



**UNIVERSIDAD MICHUACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

**Preparación de la timohidroquinona a
partir del 3,6-dihidroxi-1-menteno**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACOBIOLOGA

PRESENTA:

JESSICA MONTSERRAT LORENZO GARCÍA

DIRECTORES:

D.C. ROSA ELVA NORMA DEL RÍO TORRES

M.C. SINUHÉ GALVÁN GÓMEZ

Morelia, Mich. Noviembre 2019

ÍNDICE

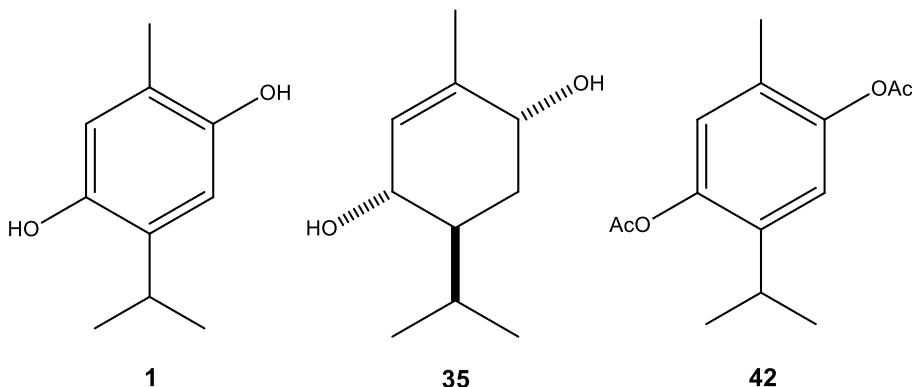
SÍMBOLOS, ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS.....	ii
RESUMEN.....	iii
ABSTRACT	iv
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES.....	4
3. JUSTIFICACIÓN	10
4. OBJETIVOS.....	11
Objetivo general.....	11
Objetivos específicos	11
5. PARTE EXPERIMENTAL	12
5.1 Generalidades.....	12
5.2 Materia vegetal.....	12
5.3 Obtención de extracto metanólico.....	13
5.4 Tratamiento ácido.....	13
5.5 Cromatografía en columna	13
5.6 Preparación de Timohidroquinona con CrO_3	15
5.7 Preparación de Timohidroquinona con PCC	15
5.8 Acetilación de Timohidroquinona	16
6 DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	17
6.1 Obtención del extracto metanólico	17
6.2 Obtención de <i>p</i> -mentenos.	20
6.3 Oxidación del compuesto 3,6-dihidroxi-1-menteno (35) con CrO_3	23
6.4 Oxidación del compuesto 3,6-dihidroxi-1-menteno (35) con PCC.....	25
6.5 Acetilación de Timohidroquinona	28
7 CONCLUSIONES.....	32
8 REFERENCIAS	33

SÍMBOLOS, ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

α	Alfa
%	Por ciento
cm	Centímetros
d	Señal doble
da	Señal doble ancha
ddd	Señal doble de dobles de dobles
dddd	Señal doble de dobles de dobles de dobles
g	Gramo
h	Horas
Hz	Hertz
J	Constante de acoplamiento
Km	Kilómetro
L	Litro
MHz	Mega Hertz
mL	Mililitro
°C	Grados Celsius
ppm	Partes por millón
qd	Quíntuple de dobles
RMN de ^{13}C	Resonancia magnética nuclear de carbono-13
RMN de ^1H	Resonancia magnética nuclear de Hidrógeno
s	Señal simple
sa	Señal simple ancha
sept	Señal séptuple
ta	Señal triple ancha
β	Beta
δ	Desplazamiento químico

RESUMEN

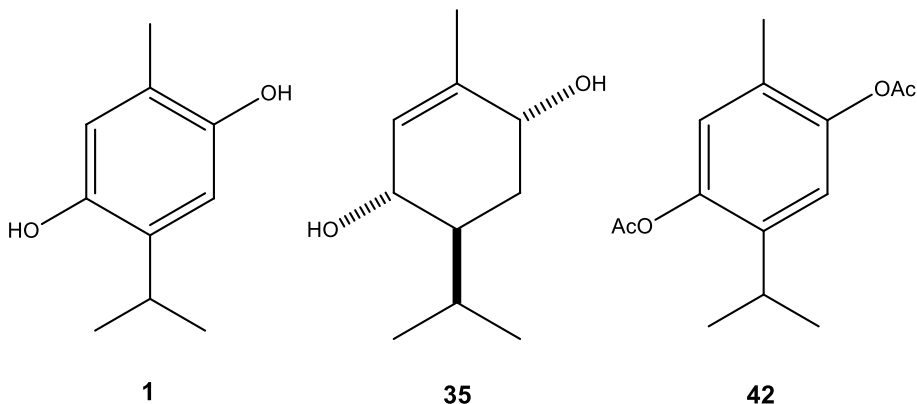
En el presente trabajo se describe la preparación de timohidroquinona (**1**) a partir del *p*-menteno (**35**) aislado de la hidrólisis ácida del extracto metanólico de la parte aérea de *Ageratina glabrata* con agentes oxidantes como CrO₃, y PCC. Por otro lado, se llevó a cabo la acetilación del compuesto **1**, logrando obtener el 2,5-diacetiltimol (**42**). La elucidación estructural de los compuestos se realizó con base en análisis espectroscópico, físico y químico.



Palabras clave: *Ageratina glabrata*, *p*-mentenos, oxidación, acetilación.

ABSTRACT

The present the preparation of thymhydroquinone (**1**) is described by using *p*-menthene (**35**), which was isolated from the acid hydrolysis of the methanolic extract of the aerial part of *Ageratina glabrata*, employing oxidative agents, such as CrO_3 , and PCC. On the other hand, from the acetylation of compound **1** was possible, to yield 2,5-diacetylthymol (**42**). The structural elucidation of these compounds was based on its spectroscopic, physical and chemical analysis.



Keywords: *Ageratina glabrata*, *p*-menthenes, oxidation, acetylation.

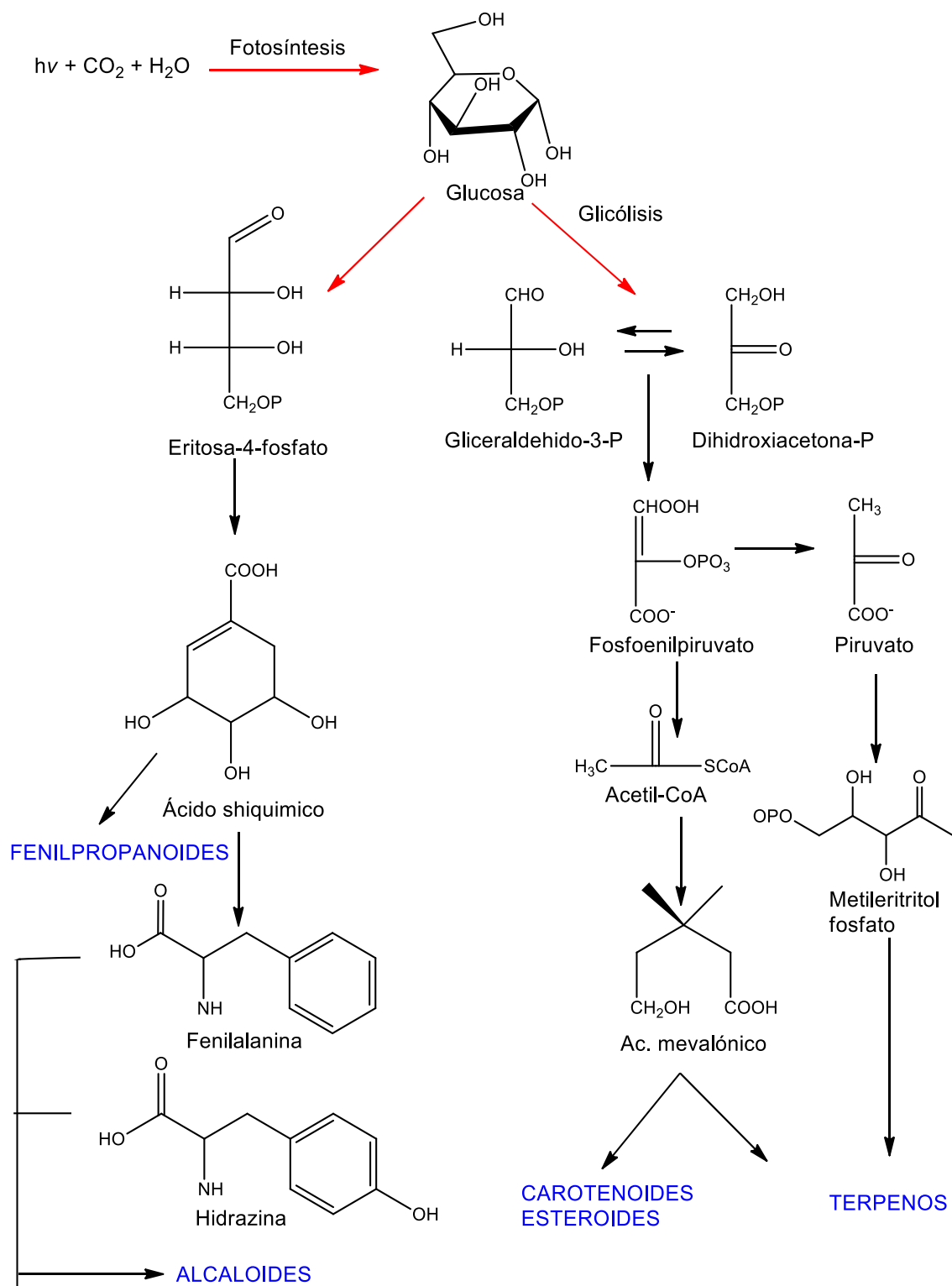
1. INTRODUCCIÓN

Los organismos vivos pueden considerarse como un laboratorio de biosíntesis no solo de compuestos que son utilizados como fuente de alimentos por el humano y otros animales, sino también de otros compuestos como los fenólicos, alcaloides, terpenoides, los cuales ejercen efectos fisiológicos. Las plantas son la principal fuente de fármacos que son susceptibles de modificaciones en la estructura molecular, obteniendo con ello otros agentes que pueden ser de gran utilidad en terapéutica (Juárez, *et al.* 2008).

Este proceso de biosíntesis es realizado mediante el anabolismo, donde participan sustancias simples para generar otras más complejas como los compuestos mencionados (Ávalos y Pérez, 2009). En el **Esquema 1** se muestra como son transformados dióxido de carbono y agua en el proceso fotosintético mediante energía lumínica obteniendo glucosa, que dependiendo de los requerimientos de la planta se utilizará como reserva o se degrada por la vía de la glucólisis activando la ruta anabólica encargada de generar metabolitos secundarios (Tissier, Ziegler y Vogt, 2014).

Los metabolitos secundarios son una expresión individual de las especies, no se producen necesariamente bajo ciertas condiciones y en gran parte de los casos aún no se sabe su función en el organismo, sin duda alguna se producen como una respuesta al entorno, ya sea como una defensa contra herbívora, patógenos o estrés abiótico y en interacciones con competidores o mutualistas. El papel que juegan para el bienestar de cualquier especie vegetal es fundamental (Dewick, 2002).

Preparación de la timohidroquinona a partir del 3,6-dihidroxi-1-menteno



Esquema 1. Ruta metabólica de metabolitos secundarios.

Los productos naturales representan un grupo estructuralmente complejo que no puede ser reemplazado fácilmente mediante síntesis orgánica, ya que representa una variedad estructural con múltiples centros estereogénicos, que además contienen en dichas estructuras heteroátomos (principalmente oxígeno y nitrógeno) (Henkel, *et al.* 1999). Un ejemplo es la timohidroquinona (**1**) obtenida mediante biotransformación (Oviedo, *et al.* 2011), y se ha comprobado que posee inhibición de la colinesterasa (Jukic, *et al.* 2007) y actividad biológica antitumoral en conjunto con la timoquinona (**2**) (Ivankovic, *et al.* 2006), a partir de esta se sintetizaron el compuesto hidrazino timohidriquinona (**3**) que permitió mediante reacciones la obtención de los compuestos **4** y **5** que demostraron tener actividad contra el cáncer de mama (**Figura 1**) (Abdelazeem, *et al.* 2016).

