



**Universidad Michoacana de San Nicolás
de Hidalgo**



FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

TESIS

Obtención de un *p*-menteno de hojas y tallos de *Ageratina glabrata*.

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO
PRESENTA

ALONSO YAEL GARCIA BARRERA

DIRECTORES
D.C. ROSA ELVA NORMA DEL RÍO TORRES
M.C. SINUHÉ GALVÁN GÓMEZ

Morelia, Mich.

Agosto 2023

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Química de Productos Naturales del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la asesoría de la D.C. Rosa Elva Norma del Río Torres y el M.C. Sinuhé Galván Gómez con el apoyo económico al Proyecto por la CIC-UMSNH.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	i
ÍNDICE DE TABLAS	ii
ÍNDICE DE ESQUEMAS	ii
SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	ii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
JUSTIFICACIÓN	12
OBJETIVOS	13
Objetivo general	13
Objetivos específicos	13
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	14
CONCLUSIONES	23
PARTE EXPERIMENTAL	24
Generalidades	24
Material Vegetal	24
Obtención de extractos	24
Hidrólisis ácida	24
Obtención del 6 α -hidroxi-3 α -metoxi-1- <i>p</i> -menteno (40)	25
Preparación del 6 α -acetoxi-3 α -metoxi-1- <i>p</i> -menteno (41)	25
REFERENCIAS	27

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Monoterpenos aislados de fuentes naturales.	2
Figura 2. Clasificación de alcoholes.	3
Figura 3. Monoterpenos aislados de <i>Daucus carota</i> .	5
Figura 4. Mentenos aislados del fruto <i>Amomum tsao-ko</i> .	6
Figura 5. Monoterpenos de <i>C. ambrosioides</i> .	6
Figura 6. Pileadimenrenoles de <i>P. aquarum</i> .	7
Figura 7. Sesquiterpenos aislados de las hojas de <i>A. glabrata</i> .	7
Figura 8. Derivados acetilados aislados de <i>A. glabrata</i> .	8
Figura 9. Monoterpenos aislados de <i>A. glabrata</i> .	8
Figura 10. Timoles aislados de los extractos hexánicos de tallos y hojas <i>A. glabrata</i> .	8
Figura 11. 10-Benzoiloxi-8,9-epoxi-6-hidroxi isobutirato de timilo.	9
Figura 12. Mentenos glucosilados aislados del extracto metanólico de <i>A. glabrata</i> .	9
Figura 13. <i>p</i> -Mentenos aislados de la hidrólisis ácida de 24 y 25 .	10
Figura 14. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del tratamiento ácido de la fase acuosa del macerado en metanol de <i>A. glabrata</i> , en CDCl_3 .	15
Figura 15. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del 6 α -hidroxi-3 α -metoxi-1- <i>p</i> -menteno (40).	16
Figura 16. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del 6 α -hidroxi-3 α -metoxi-1- <i>p</i> -menteno (40).	17
Figura 17. Experimento COSY de 6 α -hidroxi-3 α -metoxi-1- <i>p</i> -menteno (40).	19
Figura 18. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del 6 α -acetoxi-3 α -metoxi-1- <i>p</i> -menteno (41).	20
Figura 19. Expansión de la región de 3.0 a 4.0 ppm del espectro RMN de ^1H a 400 MHz.	21
Figura 20. Compuestos obtenidos de <i>Ageratina glabrata</i> 6 α -hidroxi-3 α -metoxi-1- <i>p</i> -menteno (40) y 6 α -acetoxi-3 α -metoxi-1- <i>p</i> -menteno (41).	23

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Reacciones de Sustitución Nucleofílica.	4
Tabla 2. Comparación de señales del 6 α -hidroxi-3 α -metoxi-1- <i>p</i> -menteno (40).	18

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Reacción de sustitución nucleofílica.	3
Esquema 2. Esterificación de alcoholes.	5
Esquema 3. Posibles mecanismos de reacción para la obtención de 29 y 30 .	10
Esquema 4. Obtención de <i>p</i> -cimeno (35) y carvacrol (35).	11
Esquema 5. Obtención de la timohidroquinona (36).	11
Esquema 6. Posible mecanismo de reacción de la obtención de 40 .	18
Esquema 7. Preparación del 6 α -acetoxi-3 α -metoxi-1- <i>p</i> -menteno (41).	20
Esquema 8. Probables mentenos obtenidos por tratamientos ácidos de 24 y 25 .	22

SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
β	Beta
cm	Centímetro
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
δ	Desplazamiento químico
g	Gramo
Hz	Hertz

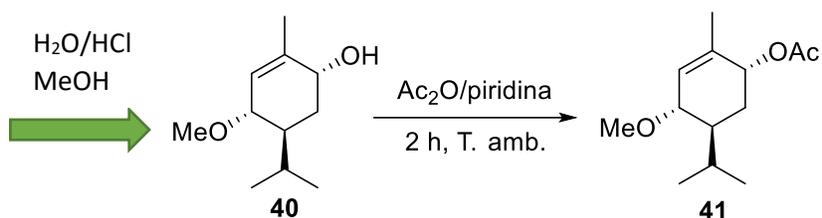
h	Horas
km	Kilómetro
MHz	Mega Hertz
mg	Miligramo
mL	Mililitro
ppm	Partes por millón
%	Porcentaje
RMN de ^{13}C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono
RMN de ^1H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
d	Señal doble
ddd	Señal doble de doble de dobles
dddd	Señal doble de dobles de dobles de dobles
dsept	Señal doble de séptuple
dt	Señal doble de triple
s	Señal simple
t	Señal triple
SN_2	Sustitución Nucleofílica Bimolecular
SN_1	Sustitución Nucleofílica Unimolecular
TMS	Tetrametilsilano

RESUMEN

El presente trabajo describe el aislamiento del 6 α -hidroxi-3 α -metoxi-1-*p*-menteno (**40**) a partir de la hidrólisis ácida de la parte acuosa del extracto metanólico de las partes aéreas de *Ageratina glabrata*, conocida comúnmente como chamizo blanco, hierba del golpe o hierba de la mula, una planta ampliamente utilizada en la medicina tradicional por su efecto analgésico y de donde se han aislado compuestos fenólicos y en su mayoría terpenos. Además, se realizó la reacción de acetilación de la cual se obtuvo el compuesto 6 α -acetoxi-3 α -metoxi-1-*p*-menteno (**41**) los cuales fueron identificados por Resonancia Magnética Nuclear.



Ageratina glabrata

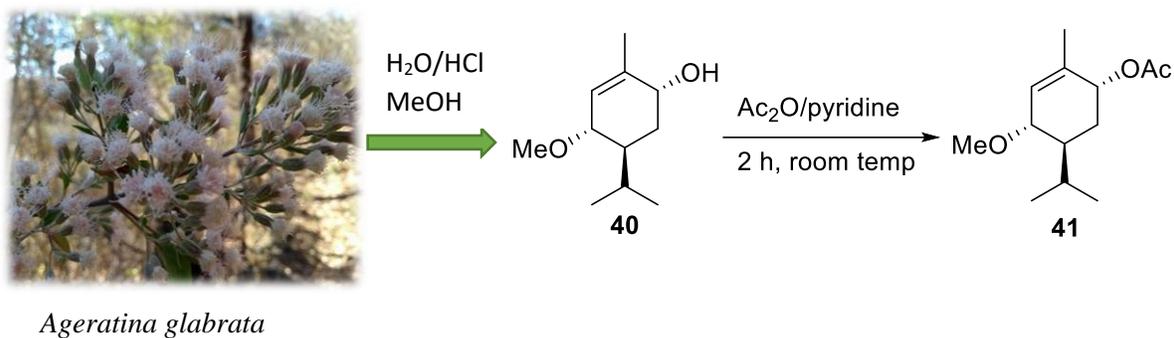


Palabras clave: *p*-menteno, *Ageratina glabrata*, monoterpeno, hidrólisis.

ABSTRACT

The present work describes the isolation of 6 α -hydroxy-3 α -methoxy-1-*p*-menthene (**40**), from the acid hydrolysis of the aqueous part of the methanolic extract of the aerial parts of *Ageratina glabrata*, commonly known as white grass hut or mule or hit weed, this plant is highly used in the traditional medicine for its analgesic effects and from where phenolic compounds and most terpenes have been isolated.

Also, the acetylation reaction was prepared, from which the compound 6 α -acetoxy-3 α -methoxy-1-*p*-menthene (**41**) was obtained, which were identified by Nuclear Magnetic Resonance.



Key words: *p*-menthene, *Ageratina glabrata*, monoterpene, hydrolysis.

INTRODUCCIÓN

Desde el principio de la humanidad, el hombre ha recurrido a la naturaleza en busca de alimento principalmente, pero mediante algunos errores, comenzaron a observar que había ciertas plantas que los curaban de ciertos males. Este conocimiento fue creciendo cada vez más, al encontrar más plantas curativas; la información fue pasando de generación en generación, hasta que diversas civilizaciones antiguas la plasmaron en pergamino, creando así los primeros escritos sobre las plantas medicinales (Hernández & Jordá, 1981).

Los productos naturales tienen una importancia para la función biológica para la propia planta; además de tener funciones como agentes terapéuticos directos, sirven de modelos de sustancias bioactivas, como materia prima para sintetizar nuevos fármacos. De los fármacos nuevos aprobados por la FDA entre los años 1981 y 2008, el 57.7% tienen origen en los productos naturales o derivados de los mismos (Ravelo & Braun, 2009).

La mayor parte de los compuestos bioactivos que se originan de plantas se siguen destacando a pesar del desarrollo de los sintéticos (Yang, *et al.*, 2012), puesto que las plantas superiores cuentan con millones de moléculas que cuentan con actividades farmacológicas que son útiles para el ser humano (Dewick, 2009), no solo en fármacos, sino también su uso como herbicidas, insecticidas, colorantes, aromatizantes, entre otros (Vanegas, 2017).

Estos metabolitos secundarios se clasifican en tres grupos principales: terpenos, compuestos fenólicos y alcaloides (Ávalos & Pérez-Urria, 2009). Los terpenos son un tipo de metabolitos secundarios cuya estructura fundamental es el isopreno, el cual es un compuesto de cinco átomos de carbono, dependiendo del número de unidades de isopreno enlazados, estos se clasifican en; hemiterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, sesterterpenos, triterpenos, tetraterpenos y politerpenos. (Macías Villamizar, *et al.*, 2010).

