



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS
DE HIDALGO**

Facultad de Químico Farmacobiología

**Estudio Químico de los Extractos Metanólicos de
*Ageratina glabrata***

Tesis

Que para obtener el título de:

Químico Farmacobiólogo

Presenta:

Héctor Manuel Arreaga González

Asesores:

D.C. Rosa Elva Norma del Río Torres

D.Q. Mario Armando Gómez Hurtado



Morelia, Michoacán Julio de 2013.

DEDICATORIA

A Dios por permitirme disfrutar cada día. Gracias

A mis padres Héctor Manuel Arreaga García y Ma. Apolinar González García, por la vida que me han dado, estoy eternamente agradecido y en deuda con ustedes, por impulsarme y apoyarme en este y todos los proyectos emprendidos, por todo el empeño puesto en la formación de su familia, son ejemplo de esfuerzo, dedicación y trabajo, las palabras me son insuficientes para expresarles lo que siento. Gracias.

A mis hermanas Vero y Lupita por cada momento compartido, por todo el apoyo que me han dado en todos los sentidos por alegrar mi infancia y mi vida entera, sé que en sus oraciones siempre estoy presente. Gracias.

A mi abuelo Alberto y Cholita por enseñarme a trabajar durisísimo y por todo el cariño que me han dado. Te extrañaré por siempre Abue. Gracias.

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores:

D.C. Rosa Elva Norma del Río Torres

D.C. Mario Armando Gómez Hurtado

Por la confianza puesta en mí para la realización de este proyecto, por compartir sus conocimientos y tiempo conmigo, impulsar mi desarrollo profesional y darme la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo. Gracias

A mis sinodales: D.C. Yliana López Castro, D.Q. Gabriela Rodríguez García, D.C. Hugo Alejandro García Gutiérrez, D.C. Judit Araceli Aviña Verduzco, D.C. Janett Betzabe González Campos, por el tiempo dedicado para la revisión de este proyecto. Gracias.

A la D.C. Martha Sonia Morales Ríos por el estímulo económico como ayudante de investigador. Gracias

A todos los miembros de mi familia por su apoyo incondicional, por cada palabra de ánimo porque nunca me dejaron caminar solo, siempre han tenido para mí una buena palabra de aliento y por ser parte fundamental de mi vida, sin su ayuda este logro no sería posible. Gracias

A Lucero Calderón, Saúl Frías, Jorge Hernández, Roberto Estrella por su gran amistad por acompañarme durante mi estancia en la facultad pero sobre todo porque a pesar de mi mal carácter siempre estuvieron conmigo, tantos recuerdos, tantas peleas, los quiero mucho, son parte de mi familia. Gracias.

A Magaly por todo el apoyo incondicional que me has dado en este tiempo, por los muchos buenos momentos que he pasado a tu lado. Amor, amor, amore tan solo se decirte, más tu comprenderás, Gracias.

A mis compañeros y amigos del laboratorio: M.C. Edgar García, Julio, Armando, Yunuen, George, Cindy, Saúl, Gabriel, Fercho, Karen, Evelin por el apoyo en la realización de esta tesis y su amistad. Gracias

A mis amigos de la casa y de Farma por los buenos momentos, por la amistad incondicional, cada uno de ustedes a su manera y en su tiempo han colaborado en mi formación profesional. Gracias

Al Dr. Jerzy Rzedowski, del Instituto de Ecología A. C. Pátzcuaro, Mich., por la identificación de la especie vegetal.

A todas las personas que integran el Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, por su apoyo en la realización de este proyecto. Gracias

A la UMSNH por el apoyo económico brindado durante cinco años y por el uso de sus instalaciones para mi formación profesional. 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 del proyecto **PROMEP PTC-332 y CIC-UMSNH.**

Parte de este trabajo se presentó en la 9ª Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales “Dra. Luisa Urania Román Marín”, celebrada del 28 al 31 de Mayo de 2013 en Pachuca de Soto, Hidalgo.

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	1
2	ANTECEDENTES	2
2.1	LA FAMILIA ASTERACEAE	6
2.2	GÉNERO <i>AGERATINA</i>	7
2.3	<i>AGERATINA GLABRATA</i>	8
2.4	ESTUDIOS QUÍMICOS REPORTADOS DE ESPECIES DEL GÉNERO <i>AGERATINA</i>	9
2.5	ESTUDIOS QUÍMICOS REPORTADOS DE <i>AGERATINA GLABRATA</i>	12
3	OBJETIVOS	15
3.1	OBJETIVO GENERAL.....	15
3.2	OBJETIVOS PARTICULARES	15
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
5	CONCLUSIONES	40
6	PARTE EXPERIMENTAL	42
6.1	MATERIAL VEGETAL.....	42
6.2	OBTENCIÓN DE EXTRACTOS	42
6.3	RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR Y ESPECTROMETRÍA DE MASA.....	42
6.4.	ACETILACIÓN	43
6.4.1	ACETILACIÓN DEL EXTRACTO METANÓLICO DE HOJAS	43
6.4.2	ACETILACIÓN DEL EXTRACTO METANÓLICO DE FLORES	43
6.5.	CROMATOGRAFÍA DEL CRUDO DE LA REACCIÓN.....	43
6.6.	ANÁLISIS QUÍMICO.....	44
7	BIBLIOGRAFÍA.....	47

SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

δ	Desplazamiento químico
AB	Sistema AB
A.C.	Asociación Civil
AcOEt	Acetato de etilo
CONABIO	Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad
cm	Centímetro
d	Doble
da	Doble ancha
ddd	Doble de doble de dobles
dd	Doble de dobles
dt	Doble de triples
g	Gramos
h	Horas
hex	Hexano
Hz	Hertz
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
km	Kilómetro
MeOH	Metanol
mL	Mililitro
mm	Milímetro
OAc	Grupo funcional acetoxi

OMe	Grupo funcional metoxi
ppm	Partes por millón
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN de ^1H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
RMN de ^{13}C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono
s	Simple
sept	señal séptuple
sa	Simple ancha
t	Triple

1 INTRODUCCIÓN

La diversidad vegetal es un recurso esencial para el bienestar humano. A lo largo de la historia las plantas han proporcionado alimentos, fibras, materiales de construcción, medicinas, combustibles y muchos otros productos para satisfacer las múltiples necesidades de las poblaciones rurales y urbanas; esto se refleja a nivel mundial, pues varias decenas de miles de especies vegetales son fuentes actuales o potenciales de satisfactores para el desarrollo de las poblaciones (**CONABIO, 2008**).

La flora fanerogámica de México es una de las más diversas del planeta. Existen varias estimaciones sobre la riqueza florística del País. El Doctor Jerzy Rzedowski estimó que el País tiene una riqueza florística de aproximadamente 22,800 especies vasculares. (**Rzedowski, 1992**). En 1993, Víctor Toledo calculó cerca de 30,000 (**Toledo, 1994**). Sin embargo, un estudio posterior realizado por José Luis Villaseñor estimó 23,424 especies, cifras que colocaron a México en el tercer lugar de la clasificación mundial por su número de plantas vasculares (**Villaseñor, 2004**). Además, México tiene uno de los mayores índices de especies endémicas, situándose solo por debajo de Sudáfrica, lo que nos indica que contamos con aproximado de 10% de todas las plantas con flores del mundo. Los datos demuestran que Chiapas, Oaxaca Jalisco, Veracruz, Michoacán y Guerrero son los Estados con mayor número de plantas vasculares (**Magaña et al., 2002**).

Dada la importancia que a lo largo de los años han jugado las plantas en la vida de los seres humanos, el aprovechamiento de los productos naturales y los compuestos con actividad farmacológica que de ellos derivan, este proyecto está enfocado a la búsqueda y caracterización de los compuestos presentes en los extractos polares de las partes aéreas de *Ageratina glabrata*.

2 ANTECEDENTES

El metabolismo hace referencia a la capacidad de las plantas para transformar moléculas simples en moléculas más complejas o viceversa, para degradar moléculas complejas en otras más simples, esto es el metabolismo primario. Las plantas producen compuestos de diversa naturaleza química que al parecer no tienen una función vital en la planta ya que pueden variar de una a otra especie pero que cumplen diferentes funciones, principalmente protectora contra amenazas como: depredadores y otras plantas con las que compiten por el espacio, estos compuestos son llamados metabolitos secundarios o productos naturales, y han sido aprovechados por el hombre como colorantes, medicamentos, insecticidas, entre otros. Estos compuestos además de no presentar una función definida, difieren de los metabolitos primarios en que ciertos grupos presentan una distribución restringida en el reino vegetal, es decir, no todos los metabolitos secundarios se encuentran en todas las variedades de plantas; se sintetizan en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, estando a menudo su producción restringida a determinado género de plantas, a una familia, o incluso a algunas especies (**Ávalos et al., 2009**).

Los metabolitos secundarios se pueden clasificar en tres grupos principales:

- Terpenos
- Compuestos fenólicos
- Alcaloides

Los terpenos constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios. La ruta biosintética de estos compuestos dan lugar a metabolitos secundarios que derivan de la unión de unidades de isopreno, se clasifican en monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, sesterterpenos, triterpenos, tetraterpenos y politerpenos que contienen dos, tres, cuatro, cinco, seis, ocho o más unidades de isopreno respectivamente (**Sepúlveda et al., 2003**); ejemplos de monoterpeno como el mentol (**1**), sesquiterpeno como la rasteviona (**2**), diterpeno como el crotonadiol (**3**), triterpeno como el sitosterol (**4**) y tetraterpeno como el beta caroteno (**5**), se muestran en la Figura 2.1.

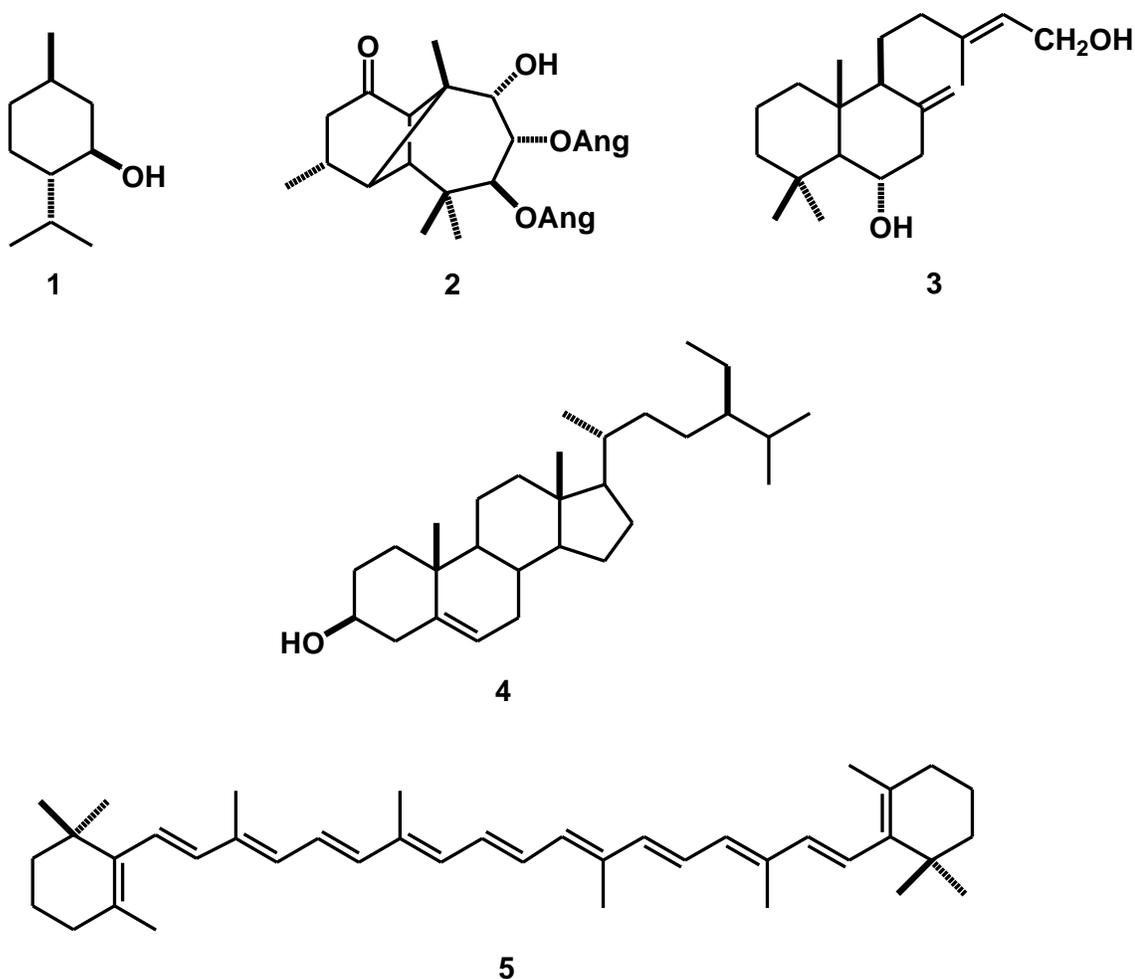


Figura 2.1. Ejemplos de compuestos terpenoides.

Los compuestos fenólicos son un grupo muy diverso que comprende desde moléculas sencillas como los ácidos fenólicos hasta polímeros complejos como los taninos y la lignina; en este grupo también se encuentran pigmentos flavonoides, muchos de ellos implicados directamente en las interacciones planta-herbívoro (**Ávalos et al., 2009**). Estos compuestos se sintetizan tanto de la ruta de la acetil-CoA (**6**) como la de la ruta del ácido shikímico (**7**), incluso algunos polifenoles como el grupo de flavonoides se generan cuando se unen fragmentos que provienen de ambas rutas; ejemplos de estos compuestos se aprecian en la Figura 2.2 (**Dewick, 2009**).

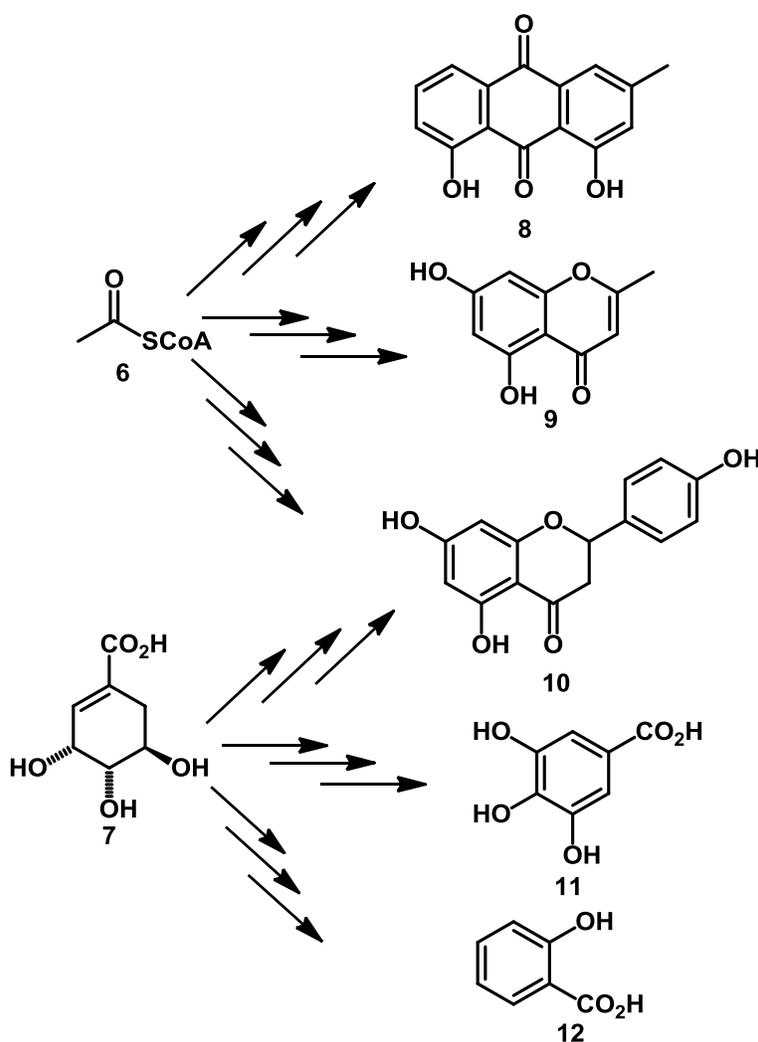


Figura 2.2. Metabolitos secundarios derivados de la biosíntesis de compuestos fenólicos.