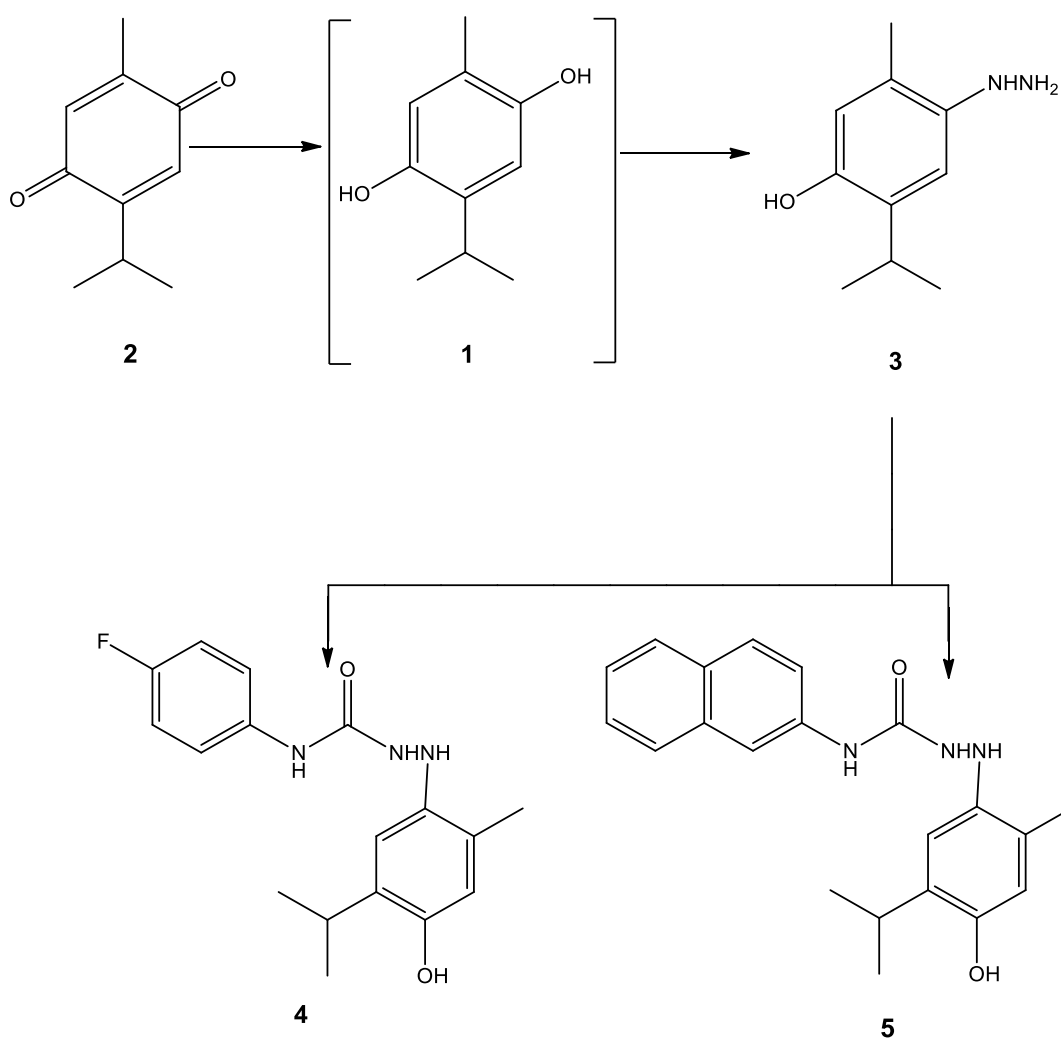


Figura 1. Derivados de la timoquinona.

2. ANTECEDENTES

El timol (**6**) es una molécula aromática, que tiene importancia industrial y farmacológica la cual se encuentra distribuida en 42 géneros de la familia Asteraceae existe en una gran variedad de sus derivados destacados por sus funcionalizaciones en las posiciones 8, 9 y/o 10 con los grupos hidroxilos, acetatos, acetónidos, aldehídos, angelatos, benzoatos y cinamatos, como se muestra en la **Figura 2** diversificando aún más sustituciones adicionales en posiciones de C-3, C-6 y/o C-7 (Talavera-Alemán, *et al.* 2016).

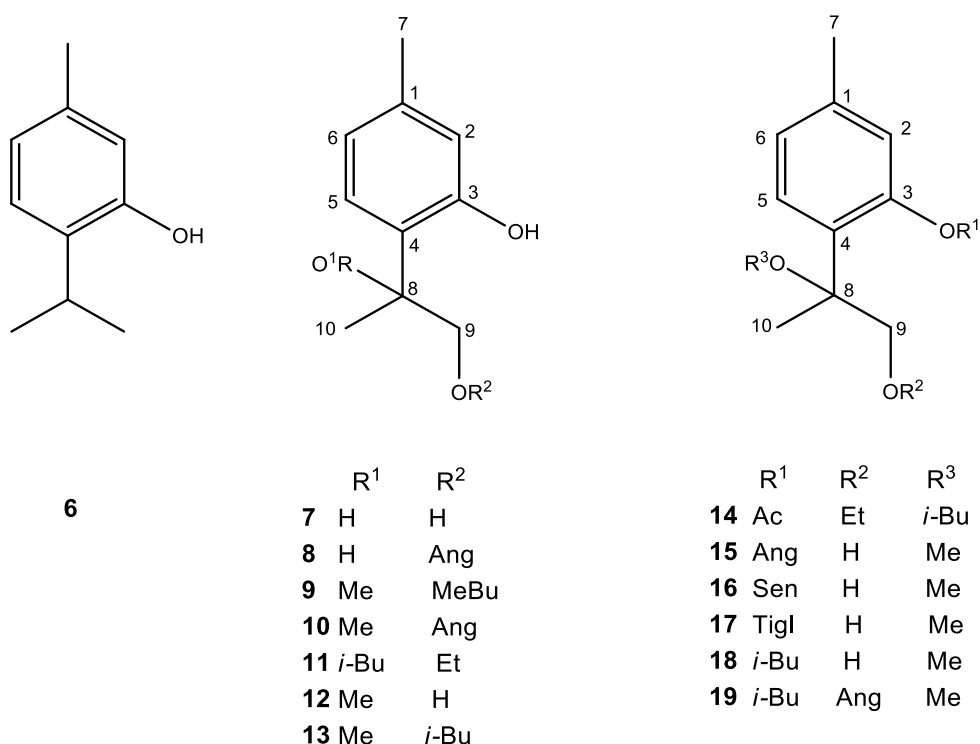
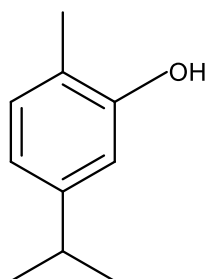


Figura 2. Derivados de timol funcionalizados.

La familia Asteraceae es la de mayor riqueza y diversidad biológica (García-Sánchez, *et al.* 2014), es cosmopolita por lo que es posible encontrarlas en casi todos los tipos de vegetación y climas (Muñoz, 2010), dentro de esta familia se

encuentra el género *Ageratina* donde se han aislado metabolitos secundarios con importancia farmacológica, industrial o biotecnológica, como: derivados de timol, sesquiterpenos, lactonas, ésteres de ácido angélico, cromenos y flavonoides (Turner, *et al.* 1993); por ejemplo, de la parte aérea de *Ageratina ibanguensis* aislaron el compuesto **6** y carvacrol (**20**) (**Figura 3**) demostrando actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram positivas, Gram negativas, hongos filamentosos y levaduras (Sanabria-Galindo, *et al.* 1999. Friedman, 2014).



20

Figura 3. Carvacrol (**20**) de la parte aérea de *Ageratina ibanguensis*.

De *Ageratina adenophora* aislaron tres derivados de timol con actividad biológica (**Figura 4**), afectando la germinación y crecimiento de *Arabidopsis thaliana* (Zhou, *et al.* 2013).

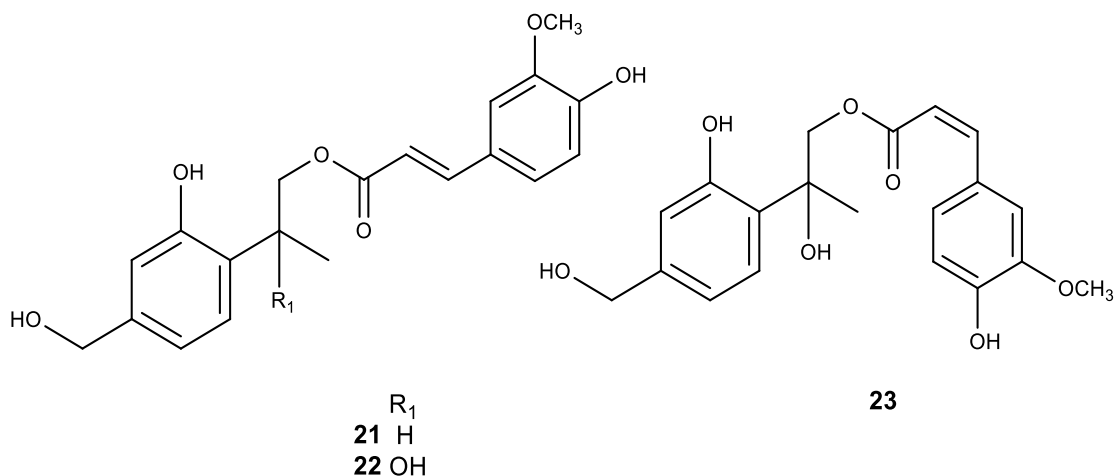


Figura 4. Compuestos aislados de *Ageratina adenophora*.

Del extracto de diclorometano de hojas de *Ageratina glabrata* aislaron el 10-benzoiloxi-8,9-epoxi-6-hidroxitimol isobutirato (**24**) y su derivado **25** el cual presentó actividad anti amebiasis y anti giardiasis (Bustos-Brito, *et al.* 2016). También aislaron los compuestos 10-benzoiloxi-8,9-epoxitimol isobutirato (**26**), 10-benzoiloxi-6-metoxi-8,9-epoxitimol isobutirato (**27**), 10-isobutiriloxi-8,9-epoxitimol isobutirato (**28**) y 10-acetoxi-6-metoxi-8,9-epoxitimol isobutirato (**29**) (Figura 5).

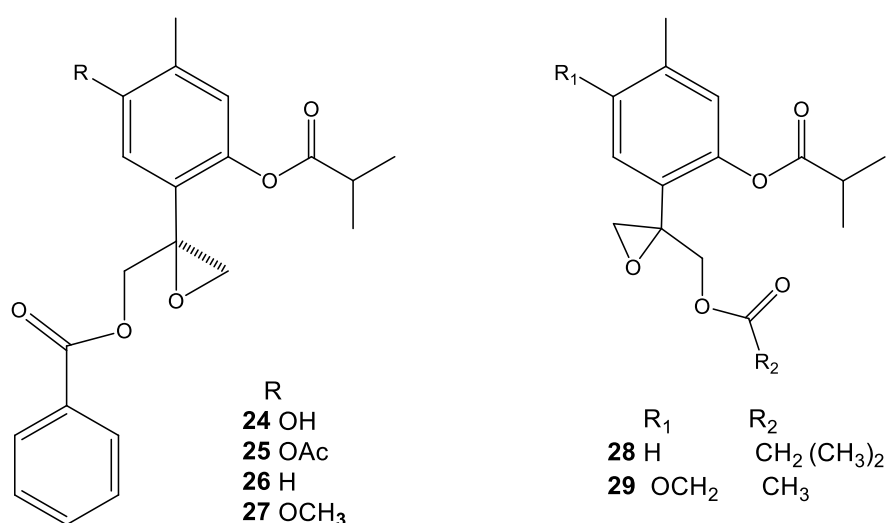


Figura 5. Derivados de timol de *Ageratina glabrata*.

