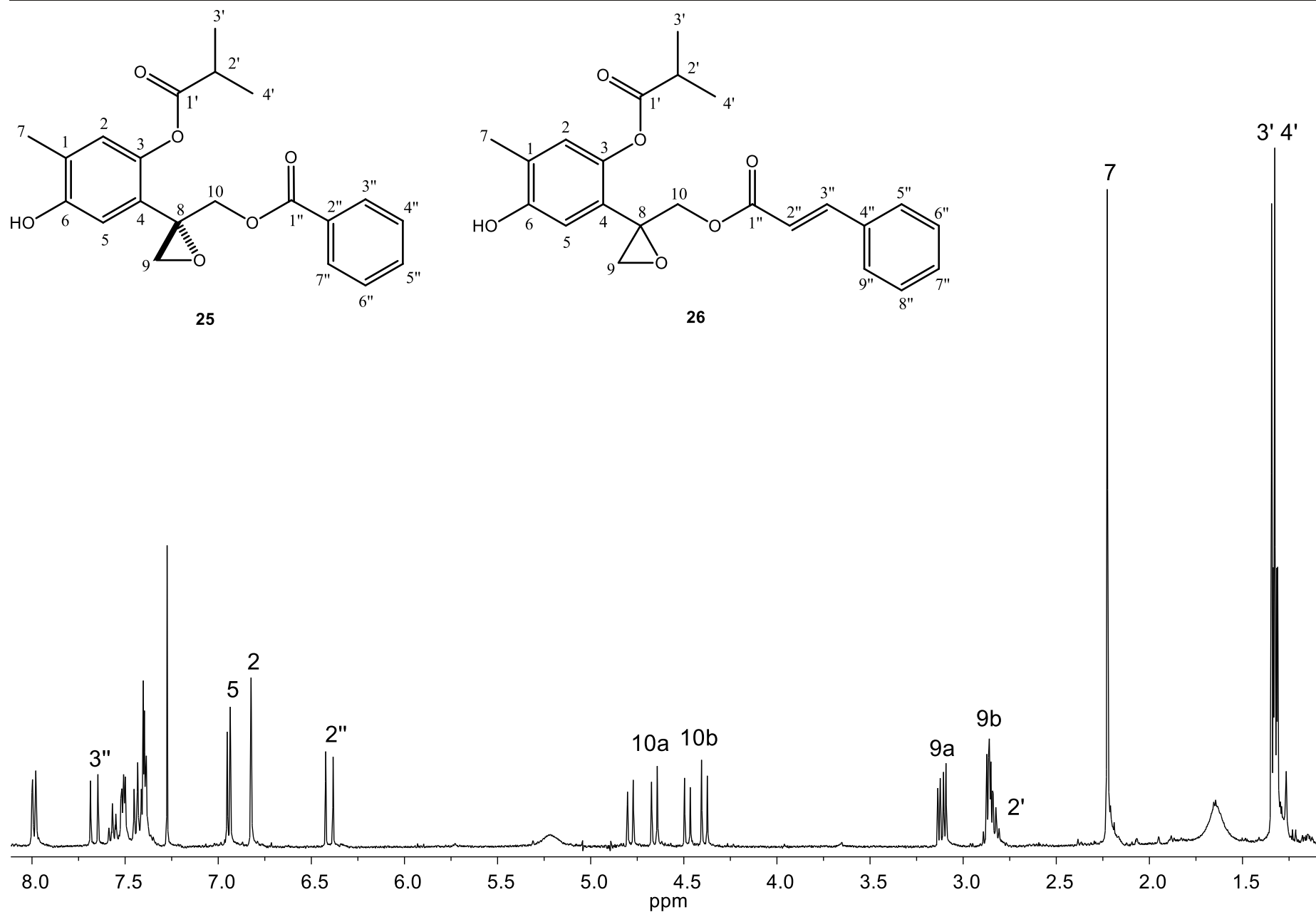
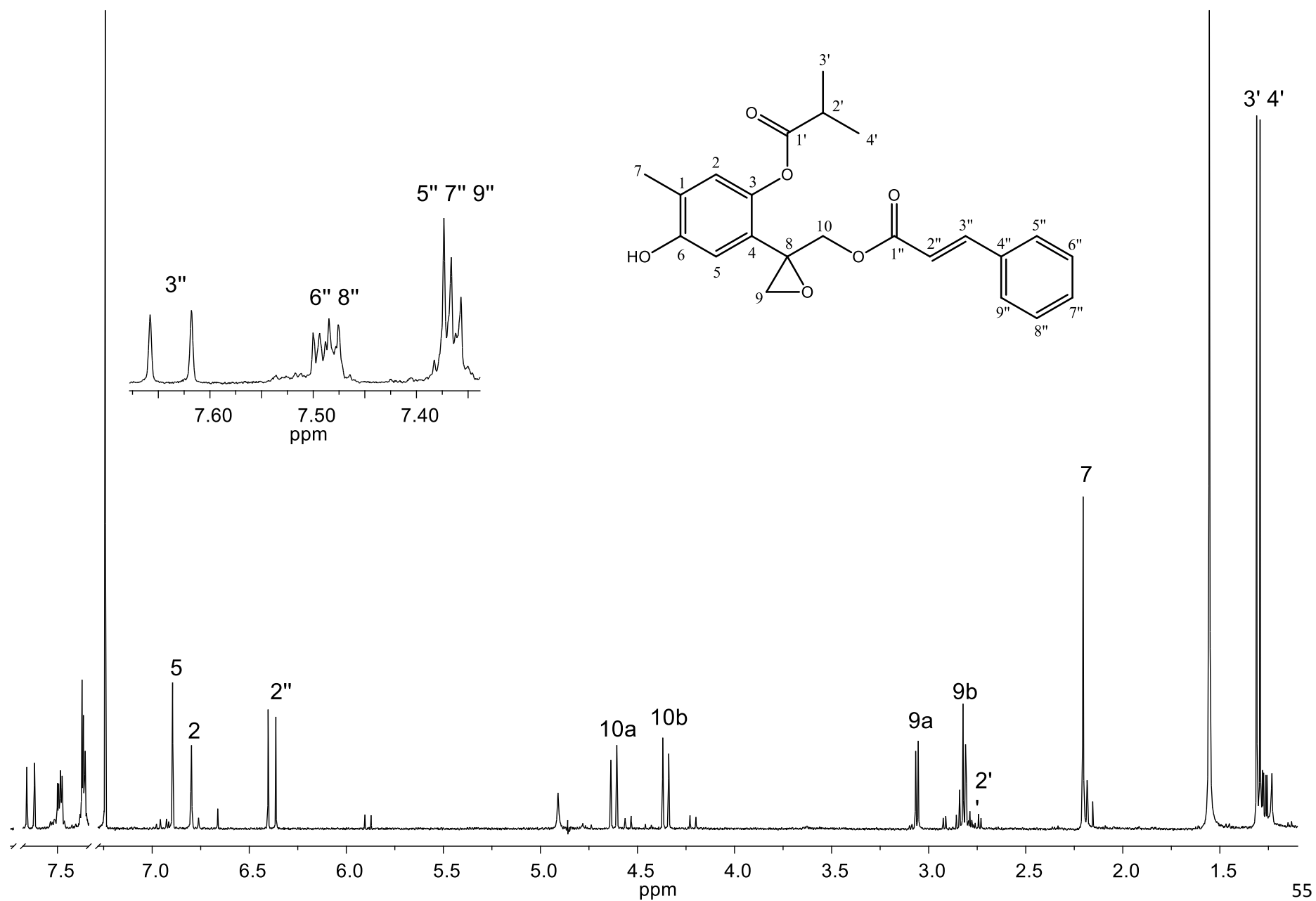


Figura 36. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  a 400 MHz en  $\text{CDCl}_3$  de la mezcla de compuestos 25 y 26.





**Figura 37.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  a 400 MHz en  $\text{CDCl}_3$  del isobutirato de 10-cinamoiloxi-6-hidroxi-8,9-epoxitimilo (**26**).

Realizando una búsqueda bibliográfica se encontró que este compuesto fue descrito por Bohlmann y colaboradores en 1977 como isobutirato de 10-cinamoiloxi-6-hidroxi-8,9-epoxitimilo (**26**) del extracto de *Ageratina glabrata* de una mezcla de Et<sub>2</sub>O-MeOH-Éter de petróleo (1:1:1) y de las partes aéreas de *Ageratina anisochroma* (Tamayo-Castillo, 1988). En la tabla 7 se muestran los datos reportados por Bohlmann y los experimentales correspondientes al compuesto **26** los cuales mostraron diferencias significativas por lo que es importante completar el análisis por RMN de 1D y 2D, para establecer de manera inequívoca la estructura de este compuesto.

**Tabla 7.** Datos de RMN de <sup>1</sup>H en CDCl<sub>3</sub> para el isobutirato de 10-cinamoiloxi-6-hidroxi-8,9-epoxitimilo (**26**).

Posición	Experimental	Literatura
<b>2</b>	6.81	6.70
<b>5</b>	6.90	6.83
<b>7</b>	2.21	2.18
<b>9a</b>	3.07*	2.67*
<b>9b</b>	2.82	2.88
<b>10a</b>	4.63*	4.18*
<b>10b</b>	4.36	4.30
<b>2'</b>	2.83	
<b>3'</b>	1.31	1.96
<b>4'</b>	1.31	1.96
<b>3''</b>	6.41	
<b>2''</b>	7.67	
<b>5'', 7'', 9''</b>	7.14-7.38	
<b>6'' 8''</b>	7.50	

Por otra parte, un lote de 26 g de los extractos metanólicos de hojas de la colecta de Pátzcuaro se sometió a cromatografía en una columna de 4.5 cm de diámetro con gel de sílice de fase normal como fase estacionaria y mezclas de hexanos-acetona (4:1, 7:3, 3:2, 1:1) y finalmente se eluyó con metanol, con lo que se obtuvieron 20 fracciones, en la polaridad hexanos-acetona (7:3) se obtuvieron 2.02 gramos de una miel rosa, que se recromatografiaron en una columna de 2.5 cm de diámetro con 6 pulgadas de gel de sílice como fase estacionaria y mezcla de hexanos-AcOEt (4:1) como fase móvil, de donde se obtuvieron 900 mg de una miel roja, de la cual una muestra se analizó por RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 38) en su espectro se observó en 7.97 ppm una señal doble de dobles con  $J = 8.4$  y  $1.2$  Hz, correspondiente a los protones de la posición H-3'' y H-7'', en 7.53 ppm se observó una señal triple de triples con  $J = 7.6$  y  $1.3$  Hz para el protón aromático H-5'', mientras que en 7.38 ppm se encontró una señal doble de dobles de dobles con constantes de acoplamiento de  $J = 8.8$ ,  $7.6$ ,  $1.2$  Hz, para dos protones aromáticos H-4'' y H-6'', respectivamente; en 6.63 ppm se localizó una señal simple para el protón de la posición H-2. En 6.60 ppm se apreció una señal simple para el protón de la posición H-5, en 4.64 ppm se observó un sistema AB que casi colapsa a un sistema  $A_2$  observándose sus respectivas satelites con un valor de  $J = 12.4$  Hz, en 4.56 ppm se observó una señal doble con  $J = 12.0$  Hz para el protón H-10a, en 4.48 ppm apareció la señal doble con  $J = 12.0$  Hz para el protón H-10b correspondientes a los protones base de benzoato. En 2.50 ppm se localizó la señal séptuple con  $J = 6.4$  Hz para el protón metínico de la posición H-2', en 2.14 ppm se localizó la señal simple para el metilo H-7, en 1.07 ppm se observó una señal doble con  $J = 6.4$  Hz de los metilos de isopropilo H-3' y H-4'.