En el 2008, para la familia de los alcaloides se consideraban cerca de 15,000 metabolitos; generalmente se describen como compuestos heterocíclicos que se biosintetizan a partir de aminoácidos tales como triptófano, tirosina, fenilalanina, lisina, arginina y ornitina, se pueden dividir según su esqueleto base en alcaloides: quinoléicos **13**, isoquinoléicos **14**, indólicos **15**, tropánicos **16**, quinolizidínicos **17**, piperidínicos **18**, purínicos **19**, pirrolizidínicos **20** (Figura 2.3) (Arango, 2008).

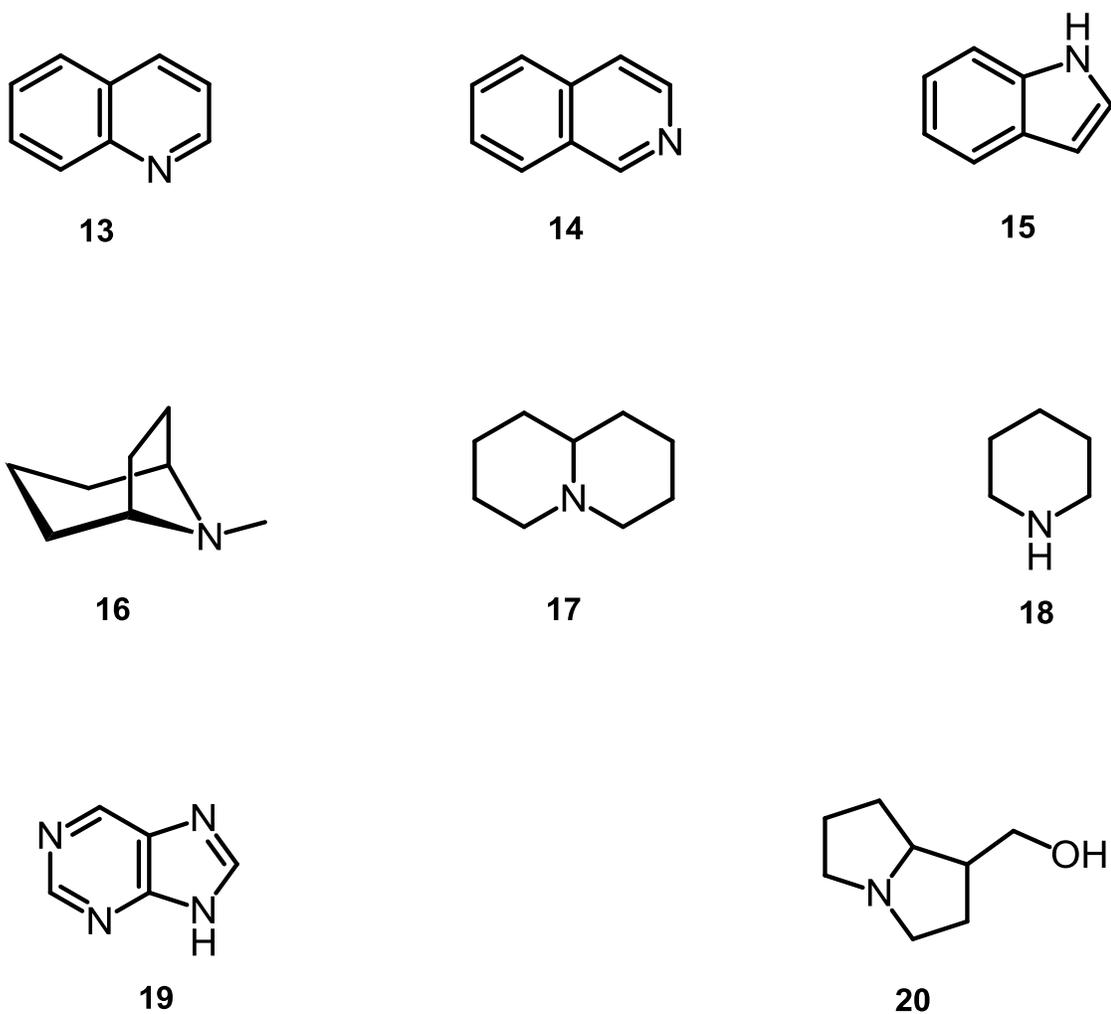


Figura 2.3. Clasificación de alcaloides según su esqueleto.

2.1 LA FAMILIA ASTERACEAE

Las plantas que integran esta familia son un grupo altamente heterogéneo respecto a la morfología de sus partes vegetativas (raíces, tallos, hojas, flores y frutos), ya que presentan casi todos los tipos de formas, disposición y arreglo; en cambio es muy homogéneo en cuanto a la morfología de su inflorescencia que las hace inconfundibles y se presenta como una cabezuela o capítulo que aparenta ser una sola flor pero si se le observa con detalle está compuesta en algunos casos de cientos de flores diminutas insertadas en una base carnosa (**Tapia, 2010**).

Es la familia de fanerógamas con mayor diversidad a nivel mundial; representa del 8 al 10% de la flora mundial y abarca 22,750 taxones específicos e infraespecíficos con 1,620 géneros incluyendo algunos de los más numerosos como *Senecio*, *Eupatorium*, *Hieracium* y *Helichrysum*. Es de distribución cosmopolita, pues está presente en todos los continentes, excepto la Antártida y Groenlandia; ocupa hábitats desde el nivel del mar hasta el límite altitudinal de la vegetación. La mayor diversidad se localiza en las zonas tropicales, subtropicales y templadas; abundan en biomas de montaña y en regiones áridas y semiáridas (**Colares, 2010**). Las hay desde diminutas plantas herbáceas de unos cuantos milímetros de tamaño, hierbas leñosas solo en la base, trepadoras, arbustos y hasta árboles. Su diversidad puede deberse a sus excelentes mecanismos de dispersión y a su capacidad de adaptarse a diversos entornos ecológicos. Para México se reportan alrededor de 323 géneros y 3,351 especies.

Desde el punto de vista económico tienen relevancia, ya que incluyen usos como: plantas comestibles como la lechuga (*Lactuca sativa*) y la alcachofa (*Cynara scolymus*), ornamentales como los géneros *Aster*, Caléndula (*Calendula officinalis*), Dalia (*Dahlia ssp.*), medicinales como la Manzanilla (*Matricaria chamomilla*), Artemisa (*Artemisia absinthium*) y oleaginosas como el Girasol (*Helianthus annuus*). Figura 2.4 (**Tapia, 2010**).



Figura 2.4. Miembros de la familia Asteraceae. **A)** Lechuga (*Lactuca sativa*). **B)** Alcachofa (*Cynara scolymus*). **C)** Caléndula (*Calendula officinalis*). **D)** Dalia (*Dahlia* sp.). **E)** Girasol (*Helianthus annuus*). **F)** Manzanilla (*Matricaria chamomilla*).

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, es posiblemente el género más distribuido de Asteraceae en México ya que posee 149 especies (Turner, 2010). El género se distribuye en todos los continentes, excepto en el continente Australiano (Figura 2.5); en el Continente Americano se distribuyen ampliamente desde el norte hasta el sur, incluyendo el Caribe (King, 1970).

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 et al., 2005**).

La especie *A. glabrata* (Figura 2.6) es conocida comúnmente como “Chamizo blanco”, “Hierba de golpe” y/o “Hierba de la mula” (**Sánchez-González, 2008**); se utiliza en la medicina tradicional como analgésico para el tratamiento de golpes y fracturas (**Bello, 2007**).

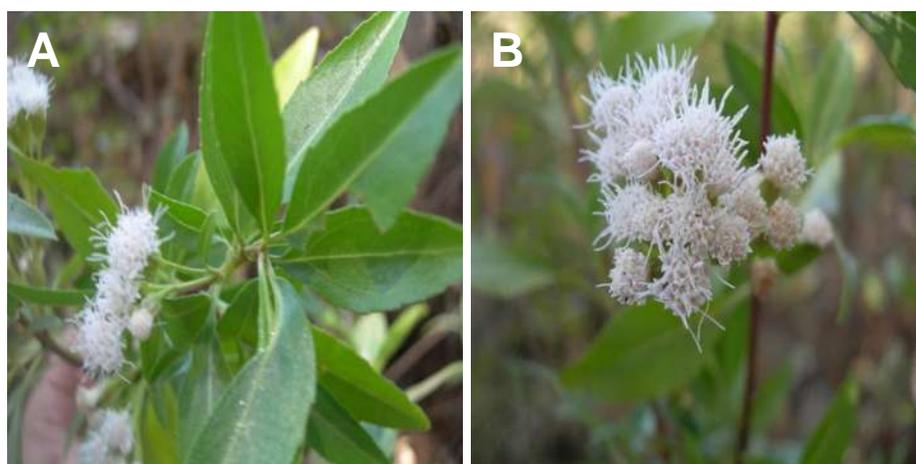


Figura 2.6. *Ageratina glabrata*; A) Hojas B) Flores.

2.4 ESTUDIOS QUÍMICOS REPORTADOS DE ESPECIES DEL GÉNERO AGERATINA

Del extracto etanólico de *Ageratina ibanguensis* aislaron al timol (**21**) y carvacrol (**22**) (Figura 2.7) los cuales fueron probados en bacterias grampositivas, gramnegativas, hongos filamentosos y levaduras demostrando que estos compuestos son los responsables de la actividad antibacteriana y antifúngica en los extractos de hojas y flor (**Sanabria et al., 1999**).

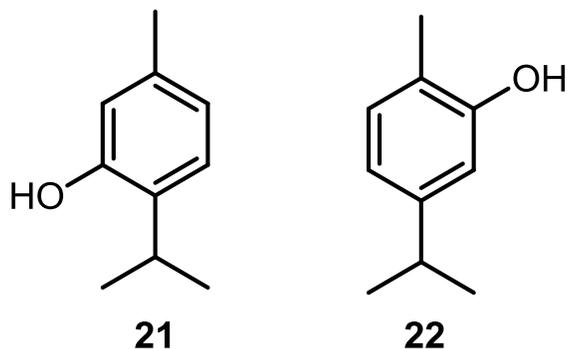


Figura 2.7. Estructuras de 21 y 22.

El extracto metanólico de *A. conyzoides* fue probado en modelos de regeneración de tejidos *in vivo*, demostrando una capacidad de regeneración del tejido mayor que en el grupo control, comprobando las propiedades regenerativas de dicha especie (Oladejo *et al.*, 2003).

Del extracto metanólico de las hojas de *A. adenofora* se reportaron por primera vez los derivados de cadinano 23-25 (Figura 2.8) (He *et al.*, 2008).

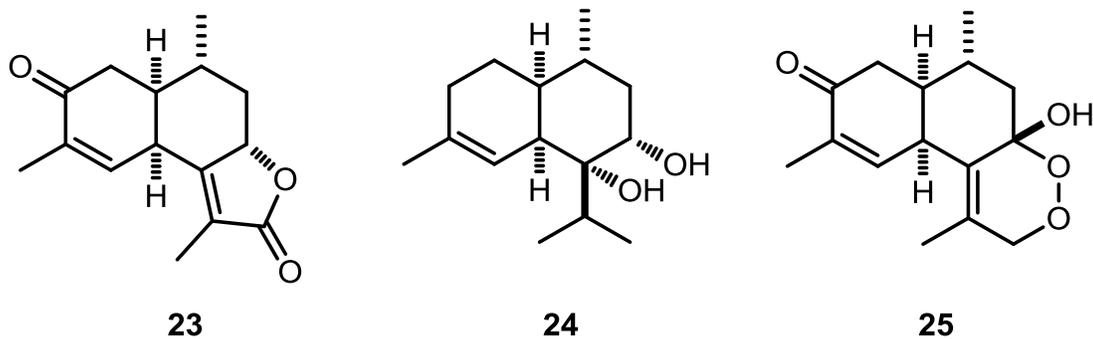


Figura 2.8. Cadinanos aislados de *A. adenofora*.

Narciso y colaboradores reportaron la actividad antiinflamatoria del extracto etanólico de los tallos de *A. sternbergiana* mediante el método de edema subplantar concluyendo que la dosis de 200 mg/kg es la que presenta mayor actividad

antinflamatoria, el análisis fitoquímico demostró la presencia de azúcares, flavonoides, alcaloides, esteroides, cumarinas, taninos y aminoácidos (León *et al.*, 2011).

Por otra parte, han sido reportados cuatro flavonoides **26-29** (Figura 2.9) de los extractos de hojas de *A. havanensis* los cuales se probaron frente a los virus de herpes simple humano de tipo 1 y 2, demostrándose que los mejores efectos se obtuvieron del extracto de acetato de etilo (del Barrio *et al.*, 2011).

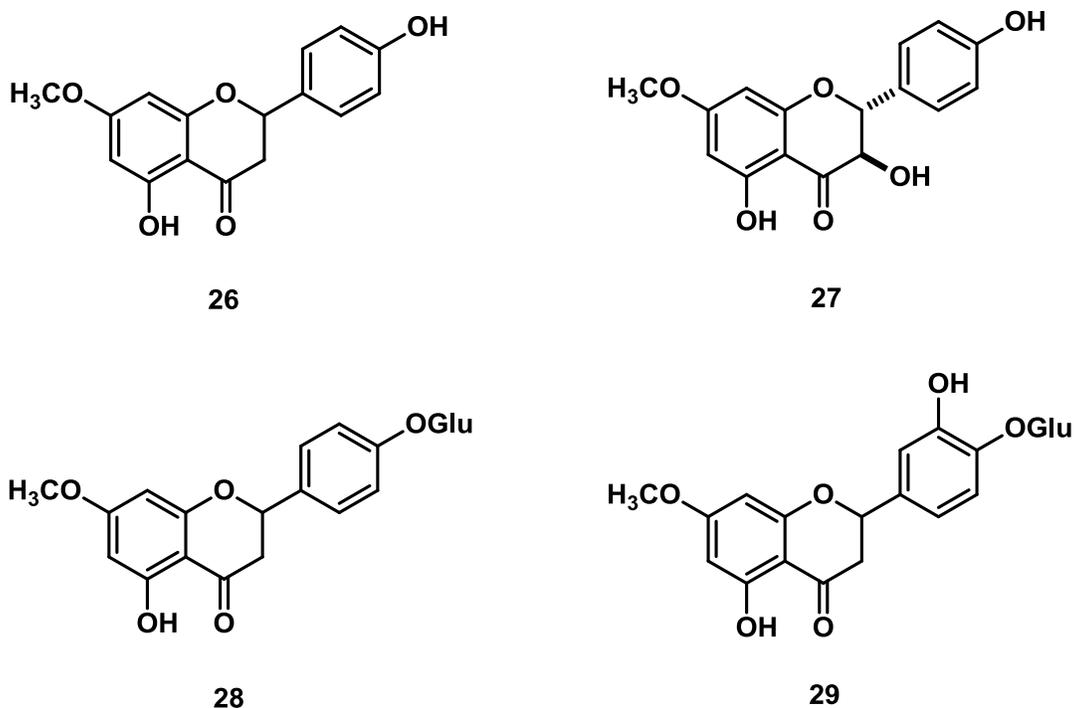


Figura 2.9. Flavonoides aislados de *A. havanensis*.