Ageratina glabrata debido a la actividad biológica, que presenta en medicina tradicional mexicana es conocida con el nombre común de chamizo blanco o hierba del golpe (García, *et al.* 2011). En estudios recientes se ha demostrado que su actividad analgésica y antimicrobiana es atribuida a algunos compuestos como 3,6-dihidroxi-1-menteno-3-*O*- β -D-glucopiranosido (**30**) y 10-benzoiloxi-6,8,9-trihidroxi-3-isobutirato de timilo (**31**) (Figura 6) (García, *et al.*, 2011, Galván, 2016, Pardo, 2010).

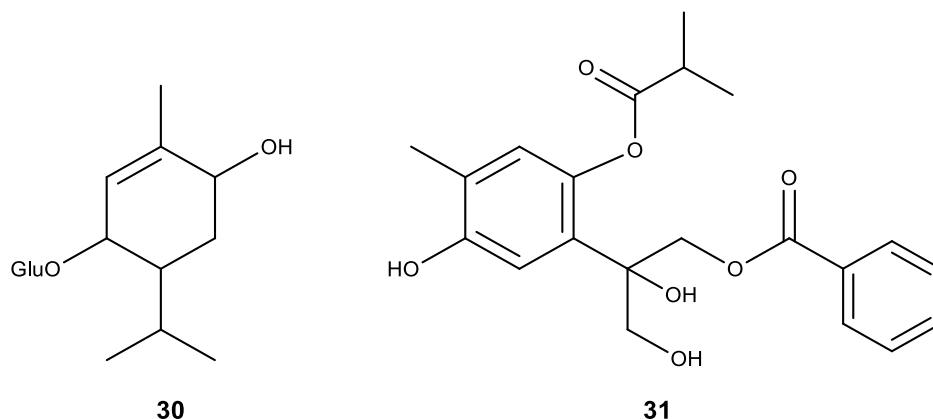


Figura 6. Compuestos aislados de *A. glabrata*.

Además también se aislaron los glucósidos 3,6-dihidroxi-1-menteno-3-*O*- β -*D*-glucopiranosido (**30**) y 3,5,6-trihidroxi-1-menteno-3-*O*- β -*D*-glucopiranosido (**32**), (Pardo *et al.*, 2016) de los cuales se llevó a cabo la hidrólisis ácida generando sus respectivas agliconas **33**, **34** y **35**, mediante un posterior tratamiento ácido sucesivo generaron el *p*-cimeno (**36**) a través de los *p*-mentenos **37-40** como intermediarios de reacción. La oxidación de **40** con yodo condujo a la obtención de carvacrol (**20**) con lo que se pudo establecer la relación química entre **36** y este terpeno fenólico. Los tratamientos ácidos de **33** y **34** permitieron la obtención de **20**, teniendo como producto intermediario al compuesto **41**, lo que permitió proponer una relación biomimética que considera el almacenamiento estratégico de precursores de aceites esenciales en las plantas y su proceso catabólico para la producción de componentes esenciales (**Figura 7**) (Pardo, *et al.* 2019).

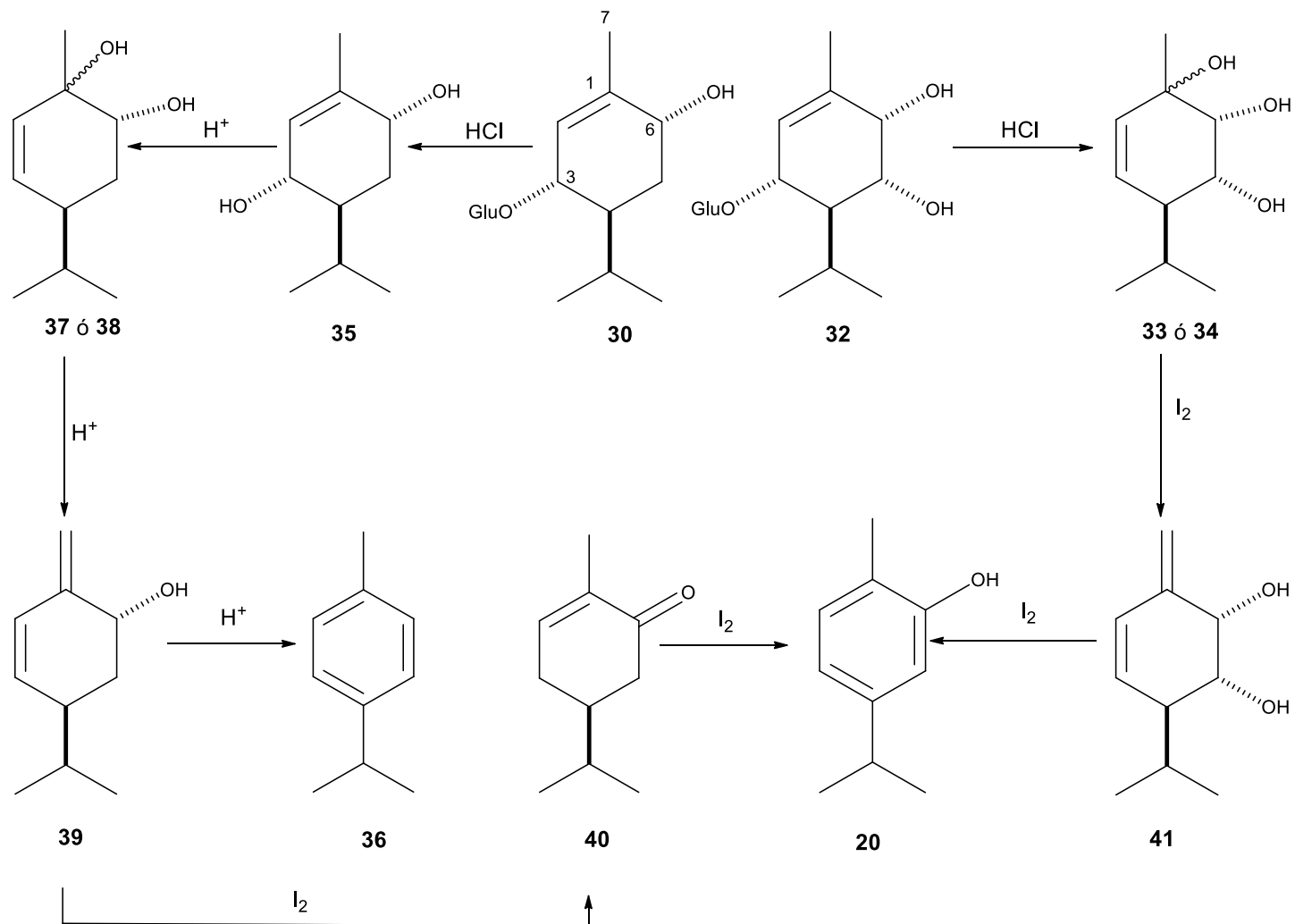


Figura 7. Obtención de monoterpenos aromáticos a partir de *p*-mentenos glucosilados.

En el análisis del aceite esencial de *A. glabrata* demostraron que está constituido por diferentes monoterpenos como se observa en la **Figura 8** el cual presentó actividad insecticida y repelente a *Sitophilus zeamais* una plaga en granos de maíz (Pimienta-Ramírez, *et al.* 2016).

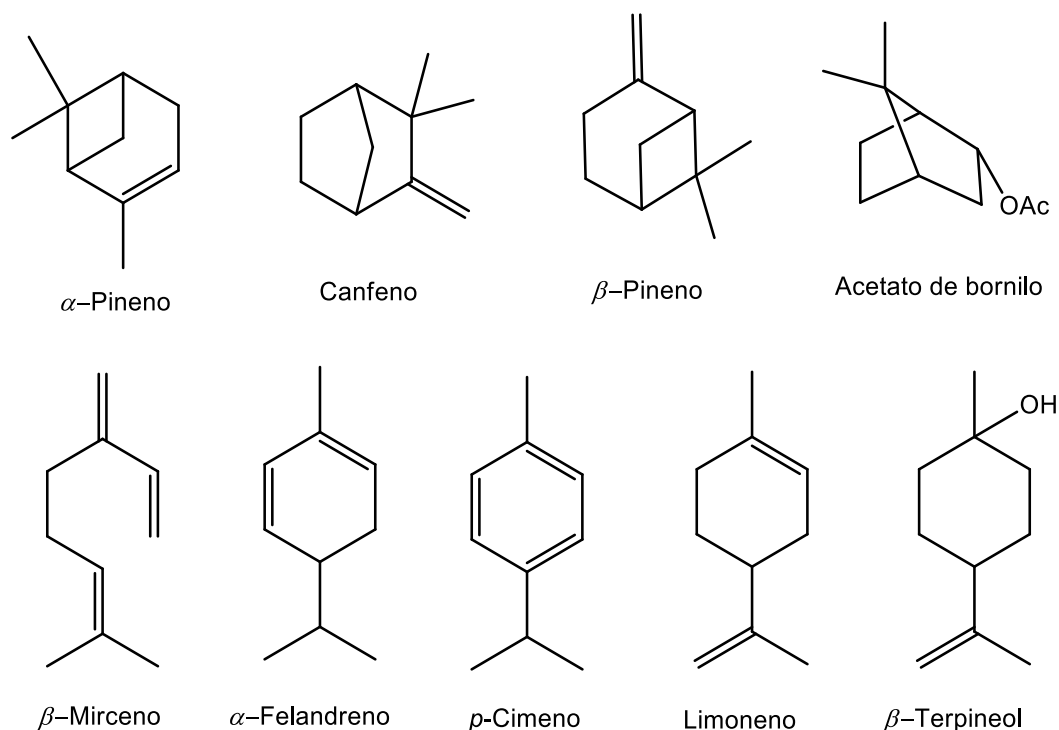


Figura 8. Monoterpenos presentes en el aceite esencial de *A. glabrata*.

3. JUSTIFICACIÓN

Los compuestos tipo *p*-menteno obtenidos por biotransformaciones, modificaciones químicas o fuentes naturales han presentado diferentes tipos de actividades biológicas además la estrecha relación que tienen con la generación de monoterpenos aromáticos, los hace una opción viable para obtener nuevos derivados los cuales nos permitan generar biomoléculas o establecer la relación en la biosíntesis con monoterpenos aromáticos.

4. OBJETIVOS

Objetivo general

Preparar la tiorhidroquinona a partir de 3,6-dihidroxi-1-menteno (**35**) de *Ageratina glabrata*.

Objetivos específicos

1. Obtener los extractos metanólicos de *A. glabrata*.
2. Aislar e identificar el 3,6-dihidroxi-1-menteno (**35**).
3. Ensayar reacciones de oxidación del compuesto **35**.
4. Identificar los derivados por métodos químicos, físicos y espectroscópicos.

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Generalidades

Los compuestos fueron separados y purificados por medio de columnas cromatográficas, utilizando como fase estacionaria gel de sílice de la marca MERCK® cuyo tamaño de poro es de 230-400. Como fase móvil se utilizó mezclas de los disolventes hexanos-AcOEt.

Los puntos de fusión fueron determinados por medio del equipo Fisher Scientific y no están corregidos.

Los espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H a 400 MHz y de ^{13}C a 100 MHz se determinaron en un espectrómetro Varian Mercury Plus 400. Como disolvente se utilizó CDCl_3 , $\text{DMSO-}d_6$ y como referencia interna se utilizó tetrametilsilano (TMS). Los espectros obtenidos se procesaron mediante el programa MestReNova.