Las propiedades biológicas de los monoterpenos y sus derivados son actividad anticancerígena, antiinflamatoria, antihiperlipidémica, antibacteriana, antifúngica, antiviral, analgésica, antioxidante y antiparasitaria; los ha llevado a una amplia utilización clínica. Las modificaciones en estos compuestos son deseables para su aplicación en cualquier área, ya sea química, cosmética, médica e industrial, **Figura 1**, (Zielinska-Błajet, *et al.*, 2021).

MONOTERPENOS NATURALES

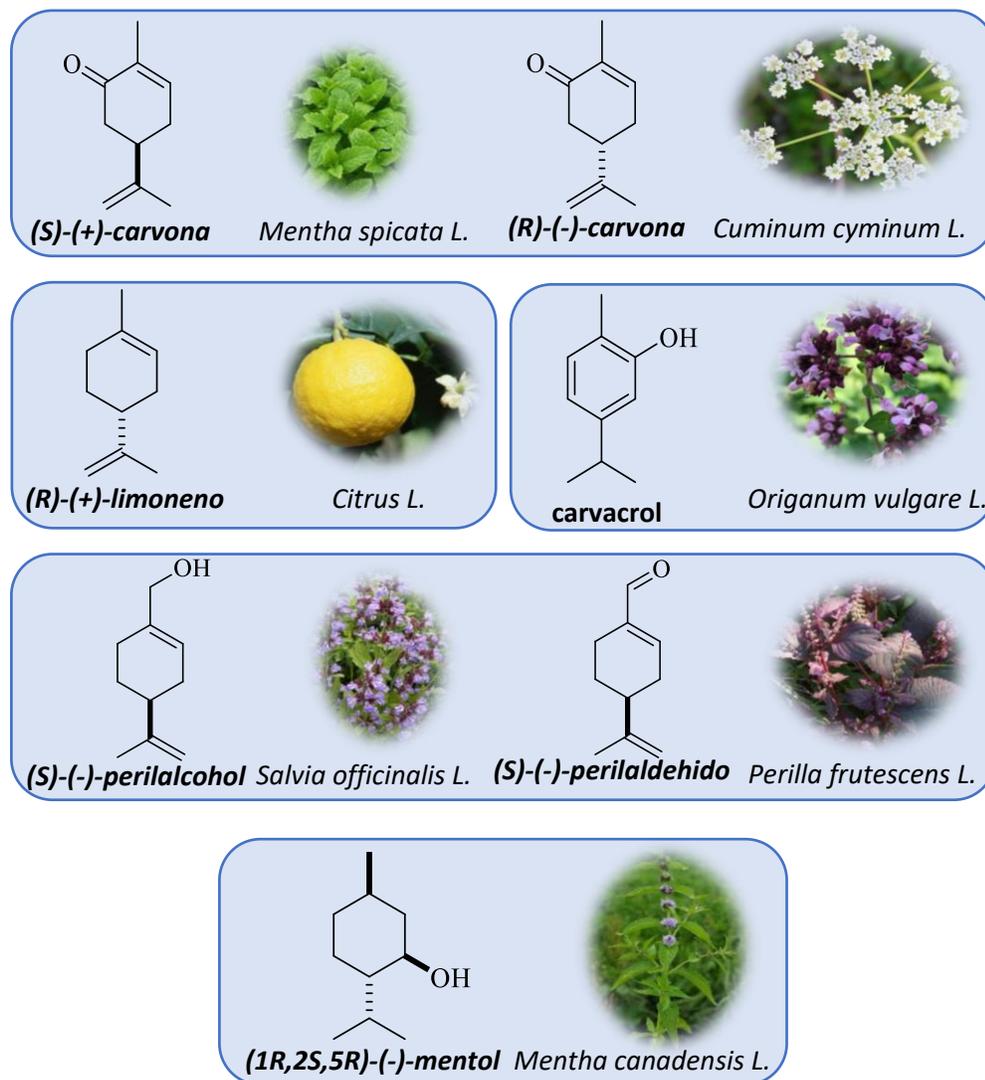


Figura 1. Monoterpenos aislados de fuentes naturales (Modificado de Zielinska-Blajet, M. et al., 2021).

ANTECEDENTES

La modificación química de productos naturales es una estrategia para producir bibliotecas de compuestos químicos con potencial farmacológico. Estas metodologías procuran aprovechar los esqueletos químicos de origen natural, sumando a su particularidad, elementos que no están comúnmente presentes en las estructuras químicas de productos naturales pero que poseen entre las estructuras núcleos o grupos funcionales privilegiados que permitan la modificación. Uno de estos grupos químicos corresponde al hidroxilo comúnmente llamados alcoholes.

Un alcohol es un compuesto en el que el grupo OH sustituye a un hidrógeno de un alcano, están clasificados en primarios, secundarios y terciarios, según si el grupo OH está unido a un carbono primario, secundario o terciario **Figura 2** (Yurkanis, 2008).

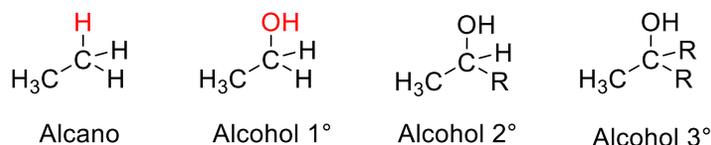
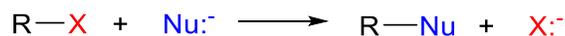


Figura 2. Clasificación de alcoholes

Las propiedades químicas de los alcoholes están determinadas por su grupo funcional, el grupo hidroxilo, -OH. Las reacciones de un alcohol pueden involucrar la ruptura de uno de los dos enlaces: el enlace C-OH con eliminación del grupo OH, o el enlace O-H con eliminación de -H. Los dos tipos de reacción pueden implicar la eliminación en la que se genera un doble enlace, o sustitución, en la que un grupo reemplaza el -OH o el -H, (Groutas, 2007).

Por otro lado, las reacciones de sustitución nucleofílica son uno de los tipos de reacción más común y versátiles en química orgánica (**Esquema 1**).

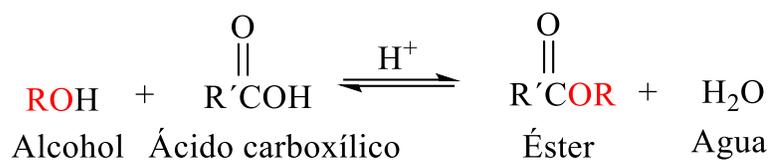


Esquema 1. Reacción general de sustitución nucleofílica

Tabla 1. Reacciones de Sustitución Nucleofílica

	SN ₁	SN ₂
Mecanismo	Dos pasos elementales: Paso 1: $R-\overset{\cdot\cdot}{\underset{\cdot\cdot}{X}} \rightleftharpoons R^+ + \overset{\cdot\cdot}{\underset{\cdot\cdot}{X}} \quad \text{Paso}$ Paso 2: $R^+ + \text{:Nu}^- \rightarrow R-\text{Nu}$	Paso único: $\text{:Nu}^- \curvearrowright R-\overset{\cdot\cdot}{\underset{\cdot\cdot}{X}} \rightarrow \text{Nu}-R + \overset{\cdot\cdot}{\underset{\cdot\cdot}{X}}$
Estado de transición determinante de la reacción	$\delta^+ R \cdots \overset{\cdot\cdot}{\underset{\cdot\cdot}{X}} \cdots \delta^-$	$\delta^- \text{Nu} \cdots R \cdots \overset{\cdot\cdot}{\underset{\cdot\cdot}{X}} \cdots \delta^-$
Molecularidad	Unimolecular	Bimolecular
Cinética	Primer orden	Segundo orden
Efecto del nucleófilo	El nucleófilo no interviene en la rapidez de la sustitución.	La rapidez dependerá tanto de la naturaleza como de la concentración del nucleófilo.
Efecto del disolvente	La rapidez aumenta con la polaridad	Los polares apróticos logran mayor rapidez en la sustitución.
Estereoquímica	No estereoespecífico	Estereoespecífico
Potencial transposición	El carbocatión intermediario puede experimentar transposiciones.	No hay carbocatión intermediario.

Otro tipo de reacciones en los alcoholes es la esterificación, la cual consiste en la condensación de un alcohol y un ácido carboxílico y al catalizarse con ácidos se obtiene un éster y agua. La síntesis de ésteres se puede realizar con cloruros de ácido y anhídridos en presencia de alcoholes (**Esquema 2**) (Carey & Giuliano, 2014).



Esquema 2. Esterificación de alcoholes

En esta reacción el efecto es la sustitución de un grupo -OH por un grupo -OR. La esterificación es reversible, si hay un exceso de alcohol del disolvente se favorece la formación de ésteres; de igual manera se favorece la formación de ésteres si se elimina el agua utilizando benceno como codisolvente. En cambio, si se quiere favorecer la formación de ácido carboxílico, se utiliza un exceso de agua en el medio (McMurry, 2012).

Los monoterpenos hidroxilados son ideales para realizar derivatizaciones de interés químico y biológico para generar moléculas novedosas las cuales puedan ser utilizadas en la industria farmacéutica, alimentaria o cosmética, un ejemplo de ellos son los monoterpenos con esqueleto de *p*-menteno los cuales se generan a partir del difosfato de geranilo, este contiene solamente un centro estereogénico en la posición C-4; sin embargo, mediante diferentes modificaciones químicas pueden generarse más estereocentros. Algunos de estos derivados se han reportado en especies vegetales medicinales o de uso cotidiano, como el caso del extracto metanólico obtenido de la parte aérea de *Daucus carota* subsp. *hispidus* aislaron los monoterpenos **1-3** donde los compuestos **2** y **3** presentaron actividad citotóxica en las líneas celulares HSC-2 y HeLa **Figura 3** (Hammami, *et al.*, 2019).

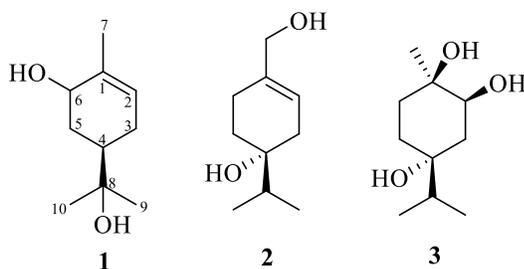


Figura 3. Monoterpenos aislados de *Daucus carota*.