Estudios farmacológicos en humanos demostraron que los extractos de las partes aéreas de *A. pichinchensis* tiene interesante capacidad de estimulación en la producción de fibroblastos en pacientes con úlceras venosas crónicas, por lo que podría sugerirse el uso de esta especie como complemento en el tratamiento contra la insuficiencia venosa crónica (Romero-Cerecero, 2012).

2.5 ESTUDIOS QUÍMICOS REPORTADOS DE *AGERATINA GLABRATA*

En 1976, Bohlmann y colaboradores aislaron de los extractos de éter de petróleo de raíz, hoja y flor de *Ageratina glabrata*, once derivados de timol con dos diferentes funcionalidades (epóxido y alqueno) como se muestra en la Figura 2.10 (Bohlmann *et al.*, 1976).

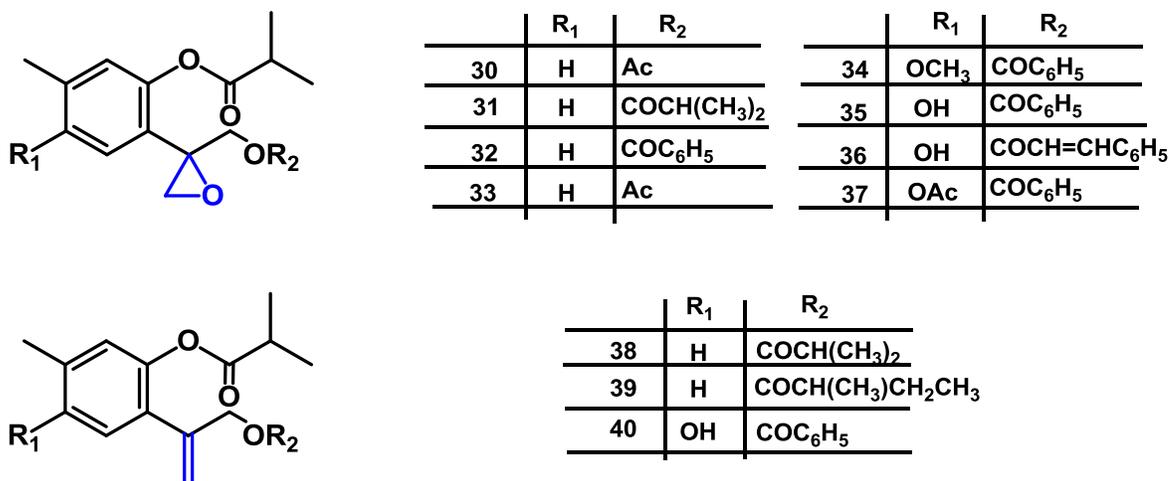


Figura 2.10. Derivados de timol aislados de *A. glabrata*.

En un estudio previo nuestro grupo de trabajo reportó el efecto analgésico de los extractos de cloruro de metileno de hojas de *A. glabrata* en animales de experimentación en modelos térmicos de dolor agudo de plato caliente y retirada de la cola demostrando su efecto analgésico 5 horas posteriores a su aplicación (García *et al.*, 2011). Adicionalmente se aisló y evaluó la actividad microbicida de dos componentes mayoritarios del extracto metanólico de hojas que correspondieron al 10-benzoiloxi-6,8,9-trihidroxi-3-isobutirato de timilo (41) y el 6-*O*-β-*D*-glucopiranosiloxi-3-hidroxi-*p*-ment-1-eno (42) (Pardo, 2011) (Figura 2.11).

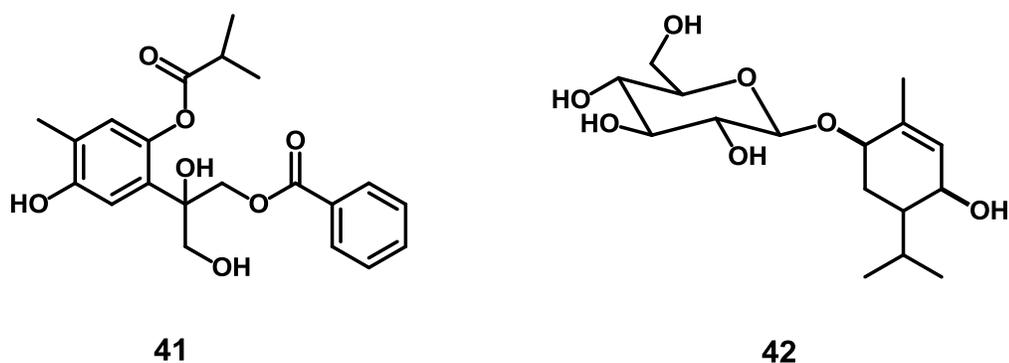


Figura 2.11 10-benzoiloxi-6,8,9-trihidroxi-3-isobutirato de timilo (**41**) y 6-O- β -D-glucopiranosiloxi-3-hidroxi-*p*-ment-1-eno (**42**).

En el estudio químico del extracto de CH_2Cl_2 de hojas de *A. glabrata*, se aislaron y caracterizaron los sesquiterpenos **43** y **44** de tipo eudesmano, así como 3 derivados de timol **32**, **35** y **41** y la preparación del derivado acetilado **45** (Figura 2.12) (Talavera, 2012).

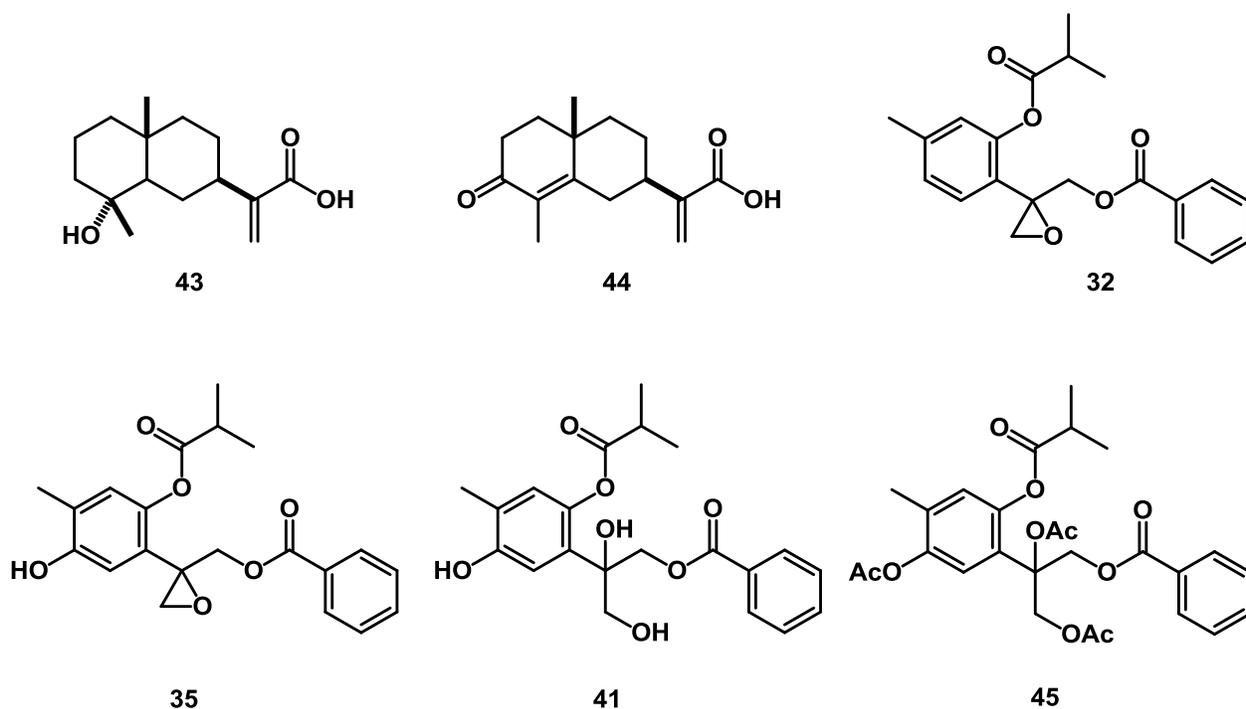


Figura 2.12. Compuestos aislados del extracto de CH_2Cl_2 de hojas de *A. glabrata*.

Como se puede observar, no hay un estudio de los compuestos presentes en el extracto metanólico de hojas de *A. glabrata*; y dada la importancia de ampliar los estudios químicos de esta especie, nos dimos a la tarea de hacer un estudio químico preliminar en el extracto mencionado para contribuir con datos que enriquezcan la quimiotaxonomía de este género.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

- Realizar un estudio químico preliminar del extracto metanólico de hojas y flores de *Ageratina glabrata*.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Obtener los extractos de hexano, cloruro metileno y metanólico de *A. glabrata*.
2. Realizar una reacción de acetilación al extracto metanólico.
3. Aislar y purificar por cromatografía los extractos acetilados en fase directa.
4. Caracterizar mediante métodos espectroscópicos los compuestos aislados.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Un lote de 200 g de hojas de *A. glabrata* se sometió a maceración primeramente con hexano, seguido de cloruro de metileno, con la finalidad de extraer los compuestos menos polares que ya habían sido reportados en nuestro grupo de trabajo. Posteriormente se continuaron las maceraciones con metanol; de este extracto se obtuvieron 23.7 g de una miel verde oscura de la cual se tomó una muestra para su análisis por RMN de ^1H (Figura 4.1), donde se observó un conjunto de señales en la región de los aromáticos y en la región de los hidrógenos bases de alcohol, lo que nos indicó que la mezcla de compuestos contiene derivados polihidroxiados. Situación que haría muy difícil llevar a cabo su separación por cromatografía en columna por gravedad.

Razón por la cual el extracto metanólico crudo se peracetiló en condiciones de anhídrido acético/piridina por 24 h a temperatura ambiente, para tener compuestos menos polares y facilitar la purificación. Una vez extraída la reacción, el crudo se analizó mediante RMN de ^1H (Figura 4.2), el cual mostró alrededor de 2.00 ppm un conjunto de señales simples típicas de metilos de acetatos. De igual manera se observó el desplazamiento de las señales que originalmente se encontraban en la región de 3.00–4.00 ppm, como bases de alcohol hacia 5.00–6.00 ppm que corresponde a desplazamiento de protones bases de ésteres, corroborando la presencia de grupos hidroxilos.

Un lote del extracto acetilado se sometió a cromatografía en columna.

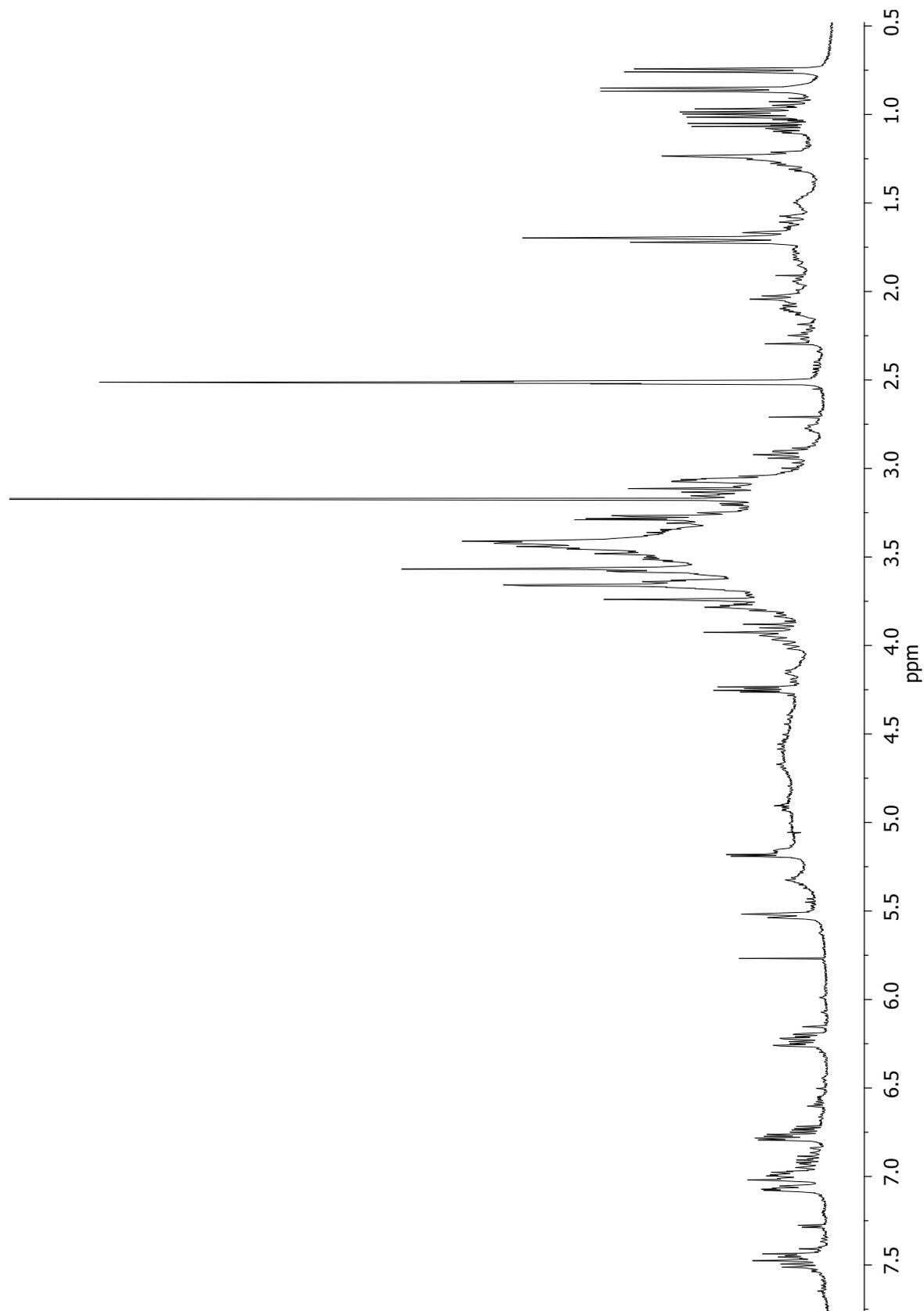


Figura 4.1. Espectro de RMN de ¹H en CDCl₃ a 400 MHz del extracto metanólico crudo de *A. glabrata*.