5.2 Materia vegetal

La colecta de la especie vegetal *A. glabrata* se llevó a cabo en la carretera Pátzcuaro-Opopeo en el kilómetro 4, se dejó secar a la sombra por un periodo de diez días, la parte aérea fue puesta a maceración por un periodo de tres días usando como disolvente metanol. Se concentró en rotavapor para obtener el extracto, este proceso se realizó en tres ocasiones utilizando el mismo disolvente.

5.3 Obtención de extracto metanólico

Un lote de 500 g de la parte aérea de *A. glabrata* se puso a maceración con 2 L de metanol a temperatura ambiente durante tres días, transcurrido este tiempo se concentró evaporando el disolvente en rotavapor, el proceso fue realizado por triplicado para obtener el extracto total.

5.4 Tratamiento ácido

Un lote de 10 g de extracto metanólico de la parte aérea se disolvió en 100 mL de agua, después fue filtrado, y extraído mediante biparticiones líquido-líquido con 100 mL de diclorometano en tres ocasiones separando la fase orgánica de la fase acuosa.

La fase acuosa fue colocada en un matraz Erlenmeyer de 250 mL adicionando 5 mL gota a gota de ácido clorhídrico al 2% y se dejó en agitación por un periodo de 2 h a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de la reacción, se extrajo con 100 mL de diclorometano por tres ocasiones, la fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se evaporó por medio de rotavapor, obteniendo una miel color marrón.

5.5 Cromatografía en columna

Un lote de 10 g de miel obtenida por el tratamiento ácido fue llevado a separación cromatográfica utilizando una columna de 5 cm de diámetro, empacada con gel sílice 230-400 a una altura de 12 cm y como fase móvil

mezclas de hexanos-AcOEt en orden de polaridad creciente, colectando fracciones de 10 mL.

La cromatografía en columna fue monitoreada mediante cromatografía en capa fina utilizando una polaridad de disolvente de 8:2 hexanos-AcOEt. Se obtuvieron los derivados: (+)-(1*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-1,5,6-trihidroxi-2-menteno (**33**), (+)-(1*S*,4*S*,5*R*,6*R*)-1,5,6-trihidroxi-2-menteno (**34**), (+)-(1*S*,4*S*,6*R*)-3,6-dihidroxi-1-menteno (**35**), (+)-(1*R*,4*S*,6*R*)-1,6-dihidroxi-2-menteno (**37**) y (+)-(1*S*,4*S*,6*R*)-1,6-dihidroxi-2-menteno (**38**) (Figura 9) (Pardo, 2014).

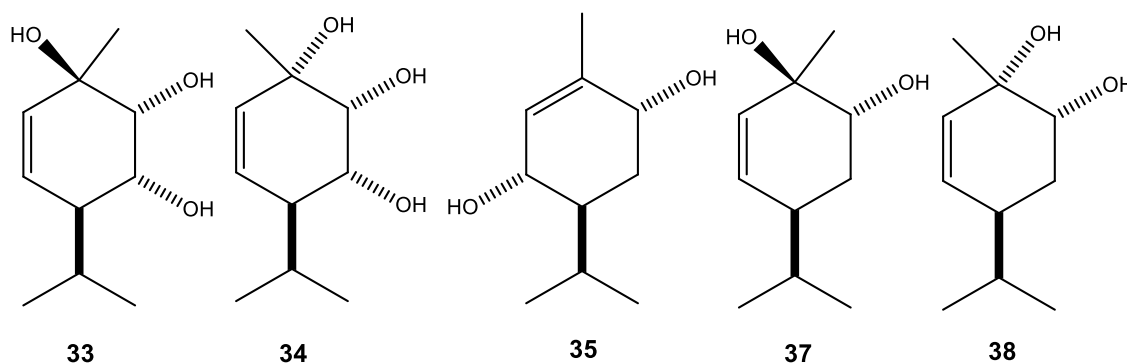
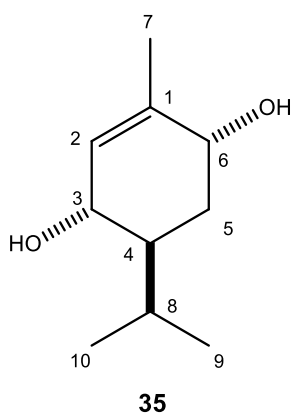


Figura 9. Compuestos tipo *p*-menteno.

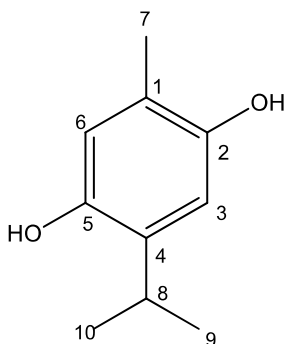
El compuesto **35** fue obtenido en forma de cristales incoloros a partir de la fracción 227 a 241 en una polaridad 7:3 de hexanos-AcOEt.



RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 5.52 (1H, sa, H-2), 3.97 (2H, sa, H-3 y H-6), 2.10 (1H, qd $J = 8.0, 4.0$ Hz H-8), 1.80 (3H, t, $J = 1.4$ $\text{CH}_3 - 7$), 1.78 (1H, m, H-4), 1.48 (1H, m, H-5), 0.97 (1H, d, $J = 7$ Hz, $\text{CH}_3 - 9$), 0.84 (1H, d, $J = 7$ Hz, $\text{CH}_3 - 10$).

5.6 Preparación de Timohidroquinona con CrO_3

50 mg de 3,6-dihidroxi-1-menteno (**35**), se disolvió en 0.5 mL de AcOEt, después fueron colocados en baño de hielo, se agregaron 0.5 mL de ácido acético glacial, se adicionó 50 mg de CrO_3 disuelto en 0.5 mL de H_2O , durante 15 minutos. Transcurrido el tiempo se vertió sobre hielo en un embudo de separación y se extrajo con AcOEt. Se lavó dos veces con agua, seis veces con solución saturada de NaHCO_3 y finalmente dos veces con agua. Se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y concentró en rotavapor obteniendo una miel de color amarilla la cual fue sometida a cromatografía utilizando una columna de 1 cm de diámetro, empacada con gel sílice como fase estacionaria a una altura de 12 cm, como fase móvil una mezcla de solventes de hexanos-AcOEt a una proporción 9:1. De las fracciones se obtuvieron cristales incoloros correspondientes a la timohidroquinona (**2**).



RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 6.63 (1H, s, H-3), 6.54 (1H, s, H-6), 3.13 (1H, sept, $J = 6.8$ Hz, H-8), 2.17 (3H, s, H-7), 1.21 (7H, d, $J = 6.9$ Hz, H-9 y H-10).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 147.6 (C, C-2), 146.2 (C, C-5), 133.0 (C, C-1), 121.5 (C, C-4), 117.6 (CH, C-6), 112.9 (CH, C-3), 26.8 (CH, C-8), 22.6 (CH_3 , C-9, CH_3 , C-10), 15.3 (CH_3 , C-7).

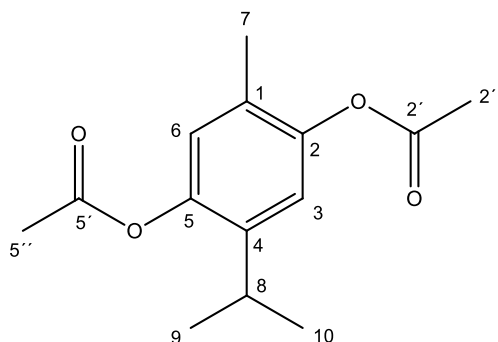
5.7 Preparación de Timohidroquinona con PCC

A una suspensión de 256 mg de clorocromato de piridino (PCC) en 3 mL CH_2Cl_2 se le agregó 100 mg de 3,6-dihidroxi-1-menteno (**35**) disueltos en 0.5 mL de AcOEt. La mezcla se dejó reaccionar por 40 minutos con agitación constante a temperatura ambiente.

El crudo de reacción se impregnó directamente en gel sílice y se sometió a purificación mediante cromatografía en columna, se utilizó como fase móvil una mezcla de hexanos-AcOEt con polaridad de 9:1 y 8:2, obteniendo en las fracciones 12-28 cristales incoloros, con un punto de fusión de 125-127 °C, correspondiente al compuesto **2**.

5.8 Acetilación de Timohidroquinona

Un lote de 100 mg de timohidroquinona (**1**) se disolvió en 1 mL de piridina, después se adicionó 1 mL de anhídrido acético, la mezcla se dejó reaccionar por 24h a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de reacción se extrajo con AcOEt, se realizaron tres lavados con HCl al 10%, seguido por tres de agua, tres con solución saturada de NaHCO₃ y finalizando con tres lavados de agua, fue secado sobre Na₂SO₄ anhidro, se concentró en rotavapor. Se obtuvieron cristales correspondientes al compuesto **42** su punto de fusión fue de 75-77 °C.



RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 6.93 (1H, s, H-6), 6.87 (1H, s, H-3), 2.95 (1H, sept, *J* = 6.9 Hz, H-8), 2.12 (3H, s, H-7), 1.18 (7H, d, *J* = 6.9, H-9 y H-10), 2.30 (6H, s, C_{2''}-OAc y C_{5''}-OAc).

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 169.5 (C, C-2'), 169.0 (C, C-5'), 147.1 (C, C-2), 145.3 (C, C-5), 138.7 (C, C-1), 128.3 (C, C-4), 124.3 (CH, C-6), 119.8 (CH, C-3), 27.2 (CH, C-8), 22.7 (CH₃, C-9, CH₃, C-10), 20.7 y 20.6 (CH₃, C-2'', CH₃, C-5''), 15.7 (CH₃, C-7).

6 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

6.1 Obtención del extracto metanólico

La colecta de la especie vegetal *A. glabrata* se realizó en la carretera Pátzcuaro-Opopeo, se dejó secar a la sombra, la parte aérea fue puesta a maceración por un periodo de tres días usando como disolvente metanol, repitiendo este proceso tres veces.

Una vez obtenido el extracto metanólico de *A. glabrata* se procedió a realizar su análisis por RMN de ^1H , en el cual se aprecian señales de protones aromáticos entre 8.0-6.0 ppm, bases de heteroátomo alrededor de 4.5-3.0 ppm en mayor proporción, y grupos alifáticos entre 2.0-0.5 ppm, destacando la presencia señales de metilos secundarios, característicos de esqueletos de *p*-menteno entre 0.7-1.0 ppm (**Figura 10**).

El extracto fue sometido a un tratamiento ácido obteniendo una miel color marrón, se analizó por RMN de ^1H , se observa la presencia de señales intensas correspondientes al ácido benzoico en 8.2-7.5 ppm, hidrógenos vinílicos en 5.8-5.5 ppm, hidrógenos bases de alcohol entre 4.0-3.8 ppm, y señales correspondientes a protones alifáticos entre 2.5-0.7 ppm (**Figura 11**).