Del fruto seco de *Amomum tsaoko* aislaron los monoterpenos con esqueleto de menteno **4-6**, **Figura 4** siendo este último el que presentó actividad antiinflamatoria y la

primera vez que obtienen mentenos del género *Amomum*. El fruto es usado en la medicina tradicional para tratar dolor abdominal, malaria, náuseas, trastornos estomacales, vómito y diarrea (Hong, *et al.*, 2021).

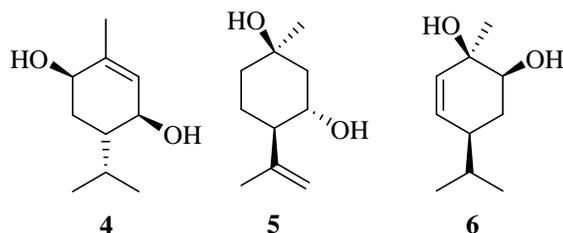


Figura 4. Mentenos aislados del fruto *Amomum tsao-ko*.

Del extracto de etanólico de tallos de *Chenopodium ambrosioides* aislaron los monoterpenos **7** como una mezcla racémica que mostró una ligera actividad antiinflamatoria y el triol **8**, las estructuras fueron establecidas de sus datos de RMN en una y dos dimensiones y de los datos espectroscópicos, **Figura 5** (Shu-Qun, *et al.*, 2017).

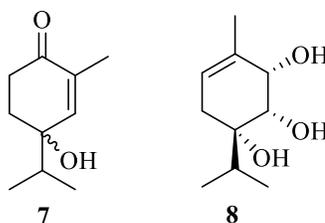


Figura 5. Monoterpenos de *C. ambrosioides*.

Recientemente del extracto de etanol de la parte aérea de *Pilea aquarum* subsp. *Brevicornuta*, planta utilizada en la medicina tradicional para tratar el dolor y la inflamación, identificaron tres monoterpenos **9-11** de tipo *p*-menteno peróxidos diméricos llamados pileadimentenoles A, B y C **Figura 6** (Yang, *et al.*, 2021).

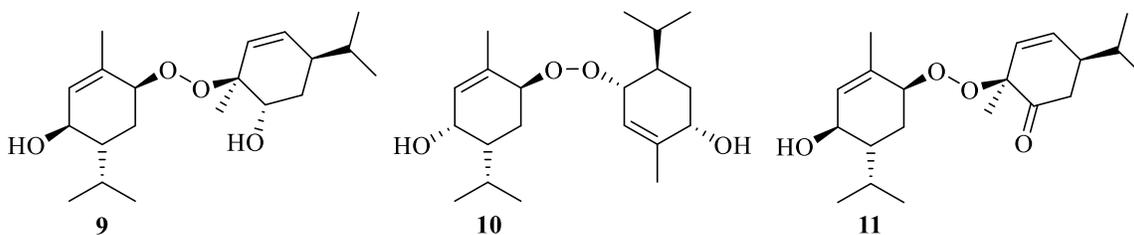


Figura 6. Pileadimentenoles de *P. aquarum*.

Ageratina glabrata es un arbusto de hasta 2.5 m de altura, tallos leñosos, cilíndricos, de flores blancas y en ocasiones de tintes rosados (Calderón & Rzedowski 2005). Es utilizada como analgésico en el tratamiento de golpes y fracturas (Bello-González & Salgado, 2007) En la medicina tradicional se le conoce como “chamizo blanco”, “hierba del golpe” o “hierba de la mula”, (Sánchez-González *et al.* 2008). *Ageratina glabrata* ha sido objeto de varios estudios químicos y biológicos, por ejemplo, el extracto de cloruro de metileno de las hojas de *Ageratina glabrata* mostró actividad analgésica en un modelo térmico de dolor agudo (García-Pérez, *et al* 2011).

Talavera-Alemán en el 2012 aisló del extracto de cloruro de metileno de hojas tres derivados de timol y los sesquiterpenos ácido ilícico (**12**) y ácido 3-oxo- γ -costico (**13**) **Figura 7**, sus estructuras fueron establecidas por comparación de sus datos espectroscópicos con los reportados en la literatura (Talavera-Alemán, 2012).

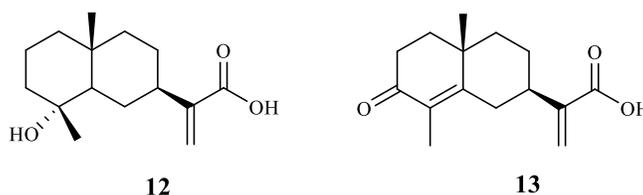


Figura 7. Sesquiterpenos aislados de las hojas de *A. glabrata*.

De la acetilación del extracto metanólico de las hojas de *Ageratina glabrata* aislaron a los derivados acetilados *neo*-inositol (**14**), la 7-acetil-pectolinaringenina (**15**) y 7-acetilacetina (**16**) (Arreaga-González, 2013), resaltando la acetilación parcial de los derivados flavonoides. **Figura 8.**

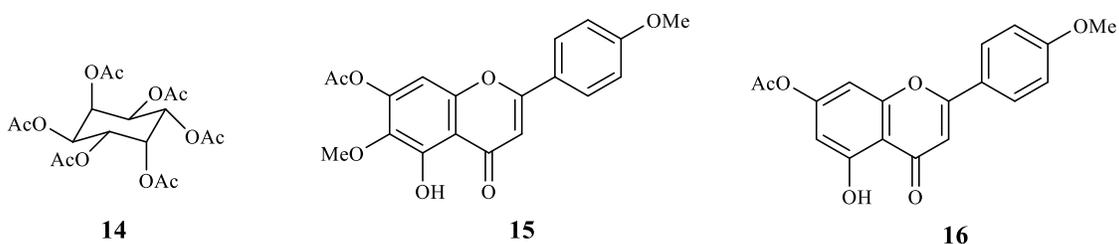


Figura 8. Derivados acetilados aislados de *A. glabrata*.

Dos años más tarde, las hojas de *Ageratina glabrata* frescas fueron extraídas por arrastre de vapor y el extracto fue analizado por cromatografía de gases acoplado a masa (CG-EM), detectándose como componentes mayoritarios al alfa-pineno (**17**) y alfa-felandreno (**18**) **Figura 9**, (Pimienta-Ramírez *et al.*, 2015).

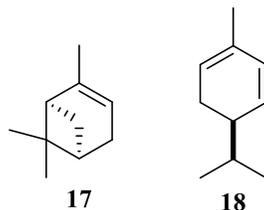


Figura 9. Monoterpenos aislados de *A. glabrata*

En ese mismo año, (Arreaga-González, 2015) aisló del extracto hexánico de tallos a los derivados de epoxitimol **19** y **20**, **Figura 10**, mientras que del extracto de hojas aisló a **21** y **22**.

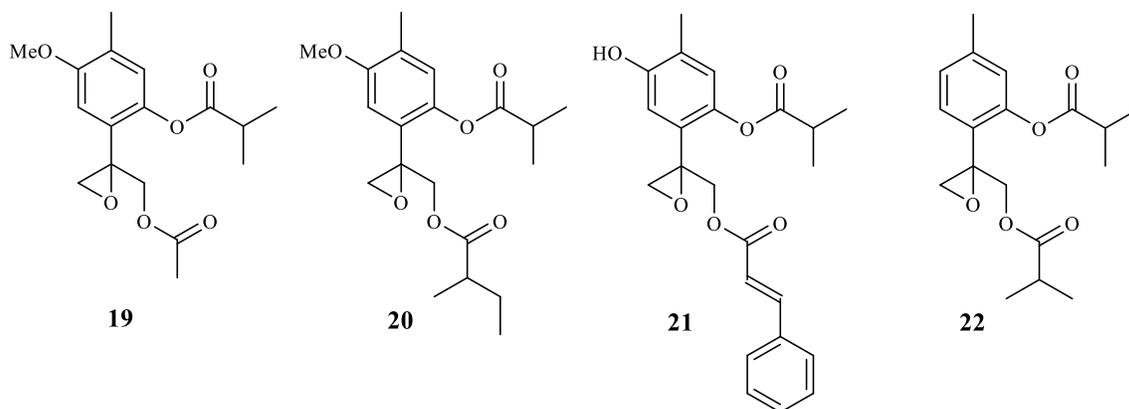


Figura 10. Timoles aislados de los extractos hexánicos de tallos y hojas *A. glabrata*.

Al año siguiente del extracto de cloruro de metileno de hojas aislaron siete derivados de timol, de los cuales el derivado **23** **Figura 11** puede ser el responsable de la actividad antidiarréica de la especie de *Ageratina glabrata* su configuración absoluta fue establecida por difracción de rayos X (Bustos-Brito *et al.*, 2016).

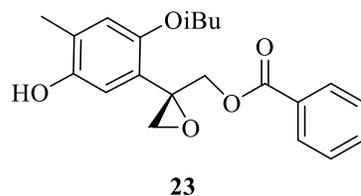


Figura 11. 10-Benzoiloxi-8,9-epoxi-6-hidroxi isobutirato de timolo (**23**)

Pardo-Novoa y colaboradores en 2016 obtuvieron el extracto metanólico de hojas de *A. glabrata*, después de realizar varias cromatografías sucesivas aislaron los mentenos glucosilados **24** y **25**, **Figura 12**.

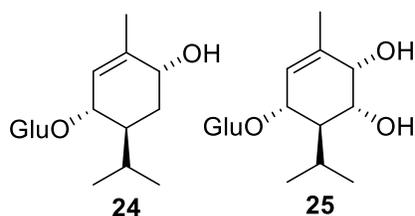


Figura 12. Mentenos glucosilados aislados del extracto metanólico de *A. glabrata*

Posteriormente mediante el tratamiento de una hidrólisis acuosa ácida obtuvieron los *p*-mentenos **26**, **27** y **28** a partir de **24**, los trioletos **29** y **30** a partir de **25** (**Figura 13**). La purificación de los mentenos la realizaron por cromatografías sucesivas.