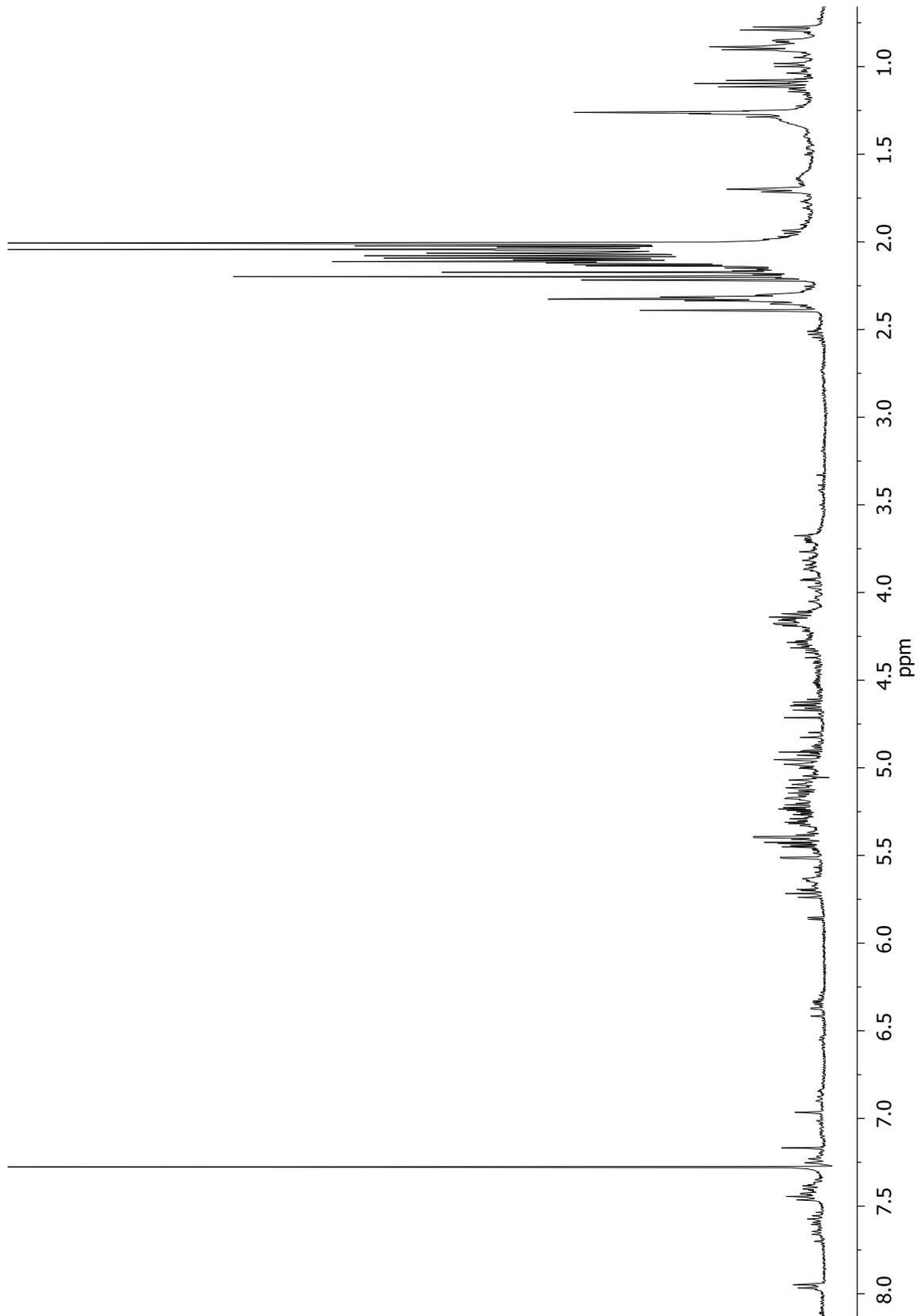


Figura 4.2. Espectro de RMN de ¹H en CDCl₃ a 400 MHz del extracto acetilado de hojas de *A. glabrata*.

En la polaridad hexano-CH₂Cl₂ 4:1 se obtuvieron 61 mg de un sólido blanco ceroso. En su espectro de RMN de ¹H (Figura 4.3) se observó un patrón de señales atribuido a un triterpeno funcionalizado; en 4.66 ppm se apreció una señal doble ancha con $J= 2.4$ Hz que se asignó al protón vinílico H-29a; de igual manera, en 4.53 ppm se encontró una señal doble de dobles con $J= 2.4$ y 1.6 Hz respectivamente asignada a H-29b, este acoplamiento evidenció una correlación alílica con los protones del metilo terciario CH₃-30; en 4.44 ppm se encontró una señal doble de triples con $J= 12.0$ y 6.0 Hz perteneciente al protón base de éster H-3, lo cual indicó que el acoplamiento mayor está dado por la correlación *trans*-diaxial entre los protones de H-3 y H-2a y el acoplamiento menor demostró el acoplamiento de tipo *axial-ecuatorial* entre H-3 y H-2b así como el acoplamiento de tipo “W” con el protón H-5; en 2.35 ppm se observó una señal doble de triples con $J= 10.4$ y 5.0 Hz asignada al protón en posición alílica H-19; se encontró en 2.25 ppm la señal triple la cual mostró un acoplamiento vecinal ($J= 7.4$ Hz) y fue asignada al metileno alifático H-2' en posición alfa a carbonilo de éster, explicándose así su desplazamiento hacia campo bajo; en 1.65 ppm se observó la señal simple ancha del metilo vinílico CH₃-30; finalmente en 1.00, 0.91, 0.82 y 0.75 ppm se observaron las señales simples de los metilos CH₃-28, CH₃-27, CH₃-24, CH₃-25 y CH₃-23 respectivamente.

En el espectro de RMN de ¹³C (Figura 4.4) fueron observadas 40 señales lo cual confirmó que se trataba de un triterpeno esterificado; se observó la presencia de una señal típica de carbonilo de éster en 173.8 ppm; en 150.8 ppm se localizó la señal del carbono vinílico cuaternario C-20, así como la del metileno vinílico C-29 en 109.6 ppm características de un esqueleto de lupano; en 80.5 ppm fue observada la señal del carbono base de éster C-3; un grupo de siete señales entre 29.0 y 30.0 ppm fueron observadas y asignadas a una cadena alifática típica de ácidos grasos saturados; también se realizó una expansión en la región que comprende entre 14.0 y 52.0 ppm que es la zona más poblada del espectro, donde se pudieron apreciar claramente el resto de las señales correspondientes a la parte alicíclica del esqueleto del triterpeno (Figura 4.5).

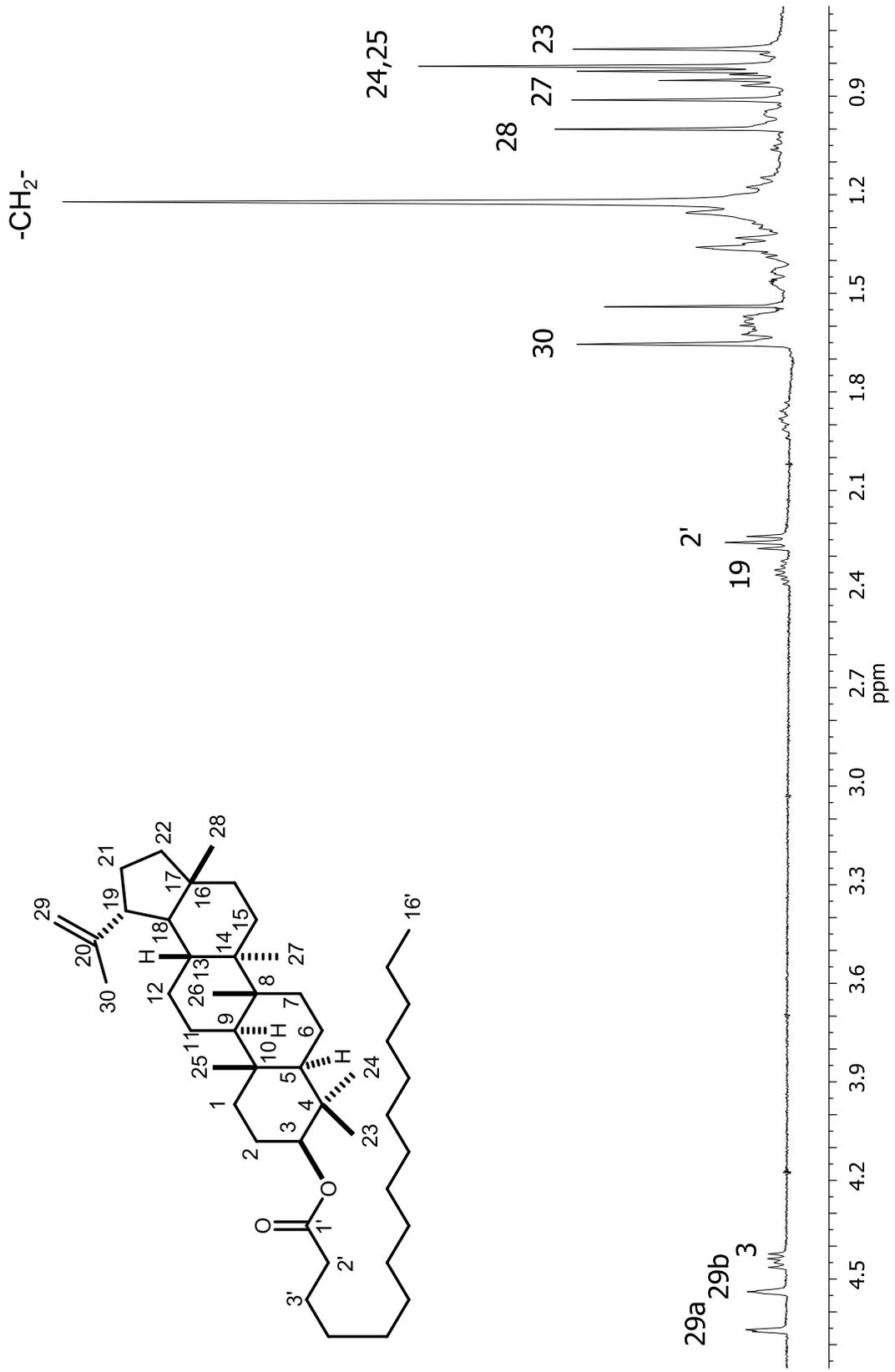


Figura 4.3. Espectro de RMN de ¹H en CDCl₃ a 400 MHz del palmitato de lupeól (46).

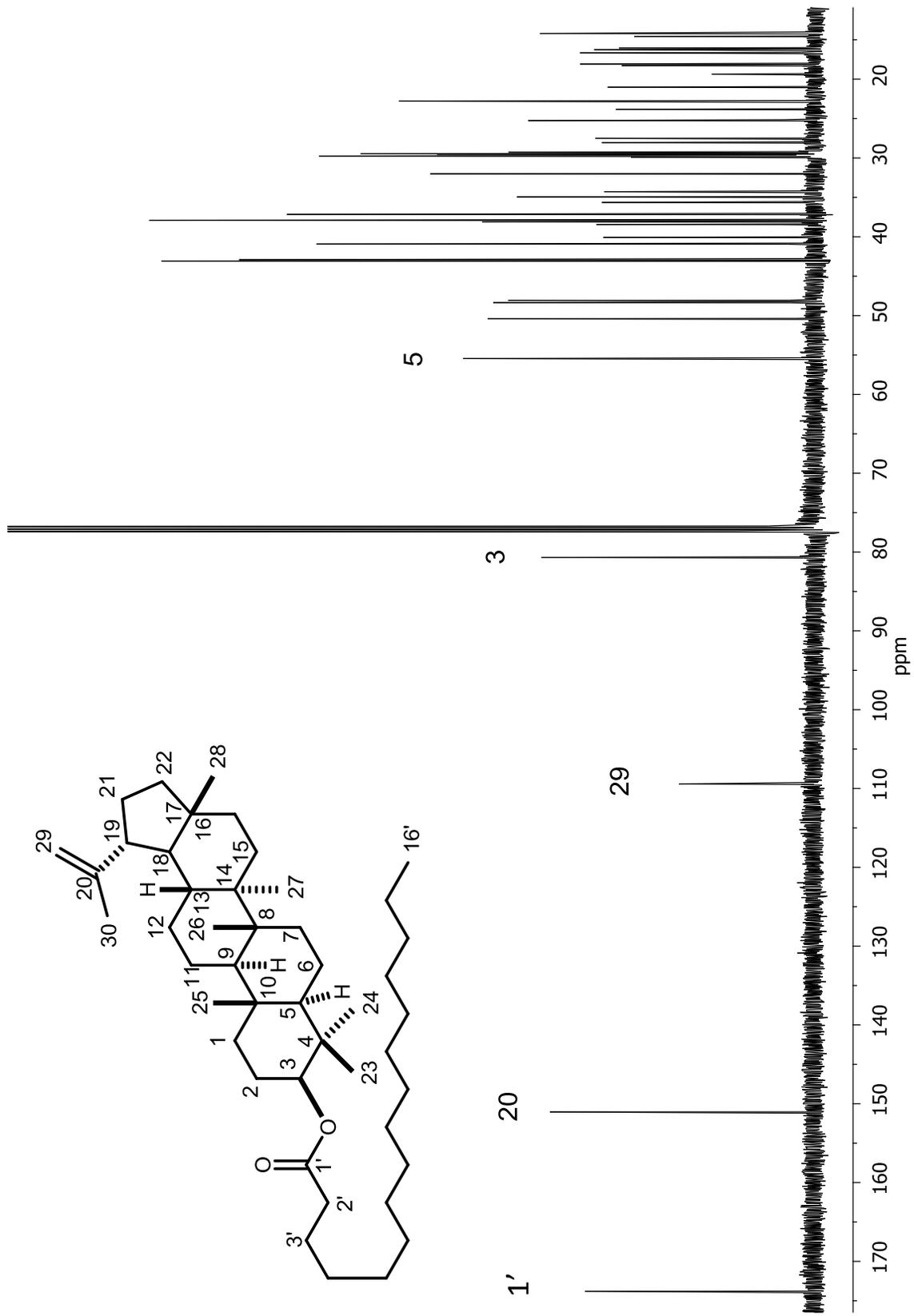


Figura 4.4. Espectro de RMN de ^{13}C en CDCl_3 a 100 MHz del palmitato de lupeolo (46).