En el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 39) se observaron en 177.8 y 166.9 ppm las señales de carbonilo de los ésteres C-1' y C-1'', respectivamente, en 149.2 y 147.1 ppm se observaron dos señales para los carbonos cuaternarios base de oxígeno de las posiciones C-6 y C-3 respectivamente, en 133.5 ppm se observó la señal del carbono C-5'', entre 129.7 y 112.7 ppm se localizaron el resto de las señales de los carbonos aromáticos de la molécula, en 77.8 ppm se observó la señal para el carbono cuaternario base de alcohol C-8, en 67.8 ppm se encontró la señal del carbono

base de oxígeno C-9, en 67.2 ppm se encontró la señal del carbono base de éster C-10, en 33.8 ppm se ubicó la señal del carbono terciario base de isopropilo de la posición C-2'; finalmente, en 18.7 y 15.6 ppm se localizaron las señales de los tres carbonos de metilo de las posiciones C-3', C-4' y C-7, respectivamente.

Realizando una búsqueda en la literatura se encontró que este compuesto había sido reportado anteriormente en nuestro grupo de trabajo (Talavera, 2012) los desplazamientos experimentales de RMN de  $^1\text{H}$  coinciden con los reportados para el compuesto **29**. Se puede proponer que este compuesto es producto de la apertura y racemización del anillo de epóxido de **25**. (Delle Monache, *et al*, 1984), debido al valor de rotación específica cercano a cero.

**Tabla 8.** Datos de RMN de  $^1\text{H}$  en  $\text{CDCl}_3$  para el isobutirato de 10-benzoiloxi-6,8,9-trihidroxitimilo (**29**).

Posición	Experimental	Literatura
<b>2</b>	6.63	6.63
<b>5</b>	6.60	6.64
<b>7</b>	2.14	2.14
<b>9a</b>	4.66	4.65
<b>9b</b>	4.63	4.65
<b>10a</b>	4.56	4.58
<b>10b</b>	4.48	4.50
<b>2'</b>	2.50	2.50
<b>7</b>	2.14	2.14
<b>3', 4'</b>	1.07	1.06
<b>3'', 7''</b>	7.97	7.96
<b>5''</b>	7.53	7.52
<b>4'', 6''</b>	7.38	7.36

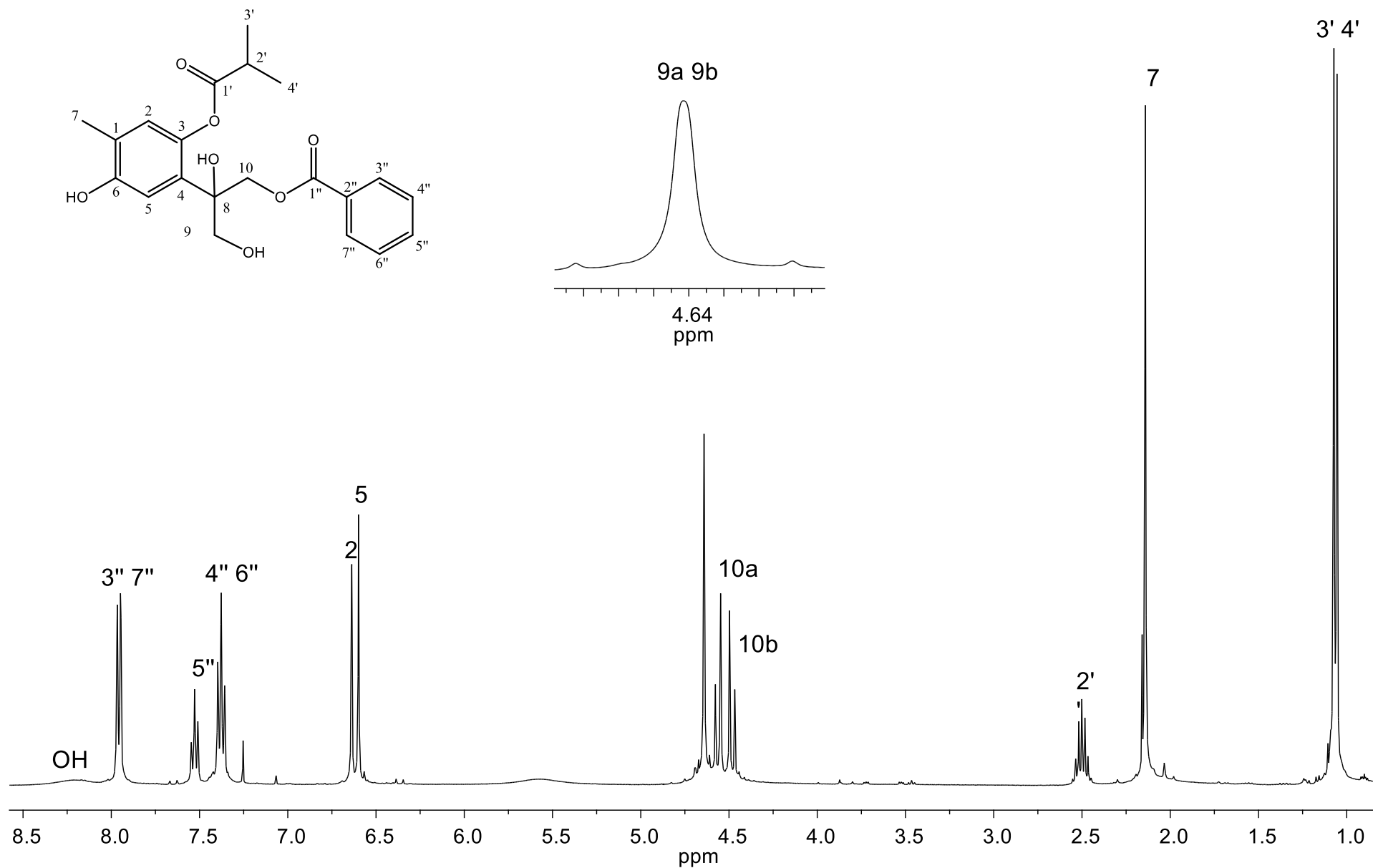


Figura 38. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  a 400 MHz en  $\text{CDCl}_3$  del isobutirato de 10-benzoiloxy-6,8,9-trihydroxitimilo (29).

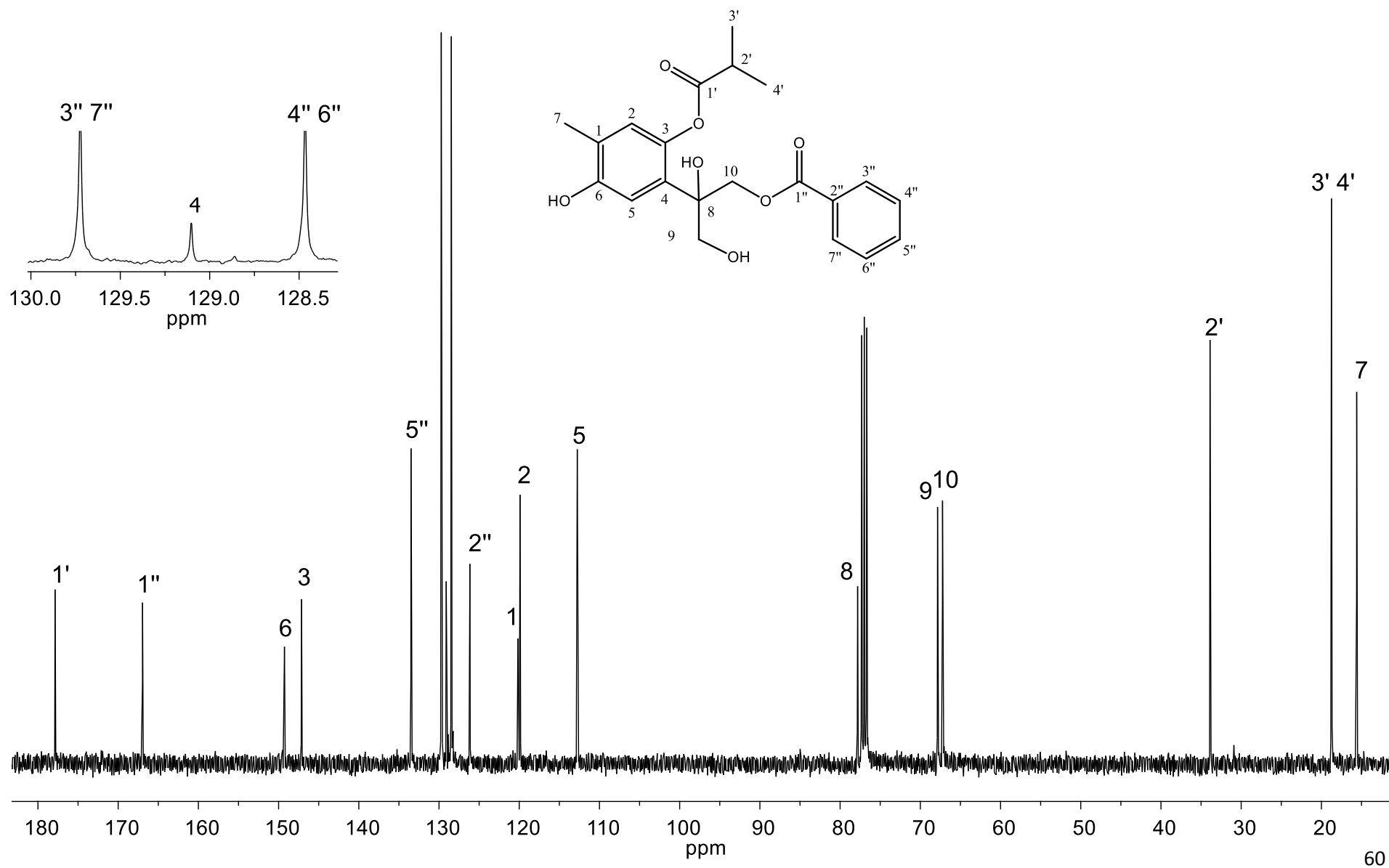


Figura 39. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  a 100 MHz en  $\text{CDCl}_3$  del isobutirato de 10-benzoiloxi-6,8,9-trihydroxitimilo (29).