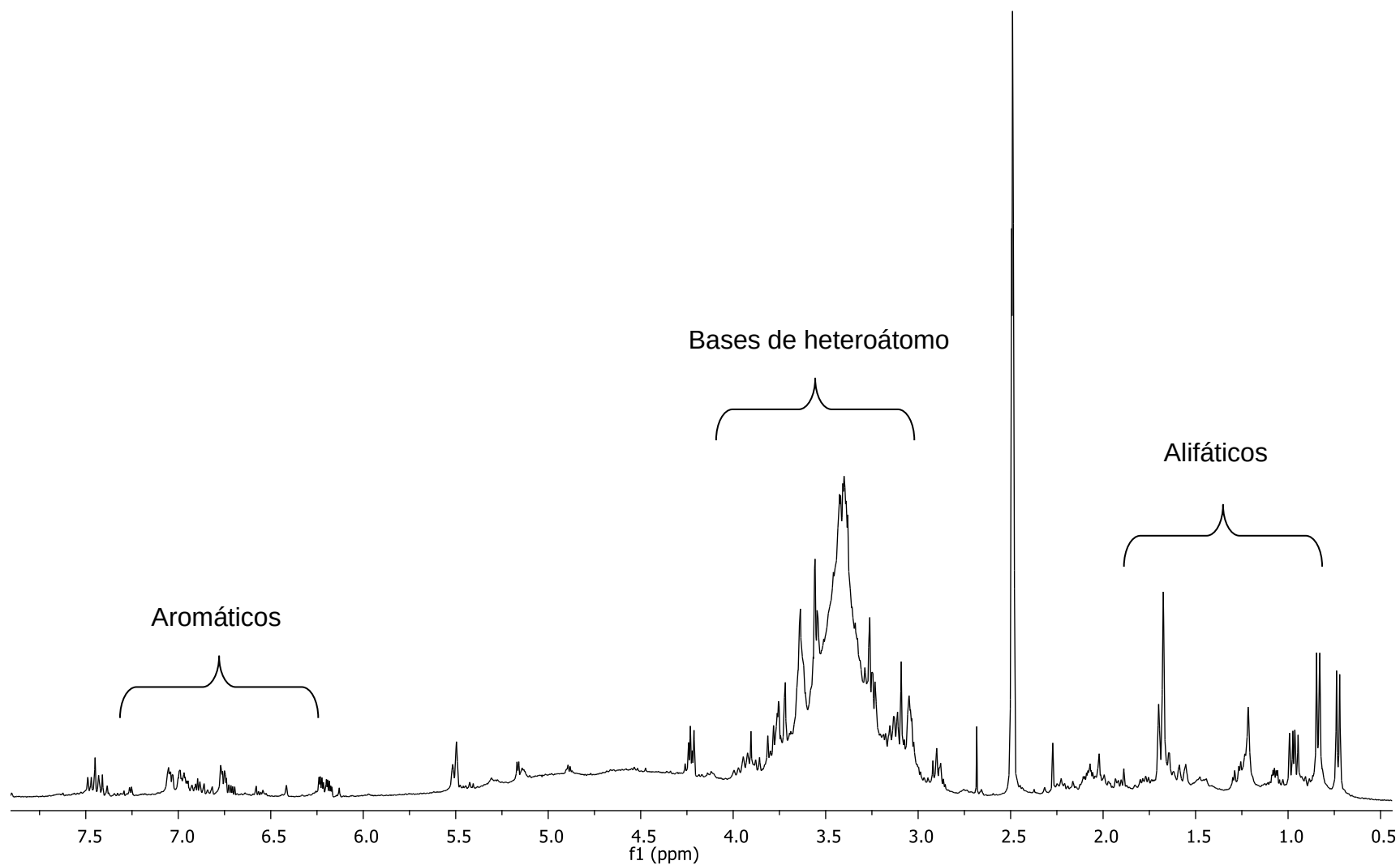


Figura 10. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del extracto metanólico total de la parte aérea de *A. glabrata* en $\text{DMSO-}d_6$.

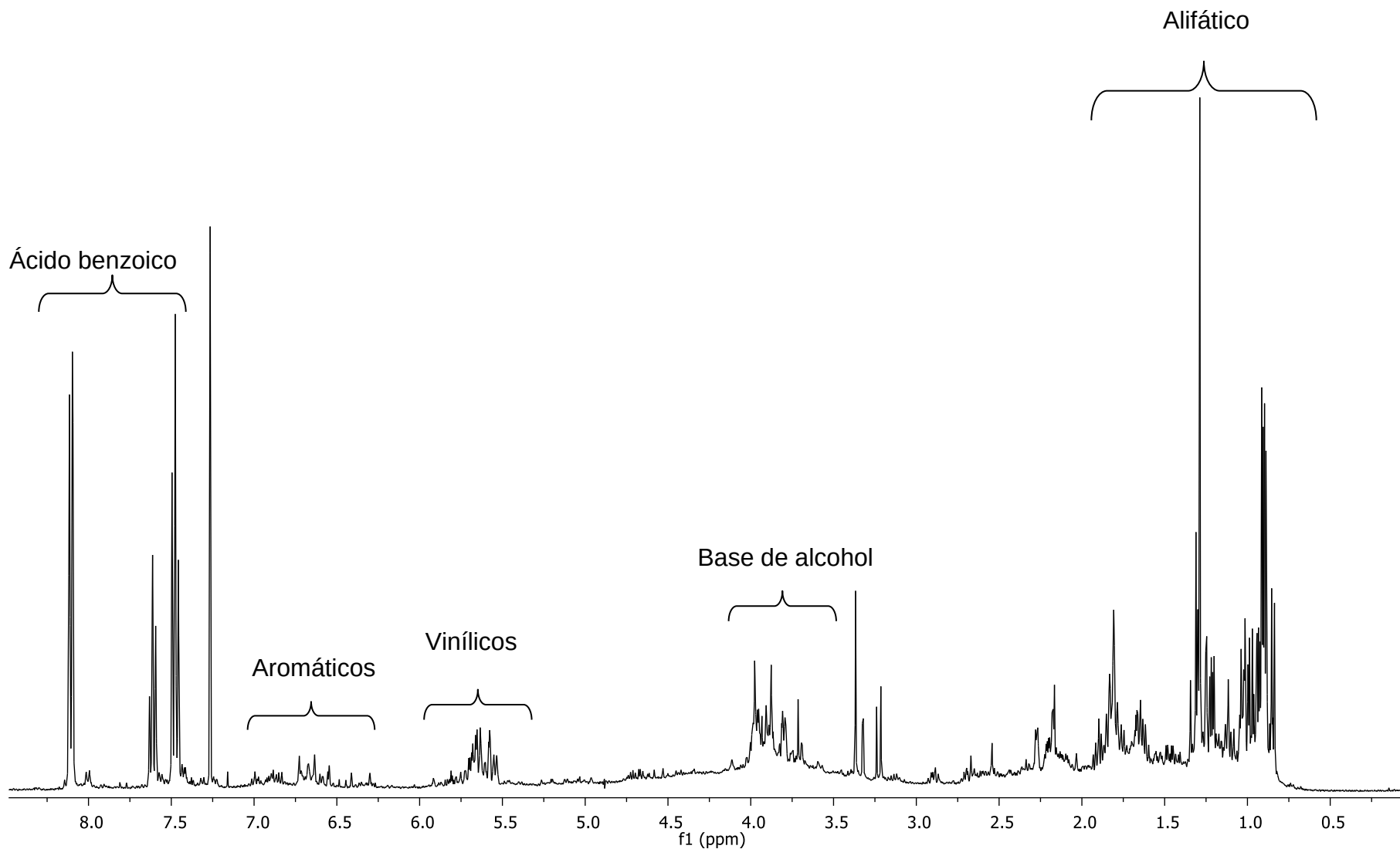


Figura 11. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del tratamiento ácido del extracto metanólico de la parte aérea de *A. glabrata*, en CDCl_3 .

6.2 Obtención de *p*-mentenos.

La miel color marrón fue llevada a columna cromatográfica para su separación, utilizando gel de sílice como fase estacionaria y como eluyente mezclas hexanos-AcOEt en orden ascendente de polaridad, aislando los compuestos (+)-(1*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-1,5,6-trihidroxi-2-menteno (**33**), (+)-(1*S*,4*S*,5*R*,6*R*)-1,5,6-trihidroxi-2-menteno (**34**), (+)-(1*S*,4*S*,6*R*)-3,6-dihidroxi-1-menteno (**35**), (+)-(1*R*,4*S*,6*R*)-1,6-dihidroxi-2-menteno (**37**) y (+)-(1*S*,4*S*,6*R*)-1,6-dihidroxi-2-menteno (**38**) **Figura 12** de acuerdo a la metodología de Pardo en 2014.

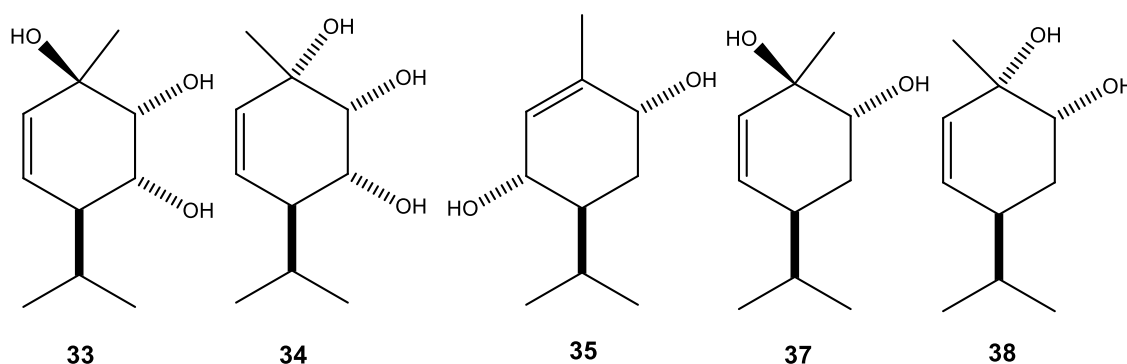


Figura 12. Agliconas obtenidas de la hidrólisis ácida.

Del análisis estructural de los compuestos **33-38** se puede observar que el derivado **35** resulta adecuado para la obtención de timohidroquinona. Este compuesto **35** fue obtenido en forma de cristales incoloros con un aspecto de aguja, el análisis de RMN de ^1H , muestra una señal simple ancha en 5.52 ppm correspondiente al H-2 vinílico, además una señal simple ancha en 3.97 ppm para los protones base de alcohol en la posición H-6 y H-3, en 2.10 ppm se observa una señal quintuple de dobles con una $J = 8.0$ y 4.0 Hz para el H-8 base de isopropilo; en 1.80 ppm se observa una señal triple para el metilo vinílico CH_3 -7 con una $J = 1.4$ Hz ; en 1.78 ppm se observa una señal múltiple que integra para

el H-4; en 1.48 ppm se observa una señal múltiple asignada al protón en la posición H-5. En 0.97 ppm y 0.84 ppm se observan dos señales dobles correspondientes a los metilos de isopropilo CH₃-9 y CH₃-10 con una $J = 7$ Hz cada una, **Figura 13**. Los datos espectroscópicos del compuesto **35** fueron iguales a los descritos por Galván 2019 y Pardo 2010.