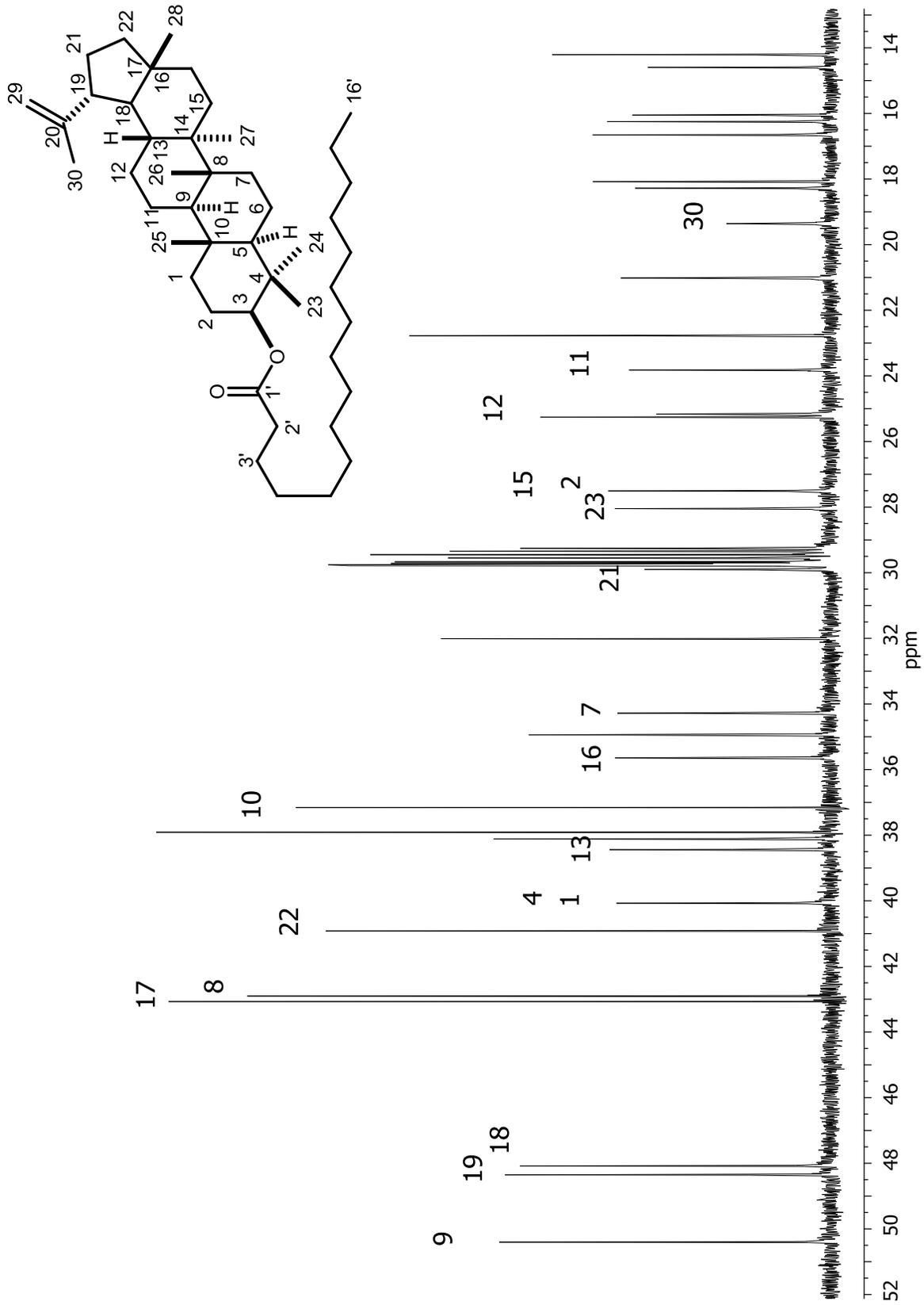


Figura 4.5. Expansión del espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del palmitato de lupeólo (**46**).

En su espectro de masa mostró un ión molecular $[M]^+$ de 664 m/z que corresponde a la fórmula $C_{46}H_{80}O_2$. El patrón de fragmentación del espectro de masa así como los datos de RMN de 1H y ^{13}C demostraron que se trataba del palmitato de lupeólo (**46**) (Figura 4.6); estos datos fueron comparados con los datos de la literatura (Serreqi *et al.*, 2000).

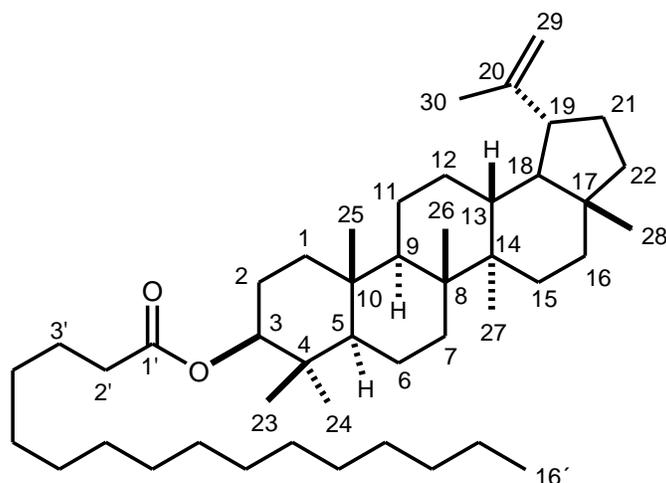


Figura 4.6 Estructura química del palmitato de lupeólo (**46**).

Continuando con el análisis químico del extracto metanólico peracetilado de las hojas de *A. glabrata*, en la polaridad hexano- CH_2Cl_2 1:1 se obtuvieron 35 mg en forma de miel verde claro en cuyo espectro de masa mostró un ión molecular $[M + 1]^+$ de 433 m/z que corresponde a la fórmula $C_{18}H_{24}O_{12}$. En su espectro de RMN de 1H (Figura 4.7) se observó una señal doble de dobles con $J = 7.6$ y 3.0 Hz en 5.43 ppm perteneciente a los protones H-1 y H-4, lo cual permitió deducir que hay acoplamiento de tipo *axial-ecuatorial* y *ecuatorial-ecuatorial*; en 5.39 ppm se encontró una señal doble de dobles con $J = 6.0$ y 3.0 Hz correspondiente a H-2 y H-5; en 5.28 ppm se observó una señal doble de triples con $J = 7.6, 3.0$ Hz que fue asignada a los protones H-3 y H-6; entre 2.00 y 2.20 ppm se observaron tres señales atribuidas a los metilos de acetilo.

En el espectro de RMN de ^{13}C (Figura 4.8) se ubicaron entre 169.8 y 169.0 ppm tres señales pertenecientes a los carbonilos de acetilo; en 69.7 ppm se observó la señal correspondiente a los carbonos terciarios C-1 y C-4; en 68.8 ppm se localizó una señal para los carbonos terciarios C-2 y C-5; en 67.2 ppm se encontró una señal para los carbonos terciarios C-3 y C-6; finalmente alrededor de 20.0 ppm se encontraron las tres señales pertenecientes a los metilos de acetato. Como se pudo apreciar, en los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C solamente aparecieron la mitad de las señales esperadas para el compuesto, lo cual se debió a que la molécula presenta un eje de simetría C_2 que atraviesa los enlaces C-1-C-2 y C-4-C-5, siendo equivalentes los hidrógenos H-1 con H-4, H-2 con H-5 y H-3 con H-6. Por lo anterior podemos proponer que se trata del compuesto peracetoxi *neo*-inositol (**47**).

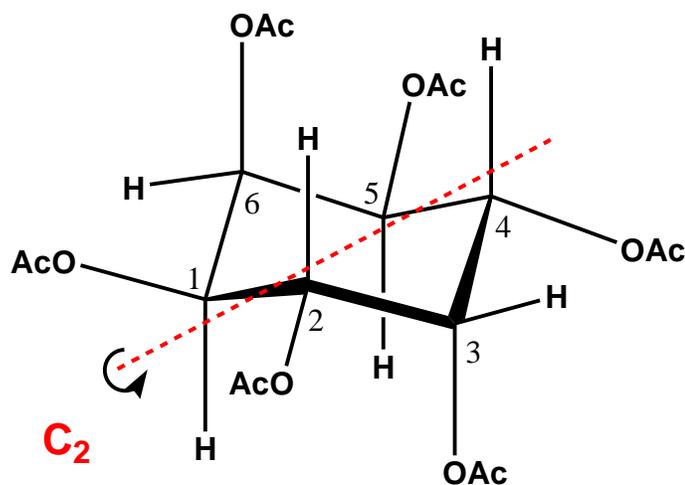


Figura 4.9. Estructura química del peracetoxi *neo*-inositol (**47**).

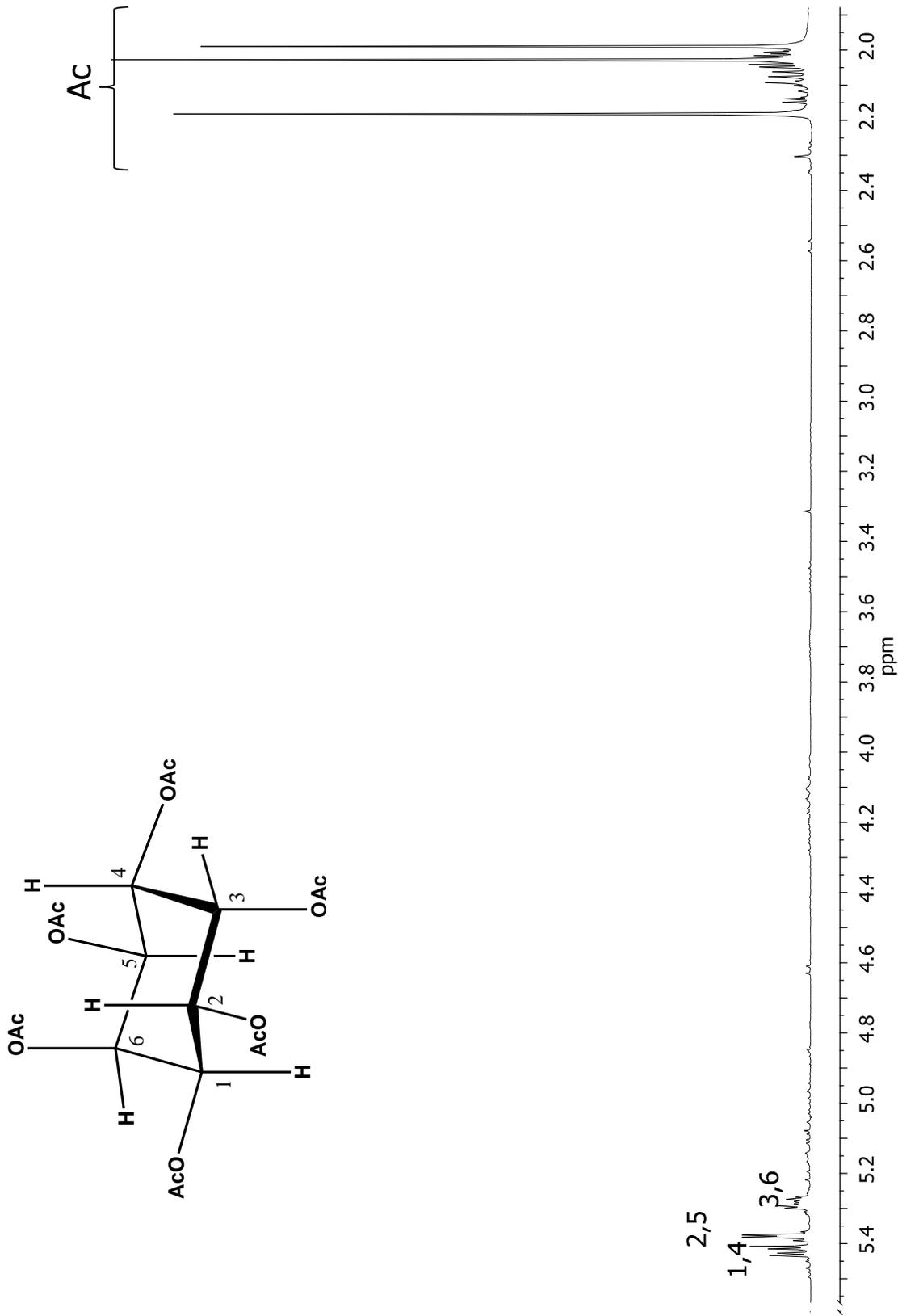


Figura 4.7. Espectro de RMN de ¹H en CDCl₃ a 400 MHz del peracetoxi neo-inositol (47).

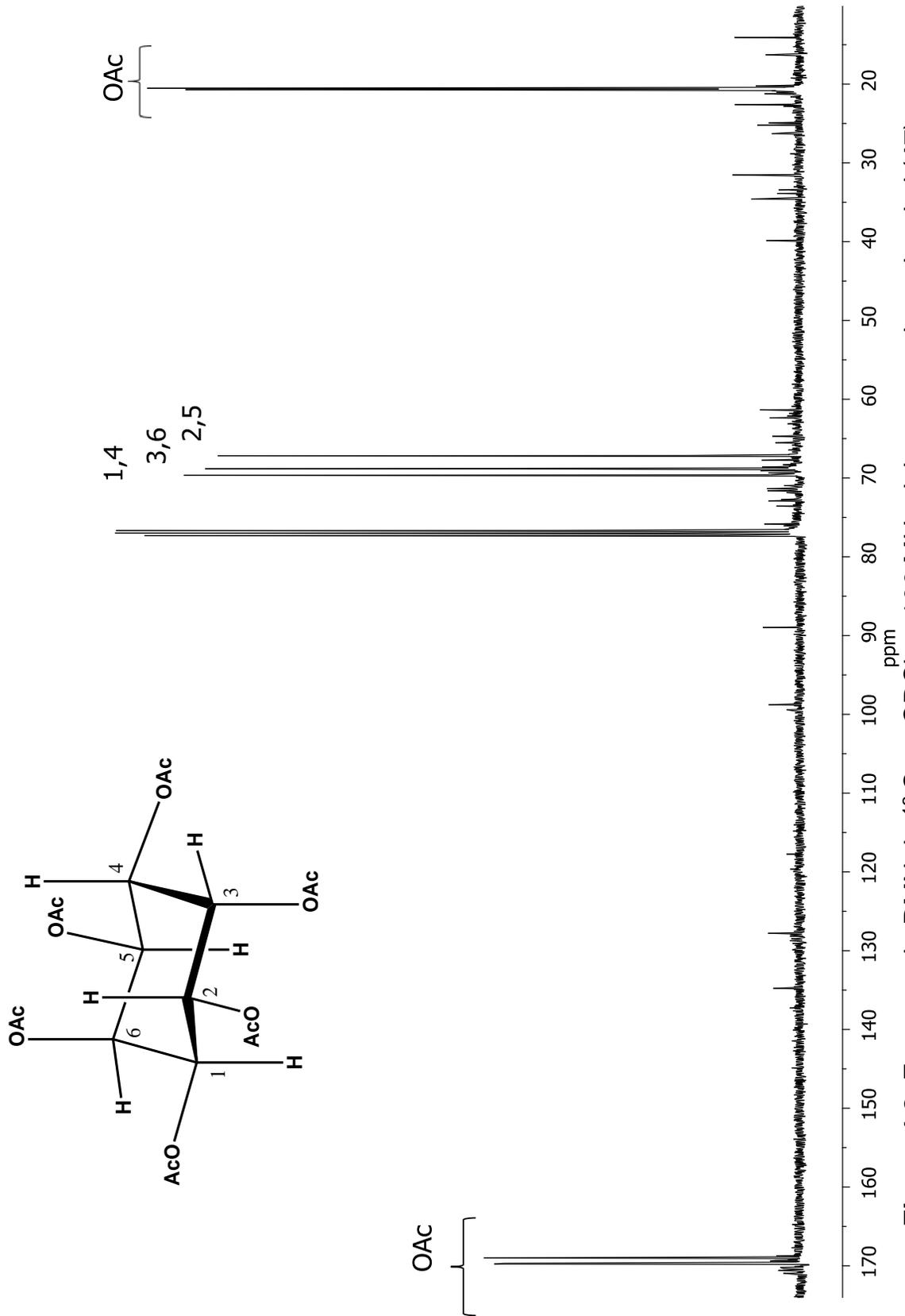


Figura 4.8. Espectro de RMN de ¹³C en CDCl₃ a 100 MHz del peracetoxi neo-inositol (47).

Tentativamente se ha propuesto la estructura del *neo*-inositol para el compuesto **47**, ya que los datos obtenidos experimentalmente hasta este punto no son suficientes para hacer dicha afirmación, así pues en la revisión bibliográfica (**Hipps et al., 1973**) se encontró una serie de estructuras de inositol (Figura 4.10) entre las cuales se encuentra **47**; lo anterior abre la posibilidad de continuar con la investigación de este compuesto para determinar su estereoestructura definitiva.