Del fraccionamiento de 3.67 g del extracto hexánico de hojas de la colecta de Pátzcuaro en la polaridad hexanos-AcOEt (4:1) se obtuvieron 90 mg de una miel amarilla en cuyo espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 40) se observó una mezcla de derivados de timol, donde sobresalen las señales características de los compuestos **23** y **25** así como una señal séptuple en 2.52 ppm y dos señales dobles en 1.30 ppm para un segundo sistema de isopropilo, lo que sugirió la presencia de un segundo sistema de isobutirato, por lo cual se decidió someter a placa preparativa un lote de 90 mg que se llevaron a cabo cuatro desarrollos en un sistema de solventes hexanos-AcOEt (19:1). De la banda principal con un  $R_F = 0.84$  se obtuvieron 15 mg de una miel amarilla la cual se analizó por RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 41). En 7.34 ppm se observó la señal doble con  $J = 7.6$  Hz para el protón de la posición H-5 del anillo aromático de timol, en 7.03 ppm se ubicó una señal doble de dobles con  $J = 7.6$  y 0.4 Hz para el protón H-6, en 6.85 ppm se observó una señal simple perteneciente al protón H-2. En 4.56 y 4.18 ppm se localizaron las señales del metileno H-10, ambas señales presentaron una  $J = 12.0$  Hz; en 3.02 y 2.78 ppm se encontraron las señales dobles con  $J = 4.0$  Hz para los protones H-9, en 2.84 ppm se localizó una señal séptuple con  $J = 7.0$  Hz para el protón de la posición H-2' de isobutirato, en 2.51 ppm se localizó una segunda señal séptuple con  $J = 7.0$  Hz que corresponde al metino de isopropilo de la posición H-2'', en 2.33 ppm se ubicó una señal simple que integró para tres protones pertenecientes al metilo aromático H-7, en 1.32 ppm se encontró una señal doble con  $J = 7.0$  Hz que integró para los 6 protones del metilos H-3' y H-4', en 1.10 ppm se localizó una señal doble con  $J = 7.0$  Hz que se asignó al metilo de la posición H-3'', finalmente en 1.07 ppm se observó una señal doble con  $J = 7.0$  Hz para los protones del metilo H-4''.

En su espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 42) se observaron 15 señales. En 176.4 y 175.8 ppm se localizaron las señales para los carbonos de carbonilo C-1'' y C-1' respectivamente, en 148.5 ppm se ubicó la señal para el carbono base de éster C-3, en 139.9 ppm la señal para el carbono cuaternario C-1, en 128.9 ppm se localizó la señal para el carbono C-5, en 126.7 ppm se observó la señal para el carbono C-6, en 125.9 ppm se ubicó la señal para el carbono C-4, en 122.9 ppm se observó la señal del carbono C-2, en 64.8 ppm se localizó la

señal del carbono base de éster C-10, en 56.9 ppm se ubicó la señal del carbono base de epóxido C-8, en 50.6 ppm se ubicó la señal para el carbono base de epóxido C-9, en 34.1 ppm se localizó la señal del carbono terciario de isopropilo C-2', en 33.8 ppm se ubicó la señal para el carbono metínico de isopropilo C-2'', en 21.1 ppm se observó la señal para el carbono aromático C-7; finalmente, entre 19.0 y 18.8 ppm se ubicaron las señales correspondientes a los carbonos de los metilos de ambos grupos isobutirato.



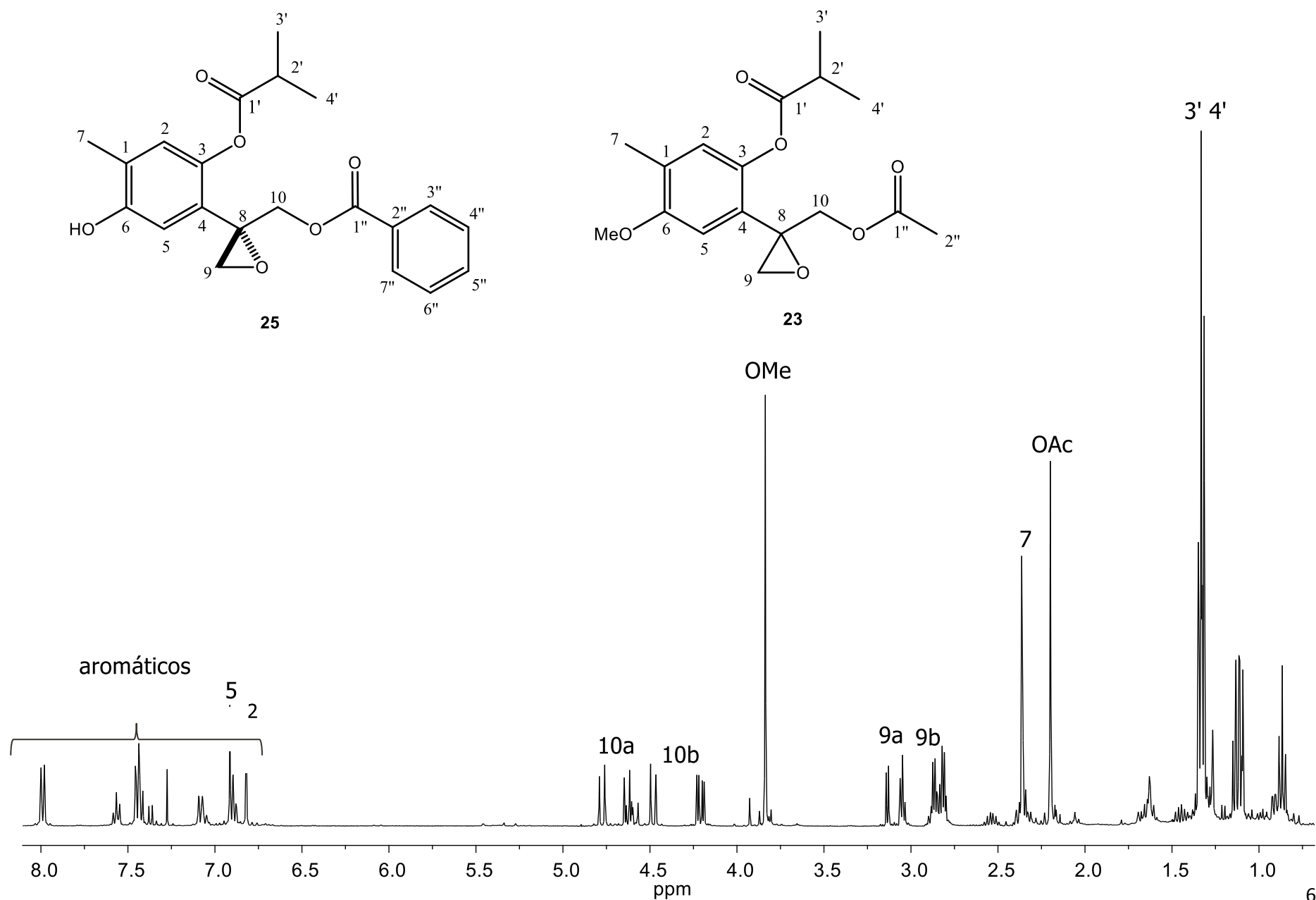


Figura 40. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  a 400 MHz en  $\text{CDCl}_3$  de la fracción 42.

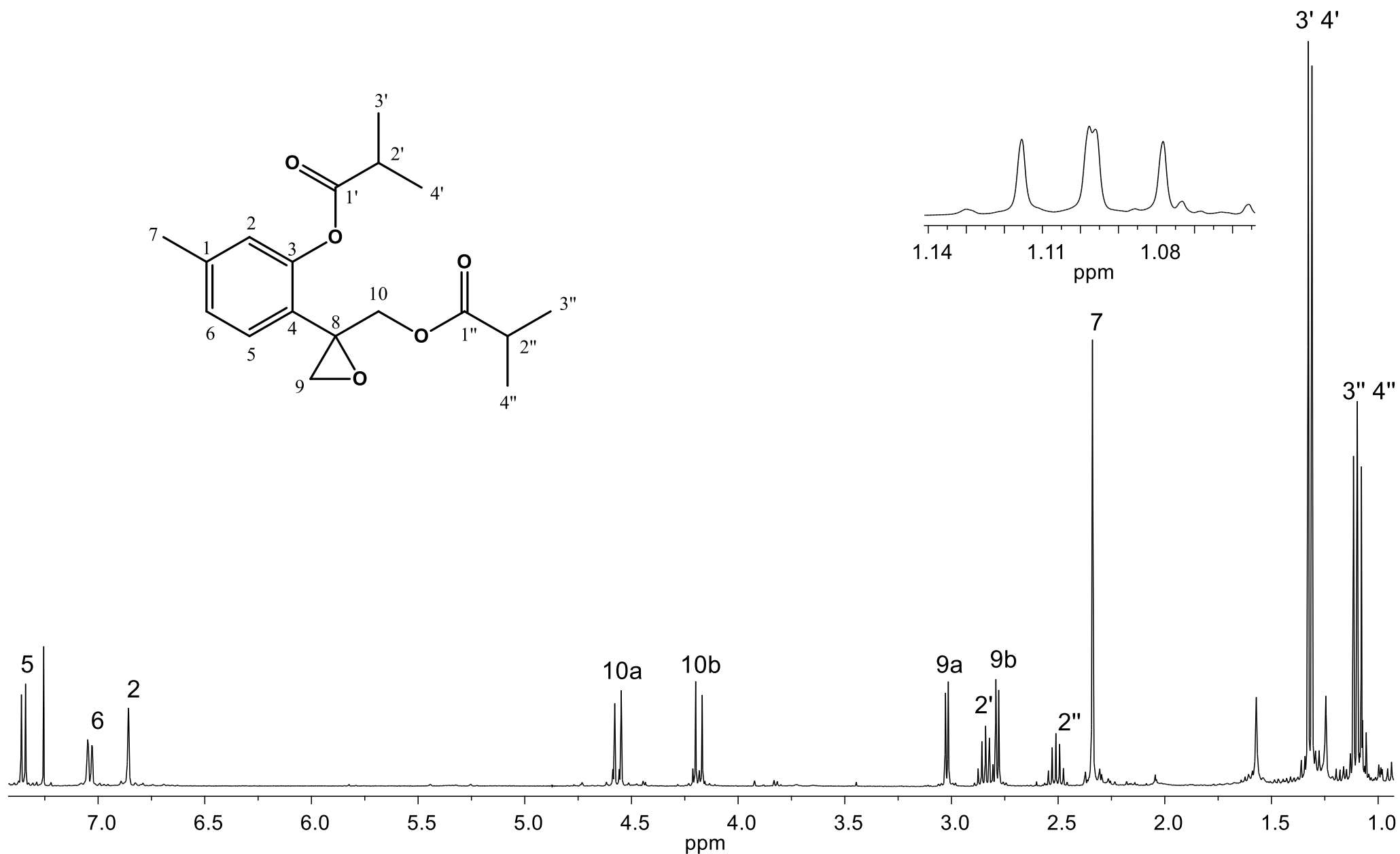


Figura 41. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H a 400 MHz en CDCl<sub>3</sub> del el isobutirato de 10-isobutyrioxi-8,9-epoxitimo (**20**).