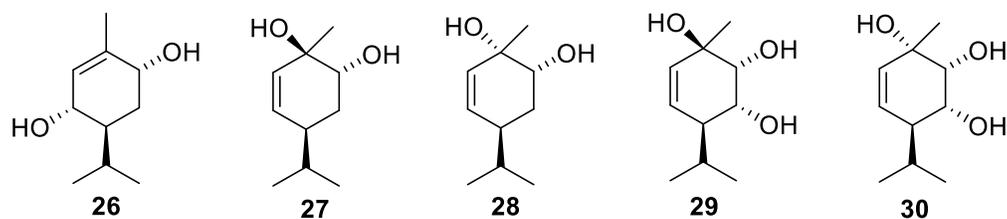
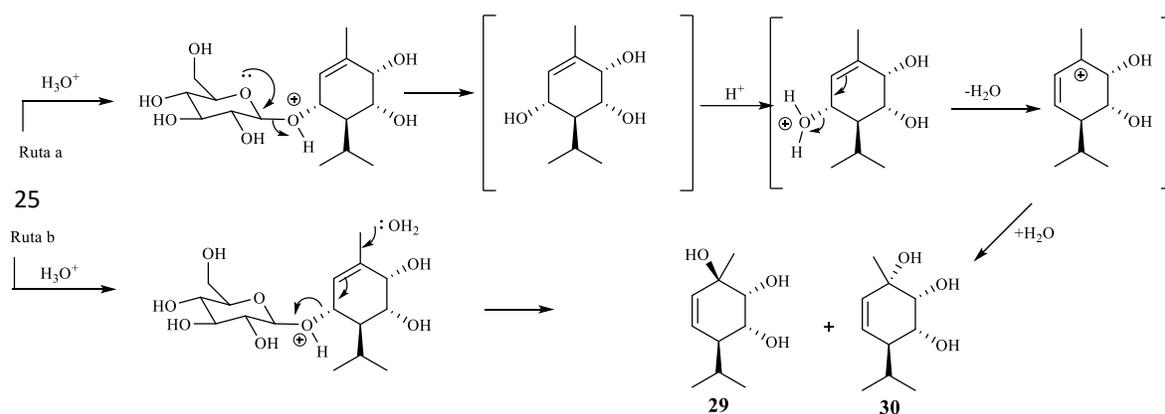


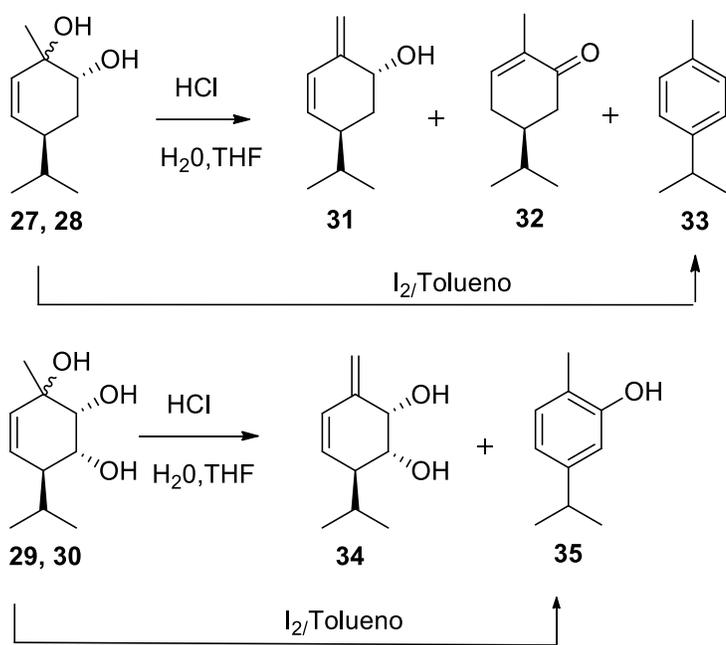
Figura 13. *p*-Mentenos aislados de la hidrólisis ácida de **24** y **25**

Para la formación de los *p*-mentenos proponen dos mecanismos de reacción posibles: Ruta a) Vía un carbocatión alílico y Ruta b) Un mecanismo concertado (**Esquema 3**) (Pardo Novoa, 2018).



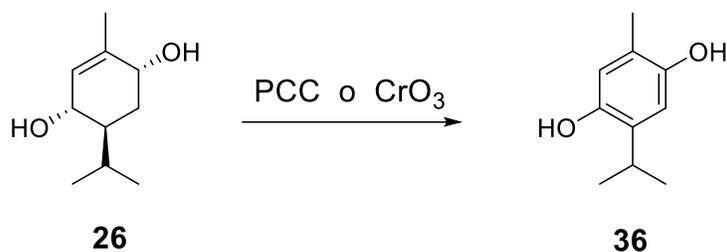
Esquema 3. Posibles mecanismos de reacción para la obtención de **29** y **30**

Adicionalmente, al someter los mentenos **27-30** a reacciones de deshidratación y oxidación como intermediarios de la reacción obtuvieron los dienos **31**, **34** y la carvotanacetona (**32**), lo cual permitió llevar la correlación biomimética entre estos glucósidos de *p*-menteno hacia el *p*-cimeno (**33**) y el carvacrol (**35**), (Pardo-Novoa, *et al.*, 2019), correspondiendo estos últimos a monoterpenos aromáticos (**Esquema 4**).



Esquema 4. Obtención de *p*-cimeno (35) y carvacrol (35).

En 2019, una investigación adicional fue la que permitió proponer una relación química entre el mentenodiol **26** y timohidroquinona (**36**), mediante una reacción de oxidación (**Esquema 5**), (Lorenzo-García, 2019) lo que resulta interesante la gran versatilidad de estas moléculas.



Esquema 5. Obtención de la timohidroquinona (36).

Por lo anteriormente mencionado se decidió realizar una variante en el método de extracción de *Ageratina glabrata*, ya que es una especie abundante en metabolitos secundarios de tipo monoterpeno los cuales pueden ser utilizados en la industria alimentaria, perfumería, cosmética o biotecnológica.

JUSTIFICACIÓN

Los metabolitos secundarios aislados de una fuente natural son agentes medicinales, en particular los monoterpenos que han sido objeto de investigación en el descubrimiento de fármacos antineoplásicos, ya que tienen efecto antitumoral potencial y baja toxicidad, además exhiben una amplia variedad de actividades biológicas como antiinflamatoria, antibacteriana y antioxidante. De igual manera, estos compuestos son utilizados por la industria como aditivos en alimentos, bebidas y perfumes. Estudios realizados a la especie vegetal *Ageratina glabrata* han puesto de manifiesto la presencia de *p*-mentenos, los cuales son de interés ya que permite obtener moléculas estratégicas para su evaluación biológica.

OBJETIVOS

Objetivo general

Realizar la hidrólisis ácida del extracto metanólico en fresco de los tallos y hojas de *Ageratina glabrata*, y obtener su componente mayoritario mediante técnicas cromatográficas.

Objetivos específicos

1. Realizar la hidrólisis ácida de la fase acuosa obtenida de la maceración con metanol de las hojas y tallos en fresco de *Ageratina glabrata*.
2. Aislar y purificar el compuesto mayoritario de la hidrólisis ácida.
3. Identificar el compuesto por métodos químicos y espectroscópicos.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Anteriormente Pardo-Novoa *et al.* 2016 y 2018 reportaron la hidrólisis ácida del extracto metanólico de la parte aérea con la materia vegetal seca. Con el cual realizó biparticiones líquido-líquido con diclorometano, de donde recuperó la fase acuosa, a la cual adicionaron ácido clorhídrico al 2%, 2 horas en agitación, lo que le permitió obtener los derivados de mentenos **26-30**.

En este proyecto se realizó la maceración en metanol de las partes aéreas frescas de *Ageratina glabrata*, evaporando en el rotavapor del cual se obtuvo una mezcla metanol-agua, debido a que la materia vegetal estaba fresca no se obtuvo un extracto total seco. Aprovechando que esta mezcla contenía cierta cantidad de metanol, se realizó el mismo proceso e iguales condiciones para la bipartición y la hidrólisis ácida, se obtuvo una miel color marrón la cual se analizó por RMN de ^1H , observándose señales de protones aromáticos entre 8.0-6.0 ppm, bases de heteroátomo alrededor de 4.5-3.0 ppm, 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 14**, comparándolo con el espectro de Pardo-Novoa *et al.* 2016 se observan señales adicionales características de grupos metoxilo que no se observan en el obtenido por dicho autor.

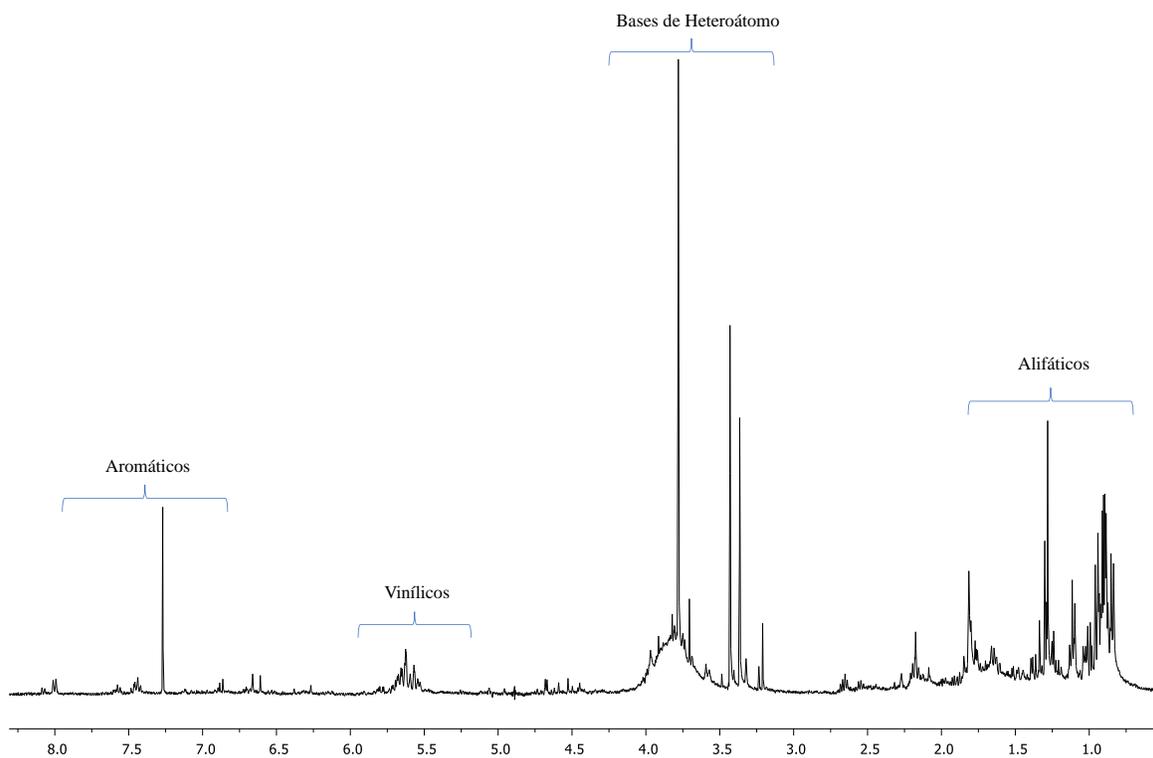


Figura 14. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del tratamiento ácido de la fase acuosa del macerado en metanol de *A. glabrata*, en CDCl_3