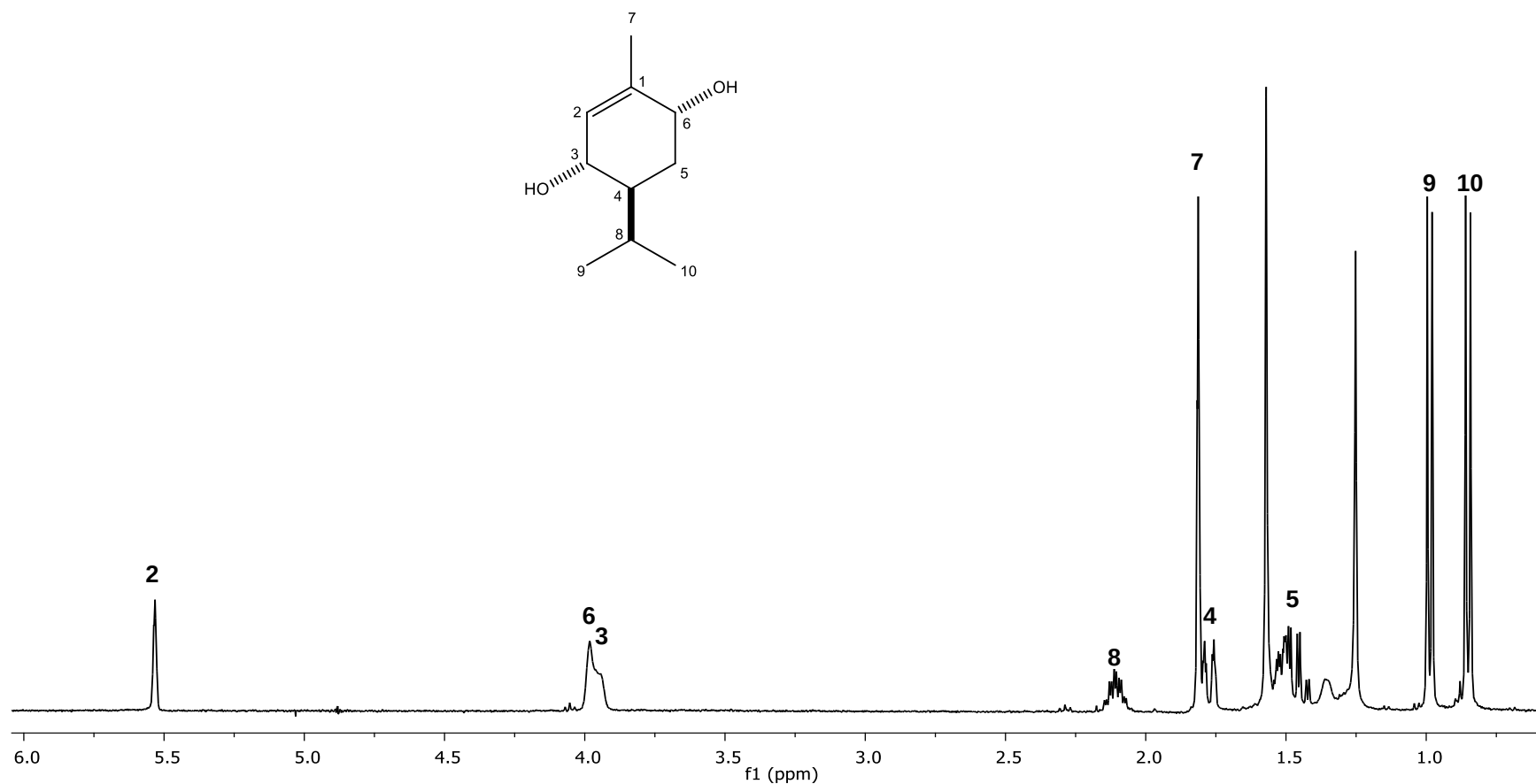
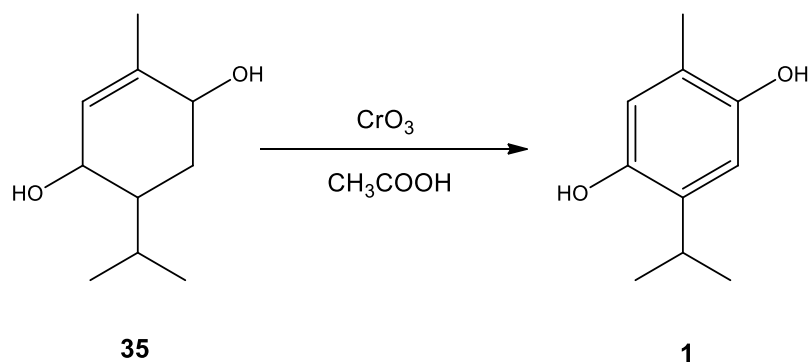


Figura 13. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del (+)-(1R,4S,6R)-3,6-dihidroxi-1-menteno (35) en CDCl_3 .

6.3 Oxidación del compuesto 3,6-dihidroxi-1-menteno (35) con CrO_3 .

La reacción de oxidación del *p*-menteno **35** se llevó bajo las condiciones descritas en el **Esquema 2** obteniendo una miel color amarilla, la cual fue purificada mediante técnicas cromatográficas, obteniendo cristales incoloros con punto de fusión de 125-127 °C, con un rendimiento de 39%.



Esquema 2. Preparación de la timohidroquinona (**1**).

En el espectro de RMN de ^1H de la timohidroquinona (**1**) se observa la presencia de una señal simple en 6.63 ppm correspondiente a H-3, en 6.54 ppm una señal simple perteneciente a H-6, indicando la presencia de hidrógenos aromáticos; en 4.37 ppm una señal ancha de los hidroxilos, en 3.13 ppm se observa una señal séptuple con una $J = 6.9$ Hz del protón H-8 base de isopropilo; en 2.17 ppm se encuentra una señal simple CH_3 -7; en 1.21 ppm se observa una señal doble con una $J = 6.9$ Hz de los metilos de isopropilo CH_3 -9 y CH_3 -10 (**Figura 15**), al aromatizarse el compuesto hay un desplazamiento del hidrógeno vinílico antes posición de H-2 en 5.44 ppm ahora por la regla de la prioridad de los grupos funcionales en el anillo aromático se encuentra en la posición de H-6 en 6.63 ppm, al igual que el H-5 en 1.36 ppm ahora correspondiente al H-3 en 6.54 ppm.

La señal del H-8 de 2.09 ppm a 3.13 ppm, la señal del CH₃-7 de 1.74 ppm ahora se encuentra desplazada a 2.17 ppm y las señales de CH₃-9 y CH₃-10 de 0.95 y 0.80 ppm respectivamente a 1.21 ppm.

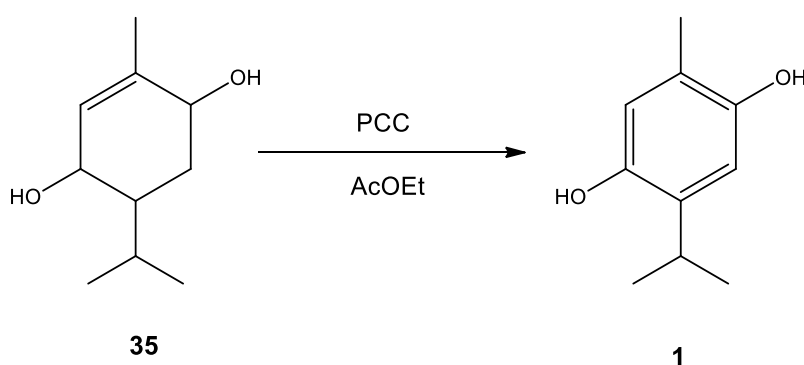
En el espectro de RMN de ¹³C, se observan diez señales correspondientes a la estructura propuesta para el derivado **1**; observándose en 147.6 ppm una señal correspondiente a C-2, en 146.2 ppm hay una señal del carbono C-5, en 133.0 y 121.5 ppm señales de los metinos de C-1 y C-4 respectivamente, en 117.6 y 112.9 ppm las señales de los carbonos C-6 y C-3 respectivamente, la señal correspondiente al carbono C-8 en 26.8 ppm, en 22.6 ppm una señal traslapada de los carbonos CH₃ de C-9 y C-10, finalmente en 15.3 ppm una señal para el carbono CH₃ C-7 (**Figura 16**), estos datos fueron comparados con los desplazamientos reportados en el 2003 por Kamat y colaboradores como se muestra en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Desplazamientos de RMN de timohidroquinona (**1**).

Posición	δ RMN ¹ H		δ RMN ¹³ C	
	Experimental	Literatura (Kamat <i>et al.</i> 2003)	Experimental	Literatura (Kamat <i>et al.</i> 2003)
1	-	-	133.0	133.1
2	-	-	147.6	147.7
3	6.63	6.62	112.9	113.1
4	-	-	121.5	121.6
5	-	-	146.2	146.3
6	6.54	6.55	117.6	117.7
7	2.17	2.15	15.3	15.3
8	3.13	3.13	26.8	26.9
9	1.21	1.22	22.6	22.7
10	1.21	1.22	22.6	22.7

6.4 Oxidación del compuesto 3,6-dihidroxi-1-menteno (35) con PCC

El *p*-menteno **35** se hizo reaccionar con PCC y CH_2Cl_2 como se observa en el **Esquema 3** con la finalidad de mejorar el rendimiento, obteniéndose un rendimiento de 49%. El producto obtenido fue purificado directamente por cromatografía en columna, obteniendo cristales incoloros, al compararlo con el rendimiento obtenido de la reacción con CrO_3 es mayor la obtención del compuesto **1** bajo estas condiciones de reacción.



Esquema 3. Preparación de la timohidroquinona con PCC.

El producto de reacción fue analizado por RMN de ^1H y ^{13}C fue comparado con los espectros ya antes descritos, dando como resultado la obtención de la timohidroquinona (**1**).

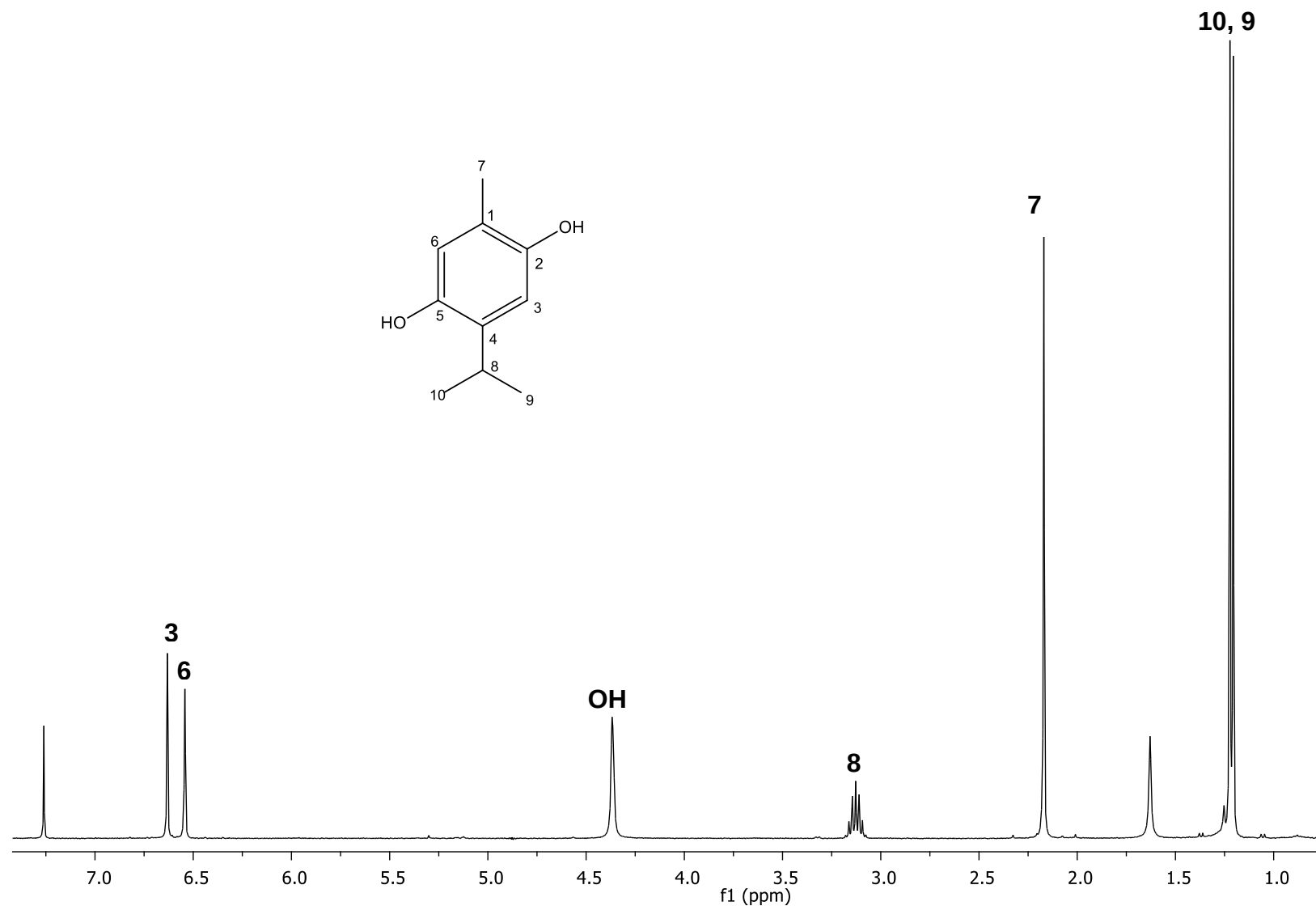


Figura 15. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz de timohidroquinona (1) en CDCl_3 .