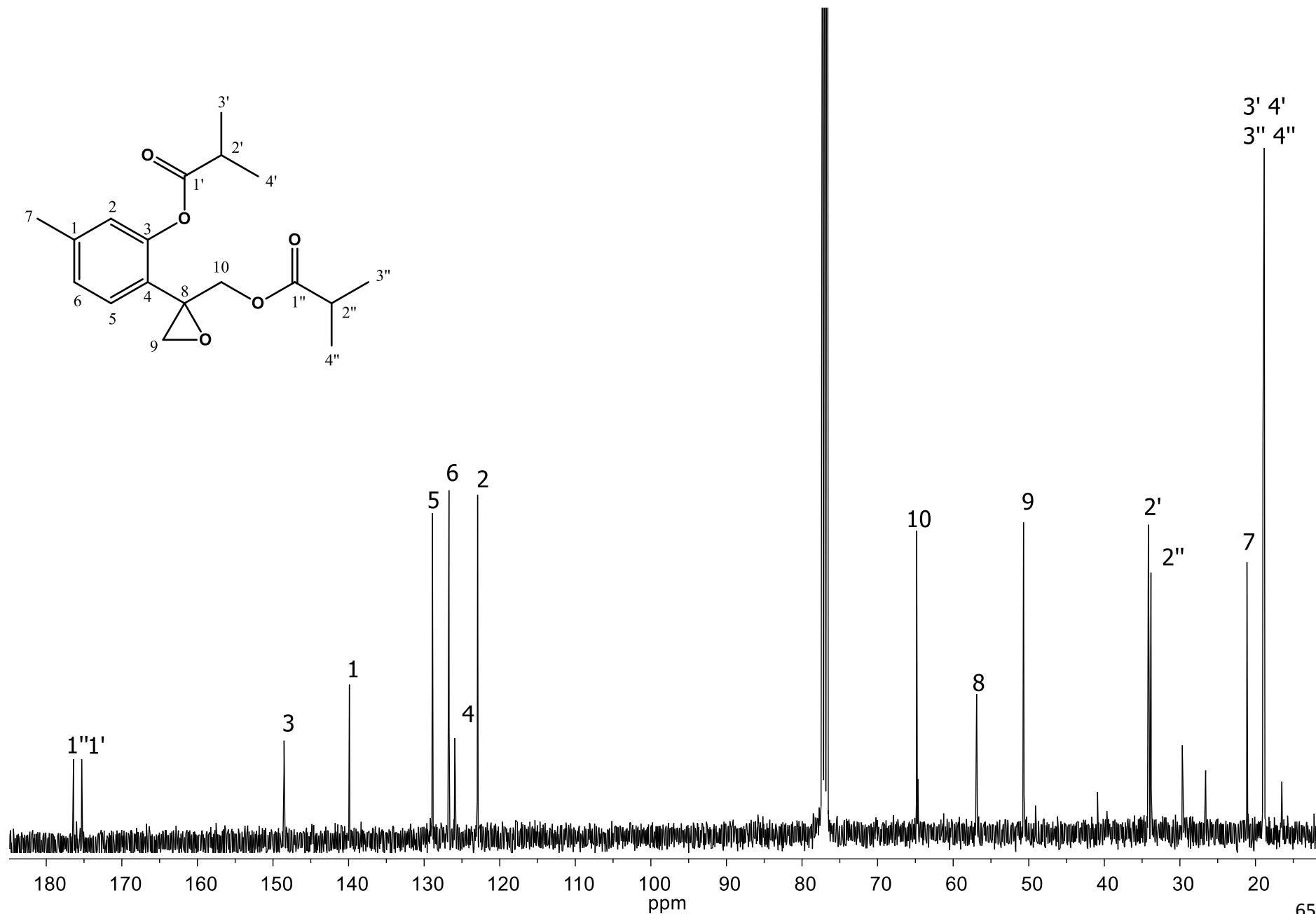
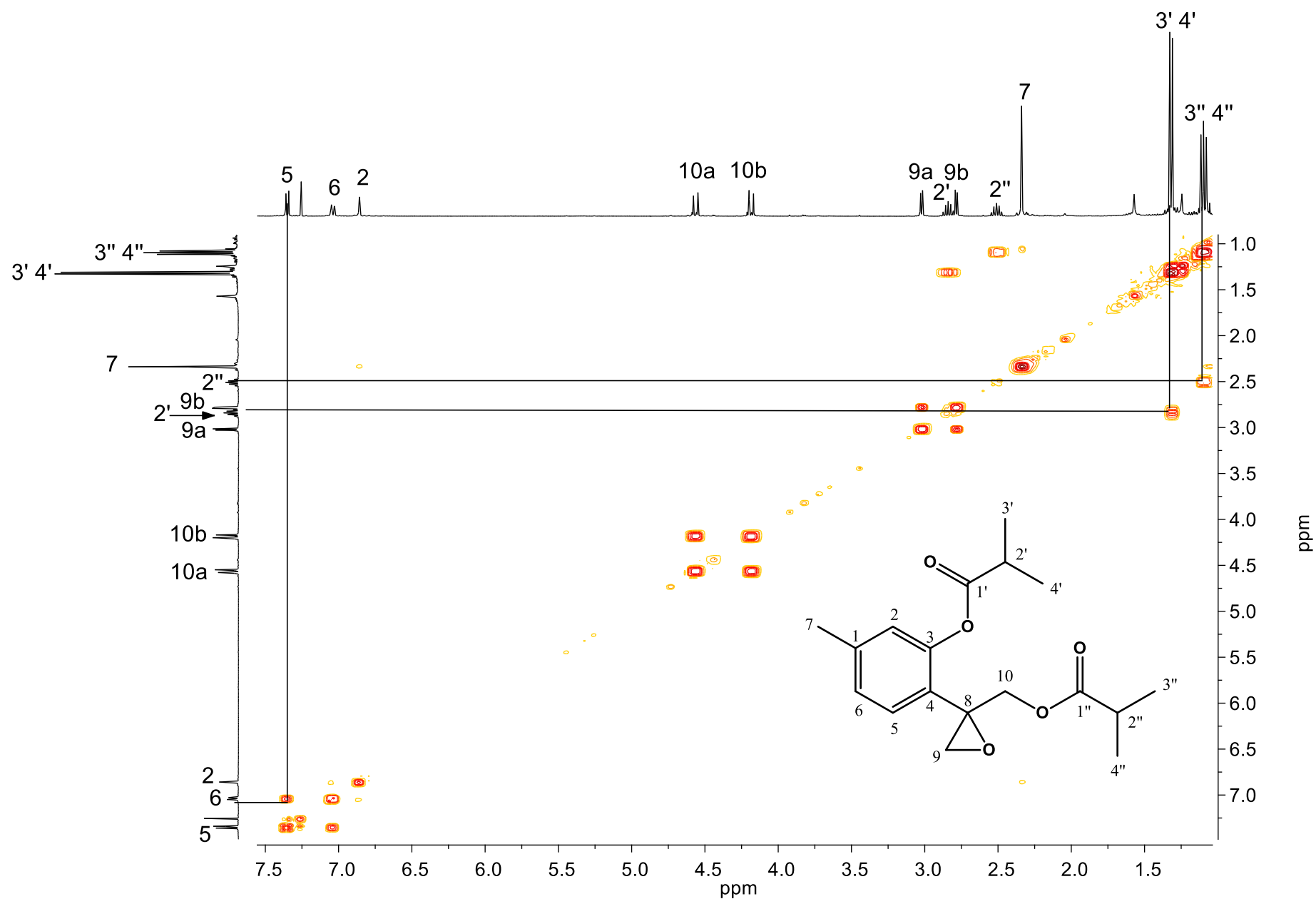


Figura 42. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  a 100 MHz en  $\text{CDCl}_3$  del el isobutirato de 10-isobutiriloxy-8,9-epoxitimilo (20).

En el experimento COSY (Figura 43) se observó la correlación entre la señal doble en 7.34 ppm del protón H-5 con la señal doble de dobles en 7.03 ppm para el protón H-6 con lo cual se pudo comprobar la trisustitución del anillo aromático de timol, también se observaron las correlaciones de la señal séptuple del metino de isopropilo H-2' (2.84 ppm) con la señal doble en 1.32 ppm correspondiente a los metilos H-3' y H-4', de igual manera se observó la correlación entre la señal séptuple correspondiente a H-2'' en 2.51 ppm con las señales dobles en 1.10 y 1.07 ppm de los metilos de isopropilo H-3'' y H-4'', con lo anterior se pudo demostrar la presencia de dos sustituyentes isobutirato en la estructura.

En el experimento HETCOR (Figura 44) se observó la correlación entre la señal simple en 6.85 ppm correspondiente a la posición H-2 y la señal de carbono terciario C-2 en 122.9 ppm, la señal doble en 7.34 ppm del protón H-5 mostró una correlación con la señal de carbono C-5 en 128.9 ppm, la señal en 7.03 ppm correspondiente a H-6 correlacionó con la señal del carbono terciario C-6 en 126.7 ppm. Por otra parte, se observaron las correlaciones entre la señal de 2.84 ppm de H-2' con la señal de carbono terciario C-2' en 34.1 ppm y la correlación de las señales en 1.32 ppm con la señal en 19.0 ppm para C-3' y C-4', la señal séptuple correspondiente a H-2' en 2.51 ppm mostró una correlación con los carbonos C-3'' y C-4'' en 18.8 ppm pertenecientes a los metilos de un sistema de isopropilo.

En el experimento *g*-HMBC (Figura 45) se observó la correlación entre los protones H-3'' y H-4'' en 1.32 ppm con la señal del carbonilo C-1'' en 176.4 ppm, este a su vez presenta una correlación con los protones H-10a y H-10b en 7.56 y 4.18 ppm respectivamente, los cuales correlacionaron con C-9 base de epóxido en 50.7 ppm y con el carbono cuaternario C-4 en 125.9 ppm, este último a su vez mostró correlación con el protón de la posición H-6 en 7.03 ppm. Finalmente, se observó la correlación entre el protón H-6 en 7.03 ppm con C-7 en 21.1 ppm, en base a lo anterior se pudo determinar la conectividad de esta estructura como se muestra en la figura 46 y en la tabla 9.