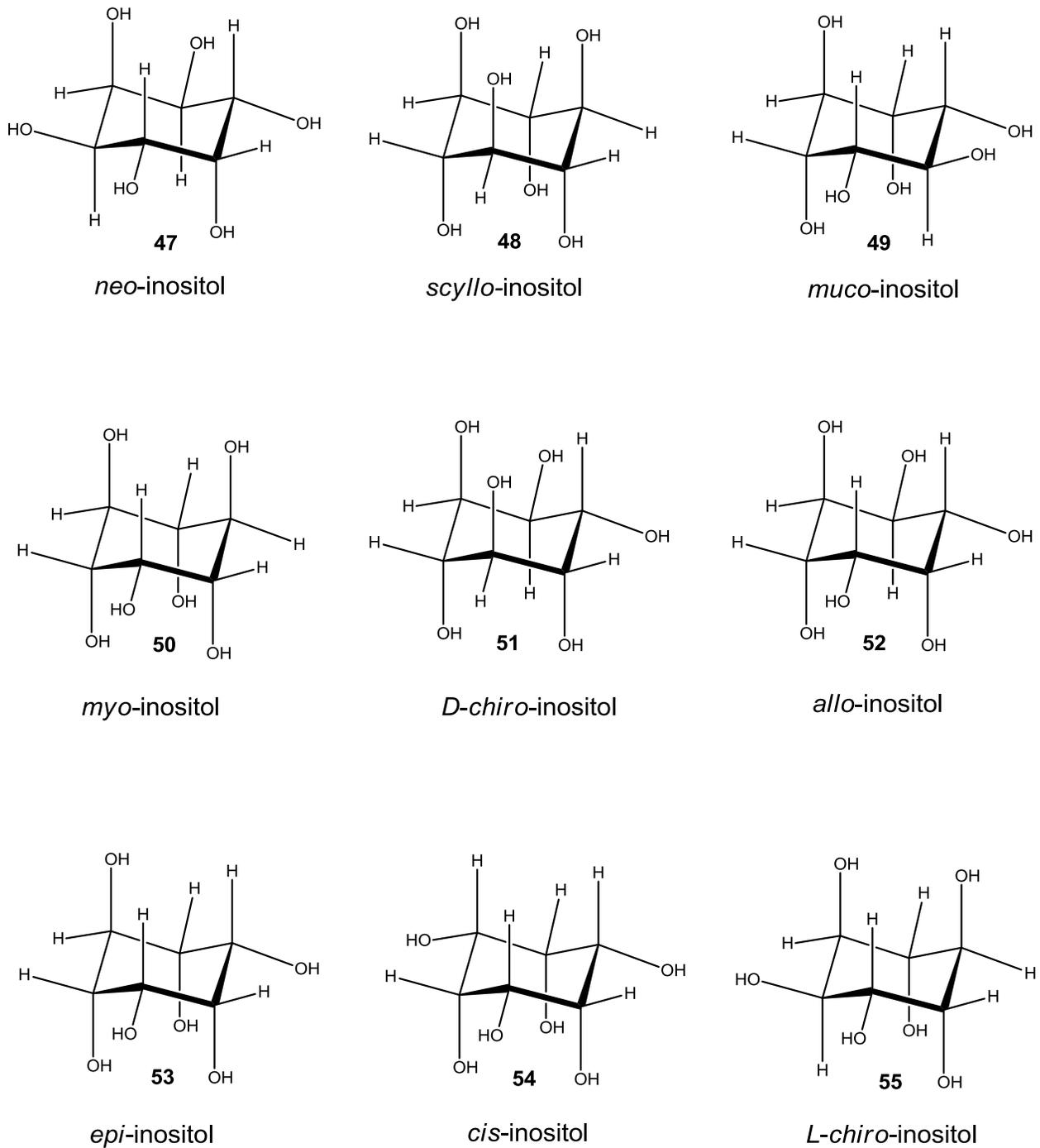


Figura 4.10. Isómeros del inositol.

En la polaridad hexano-CH₂Cl₂ 3:2 se obtuvieron 200 mg de una miel viscosa verde la cual al ser analizada por RMN de ¹H se observó una mezcla de compuestos por lo que se decidió hacer una recromatografía en columna de la cual en la polaridad hexano-AcOEt 4:1 se obtuvieron 25 mg del compuesto **45**. En su espectro de RMN de ¹H (Figura 4.11) se observaron entre 7.95 y 7.44 ppm las señales características de un grupo benzoato, en 7.95 ppm se observó una señal doble de dobles con $J= 8.4$ y 1.3 Hz para los protones H-3'' y H-7''; en 7.57 ppm se localizó una señal triple de triples con $J= 7.4$ y 1.3 Hz para H-5''; en 7.44 ppm se ubicó una señal doble de doble de dobles para las posiciones H-4'' y H-6'' con $J= 8.4, 7.4, 1.3$ Hz; en 7.16 ppm se observó una señal simple y en 6.96 ppm apareció una señal doble con $J= 0.7$ Hz de los hidrógenos en posición *para* del benceno tetrasustituido H-5 y H-2 respectivamente. Se observaron dos sistemas de acoplamiento AB para los metilenos H-9 y H-10; en 2.52 ppm se encontró una señal séptuple con constantes de acoplamiento vecinal ($J= 7.0$ Hz) asignada al protón metínico de un grupo isobutirato H-2'; en 2.38, 2.32 y 2.00 ppm se localizaron las tres señales simples de los metilos de acetilo; en 2.17 ppm se observó la señal simple desplazada a campo bajo de los protones del metilo en posición CH₃-7; en 1.10 y 1.08 ppm se localizaron las señales dobles de H-3' y H-4' que pertenecen al isobutirato que funcionaliza a la molécula.

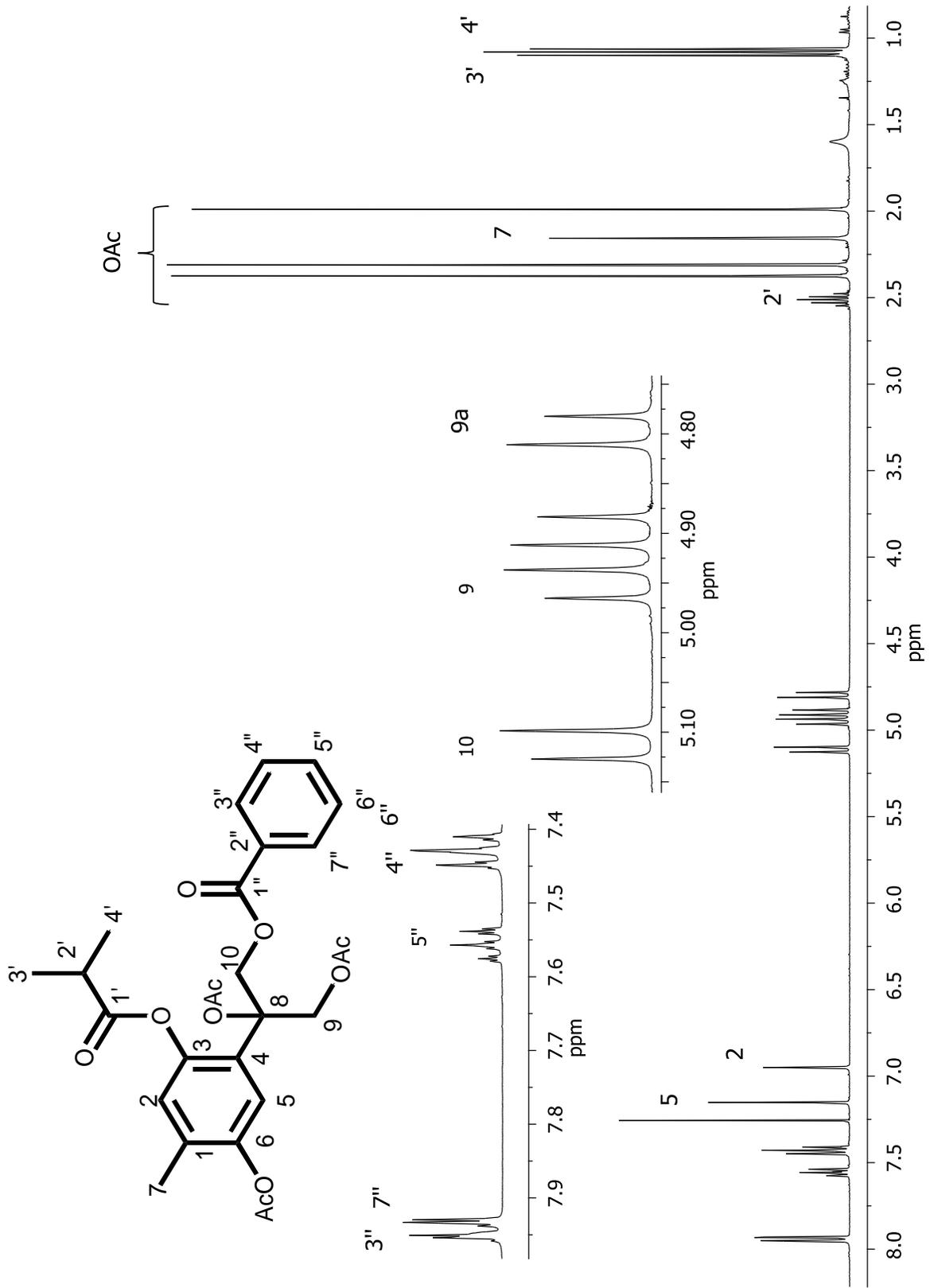


Figura 4.11. Espectro de RMN de ^1H en CDCl_3 a 400 MHz del 10-benzoiloxi-6,8,9-triacetoxi-3-isobutirato de timilo (45).

En el espectro de RMN-¹³C (Figura 4.12) se observó en 176.1 ppm la señal para el carbonilo del isobutirato C-1'; entre 169.3, y 168.6 ppm se encontraron las tres señales de los carbonilos de los grupos acetato. En 165.6 ppm se localizó la señal del carbonilo C-1'' del grupo benzoato; entre 146.8 y 121.6 ppm se ubicaron doce señales correspondientes a los carbonos aromáticos; en 80.5 ppm apareció la señal del carbono cuaternario C-8; se observaron las señales de los carbonos metilénicos C-10 y C-9 en 63.3 y 62.6 ppm respectivamente; entre 21.2 y 20.7 ppm se localizaron las tres señales pertenecientes a los metilos de acetato; en 33.8, 18.7 y 18.6 ppm se encontraron las señales de los carbonos C-2', C-3' y C-4' pertenecientes al grupo funcional isobutirato, finalmente en 15.9 ppm se observó la señal del metilo C-7.

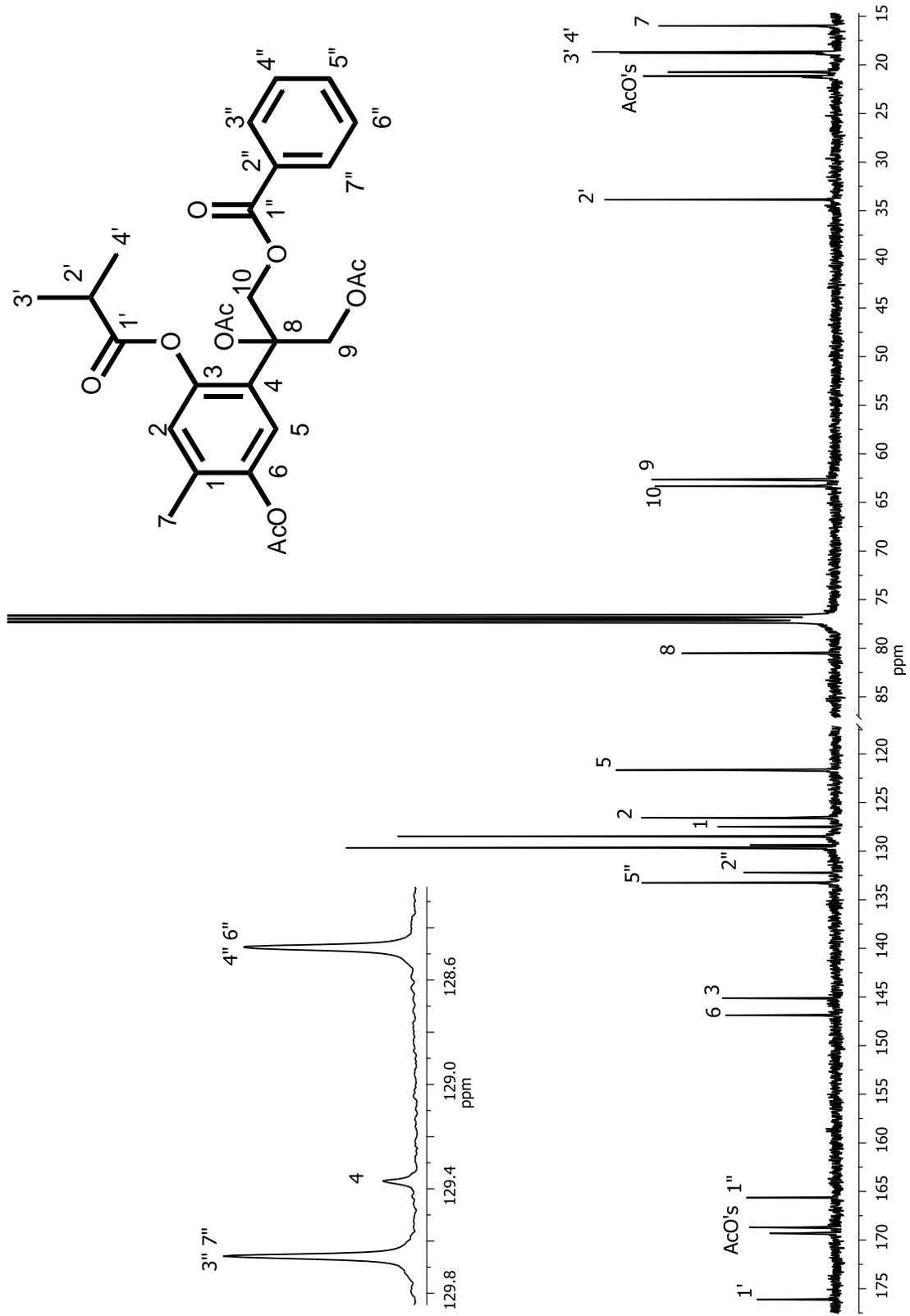


Figura 4.12. Espectro de RMN de ¹³C en CDCl₃ a 100 MHz del 10-benzoiloxi-6,8,9-triacetoxi-3-isobutirato de timilo (**45**).

Los datos espectroscópicos fueron comparados con una muestra auténtica con lo que se demostró que se trataba del derivado de timol **45** (Figura 4.13).

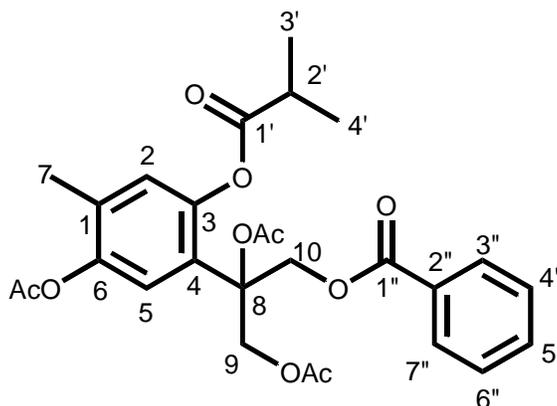


Figura 4.13. Estructura del 10-benzoiloxi-6,8,9-triacetoxi-3-isobutirato de timilo (**45**).