La miel color marrón fue llevada a cromatografía en columna para su separación, utilizando mezclas de hexanos-acetato de etilo iniciando con hexanos y aumentando su polaridad en orden creciente de donde se obtuvo el compuesto tipo *p*-menteno **40** en forma de miel ligeramente amarilla, con polaridad (4:1) en las fracciones 60-70. En el espectro de RMN de ^1H **Figura 15** se apreció en 5.61 ppm una señal simple del H-2 vinílico. En 3.98 ppm se observó una señal triple con $J = 3.6$ Hz correspondiente al protón H-6; en 3.56 ppm se encontró una señal doble con una constante de acoplamiento de $J = 8.4$ Hz correspondiente al H-3 base de éter, en 3.55 ppm se encontró una señal simple que integra para tres hidrógenos del metoxilo. En 2.00 ppm se visualizó la señal múltiple que corresponde al H-8. En 1.81 ppm se observó la señal simple que corresponde al CH_3 -7, en 1.77 ppm se apreció una señal múltiple correspondientes al H-5'. La señal en 1.66 ppm corresponde al H-4 y en 1.50 ppm se observó una señal doble de dobles de dobles con constantes de acoplamiento de $J = 12.4$, 8.4 y 4.0 Hz del H-5. Y por último en 0.95 y 0.84 ppm se visualizaron dos señales dobles con una constante de acoplamiento de $J = 6.8$ Hz de los metilos del isopropilo CH_3 -9 y CH_3 -10,

respectivamente, en la literatura no se encuentra ningún reporte, por lo que se sugiere que se trata de un compuesto nuevo.

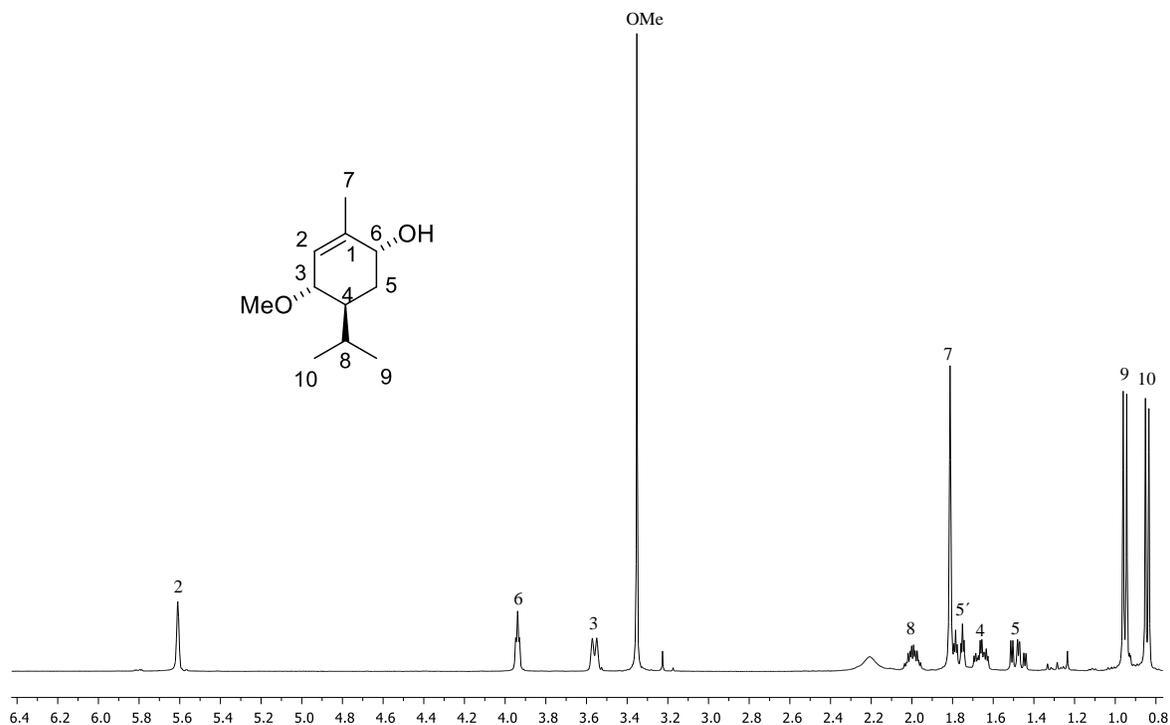


Figura 15. Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz del 6α-hidroxi-3α-metoxi-1-p-menteno (**40**).

El espectro de RMN de ¹³C **Figura 16** mostró 11 señales, de las cuales en 137.9 ppm se observó la señal correspondiente al carbono cuaternario C-1. En 125.5 ppm se ubicó la señal correspondiente al carbono de un doble enlace C-2. En 77.6 ppm se observó la señal del C-3, base de hidroxilo. En 67.8 ppm se encontró la señal base de metoxilo del C-6 y en 55.4 ppm la señal del metoxilo. En 39.0 y 30.6 ppm se encontraron las señales de dos carbonos en posición 4 y 8 respectivamente. En 26.1 ppm se encontró la señal correspondiente al C-5. En 20.8 se observó una señal correspondiente al metilo C-7. Por último, en 20.0 y 17.4 ppm se percibieron las señales de los metilos del isopropilo.

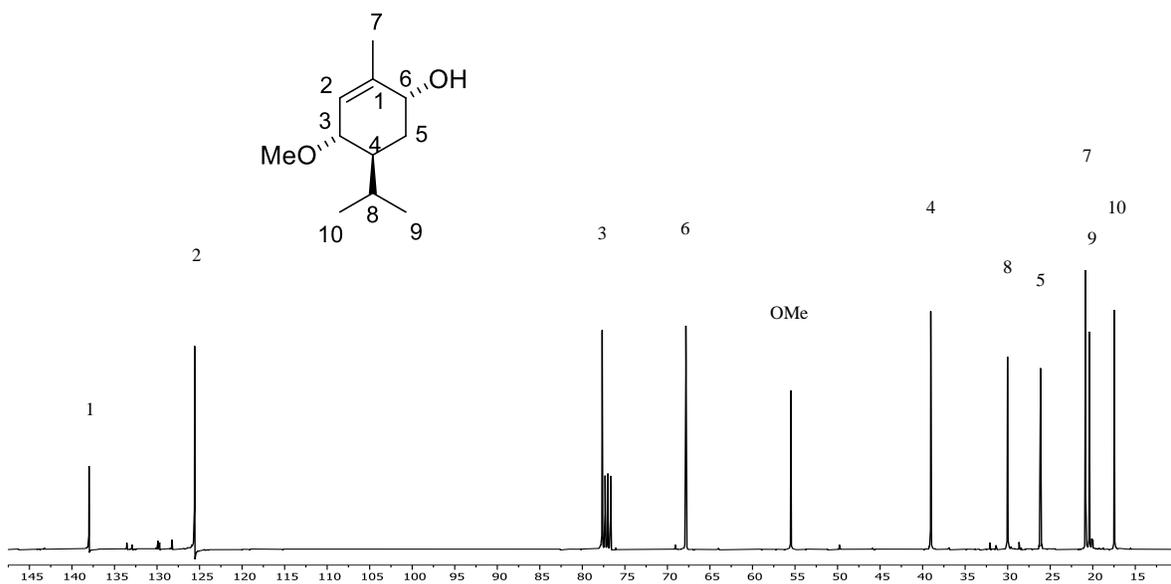
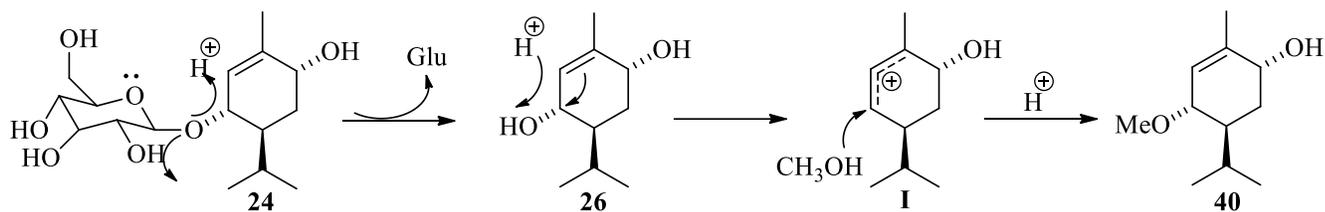


Figura 16. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del 6 α -hidroxi-3 α -metoxi-1-*p*-menteno (**40**).

El **Esquema 6** describe el posible mecanismo de reacción de la obtención de la aglicona **40** a partir del glucósido **24** que se conoce que está presente en el extracto metanólico (Pardo, *et al.*, 2016). Iniciando con la protonación del oxígeno en el C-3 de **24** y posteriormente la ruptura del enlace glucosídico con la salida de glucosa y la formación del compuesto **26**, para después ser protonado el OH-3, y la posterior deshidratación en el C-3 y la formación del carbocatión alílico (**I**) el cual es susceptible a un ataque nucleofílico por el metanol presente en el medio y generar el compuesto **40**, la hidrólisis ácida del extracto metanólico de la parte aérea de *Ageratina glabrata* se realizó como anteriormente ha reportado Pardo Novoa *et al.*, 2016, modificando las condiciones de reacción al tener la mezcla MeOH/H₂O en el medio. Sin embargo, para establecer el mecanismo de reacción es necesario obtener los compuestos metilados que se observan en la **Figura 13**, para poder determinar de manera inequívoca los compuestos intermediarios que se podrían generar, por lo que crecen las expectativas para seguir explorando la reactividad de los glucósidos de *p*-menteno y poder establecer su mecanismo de reacción en futuras investigaciones de los compuestos metoxilados obtenidos por esta metodología.