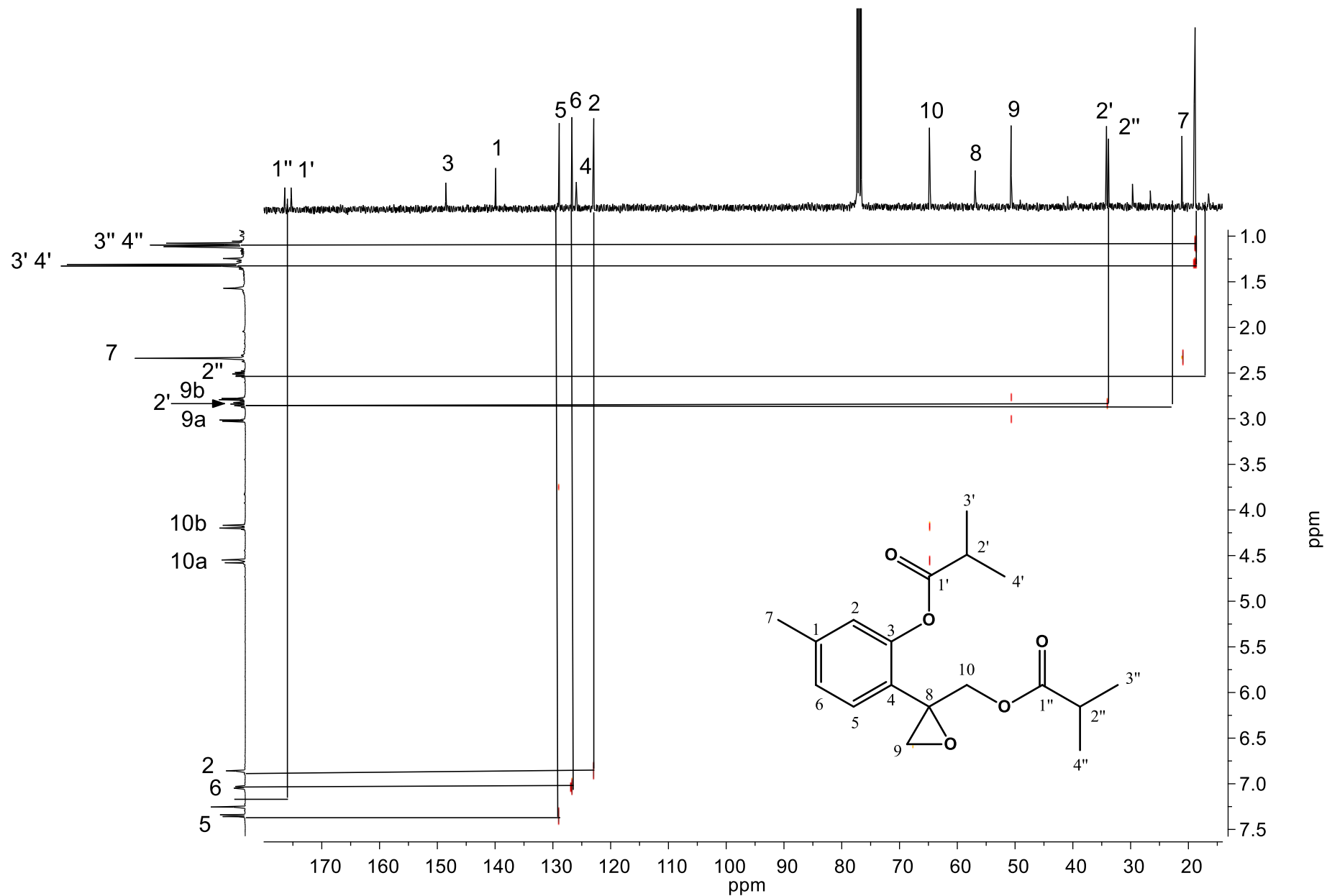


Figura 44. Experimento HETCOR del isobutirato de 10-isobutiriloxi-8,9-epoxitimilo (20).

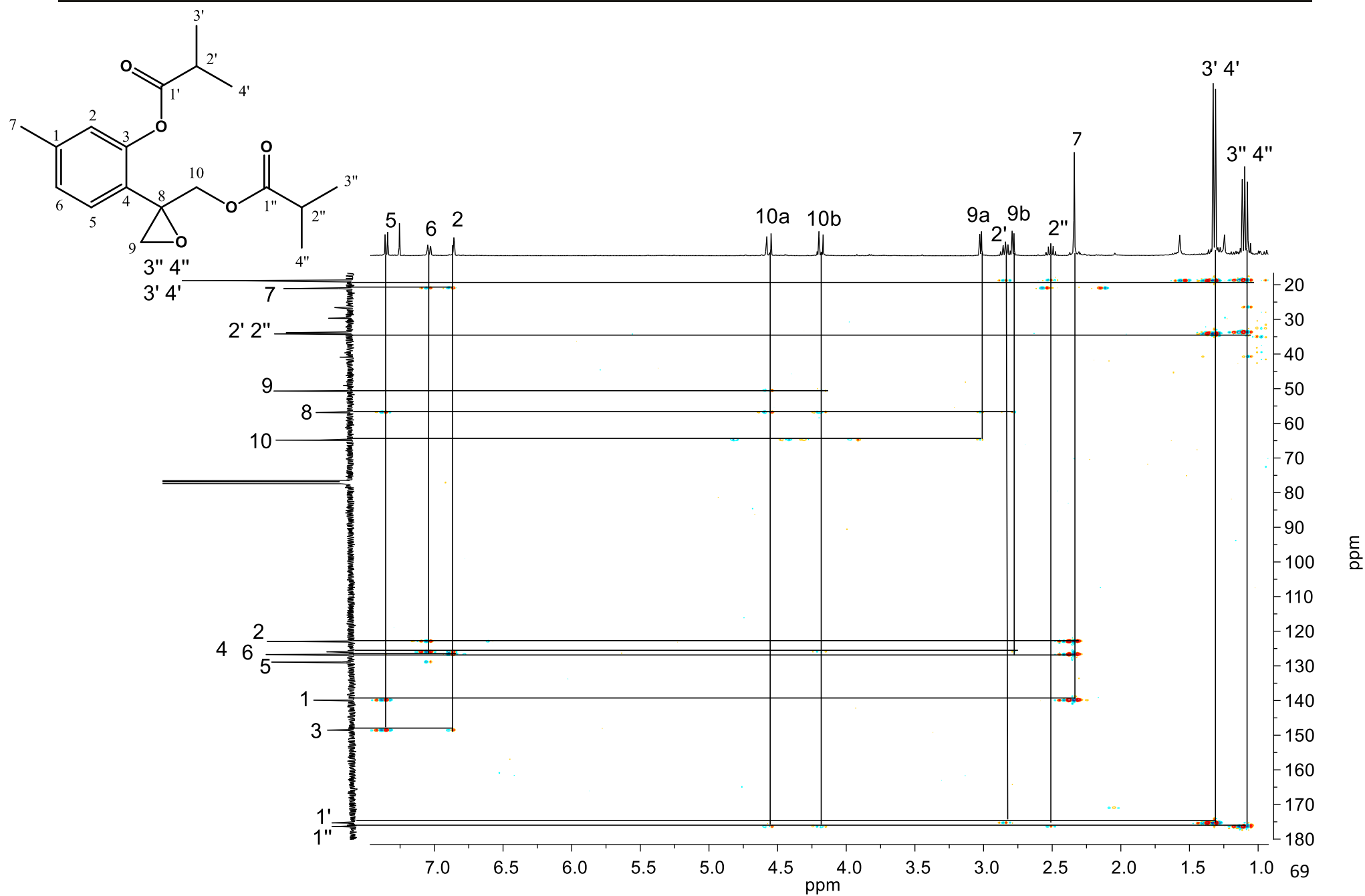


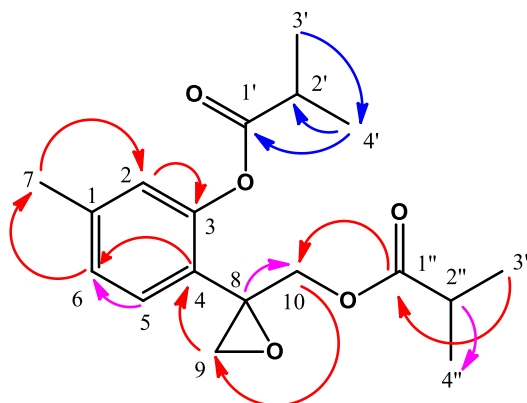
Figura 45. Experimento  $g$ -HMBC del isobutirato de 10-isobutiriloxy-8,9-epoxitimilo (**20**).

**Tabla 9.** Datos de RMN del compuesto **20**.

Posición	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	<i>g</i> -HMBC
1	139.9		/
2	122.9	6.85	148.5, 126.7, 125.9, 21.1
3	148.5		/
4	125.9		/
5	128.9	7.34	148.5, 139.9, 56.9
6	126.7	7.03	125.9, 122.9, 21.1
7	21.1	2.33	139.9, 126.7, 122.9
8	56.9		/
9	50.6	3.02 y 2.87	56.9, 64.8
10	64.8	4.56 y 4.18	176.4, 125.9, 56.9, 50.7
1'	175.8		/
2'	34.1	2.84	175.3, 18.9, 19.0
3'	19.0	1.32	175.3, 34.2, 18.9,
4'	19.0	1.32	175.3, 34.2, 19.0
1''	176.4		/
2''	33.8	2.51	176.4, 18.8
3'' 4''	19.0	1.10 y 1.07	176.4, 33.8, 18.8

Realizando una búsqueda bibliográfica se encontró que este compuesto había sido reportado anteriormente por Bohlmann y colaboradores en 1977, destacando que el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de la literatura fue medido en  $\text{CCl}_4$  por lo cual los desplazamientos reportados en la literatura no pudieron ser comparados con los obtenidos experimentales ya que presentaron diferencias significativas, por lo que es necesario medir nuestro compuesto en  $\text{CCl}_4$ .





**Figura 46.** Correlaciones observadas del *g*-HMBC del el isobutirato de 10-isobutiriloxi-8,9-epoxitimilo (**20**).

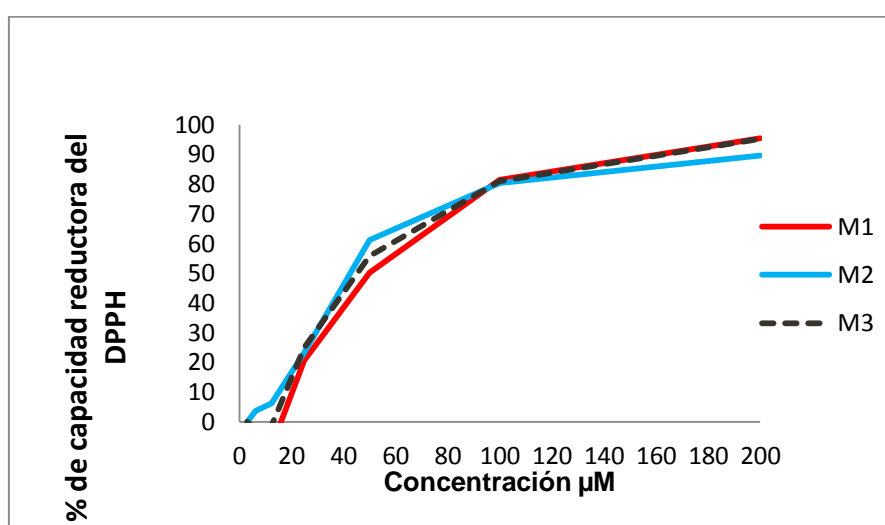
**Tabla 10.** Desplazamientos de RMN de  $^1\text{H}$  para el isobutirato de 10-isobutiriloxi-8,9-epoxitimilo (**20**).

Posición	Experimental $\text{CDCl}_3$	Literatura $\text{CCl}_4$
<b>2</b>	6.85	6.78
<b>5</b>	7.34	7.29
<b>6</b>	7.03	6.96
<b>7</b>	2.33	2.34
<b>9a</b>	3.02	2.87
<b>9b</b>	2.78	2.63
<b>10a</b>	4.56	4.45
<b>10b</b>	4.18	4.11
<b>2'</b>	2.84	2.79
<b>3'</b>	1.32	1.29
<b>4'</b>	1.32	1.29
<b>2''</b>	2.51	2.44
<b>3''</b>	1.10	1.09
<b>4''</b>	1.07	1.07

Adicionalmente, a los compuestos **25** y **29** se les realizó un ensayo de captura de radicales libres por el método de DPPH. Se ensayó una curva control empleando ácido ascórbico a concentraciones de 200, 100, 50, 25, 12.5 y 6.25  $\mu\text{g/mL}$  disuelto en DMSO. Bajo estas mismas condiciones se realizó el ensayo para el compuesto **29**. Por cada 195  $\mu\text{L}$  de muestra se agregaron 5  $\mu\text{L}$  de DPPH\* 5 mM; estas diluciones fueron preparadas en placa de 96 pocillos, se incubaron por 20 min en oscuridad. Se midió la absorbancia a 515 nm. En este ensayo el compuesto **29** mostró una capacidad importante de neutralización de DPPH pues la  $\text{CE}_{50}$  calculada fue de 52.3  $\mu\text{M}$  (Tabla 11 y gráfico 1); mientras que el compuesto **25** mostró nula actividad antioxidante. Cabe mencionar que los ensayos se llevaron a cabo por triplicado y se validaron a partir de las curvas obtenidas con el ácido ascórbico cuya  $\text{CE}_{50}$  fue de 22.6  $\mu\text{M}$  (Tabla 11).