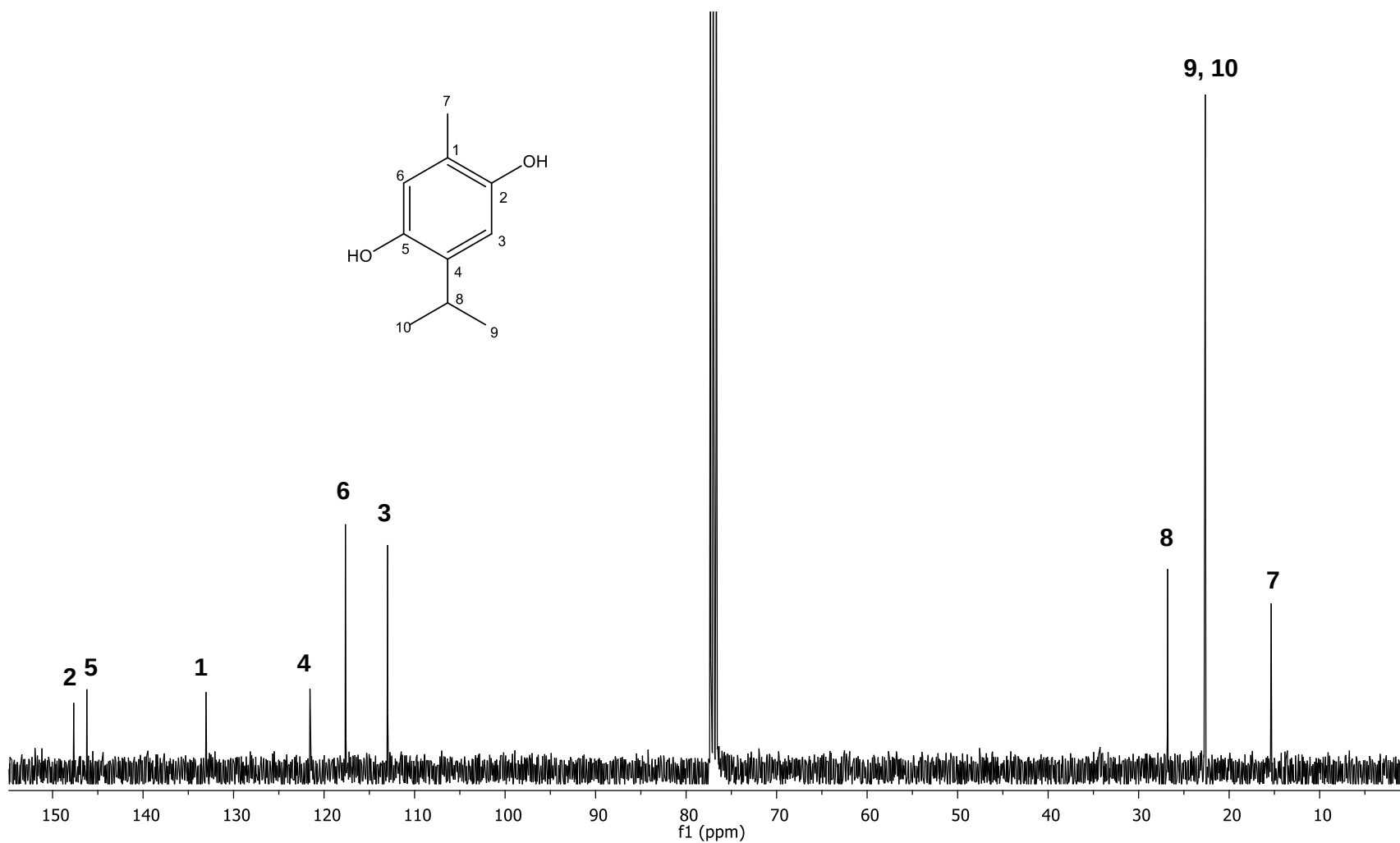
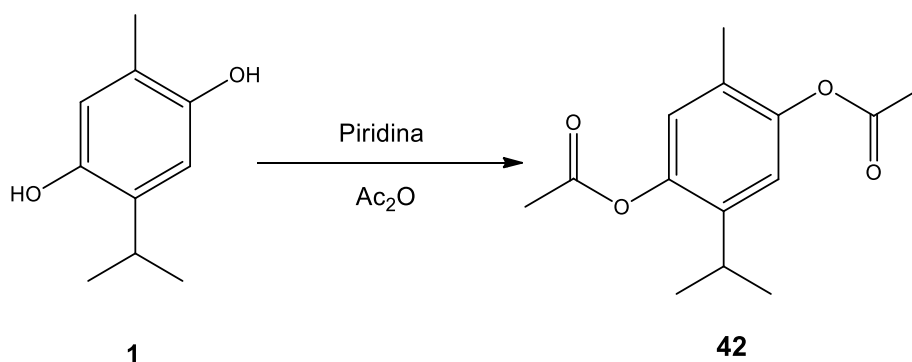


Figura 16. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz de timohidroquinona (**1**) en CDCl_3 .

6.5 Acetilación de Timohidroquinona

Como se puede apreciar la timohidroquinona (**1**) se encuentra funcionalizada por grupos hidroxilo, por lo que se llevó a cabo la preparación del derivado acetilado, con la finalidad de comprobar la presencia de dicho grupo en la estructura propuesta. Se realizó utilizando anhídrido acético con piridina obteniendo el derivado **42** cuyo punto de fusión fue de 75-77 °C, bajo estas condiciones se obtuvo un rendimiento del 38%, así mismo fueron analizado por espectro de RMN de ^1H y ^{13}C .



Esquema 3.- Acetilación de timohidroquinona.

En el espectro de RMN de ^1H se puede observar una señal simple con un desplazamiento en 6.93 ppm correspondiente a H-3, en 6.87 ppm hay una señal simple perteneciente a H-6, además la presencia de una señal simple que integra para seis hidrógenos correspondiente a los metilos de los grupos acetato en 2.30 ppm. En 2.95 ppm se observa una señal séptuple con una $J = 6.9$ Hz del CH-8, en 2.12 ppm se observa la presencia de una señal simple correspondiente al CH₃-7 y en 1.18 ppm se presenta una señal doble con una $J = 6.9$ Hz para CH₃-9 y CH₃-10 (**Figura 17**). Estos desplazamientos fueron comparados con los reportados por Metwally y colaboradores en 1986, teniendo una ligera diferencia en los desplazamientos reportados, hasta la fecha no existen otros reportes acerca de este compuesto (**42**) por lo que estos resultados deben ser revisados.

Tabla 2. Desplazamientos de RMN de ^1H del 2,5-diacetiltimol (**42**).

Posición	δ RMN ^1H		
	Experimental	Literatura (Metwally <i>et al</i> , 1986)	
1	-	-	-
2''-OAc	2.30	2.21	Δ 0.09
3	2.30	2.29	Δ 0.09
4	-	-	-
5''-OAc	6.87	6.69	Δ 0.18
6	6.93	6.74	Δ 0.19
7	2.12	2.19	Δ -0.07
8	2.95	2.90	Δ 0.05
9	1.18	1.13	Δ 0.05
10	1.18	1.13	Δ 0.05

En el espectro de RMN de ^{13}C , se observan catorce señales correspondientes a la estructura propuesta para el diacetato **42** observándose en 169.6 y 169.0 ppm las señales correspondientes a los carbonilos de los acetatos, en 147.3 ppm se observa una señal que del C-2, en 145.3 ppm la señal para el carbono C-5, en 138.7 ppm una señal que corresponde a C-1, en 128.3 ppm una señal para el C-4, en 124.3 ppm se observa una señal correspondiente al CH de C-6, en 119.8 ppm una señal que del CH del C-3, en 27.2 ppm una señal correspondiente a CH de C-8, en 22.7 ppm una señal que integra para dos carbonos de CH_3 de C-9 y C-10, en 20.7 y 20.6 ppm se observan las señales correspondientes a los CH_3 de los acetatos. Por último, una señal en 15.7 ppm correspondientes al CH_3 del C-7 (**Figura 18**).

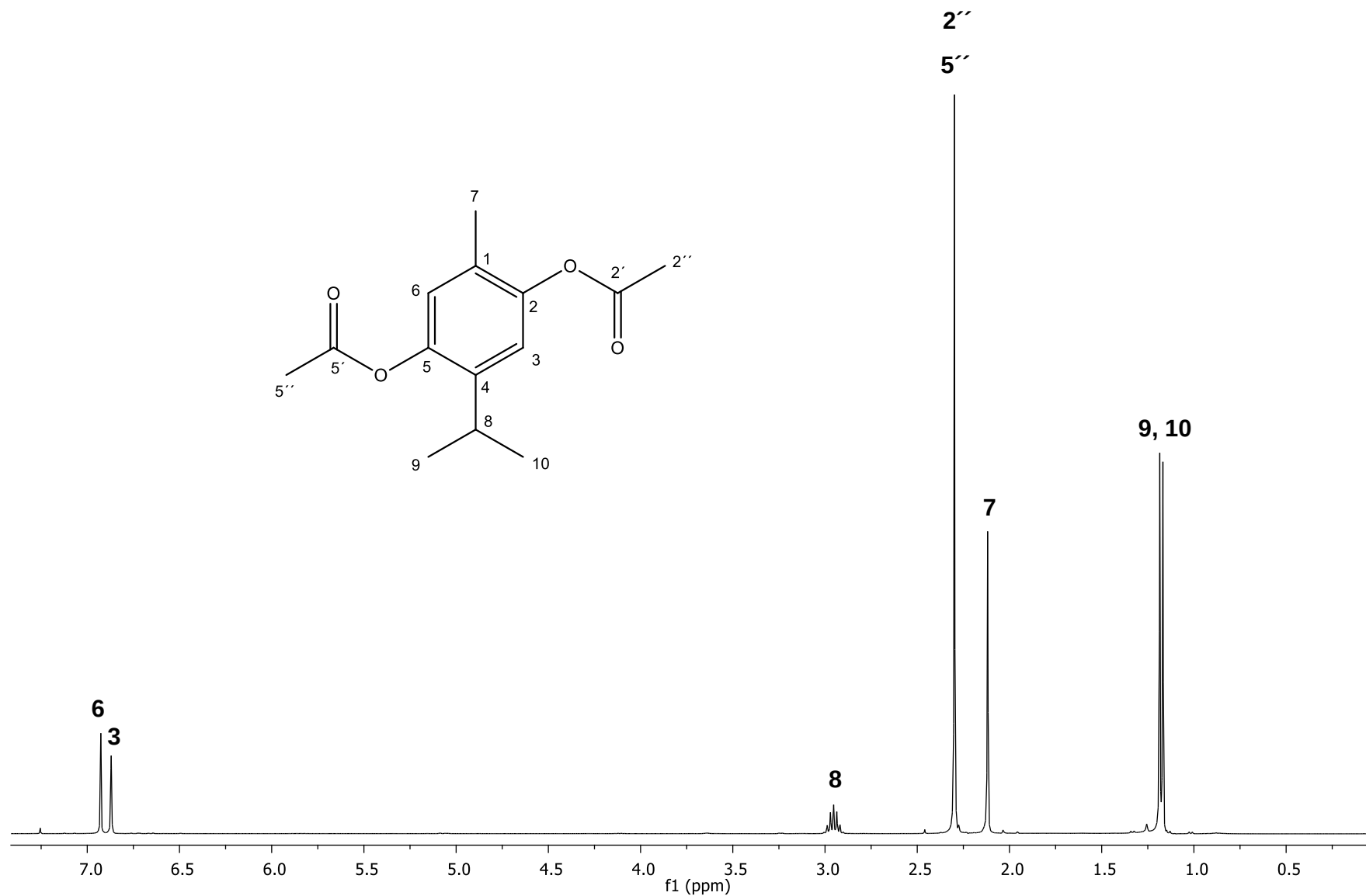


Figura 17. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del compuesto **42** en CDCl_3 .