Esquema 6. Posible mecanismo de reacción de la obtención de **40**.

Las señales del compuesto **40** se compararon con los reportados en la literatura, (**Tabla 2**) por Pardo Novoa en 2016 para el compuesto **26**, donde se pueden observar las diferencias de los desplazamientos de ambos y además la señal simple corresponde al metoxilo en 3.35 ppm.

Tabla 2. Comparación de los desplazamientos químicos de **40** y **29**, en ppm (multiplicidad).



H ¹	6 α -hidroxi-3 α -metoxi-1- <i>p</i> -menteno (40)	3 α ,6 α -dihidroxi-1-menteno (26)
2	(sa) 5.61	(sa) 5.53
3	(d) 3.56	(sa) 3.94
4	(m) 1.66	(m) 1.51
5	(ddd) 1.48	(ddd) 1.46
5'	(dt) 1.77	(dt) 1.77
6	(ta) 3.94	(sa) 3.96
7	(s) 1.81	(s) 1.81
8	(septd) 2.00	(septd) 2.11
9	(d) 0.95	(d) 0.99
10	(d) 0.84	(d) 0.85
OCH ₃	(s) 3.35	-

Por otro lado, las señales H-3 y H-6 base de alcohol del compuesto **26**, se encuentran casi traslapadas por lo que se dificulta ubicar la posición en que se encuentra el grupo metoxilo del compuesto **40** por comparación de los desplazamientos químicos, lo que llevó a hacer el análisis del experimento COSY (**Figura 17**), donde se pudieron observar las correlaciones entre el H-3 que se encuentra en 3.56 ppm, con los hidrógenos del metoxilo ubicados en 3.35 ppm y el H-2 correspondiente al hidrógeno vinílico en 5.61 ppm; confirmando que el grupo metoxilo se encuentra en la posición del C-3.

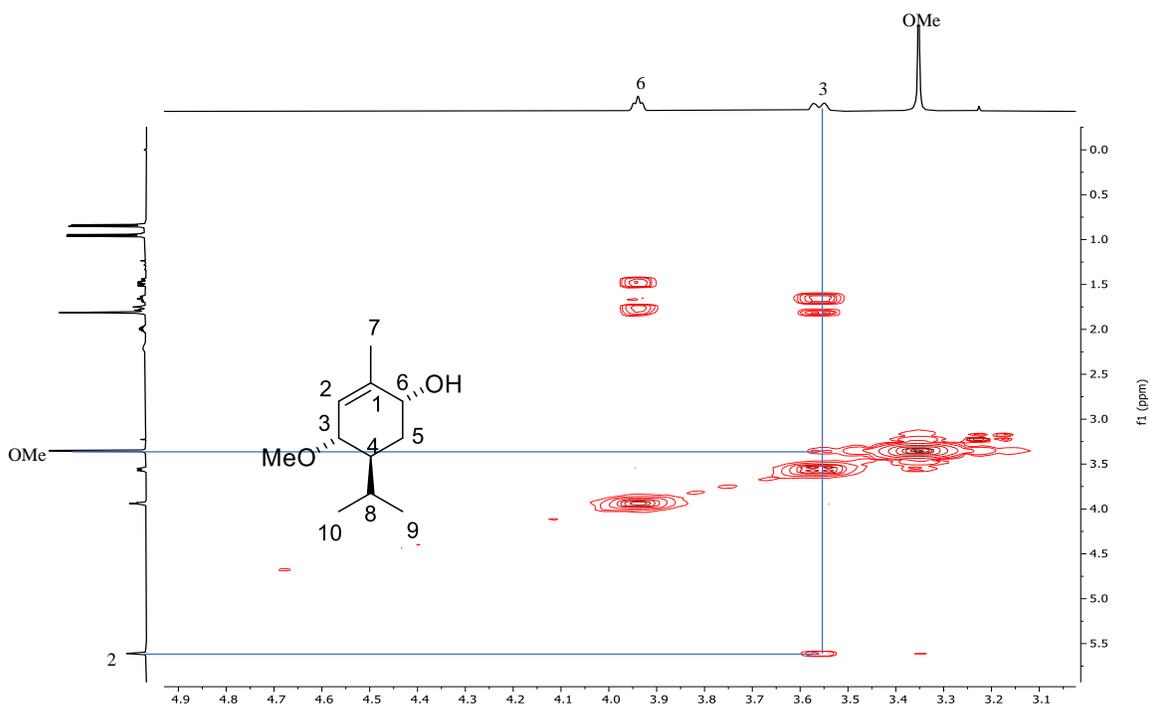
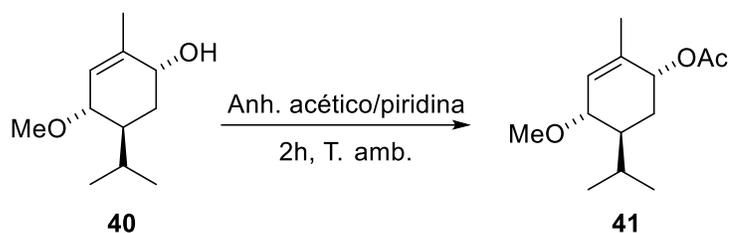


Figura 17. Experimento COSY de 6 α -hidroxi-3 α -metoxi-1-*p*-menteno (**40**).

Una vez obtenido el 6 α -hidroxi-3 α -metoxi-1-*p*-menteno (**40**) se llevó a cabo la acetilación para la obtención de **41**, con la finalidad de comprobar la presencia del grupo hidroxilo; el cual se hizo reaccionar con anhídrido acético en piridina a temperatura ambiente durante 2 h (**Esquema 7**). El crudo de reacción se purificó mediante cromatografía en columna utilizando gel de sílice como fase estacionaria y una mezcla de hexanos-acetato de etilo con una polaridad (4:1), obteniendo una miel incolora.



Esquema 7. Preparación del 6 α -acetoxi-3 α -metoxi-1-*p*-menteno (**41**).

En el espectro de RMN de ^1H se observó el desplazamiento a frecuencia mayor del H-6 en 5.18 ppm, lo que indicó un cambio del grupo funcional en esta posición; de igual manera, adicionalmente apareció la señal simple en 2.06 ppm, correspondiente a los hidrógenos del metilo del acetato, **Figura 18**, que corroboran la formación del derivado 6 α -acetoxi-3 α -metoxi-1-*p*-menteno (**41**), el cual es un compuesto novedoso.

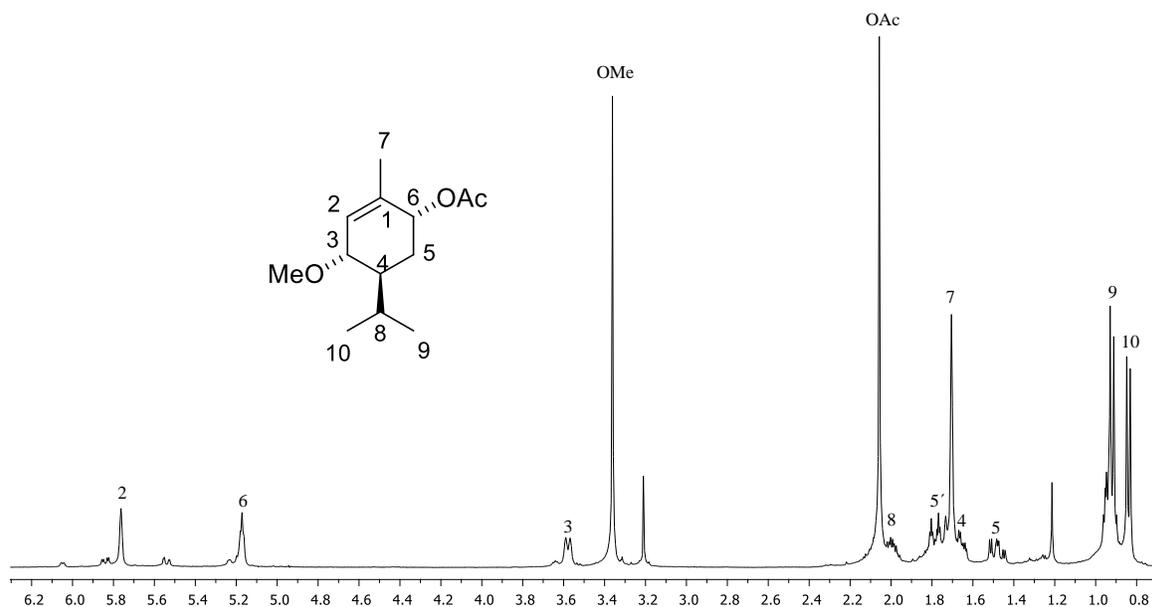


Figura 18. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del 6 α -acetoxi-3 α -metoxi-1-*p*-menteno (**41**).

Como puede observarse en la expansión del espectro de RMN de ^1H del tratamiento ácido de la fase acuosa del macerado en metanol en la zona de 3 a 4 ppm, la presencia de tres señales más intensas de metoxilos, **Figura 19**.