**Tabla 11.** Resultados obtenidos en el ensayo de captura de radicales libres por DPPH.

Muestra	Captación de radicales libres DPPH $\text{CE}_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Captación de radicales libres DPPH $\text{CE}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )
Ácido ascórbico (Curva control)	3.98	22.6
compuesto <b>29</b>	22.43 $\pm$ 2.28	52.3

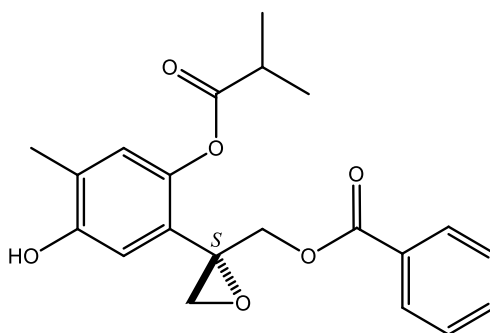


**Gráfico 1.** Representación de la captación de DPPH por triplicado del compuesto **29**.

## 7 CONCLUSIONES

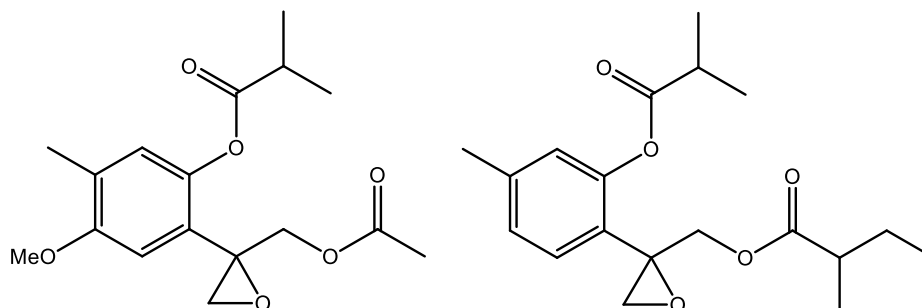
El comparativo de especímenes de *Ageratina glabrata* colectadas en las distintas zonas del Estado de Michoacán, permitió determinar que las ubicadas en la región de Pátzcuaro presentaron mayor abundancia de epoxitimoles.

Del extracto de cloruro de metileno de las hojas de *Ageratina glabrata* de la colecta de Pátzcuaro se aisló el (+)-(8*S*)-isobutirato de 10-benzoiloxi-8,9-epoxi-6-hidroxitimilo (**25**). A través de experimentos de RMN 1D y 2D, y difracción de rayos X se estableció la conectividad y configuración absoluta 8*S* de la misma mediante los parámetros Flack y Hooft; si bien con el valor de  $R = 8.6\%$  se pudo determinar la configuración absoluta, este valor es elevado, por lo que debe ser refinado.



25

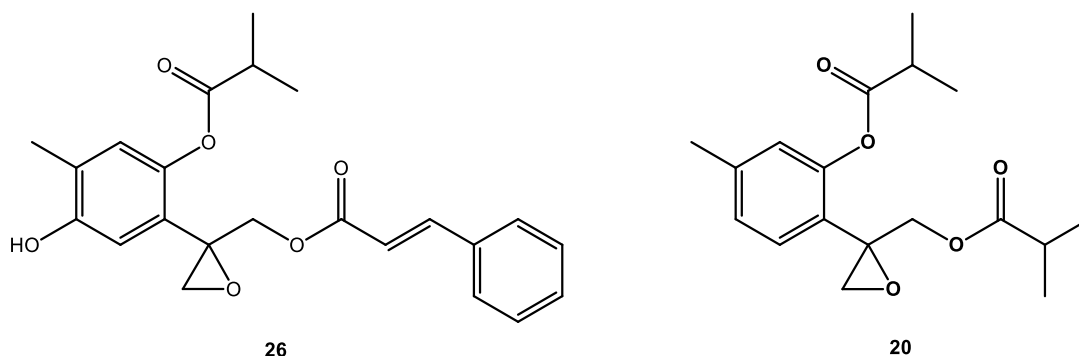
Del extracto hexánico de tallos de *Ageratina glabrata* de la colecta de Pátzcuaro se aislaron el isobutirato de 10-acetoxi-6-metoxi-8,9-epoxitimilo (**23**) y el isobutirato de 10-(2-metilbutiriloxi)-8,9-epoxitimilo (**5c**).



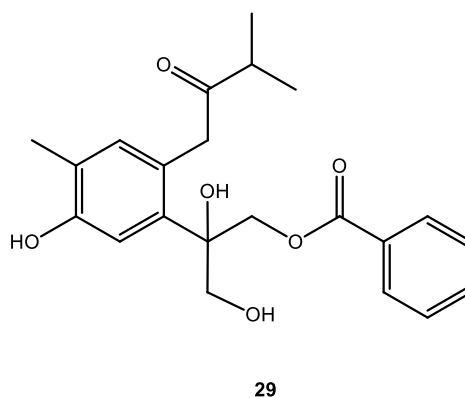
23

5c

Del extracto hexánico de hojas de *A. glabrata* de la colecta de Pátzcuaro se aisló el isobutirato de 10-cinamoiloxi-6-hidroxi-8,9-epoxitimilo (**26**) y el isobutirato de 10-isobutiriloxi-8,9-epoxitimilo (**20**).



Del extracto metanólico de las hojas de *A. glabrata* de la colecta de Pátzcuaro se aisló el isobutirato de 10-benzoiloxi-6,8,9-trihidroxitimilo (**29**). Se propone que este compuesto es producto de la apertura y racemización del anillo de epóxido, ya que este compuesto mostró una rotación específica cercana a cero.



A los compuestos **25** y **29** se les realizó un ensayo de captura de radicales libres por DPPH, donde el compuesto **25** mostró nula actividad antioxidante, mientras que el compuesto **29** presentó moderada actividad ( $22 \mu\text{g/mL}$ ).

## 8 PARTE EXPERIMENTAL

### 8.1 GENERALIDADES

Los espectros de resonancia magnética nuclear de RMN de  $^1\text{H}$  a 400 MHz y de RMN de  $^{13}\text{C}$  a 100 MHz, así como los diagramas bidimensionales de correlación de  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  (HETCOR) y  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (COSY) se determinaron en un espectrómetro Varian Mercury Plus-400. En todas las determinaciones se utilizó como disolvente deuterocloroformo ( $\text{CDCl}_3$ ) y como referencia interna se utilizó tetrametilsilano (TMS); los experimentos *g*-HSQC y *g*-HMBC se determinaron en un aparato VARIAN Mercury 300, así como los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  a 300 MHz y RMN de  $^{13}\text{C}$  a 75 MHz. Los espectros fueron procesados empleando el programa MestRe Nova.

El análisis de difracción de rayos X de monocristal se llevó a cabo en un difractómetro Bruker-Nonius CAD4 de irradiación de  $\text{CuK}_\alpha$ .

Los espectros de Infrarrojo (IR) se obtuvieron con el instrumento Thermo Scientific Nicolet Is10FT IR Spectrometer con accesorio ATR, cristal de ZnSe y región de 4000 a 650  $\text{cm}^{-1}$ , los datos se representaron en números de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) para los máximos principales de absorción.

Los puntos de fusión se obtuvieron mediante el instrumento, Fisher Scientific, los cuales no están corregidos.

Los valores de rotación específica se determinaron en  $\text{CHCl}_3$  en un polarímetro Perkin-Elmer341

Los espectros de UV fueron determinados en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 12.

Las mediciones del potencial antioxidante fueron realizadas en un espectrofotómetro de luz Ultravioleta-visible, Biotek<sup>®</sup> modelo ELx808, a una longitud de onda 515 nm, operado por el programa de computo Gen 5 versión 2.01.14. Los parámetros estadísticos de las absorbancias medidas, se determinaron, utilizando una hoja de cálculo Microsoft Office Excel<sup>®</sup> 2010.

## 8.2 MATERIA VEGETAL

*Ageratina glabrata* fue colectada en cuatro localidades del Estado de Michoacán.

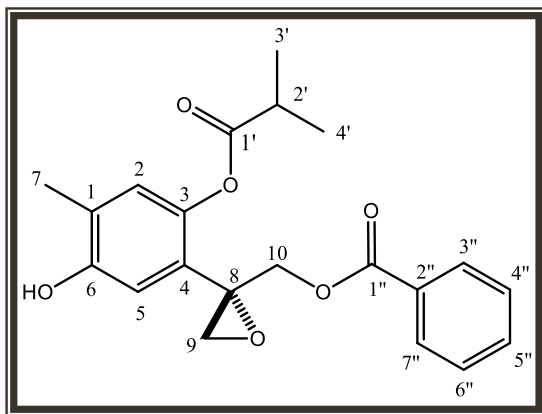
Colecta de Quiroga: 18 de febrero de 2012, km 52 carretera Quiroga-Zacapu, Colecta Mil Cumbres: 31 de agosto de 2013, km 211 carretera México-Morelia, Colecta Pátzcuaro: 19 de diciembre de 2013, desviación a Cuanajo a 1 km de la carretera Pátzcuaro-Santa Clara del Cobre, Colecta Cuanajo: 26 de febrero de 2014, km 3 de la carretera Pátzcuaro-Cuanajo.

## 8.3 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS

*Ageratina glabrata*, se separó en sus partes: raíces, tallos, hojas y flores, se secaron a la sombra por dos semanas, posteriormente se maceraron por separado en polaridad ascendente y por triplicado con hexanos, cloruro de metileno, acetato de etilo y metanol obteniendo un total de 32 extractos.