Adicionalmente, se llevó a cabo un estudio químico del extracto metanólico de las flores de *A. glabrata*; para lo cual, se tomaron 200 g de flores y se sometieron a maceración en polaridad ascendente con hexano, cloruro de metileno y metanol, del extracto metanólico se obtuvieron 17.5 g, del cual se tomó una muestra y se le determinó su espectro de RMN de ^1H . (Figura 4.14), en el cual se observa una menor proporción de señales en la región de hidrógenos bases de heteroátomos. El extracto fue sometido a peracetilación, bajo las mismas condiciones que el extracto de hojas y fue analizado mediante RMN de ^1H (Figura 4.15), el espectro mostró en aproximadamente 1.90 a 2.40 ppm un conjunto de señales simples de metilos de acetatos lo cual demostró la presencia de oxhidrilos.

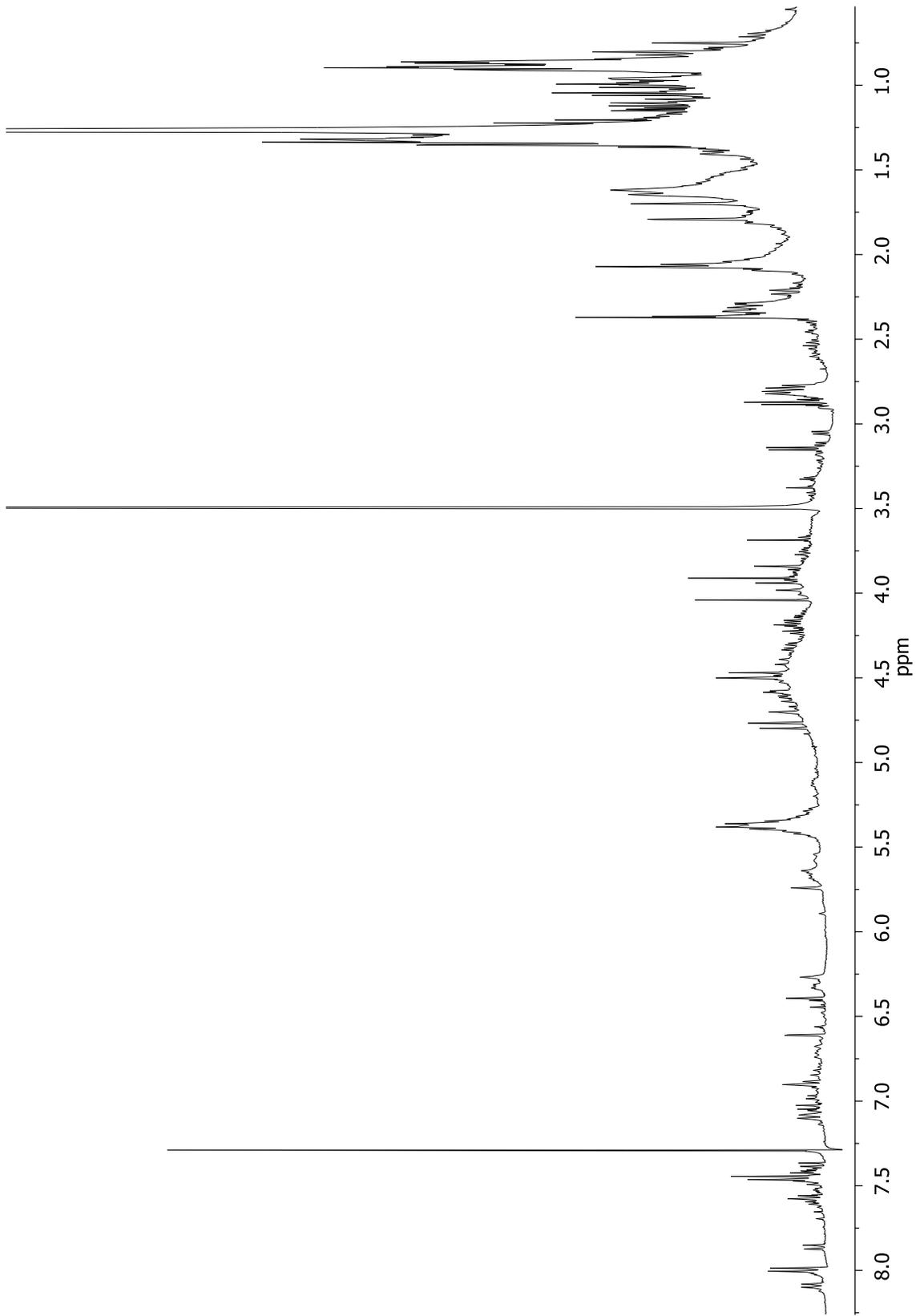


Figura 4.14. Espectro de RMN de ^1H en CDCl_3 a 400 MHz del extracto metanólico crudo de flores de *A. glabrata*.

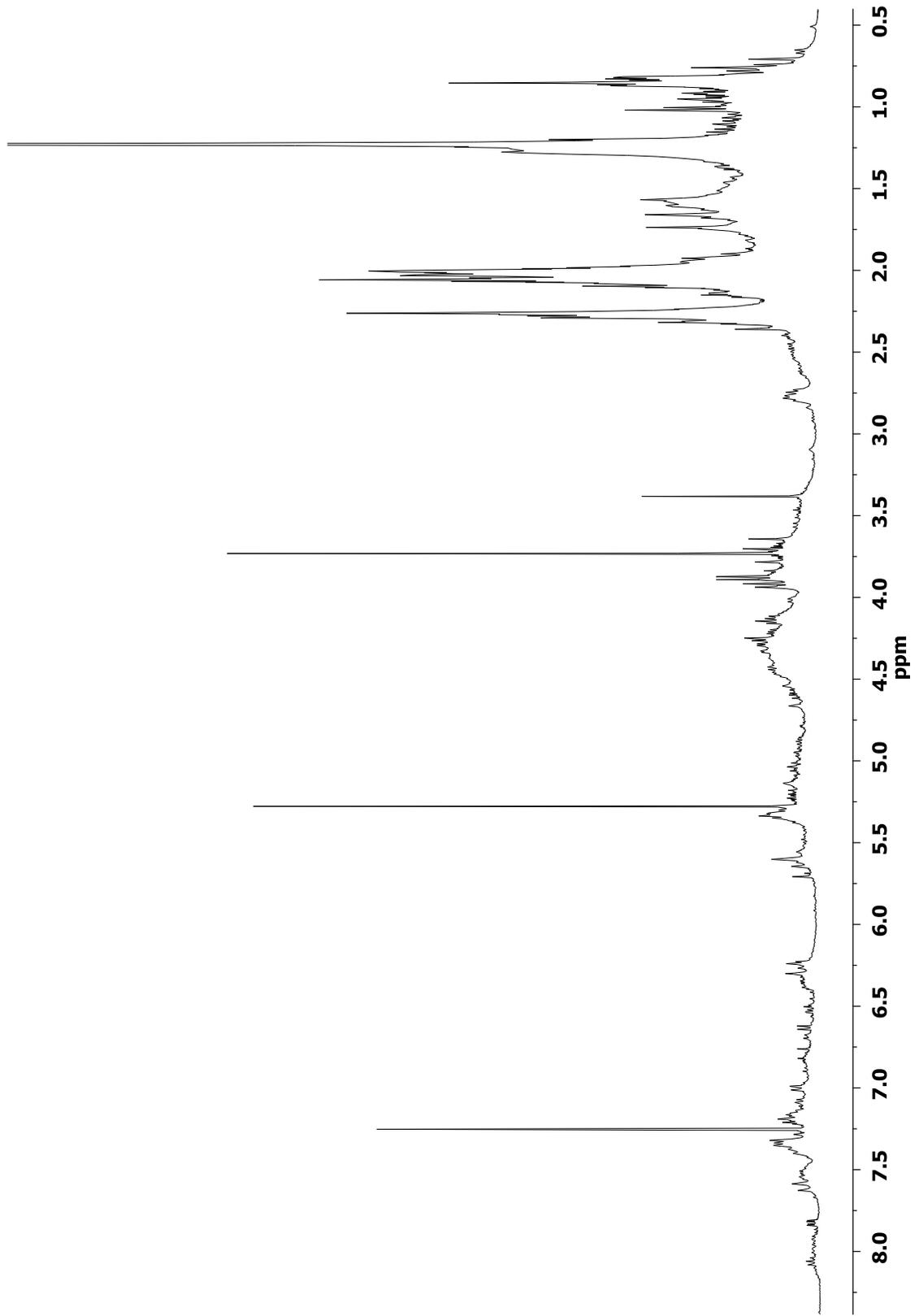


Figura 4.15. Espectro de RMN de ¹H en CDCl₃ 400 MHz del extracto acetilado de flores de *A. glabrata*.

El extracto acetilado fue sometido a separación cromatográfica empleando gel de sílice como fase estacionaria y mezclas de hexano-CH₂Cl₂ en orden creciente de polaridad. En la polaridad 1:1 se obtuvieron 25 mg de una miel verde la cual se caracterizó por RMN de ¹H (Figura 4.16) donde se observó en 13.03 ppm una señal simple perteneciente al protón del hidroxilo OH-5, esta señal es típica de hidrógenos que forman enlaces por puentes de hidrógeno; en 7.84 ppm se localizó una señal doble con *J*= 9.0 Hz que integró para dos protones y fue asignada a los protones H-2' y H-6'; en 7.03 ppm se observó otra señal doble con *J*= 9.0 Hz que fue asignada a los hidrógenos de las posiciones H-3' y H-5'; también se localizaron en 6.78 y 6.63 ppm dos señales simples pertenecientes a los protones aromáticos H-8 y H-3; en 3.94 y 3.90 ppm se observaron las dos señales simples de los grupos metiléter; en 2.39 ppm se localizó una señal simple que integró para tres protones atribuida al metilo del acetato. Los datos anteriores nos llevan a la conclusión que se trata de un flavonoide parcialmente acetilado. La estructura fue comparada con los datos de la literatura (Sujatha *et al*, 2013) este compuesto es conocido como pectolinarigenina el cual presenta propiedades analgésicas. Estos compuestos solo difieren en el grupo acetato en la posición 7, producto de la acetilación parcial.

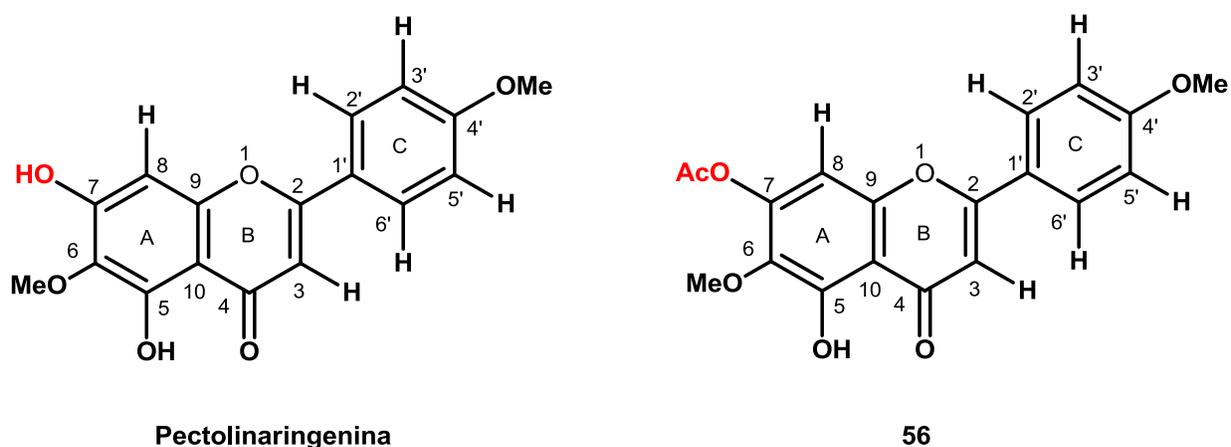


Figura 4.17. Estructuras de Pectolinarigenina y del 7-acetil-pectolinarigenina. (56).

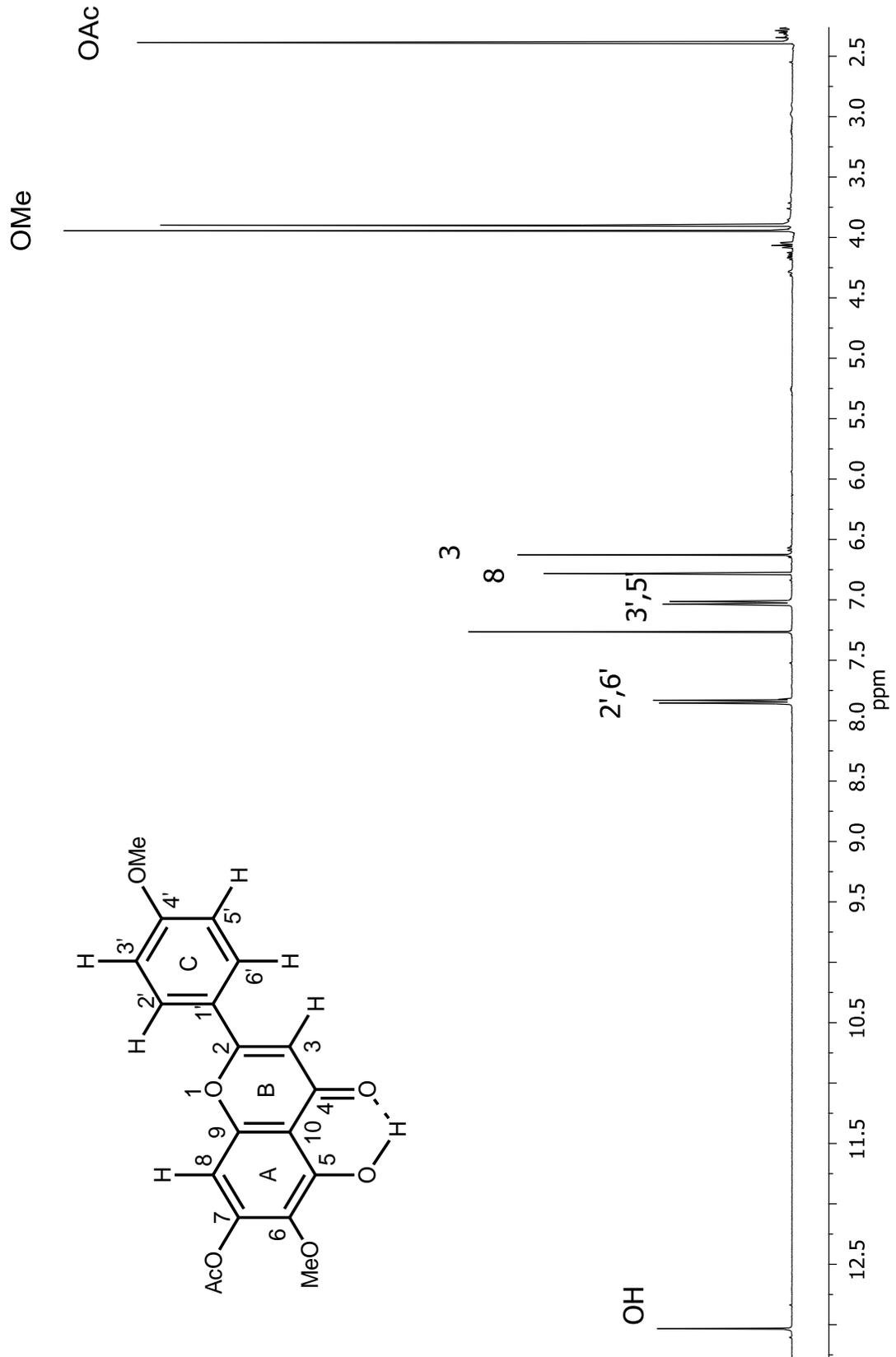


Figura 4.16. Espectro de RMN de ¹H en CDCl₃ a 400 MHz de del 7-acetil-pectolinaringenina (56).