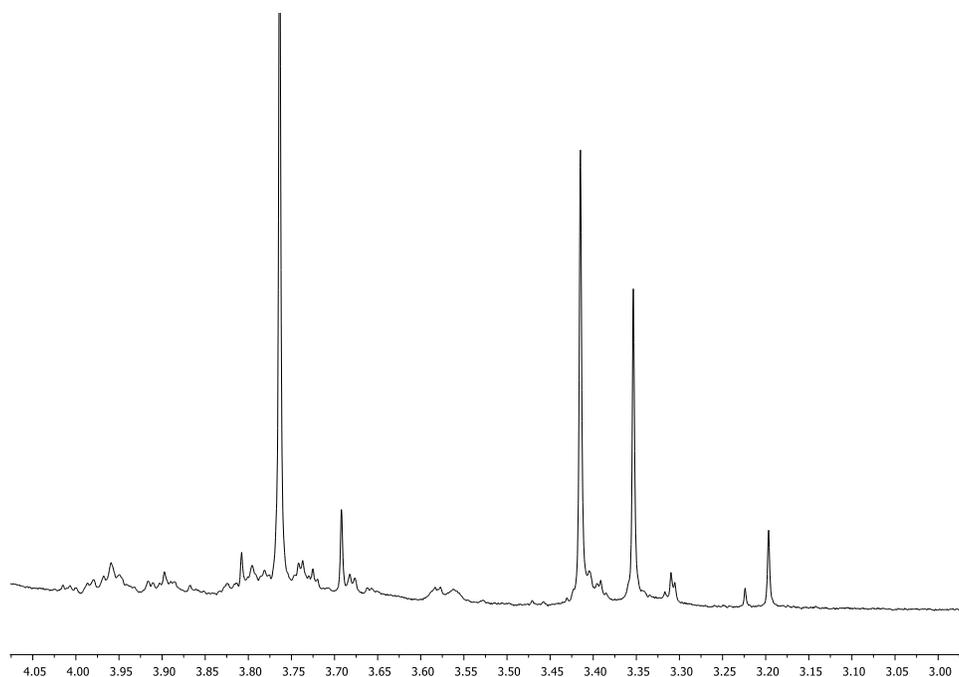
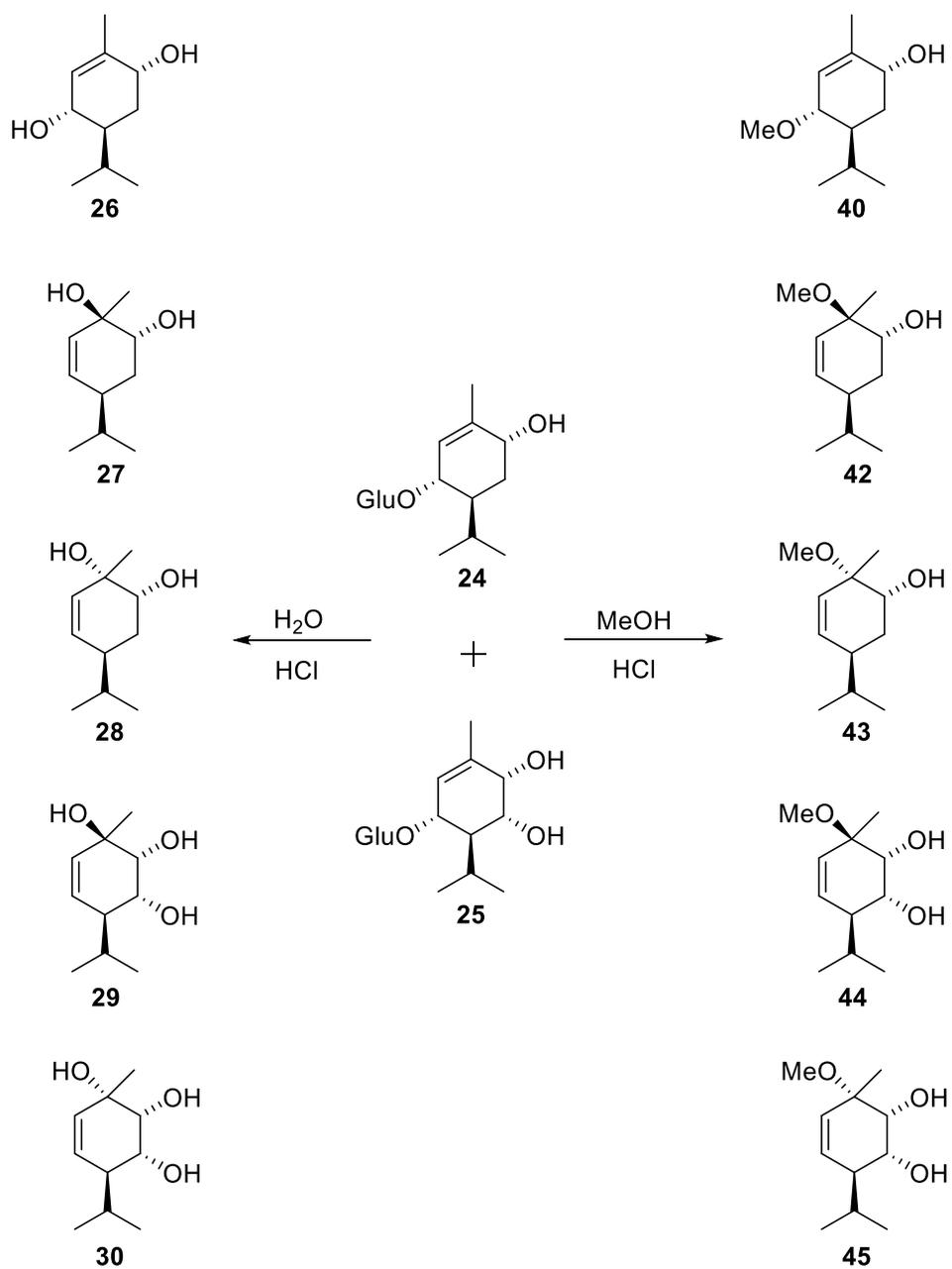


Figura 19. Expansión de la región de 3.0 a 4.0 ppm del espectro RMN de ^1H a 400 MHz.

Analizando los desplazamientos químicos de los metoxilos, en aproximadamente 3.35 ppm corresponde al derivado metoxilado **40** aislado por cromatografía en columna. Sin embargo, puede apreciarse una señal intensa en aproximadamente 3.75 ppm correspondiendo al producto mayoritario pero este producto no pudo ser aislado. De acuerdo con el mecanismo de reacción reportado por Pardo-Novoa y col en el 2019 y realizando un comparativo de los compuestos aislados mediante el tratamiento de $\text{H}_2\text{O}/\text{HCl}$ (**26** - **30**), se esperaría que al cambiar el nucleófilo de H_2O por MeOH/HCl los productos esperados fueran los indicados en el **esquema 8** (**40**, **42-45**).



Esquema 8. Probables mentenos obtenidos por tratamientos ácidos de **24** y **25**.

CONCLUSIONES

El metabolito secundario encontrado en la hidrólisis ácida con metanol de la parte aérea de *Ageratina glabrata* es un monoterpeno tipo *p*-menteno el cual se vio favorecido posiblemente por una reacción de sustitución, debido a la presencia del metanol en el medio de reacción dando como resultado el compuesto 6 α -hidroxi-3 α -metoxi-1-*p*-menteno (**40**), **figura 20**. Es importante mencionar que el mecanismo probable de la formación no puede ser establecido por comparación con el demostrado por Pardo-Novoa en el 2019, ya que no fue posible aislar los otros intermediarios o posibles productos de reacción, aunque en el crudo de reacción se puede observar la presencia de otros grupos de metoxilos. La estereoquímica relativa de las posiciones 3 y 6 se establecieron por comparación **Tabla 2**, con los derivados obtenidos por Pardo-Novoa 2018.

La dificultad para aislarlos es muy probable que se deba a su volatilidad, ya que se sabe que estos compuestos monoterpénicos, son muy volátiles. Estos resultados preliminares abren la posibilidad de continuar con la exploración y búsqueda de todos los posibles productos de reacción. Así como ensayar la reacción con otros alcoholes.

Además, se preparó el derivado esterificado del 6 α -acetoxi-3 α -metoxi-1-*p*-menteno (**41**), **figura 20**, ambos compuestos son novedosos, que pueden ser precursores para realizar modificaciones químicas o bien aplicarse a la industria alimentaria, farmacéutica, alimentaria o cosmética (Li *et al.*, 2021; Rubulotta *et al.*, 2019).

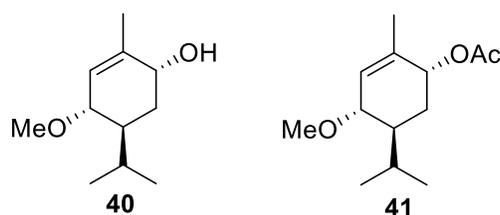


Figura 20. Compuestos obtenidos de *Ageratina glabrata* 6 α -hidroxi-3 α -metoxi-1-*p*-menteno (**40**) y 6 α -acetoxi-3 α -metoxi-1-*p*-menteno (**41**).

PARTE EXPERIMENTAL

Generalidades

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H a 400 MHz y de ^{13}C a 100 MHz, se determinaron en un espectrómetro Varian Mercury Plus 400 utilizando como disolvente CDCl_3 y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los espectros fueron procesados en el programa MestReNova.

Las purificaciones se llevaron a cabo en cromatografía en columna abierta, utilizando columnas de vidrio, gel de sílice 230-400 mallas de la marca Merck como fase estacionaria y como fase móvil mezclas hexanos- AcOEt. Los disolventes se adquirieron grado industrial y se destilaron antes de ser usados.

Material Vegetal

La especie vegetal fue colectada a orilla de la carretera del km 4.0 de la carretera Pátzcuaro-Opopeo, y fue autenticada taxonómicamente por el Dr. Jerzy Rzedowski conservándose un ejemplar en el Instituto de Ecología A.C. en Pátzcuaro, Mich.

Obtención de extractos

Los tallos y hojas frescas de *A. glabrata* se maceraron con metanol a temperatura ambiente durante tres días, se concentró en un rotavapor, transcurrido este proceso se obtuvo el extracto con una mezcla agua-metanol.

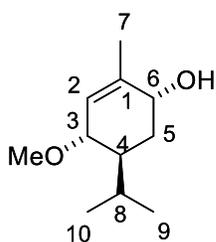
Hidrólisis ácida

Un lote de 100 mL del extracto obtenido con agua-metanol de las hojas y tallos frescas de *Ageratina glabrata* se le realizaron biparticiones líquido-líquido con 100 mL de diclorometano por tres ocasiones. La fase acuosa fue colocada en un matraz Erlenmeyer de 200 mL, se le agregaron 20 mL de metanol y posteriormente se le adicionó lentamente el ácido clorhídrico al 2% (5.2 mL) se dejó en agitación durante 2 h a temperatura ambiente; posteriormente, se realizó una extracción con 100 mL de diclorometano por tres ocasiones

en embudo de separación, la fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y concentró en rotavapor. Con este proceso se obtuvieron 300 mg de una miel color marrón.