## 8.4 ANÁLISIS QUÍMICO

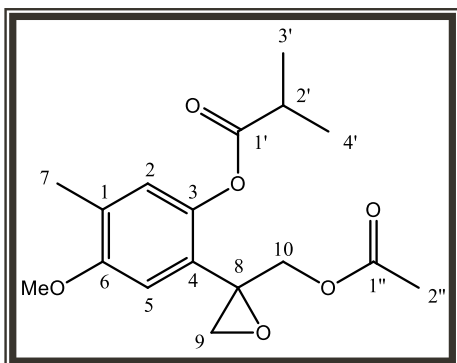
### (+)-(8S)-isobutirato de 10-benzoiloxi-8,9-epoxi-6-hidroxitimilo (25)



Del extracto de cloruro de metileno de hojas de la colecta de Pátzcuaro se obtuvieron 100 mg de cristales incoloros p.f. 112-114 °C [ $\alpha$ ]<sub>589</sub> +9.9, [ $\alpha$ ]<sub>578</sub> +10.0, [ $\alpha$ ]<sub>546</sub> +11.0, [ $\alpha$ ]<sub>436</sub> +17.1, (c 0.8, CHCl<sub>3</sub>); UV (EtOH)  $\lambda_{\text{max}}$  nm: 228; IR (CHCl<sub>3</sub>)  $\nu_{\text{max}}$  cm<sup>-1</sup>: 3595, 3446, 2983, 1749, 1722, 1453, 1273, 1119 RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 7.97 (2H, dd,  $J$  = 7.8, 1.5 Hz, H-3'', H-7''), 7.55 (1H, tt,  $J$  = 7.8, 1.5 Hz, H-5''), 7.41 (2H, t,  $J$  = 7.8 Hz, H-4'', H-6''), 6.93 (1H, s, H-5), 6.81 (1H, s, H-2), 4.76 (1H, d,  $J$  = 12.3 Hz, H-10a), 4.47 (1H, d  $J$  = 12.3 Hz, H-10b), 3.10 (1H, d,  $J$  = 5.3 Hz, H-9a), 2.85 (1H, d,  $J$  = 5.3 Hz, H-9b), 2.82 (1H, sept,  $J$  = 6.8 Hz, H-2'), 2.21 (3H, s, H-7), 1.30 (3H, d,  $J$  = 6.8 Hz, H-3'), 1.29 (3H, d,  $J$  = 6.8 Hz, H-4'). RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 175.0 (C, C-1'), 166.0 (C, C-1''), 151.7 (C, C-6), 141.7 (C, C-3), 133.2 (CH, C-5''), 129.7 (CH, C-3'', C-7''), 129.5 (C, C-4), 128.4 (CH, C-4'', C-6''), 127.1 (C, C-2''), 125.8

(C, C-1), 124.7 (CH, C-2), 114.7 (CH, C-5), 65.5 (CH<sub>2</sub>, C-10), 57.0 (C, C-8), 51.0 (CH<sub>2</sub>, C-9), 34.1 (CH, C-2'), 19.0 (CH<sub>3</sub>, C-3', C-4'), 15.7 (CH<sub>3</sub>, C-7).

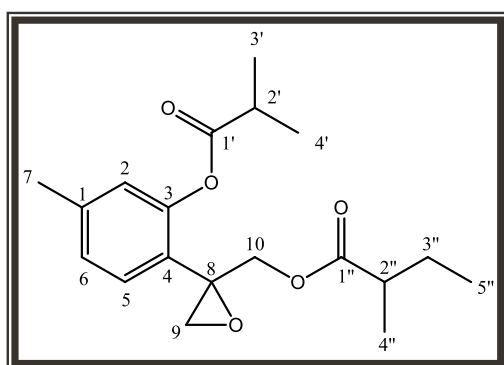
### isobutirato de 10-acetoxi-6-metoxi-8,9-epoxitimilo (23)



Del extracto hexánico de tallos de *Ageratina glabrata* de la colecta de Pátzcuaro se obtuvieron 235 mg de una miel amarilla,  $[\alpha]_{589} +28.0$ ,  $[\alpha]_{578} +29$ ,  $[\alpha]_{546} +33.1$ ,  $[\alpha]_{436} +58.6$ , (c 1.05, CHCl<sub>3</sub>); UV (EtOH)  $\lambda_{\max}$  nm: 284, 278, 221; IR: (CHCl<sub>3</sub>)  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup>: 2983, 1746, 1506, 1466, 1179; RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ :

6.88 (1H, s, H-5), 6.79 (1H, s, H-2), 4.54 (1H, d,  $J = 12.0$  Hz, H-10a), 4.19 (1H, d,  $J = 12.0$  Hz, H-10b) 3.81 (3H, s, OMe), 3.03 (1H d,  $J = 5.6$  Hz, H-9a), 2.80 (1H, d,  $J = 5.6$  Hz, H-9b), 2.80 (1H, sept,  $J = 7.0$  Hz, H-2'), 2.17 (3H, s, H-7), 2.02 (3H, s, H-2''), 1.31 (3H, d,  $J = 7.0$  Hz, H-3'), 1.30 (3H, d,  $J = 7.0$  Hz, H-4'). RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 175.6 (C, C-1'), 170.3 (C, C-1''), 155.3 (C, C-3), 141.3 (C, C-6), 128.2 (C, C-4), 126.6 (C, C-1), 124.3 (CH, C-2), 109.5 (CH, C-5), 65.1 (CH<sub>2</sub>, C-10), 56.7 (C, C-8), 55.6 (CH<sub>2</sub>, C-9), 50.6 (CH<sub>3</sub>, OMe), 34.0 (CH, C-2'), 20.6 (CH<sub>3</sub>, C-2''), 18.9 (CH<sub>3</sub>, C-3', C-4'), 16.0 (CH<sub>3</sub>, C-7).

### isobutirato de 10-(2-metilbutiriloxi)-8,9-epoxitimilo (5c)

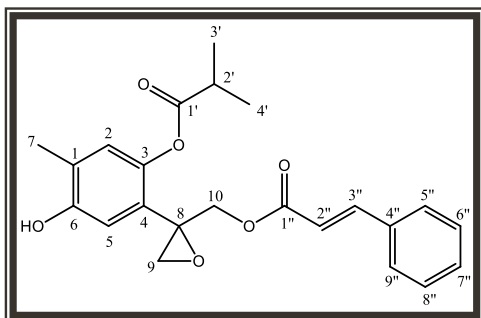


Del extracto hexánico de tallos de *Ageratina glabrata* de la colecta de Pátzcuaro se obtuvieron 200 mg de un miel amarilla, RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 7.33 (1H, d,  $J = 7.5$  Hz, H-5) 7.02 (1H, da,  $J = 7.5$  Hz, H-6), 6.84 (1H, sa, H-2), 4.56 (1H, d,  $J = 12.4$  Hz, H-10a),

4.18 (1H, d,  $J = 12.4$  Hz, H-10b), 3.01 (1H, d,  $J = 5.4$  Hz, H-9a), 2.82 (1H, sept,  $J = 6.8$  Hz, H-2') 2.76 (1H, d,  $J = 5.4$  Hz, H-9b), 2.34 (3H, s, H-7), 2.34 (1H, m, H-2''), 1.60 (1H, m, H-3a''), 1.42 (1H, m, H-3b''), 1.33 (6H, d,  $J = 6.8$  Hz, H-3', H-4'), 1.07 (3H, d,  $J = 6.8$  Hz, H-4''), 0.82 (3H, t,  $J = 7.6$ , H-5''). RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 175.8 (C, C-1'), 175.1 (C, C-1''), 148.5 (C, C-3), 139.9 (C, C-

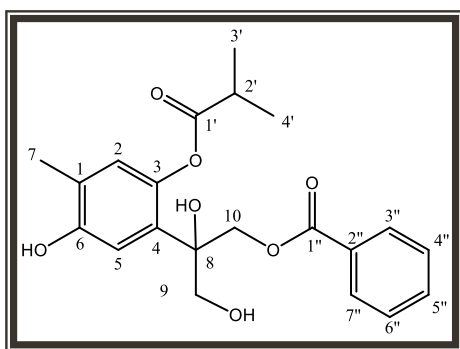
4), 128.8 (CH, C-5), 126.6 (CH, C-6), 125.9 (C, C-1), 122.8 (CH, C-2), 64.9 (CH<sub>2</sub>, C-10), 56.8 (C, C-8), 50.5 (CH<sub>2</sub>, C-9), 40.8 (CH, C-2''), 34.1 (CH, C-2'), 26.5 (CH<sub>2</sub>, C-3''), 21.0 (CH<sub>3</sub>, C-7), 18.9 (CH<sub>3</sub>, C-3', C-4'), 16.4 (CH<sub>3</sub>, C-4''), 11.4 (CH<sub>3</sub>, C-5'').

#### isobutirato de 10-cinnamoiloxi-6-hidroxi-8,9-epoxitimilo (26)



Del extracto hexánico de hojas de *Ageratina glabrata* de la colecta de Pátzcuaro se obtuvieron 5 mg de una miel verde, RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.67 (1H, d, *J* = 16 Hz, H-3''), 7.50 (2H, m, H-6'', H-8''), 7.41-7.38 (3H, m, H-9'', H-5'', H-7''), 6.90 (1H, s, H-5), 6.81 (1H, s, H-2), 6.41 (1H, d, *J* = 16 Hz, H-2''), 4.63 (1H, d, *J* = 12.0 Hz, H-10a), 4.36 (1H, d, *J* = 12.0 Hz, H-10b), 3.07 (1H, d, *J* = 5.2 Hz, H-9a), 2.83 (1H, sept, *J* = 7.2 Hz, H-2'), 2.82 (1H, d, *J* = 5.2 Hz, H-9b), 2.21 (3H, s, H-7), 1.31 (6H, d, *J* = 7.2 Hz, H-3', H-4').

#### isobutirato de 10-benzoiloxi-6,8,9-trihidroxitimilo (29)

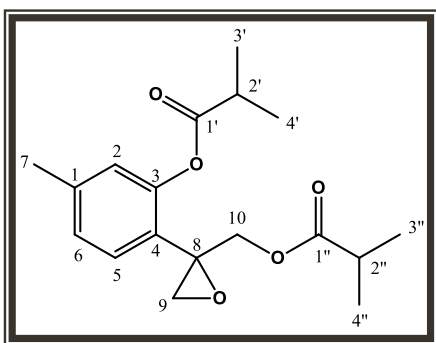


Del extracto metanólico de hojas de *Ageratina glabrata* de la colecta de Pátzcuaro se obtuvieron 900 mg de una miel roja,  $[\alpha]_{589} -1.0$ ,  $[\alpha]_{578} -1.2$ ,  $[\alpha]_{546} -1.5$ ,  $[\alpha]_{436} -3.2$ ,  $[\alpha]_{365} -1.0$ ,  $[\alpha]_{246} -1.2$ ,  $[\alpha]_{546} -1.5$ ,  $[\alpha]_{436} -3.2$ ,  $[\alpha]_{365} -1.0$  BE (c 2.46, CHCl<sub>3</sub>); UV (EtOH)  $\lambda_{\max}$  nm: 296, 228; IR: (CHCl<sub>3</sub>)  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup>: 3604, 3425, 1715, 1470, 1272, 1158; RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.97 (2H, dd, *J* = 8.4, 1.2 Hz, H-3'', H-7''), 7.53 (1H, tt, *J* = 7.6, 1.3 Hz, H-5''), 7.38 (2H, ddd, *J* = 8.8, 7.6, 1.2 Hz, H-4'', H-6''), 6.63 (1H, s, H-2), 6.60 (1H, s, H-5), 4.64 (2H, AB, *J* = 12.4 Hz, H-9a, H-9b), 4.56 (1H, d, *J* = 12.0 Hz, H-10a), 4.48 (1H, d, *J* = 12.0 Hz, H-10b), 2.50 (1H, sept, *J* = 6.4 Hz, H-2'), 2.14 (3H, s, H-7), 1.07 (6H, d, *J* = 6.4 Hz, H-3', H-4'). RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 177.8 (C, C-1'), 166.9 (C, C-1''), 149.2 (C, C-6), 147.1 (C, C-3), 133.5 (CH, C-5''), 129.7 (CH, C-3'', C-7''), 129.1 (C, C-4), 128.4 (CH, C-4'', C-6''), 126.1 (C, C-2''), 120.1 (C, C-2), 119.9 (CH, C-1), 112.7 (CH, C-5), 77.8 (C, C-8), 67.8



(CH<sub>2</sub>, C-9), 67.2 (CH<sub>2</sub>, C-10), 33.8 (CH, C-2'), 18.7 (CH<sub>3</sub>, C-3', C-4'), 15.6 (CH<sub>3</sub>, C-7).