Jessica Montserrat Lorenzo García

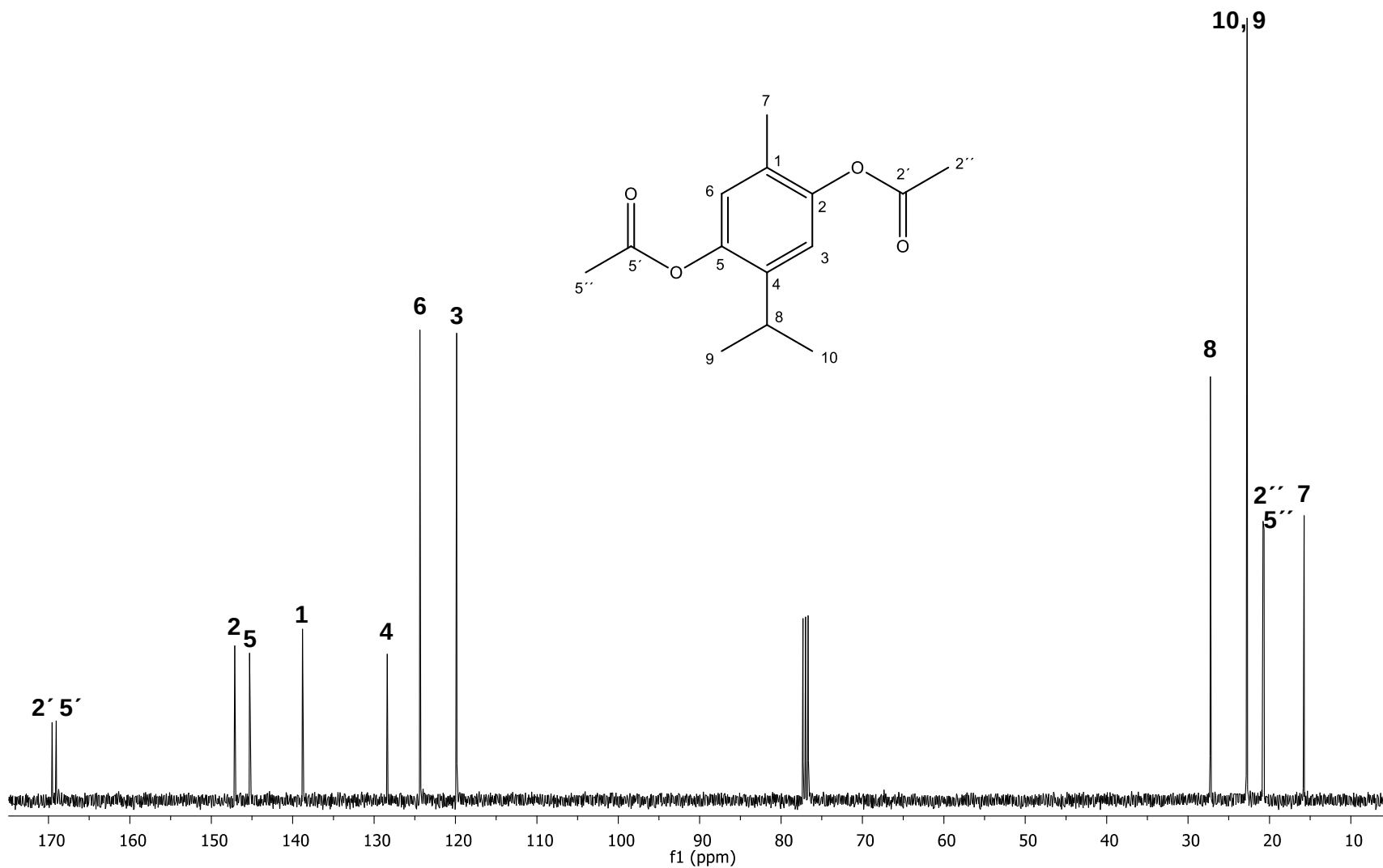
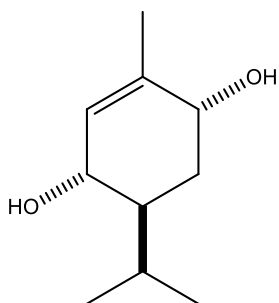


Figura 18. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del compuesto **42** en CDCl_3 .

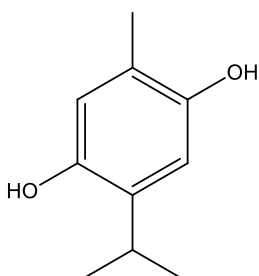
7 CONCLUSIONES

De la hidrólisis ácida del extracto metanólico de la parte aérea de *Ageratina glabrata* se aisló el compuesto **35**.

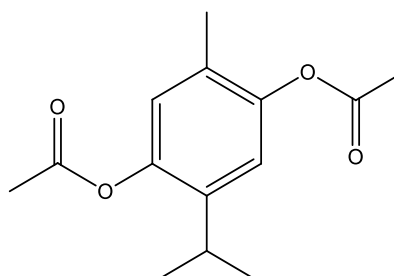


35

A partir del compuesto **35** por medio de reacciones con CrO_3 y PCC se obtuvo la timohidroquinona (**1**), el rendimiento bajo condiciones de reacción con PCC fue de 49% y con CrO_3 de 39%. A partir de la timohidroquinona (**1**) se preparó el derivado diacetilado **42**.



1



42

8 REFERENCIAS

- Abdelazeem H., Mohamed A., Gouda A., Omar A. & Robaian M. Novel Thymohydroquinone Derivatives as Potential Anticancer Agents: Design, Synthesis and Biological Screening. *Australian Journal of Chemistry*. **2016**, 69 (11), 1277-1284
- Ávalos G. & Pérez-Urria C. Metabolismo secundario de plantas. *Serie Fisiología Vegetal* **2009**, 2 (3), 119 - 145.
- Bustos-Brito C., Vázquez-Heredia V.J., Calzada F., Yépez-Mulia L., Calderón S.J., Hernández-Ortega S., Esquivel B., García-Hernández N., Quijano L. Antidiarrheal Thymol Derivatives from *Ageratina glabrata*. Structure and Absolute Configuration of 10-Benzoyloxy-8,9-epoxy-6-hydroxythymol Isobutyrate. *Molecules* **2016**, 21 (9) 11 - 32.
- Dewick P. M. *Natural Product Reports* **2002**, (19) 181 - 222.
- Friedman M. J. Chemistry and multibeneficial bioactivities of carvacrol (4-isopropyl-2-methylphenol), a component of essential oils produced by aromatic plants and spices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2014**, 62, 7652 - 7670.
- Galván Gómez S. Efecto analgésico de un derivado de timol de *Ageratina glabrata*. **2016** Tesis de licenciatura presentada en la facultad de Químico Farmacobiología de la UMSNH.
- Galván Gómez S. Preparación de derivados de *p*-menteno y su análisis por dicroísmo circular vibracional **2019** Tesis de maestría presentada en el Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la UMSNH.
- García P.G., del Río T.R., Ramón Guzmán M., Martínez G.I., Tomas R.F. Estudios preliminares sobre el efecto analgésico del extracto de hojas de *Ageratina glabrata* en dos métodos térmicos de dolor agudo. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* **2011**, 42, 45 - 51.

- García-Sánchez C. A., Sánchez-González A., Villaseñor J. L. La familia Asteraceae en el parque nacional los mármoles, Hidalgo, México. *Acta Botánica Mexicana* **2014**, 2 (106), 97 - 116.
- Henkel, T., Brunne R. M., Müller H., Reichel F. Statistical investigation into the structural complementarity of natural products and synthetic compounds. *Angewandte Chemie International* **1999**, 38, 643 - 647.
- Ivankovic S., Stojkovic R., Jukic M., Milos M., Milos M., Jurin M. The antitumor activity of thymoquinone and thymohydroquinone in vitro and in vivo. *Experimental Oncology* **2006**, 28 (3), 220 - 234.
- Juárez J., Cardona M., Rincón S. *Farmacología General*. Universidad Autónoma de Aguascalientes, Textos Universitarios 2da edición. **2008**, 117 - 153.
- Jukic M., Politeo O., Maksimovic M., Milos M., Milos M. In Vitro Acetylcholinesterase Inhibitory Properties of Thymol, Carvacrol and their Derivatives Thymoquinone and Thymohydroquinone. *Phytotherapy Research* **2007**, 21 (3), 259 - 261.
- Kamat, S. P., D'Souza, A. M., & Paknikar, S. K. Sodium metaperiodate oxidation of isocarvacrol. *Journal of Chemical Research* **2003**, (7), 395 - 397.
- Metwally M., Dawidar A., Metwally S. A new thymol derivate from *Pulicaria undulata*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **1986**, 34 (1), 378 - 379.
- Muñoz, J. L. La familia Asteraceae . Centro de Investigación Científica de Yucatán **2010**, (2), 82 - 84.
- Oviedo. L., Numpaque M., Gil J., García C., Durango D. Thymol and carvacrol: biotransformation and antifungal activity against the plant pathogenic fungi colletotrichum acutatum and botryodiplodia theobromae. *Tropical plant pathology* **2011**, 36 (1), 03 - 13.

- Pardo Novoa J.C. Estudio fitoquímico y microbiano de *Eupatorium glabratum* H.B.K. **2010**. Tesis de licenciatura presentada en la Facultad de Químico Farmacobiología de la UMSNH.
- Pardo Novoa J.C. Estudio químico de extractos polares de *Ageratina glabrata* H.B.K. **2014** Tesis de maestría presentada en el Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la UMSNH.
- Pardo-Novoa J., Arreaga-González H., Galván-Gómez S., Rodríguez-García G., del Río R.E., Cerda-García-Rojas C., Joseph-Nathan P., Gómez-Hurtado M. Biomimetic Transformation of *p*-Menthene Glucosides into *p*-Cymenes and Carvotanacetone. *Journal of Natural Products* **2019**, 82, 485 - 491.
- Pardo-Novoa J., Arreaga-González H., Gómez-Hurtado M.A., Rodríguez-García G., Cerda-García-Rojas C., Joseph-Nathan P., del Río R. E. Absolute Configuration of Menthene Derivatives by Vibrational Circular Dichroism. *Journal of Natural Products* **2016**, 79 (10), 2570 - 2579.
- Pimienta-Ramírez L., García-Rodríguez Y., Ríos-Ramírez E., Lindig-Cisneros R., Espinosa-García F. Chemical composition and evaluation of the essential oil from *Eupatorium glabratum* as biopesticide against *Sitophilus zeamais* and several stored maize fungi. *Journal of Essential Oil Research* **2016**, 28 (2), 113 - 120.
- Sanabria-Galindo A., Arciniegas N., Suarez I. Timol y Carvacrol sustancias responsables de la actividad antimicrobiana de *Ageratina ibanguensis*. *Revista colombiana de Ciencias químico farmacéuticas* **1999**, 28, 83 - 88.
- Talavera-Alemán A., Rodríguez-García G., López Y., García-Gutiérrez H., Torres-Valencia J., del Río R.E., Cerda-García-Rojas C., Joseph-Nathan P., Gómez-Hurtado M.A. Systematic evaluation of thymol derivatives possessing stereogenic or prostereogenic centers. *Phytochemistry Reviews* **2016**, 15, 251 - 277.

- Tissier A., Ziegler J., Vogt T. Specialized plant metabolites: Diversity and biosynthesis, Ecological biochemistry: Environmental and interspecies interactions, **2014** 14 - 37.
- Turner B.L., Nesom G.L. Diversity and endangered or threatened status of Mexican (Asteraceae) biological diversity of Mexico. Origins and distribution edit by ramamoorthy, **1993**, 20, 559 - 575.
- Zhou Z., Lui W., Pei G., Ren H., Wang J., Xu Q., Xie H., Wan F., Tan J. Phenolics from *Ageratina adenofora* roots and their phytotoxic effects on *Arabidopsis taliana* seed germination and seedling growth, Journal of agricultural and food chemistry **2013**, 61, 11792 - 11799.