Obtención del 6 α -hidroxi-3 α -metoxi -1-*p*-menteno (40).

En una columna de 2 cm de diámetro empacada con gel de sílice 15 cm, se colocaron 1.5 g de miel obtenida de la hidrólisis ácida, fue eluída con mezclas de hexanos-AcOEt en orden de polaridad ascendente, colectando fracciones de 10 mL, de las fracciones eluidas con la polaridad (4:1) se obtuvo el derivado tipo *p*-menteno **40**.



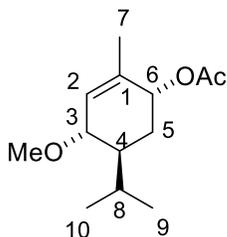
RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 5.61 (1H, sa, H-2), 3.94 (1H, ta, J = 3.6 Hz, H-6), 3.56 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-3), 3.35 (3H, s, OCH₃), 2.00 (1H, septd, J = 6.8, 4.0 Hz, H-8), 1.81 (3H, s, CH₃-7), 1.77 (1H, dt, J = 16.0, 4.0 Hz, H-5'), 1.66 (1H, m, H-4), 1.48 (1H, ddd, J = 16.0, 12.0, 4.0 Hz, H-5), 0.95 (3H, d, J = 6.8 Hz, CH₃-9), 0.84 (3H, d, J = 6.8 Hz, CH₃-10).

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 137.9 (C, C-1), 125.5 (CH, C-2), 77.65 (CH, C-3), 67.8 (CH, C-6), 55.4 (CH₃, OCH₃), 39.0 (CH, C-4), 30.6 (CH, C-8), 26.1 (CH₂, C-5), 20.8 (CH₃, C-7), 20.0 (CH₃, C-9), 17.4 (CH₃, C-10).

Preparación del 6 α -acetoxi-3 α -metoxi -1-*p*-menteno (41).

A una solución de 200 mg de **40** en 1 mL de piridina, colocada en un baño de hielo, se le adicionó 1 mL de anhídrido acético. La mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 2 h. Transcurrido este tiempo se vertió sobre hielo y se extrajo con AcOEt, se lavó tres veces con ácido clorhídrico al 10%, tres veces con agua, tres con solución saturada de NaHCO₃ y con agua dos veces. La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se evaporó el disolvente en rotavapor. El crudo de la reacción se purificó mediante cromatografía en columna, utilizando gel de sílice como fase estacionaria y mezclas de

hexanos-acetato de etilo en orden creciente de polaridad como fase móvil donde se obtuvo el derivado **41** en las fracciones eluidas en la polaridad 4:1.



RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 5.76 (1H, s, H-2), 5.18 (1H, t, $J = 3.2$ Hz, H-6), 3.58 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-3), 3.36 (3H, s, OCH_3), 2.06 (3H, s, OAc), 2.00 (1H, dsept, $J = 6.8, 4.0$ Hz, H-8), 1.78 (1H, m, H-5'), 1.70 (3H, s, CH_3 -7), 1.66 (1H, m, H-4), 1.48 (1H, ddd, $J = 14.1, 12.2, 4.0$ Hz, H-5), 0.92 (1H, d, $J = 6.8$ Hz, CH_3 -9), 0.84 (1H, d, $J = 6.8$ Hz, CH_3 -10).

REFERENCIAS

- Arreaga González, H. M. Determinación estructural de derivados de timol de *Ageratina glabrata*. Tesis de Maestría presentada en el Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la UMSNH, **2015**.
- Arreaga González, H. M. Estudio químico de los extractos metanólicos de *Ageratina glabrata*. Tesis de Licenciatura presentada en la Facultad de Químico Farmacobiología de la UMSNH, **2013**.
- Ávalos, G. A. & Pérez-Urria, C.E., Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*. **2009**, 2(3), p.p. 122.
- Bello-González, M. & Salgado, G.R. Plantas medicinales de la Comunidad Indígena Nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacán, México, *Biológicas*, Revista de la Facultad de Biología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. **2007**, 9: 133.
- Bustos-Brito C., Vázquez-Heredia V.J., Calzada F., Yépez-Mulia L., Calderón J.S., Hernández-Ortega S., Esquivel B., García-Hernández N. & Quijano L. Antidiarrheal thymol derivatives from *Ageratina glabrata*. Structure and absolute configuration of 10-Benzoyloxy-8,9-epoxy-6-hydroxythymol isobutyrate. *Molecules*. **2016**, 21(9):1132.
- 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**, 970-9000-17-9.
- Carey, F. A. & Giuliano, R. M., Química Orgánica. 9a ed. McGraw-Hill Education, México, D.F., **2014**. p.p. 334
- Dewick, P. Medicinal Natural products: A biosynthetic Approach. United Kingdom: John Wiley & Sons; **2009**.
- García-Pérez, G., García-Sánchez, E., Martínez-García, I., Scior, T.R.F., Salvador-Hernández, J.L., Martínez-Pacheco, M.M. & del Río, R.E. Analgesic effect of leaf extract from *Ageratina glabrata* in the hot plate test. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. **2011**, 21(5): 928-935.
- Groutas, C.W., Mecanismos de Reacción en Química Orgánica. 1a ed, Ed. McGraw Hill, España, **2007**, pp. 217-220.

- Hammami, S., Elshamy, A. I., El Mokni, R., Snene, A., Iseki, K., Dhaouadi, H., Okamoto, Y., Suenaga, M., Noji, M., Umeyama, A. & Asakawa, Y. Chemical constituents of the aerial parts of *Daucus carota* subsp. *hispidus* Growing in Tunisia. *Natural Product Communication*. **2019**, 14(7): 1-6.
- Hernández, R., & Jordá, M. G. *Plantas medicinales*. **1981**, Editorial Pax México.
- Hong, S.S., Lee, J.E., Jung, Y.W.; Park, J. H, Lee, J.A., Jeong, W., Ahn, E. K., Choi, C.W. & Oh, J.S. Monoterpenoids from the fruits of *Amomum tsao-ko* have inhibitory effects on nitric oxide production. *Plants*. **2021**, 10(2): 257.
- Lorenzo-García J.M. Preparación de timohidroquinona a partir de 3,6-hidroxi-1- menteno. Tesis de Licenciatura presentada en la Facultad de Químico Farmacobiología de la UMSNH, **2019**.
- Li, X.-J., Tang, S.-Q., Huang, H., Luo, J., Zhang, X.-D., Yook, C.-S., Whang, W.-K., Kim, Y.-C., Liu, X.-Q. *Acanthopanax henryi*: Review of botany, phytochemistry and pharmacology. *Molecules* **2021**, 26(8): 2215.
- Macías Villamizar, V. E., Álvarez Caballero, J. M., & Suárez Gómez, H. Terpenos con actividad biológica anti-VIH. *Duazary*. **2010**,7(2): 258.
- McMurry, J., Química Orgánica. 8a ed. Cengage Learning Editores., **2012**. p.p. 825
- Pardo Novoa, J. C. Determinación de la Configuración Absoluta de Derivados de *p*-menteno de *Ageratina glabrata* H. B. K. Tesis de doctorado presentada en el Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la UMSNH, **2018**.
- Pardo-Novoa, J.C., Arreaga-González, H.M., Galván-Gómez, S. Rodríguez-García, G., del Río, R.E., Cerda-García-Rojas, C.M., Joseph-Nathan, P. & Gómez-Hurtado, M.A. Biomimetic transformation of *p*-Menthene glucosides into *p*-Cymenes and Carvotanacetone. *Journal of Natural Products*. **2019**, 82(3): 485- 491.
- Pardo-Novoa, J.C., Arreaga-González, H.M., Gómez-Hurtado, M.A., Rodríguez-García, G., Cerda-García-Rojas, C.M., 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. M., Ríos-Ramírez, E. M., Lindig-Cisneros, R., & Espinosa-García, F. J. 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*. **2015**, 28(2): 113–120.
- Ravelo, Á. G., & Braun, A. E. Relevancia de los productos naturales en el descubrimiento de nuevos fármacos en el S. XXI. *Revista Real Academia Ciencias Exactas Físicas Naturales*. **2009**, 103: 412-413.
- Rubulotta, G., & Quadrelli, E. A. Terpenes: A valuable family of compounds for the production of fine chemicals. Chap. 11. *Studies in Surface Science and Catalysis*, **2019**, 178: 215–229.
- Sánchez-González, A., Granados-Sánchez & Simón-Nabor, R. Uso medicinal de las plantas por los otomíes del municipio de Nicolás Flores, Hidalgo, México. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. **2008**, 14: 271-279
- Shu-Qun, H., Yan-Hong, L., Xiang-Zhong, H., Rong, L., Huai, L., Kai, T., Rong-Sheng, R. & Yu-Kui, L. Polyol monoterpenes isolated from *Chenopodium ambrosioides*. *Natural Product Research*. **2017**, 31(21): 2467-2472.
- Talavera-Alemán, A. Componentes minoritarios de *Ageratina glabrata*. Tesis de licenciatura presentada a la Facultad de Químico Farmacobiología de la UMSNH, **2012**.
- Vanegas, A. M. M. Una visión histórica en el desarrollo de fármacos a partir de productos naturales. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. **2017**, 48(3): 16-27.
- Yang, G., Zhou, P., Li, Y., Ding, J., & Hu, J. *p*-Menthene-type monoterpene peroxy dimers from *Pilea aquarum* subsp. *brevicornuta*. *Tetrahedron Letters*. **2021**, 85: 153463.
- Yang, Y., Xi-Qiang, L., Chun-Ping, T. & Sheng, Y. Natural products chemistry research 2010's progress in China. *Chinese Journal of Natural Medicines*. **2012**, 10(1): 1-12.
- Yurkanis, B. P., Química Orgánica. 5a ed, Ed. Pearson Educación, México. 2008, pp. 87.
- Zielinska-Błajet, M., Pietrusiak, P. & Feder-Kubis, J. Selected monocyclic monoterpenes and their derivatives as effective anticancer therapeutic agents. *International Journal of Molecular Sciences*. **2021**, 22(9): 4763.