### isobutirato de 10-isobutiriloxi-8,9-epoxitimilo (20)



Del extracto hexánico de hojas de *Ageratina glabrata* de la colecta de Pátzcuaro se obtuvieron 15 mg de una miel amarilla, RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.34 (1H, d, *J* = 7.6 Hz, H-5), 7.03 (1H, dd, *J* = 7.6, 0.4 Hz, H-6), 6.85 (1H, s, H-2), 4.56 (2H, d, *J* = 12.0 Hz, H-10a), 4.18 (1H, d, *J* = 12.0 Hz, H-10b), 3.02 (1H, d, *J* = 4.0 Hz, H-9a), 2.84 (1H, sept, *J* = 7.0 Hz, H-2'), 2.78 (1H, d, *J* = 4 Hz, H-9b), 2.51 (1H, sept, *J* = 7.0 Hz, H-2''), 2.33 (3H, s, H-7), 1.32 (6H, d, *J* = 7.0 Hz, H-3',H-4'), 1.10 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, H-3''), 1.07 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, H-4''). RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 176.4 (C, C-1''), 175.8 (C, C-1'), 148.5 (C, C-3), 139.9 (C, C-1), 128.9 (CH, C-5), 126.7 (CH, C-6), 125.9 (C, C-4), 122.9 (CH, C-2), 64.8 (CH<sub>2</sub>, C-10), 56.9 (C, C-8), 50.6 (CH<sub>2</sub>, C-9), 34.1 (CH, C-2'), 33.8 (CH, C-2''), 21.1 (CH<sub>3</sub>, C-7), 19.0 (CH<sub>3</sub>, C-3'), 18.9 (CH<sub>3</sub>, C-4'), 18.8 (2 CH<sub>3</sub>, C-3'', C-4''). C-3' y C-4' podrían estar intercambiados.

## 9 BIBLIOGRAFÍA

- Aponte José C., Jin Z., Vaisverg A. J., Castillo D., Málaga E., Lewis W. H., Swauain M., Gilman R. H., Hammond G. B., Cytotoxic and anti-infective phenolic compounds isolated from *Mikania decora* and *Crematosperma microcarpum*. *Planta Medica*. (2011) **77**:1597-1599.
- Arreaga González H. M., Estudio químico de los extractos metanólicos de *Ageratina glabrata*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Químico Farmacobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. (2013) Morelia, Michoacán, México.
- Bello González M., Salgado Garciglia R., Plantas medicinales de la comunidad indígena Nueva San Juan Parangaricutiro. Michoacán, México. *Revista de la Facultad de Biología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo*. (2007) **9**:126-136.
- Beltrán Martínez J. C., Castañeda Rosillo S. J., Vázquez Guerra V., Diversidad y uso potencial de la comunidad de la selva baja caducifolia en Jungapeo. Michoacán, México, *Larvae*. (2011) **1**: 1-18.
- Bolhmann F., Zdero C., Notiz Über neue Inhaltsstoffe aus *Wedelia fosteriana* Endl., *Chemische Berichte*. (1976) **109**: 791-792.
- Bohlmann F., Jakupovic J., Lonitz M., Über Inhaltsstoffe der *Eupatorium-Gruppe*. *Chemische Berichte*. (1977) **110**: 301-314.
- Bohlmann F., Niedballa U., Schulz J., Über einige Thymolderivative aus *Gaillardia*- und *Helenium*-Arten. *Chemische Berichte*. (1969) **102**: 864-871.
- Bohlmann F., Mahanta P.K., Swuita A., Swuita A., Natsu A.A., Zdero C., Dorner W., Ehlers D., Grenz M., Neue sesquiterpenlactone und andere inhaltsstoffe aus vertretern der *Eupatorium*-gruppe. *Phytochemistry*. (1977) **16**: 1973-1981.
- Brito-Bustos C., Sánchez-Castellanos M., Esquivel B., Calderón J. S., Calzada F., Yepez-Mulia L., Hernández-Barragán A., Joseph-Nathan P., Cuevas

- G., y Quijano L., *Structure, Absolute configuration, and antidiarrheal activity of a thymol Derivative from Ageratina cylindrica. Journal of Natural Products.* (2014) **77**: 358–363.
- Calderón de Rzedowski G., Rzedowski J., Flora fanerogámica del Valle de México. Pátzcuaro: Instituto de Ecología A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. (2005) 792-794.
- Carmona M., Valero A., Zalacaín I, Zalacaín A., Salinas M., Influencia del timol en la puesta de cría de la abeja melífera. *Vida Apícola.* (2002) **113**: 43.
- Chen J.J., Tsai Y.C., Hwang T.L., Wang T.C., Thymol, benzofuranoid and phenylpropanoid derivatives: anti-inflammatory constituents from *Eupatorium cannabinum.* *Journal of Natural Products.* (2011) **74**: 1021-1027
- Cozme Pérez I., El uso de las plantas medicinales. *Revista Intercultural Universidad Veracruzana Intercultural* (2008). 23-25.
- Delle Monache G., Delle Monache F., Becerra J., Silva M., Menichini F., Thymol derivatives from *Eupatorium glechonophyllum.* *Phytochemistry.* (1984) **23**: 1947-1950.
- Dolomanov, O. V., Bourhis, L. J., Gildea, R. J., Howard, J. A. K., Puschmann, H., OLEX2: A complete structure solution, refinement and analysis program. *Journal of Applied Crystallography.* (2009) **42**: 339–341.
- Flack H. D., The use of X-ray crystallography to determine absolute configuration (II). *Acta Chimica Slovenica.* (2008) **55**: 689-691.
- Flack H. D., Bernardinelli G., The use of X-ray Crystallography to determine absolute configuration. *Chirality.* (2008) **20**: 681-690.
- García P. G., del Río Torres. R. E., Guzmán M. R., Martínez G. M. I., Scior, T. R. F., Estudios preliminares del extracto de hojas de *Ageratina glabrata* en dos modelos térmicos de dolor agudo. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas.* (2011) **42**: 45-51.

- Gómez-Hurtado M. A., Aviña-Verduzco J. A., González-Campos J. B., López-Castro, Y., Rodríguez-García G., Cerda-García-Rojas C. M., del Río R. E., X-ray diffraction and NMR studies of two the chromenes from the roots of *Ageratina arsenei*. *Revista Latinoamericana de Química*. (2012) **40**: 199-209.
- Hernández J. D., Román M. L. U., Rodríguez M., Espiñeira J., Joseph-Nathan P., Areolal, a thymol from *Piptotrix areolare*. *Phytochemistry*. (1986) **7**: 1743-1744.
- Karpouhtsis I., Pardali E., Feggou E., Kokkini S., Scouras Z. G., Mavragani-Tsipidou P., Insecticidal and genotoxic activities of regano essential oils. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. (1998) **46**: 1111-1115.
- King M. R., Robinson H. Studies in the *Eupatorieae* (Asteraceae), *Phytologia*. (1978) **38**: 323-355.
- Liang H., Bao F., Dong X., Tan R., Zhang C., Lu Q., Cheng Y., Antibacterial thymol derivatives isolated from *Centipeda minima*. *Molecules*. (2007) **12**: 1606-1613.
- Libellus de medicinalibus indorum herbis*. Edición Especial del Instituto Mexicano del Seguro Social. México (1964).
- Pardo Novoa J. C., Escrutinio fitoquímico y antimicrobiano de *Eupatorium glabratum* H.B.K. Tesis de Licenciatura, Facultad de Químico Farmacobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, (2011) Morelia, Michoacán, México.
- Redonda Martinez R., Villaseñor Ríos J. L., Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. *Asteraceae Bercht. & J. Presl*. (2011) **89**: 1-64.
- Romo de Vivar A., Cuevas L. A., Guerrero C., Eupaglabrina, un nuevo terpeno aislado de *Eupatorium glabratum*. *Revista Latinoamericana de Química*. (1971) **2**: 32-34.
- Sanabria-Galindo A., Arciniegas N., Suárez I., Timol y Carvacrol: sustancias responsables de la actividad antimicrobiana de *Ageratina ibanguensis*.

- Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas*. (1999) **28**: 83-88.
- Sánchez-González A., Granados-Sánchez D., Uso medicinal de las plantas por los Otomíes del Municipio de Nicolás Flores, Hidalgo, México. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. (2008) **14**: 271-279.
- Stojakowska A., Michalska K., Malarz J., Simultaneous Quantification of Eudesmanolides and Thymol derivatives from tissues of *Inula helenium* and *I. royleana* by Reversed-phase High-performance Liquid Chromatography. *Phytochemical analysis*. (2006) **17**: 157-161.
- Suárez-Mota M. E., Villaseñor J. L., Las compuestas endémicas de Oaxaca, México: Diversidad y Distribución; *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. (2011) **88**: 55-56.
- Talavera Alemán A., Componentes minoritarios de *Ageratina glabrata*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Químico Farmacobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, (2012) Morelia, Michoacán, México.
- Tamayo-Castillo G., Jaupovic J., Bolhmann F., Rojas A., Castro V., King R. M., Germacranolides and other constituents from *Ageratina* species. *Phytochemistry*. (1988) **27**: 2893-2897.
- Tapia Muñoz J.L., La familia *Asteraceae*, Herbario CICY, Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. (2010), consultado el 24 de Noviembre de 2013, [http://www.cicy.mx/SITIOS/desde\\_herbario/index.php?option=com\\_content&view=article&id=127&Itemid=222](http://www.cicy.mx/SITIOS/desde_herbario/index.php?option=com_content&view=article&id=127&Itemid=222).
- Tori M., Ohara Y., Nakashima K., Sono M., Thymol derivatives from *Eupatorium fortunei*. *Journal of Natural Products*. (2001) **64**: 1048-1051.
- Turner B. L., Four New Species of *Ageratina* (*Asteraceae*: *Eupatorieae*) from Oaxaca, Mexico. *Phytologia*. (2010) **92**: 388-399.

- Villagómez G. A. K., Estudio Químico Preliminar de *Perymenium buphtalmoides*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Químico Farmacobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. (2014) Morelia, Michoacán, México.
- Villarreal Quintanilla J. A., Reyna Valdés J., Villaseñor J. L., Corología de las asteráceas de Coahuila, México. *Acta Botánica Mexicana*. (1996) **36**: 29-42.
- Weremczuk I. J., Kisiel W., Wysokińska H., Thymol derivatives from hairy roots of *Arnica Montana*. *Plant Cell Reports*. (2006) **25**:993-996.
- Zee O. P., Daejeon Y., Jung Y. H., Lee K. R., Moon H. I., BAek H. G., Lee M. J., Kim D. K., Thymol derivatives having antitumor Activity, and anti-cancer agent comprising the same. Patent No. US 6255517 B1, 2001.
- Zepeda G. C., White O. L., Herbolaria y Pintura Mural: Plantas Medicinales en los Murales del Convento del Divino Salvador de Malinalco, Estado de México. *Polibotánica*. (2008) **25**: 137-199.
- Zhou Z. Y., Liu W. X., Pei G., Ren H., Wang J., Xu Q.L., Xie H. H., Wan F. T., Tan J. W., Phenolics from *Ageratina adenofora* roots and their phytotoxic effects on *Arabidopsis thaliana* seed germination and seedling growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (2013) **61**: 11792-11799.