En la misma polaridad hexano-CH₂Cl₂ 1:1 se obtuvieron 5 mg de una miel verde cuyo espectro de RMN de ¹H (Figura 4.18) se observó a 12.83 ppm una señal simple que pertenece al grupo OH-5 que forma puente de hidrogeno; en 7.85 ppm se localizó una señal doble con *J*= 9.0 Hz para los protones aromáticos H-2' y H-6'; en 7.03 ppm se observó una señal doble con *J*= 9.0 Hz para los protones aromáticos H-3' y H-5'; en 6.84 ppm se localizó una señal doble con *J*= 2.0 Hz para el protón aromático H-8; en 6.64 ppm se encontró una señal simple para el protón H-3; en 6.56 ppm se observó una señal doble con *J*= 2.0 Hz para H-6; en 3.90 ppm se observó una señal simple del grupo metoxilo y finalmente en 2.34 ppm se localizó una señal simple para el grupo acetato. Estos datos sugieren la presencia de un flavonoide parcialmente acetilado **60** (Figura 4.19) El compuesto se comparó con los datos de la literatura (**Pinzon et al, 2011**). Al igual que el flavonoide anterior, solo se encuentra acetilado en la posición 7.

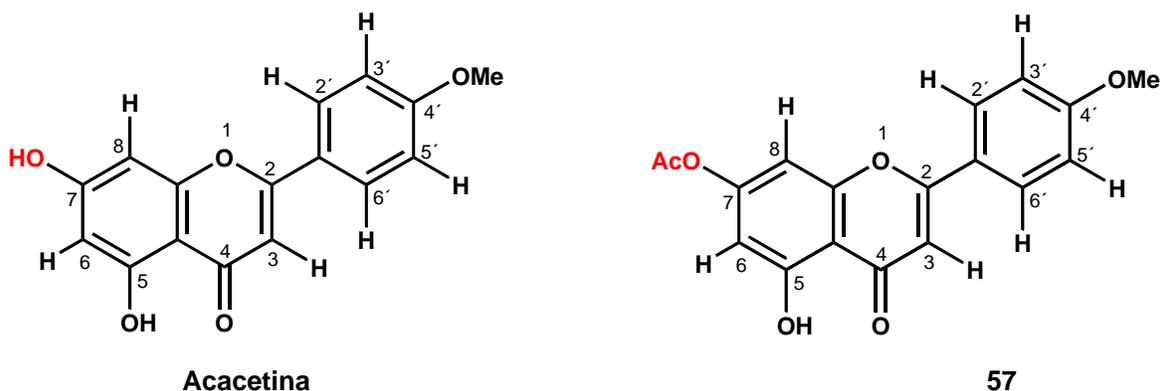


Figura 4.19. Estructuras de Acacetina y del 7-acetilacacetina (**57**).

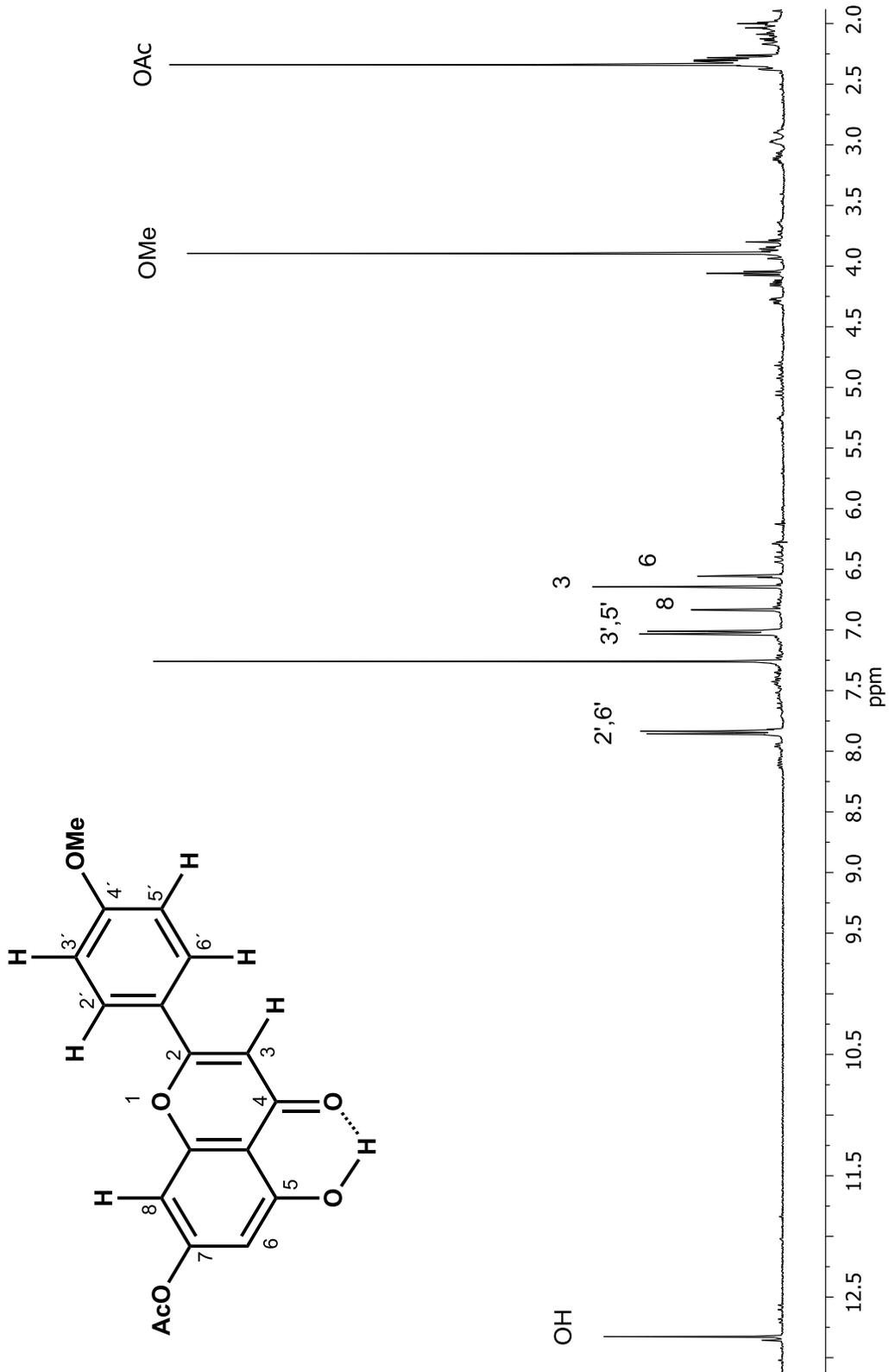
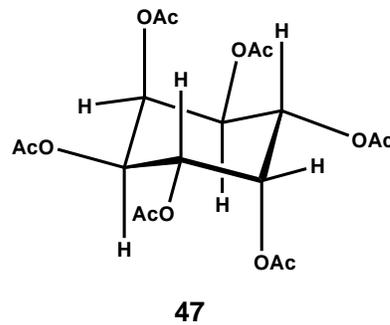
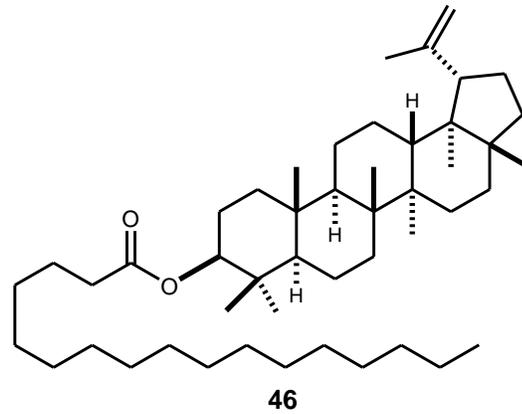
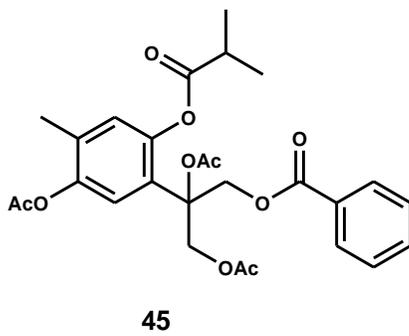


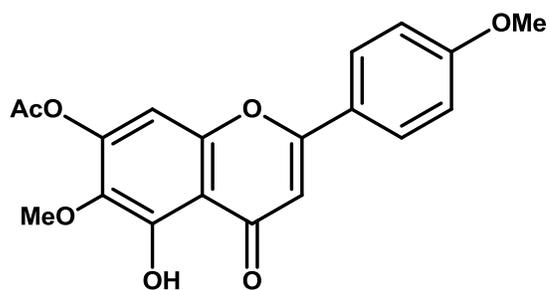
Figura 4.18. Espectro de RMN ^1H en CDCl_3 a 400 MHz de del 7-acetilacetina (57).

5 CONCLUSIONES

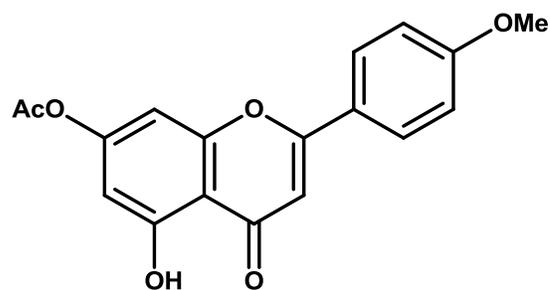
Del extracto metanólico acetilado de hojas de *A. glabrata*, se aislaron los siguientes compuestos: 10-Benzoiloxi 6,8,9-triacetoxi-3-isobutirato de timilo (**45**), Palmitato de lupeilo (**46**), peracetoxi *neo*-inositol (**47**).



Del extracto metanólico de flores de *A. glabrata* acetilado se aislaron únicamente derivados flavonoides parcialmente acetilados: 7-acetilpectolinaringenina (**56**), 7-acetilacetina (**57**).



56



57

La acetilación de los extractos metanólicos de *A. glabrata* permitió obtener derivados menos polares al formarse sus respectivos derivados acetilados, lo que facilitó su purificación e identificación.

Los compuestos fueron caracterizados por RMN-¹H y RMN-¹³C.

6 PARTE EXPERIMENTAL

6.1 MATERIAL VEGETAL

Ageratina glabrata fue colectada el día 10 de Febrero de 2010 en el Km 202 de la carretera México-Morelia, Vía Mil Cumbres. La planta fue identificada por el Dr. J. Rzedowski, conservando un ejemplar en el Herbario del Instituto de Ecología Pátzcuaro A.C.

La planta se separó en sus distintas partes (hojas, flores, tallos y raíces), se secaron a la sombra por 15 días y se obtuvieron los extractos de hexano, cloruro de metileno y metanol de las hojas y flores.

6.2 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS

Dos lotes de 200 gramos, uno de hojas y otro de flores secas y trituradas se sometieron a extracción por el método de maceración a temperatura ambiente, utilizando como disolventes hexano, cloruro de metileno y metanol por periodos de tres días y tres periodos por disolvente respectivamente.

6.3 RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR Y ESPECTROMETRÍA DE MASA

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H y ^{13}C fueron medidos en un equipo Varian Mercury Plus 400 a 400 MHz y 100 MHz respectivamente, utilizando cloroformo deuterado (CDCl_3) como disolvente, y como referencia interna tetrametilsilano (TMS). Los espectros de masa fueron medidos en un equipo Hewlett-Packard 5890 series II a 70 eV.

6.4 ACETILACIÓN

6.4.1 ACETILACIÓN DEL EXTRACTO METANÓLICO DE HOJAS

17 g del extracto metanólico de hojas se mezclaron con 10 mL de cloruro de metileno, 15 mL de piridina, 40 mL de anhídrido acético, la mezcla de reacción se dejó en agitación por 24 h. Transcurrido este tiempo la mezcla de reacción se vertió sobre hielo y se extrajo con AcOEt en un embudo de separación, se realizaron cuatro lavados con ácido clorhídrico al 5%, dos lavados con agua, cuatro lavados con solución saturada de bicarbonato de sodio y finalmente dos lavados con agua destilada, posteriormente se secó la muestra con sulfato de sodio anhidro; se concentró en rotavapor, obteniéndose 19.7 g del crudo de reacción. Este procedimiento se repitió hasta obtener 30 g de extracto acetilado.

6.4.2 ACETILACIÓN DEL EXTRACTO METANÓLICO DE FLORES

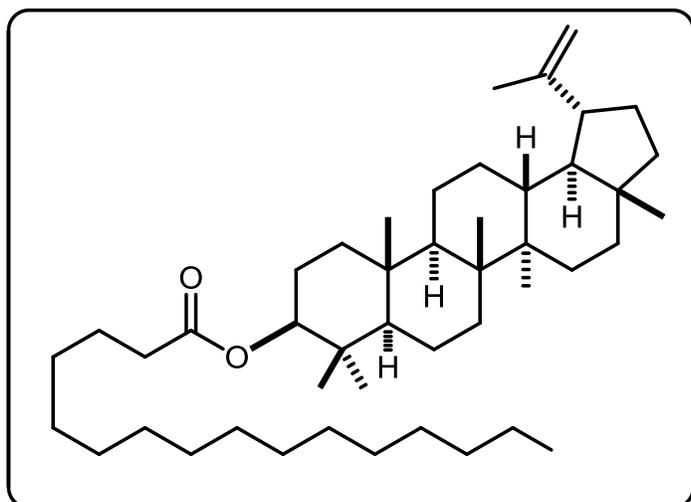
6.0 g de extracto metanólico crudo de flores se mezclaron con 5 mL de cloruro de metileno, 6.0 mL de piridina, 14.0 mL de anhídrido acético, la mezcla de reacción se dejó en agitación por 24 h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo la mezcla de reacción se vertió sobre hielo y se extrajo con AcOEt, en un embudo de separación, se realizaron cuatro lavados con ácido clorhídrico al 5%, dos lavados con agua, cuatro lavados con solución saturada de bicarbonato de sodio y dos lavados con agua destilada, posteriormente se secó la muestra con sulfato de sodio anhidro, se concentró en rotavapor, obteniéndose 10.7 g de extracto acetilado.

6.5 CROMATOGRAFÍA DE LOS CRUDOS DE LA REACCIÓN

Los extractos acetilados de las hojas y flores se sometieron a purificación por separado, en una columna cromatográfica de 3 cm de diámetro por 15 cm de altura, con gel de sílice de 230-400 mallas como fase estacionaria previamente impregnada

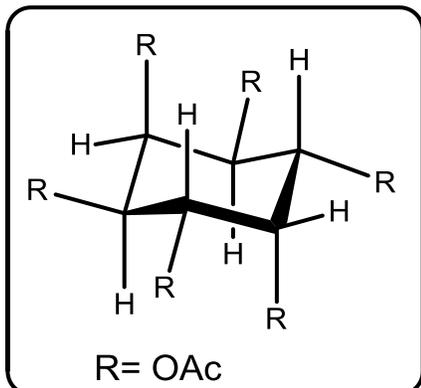
con el extracto acetilado y cloruro de metileno, usando polaridades de hexano-CH₂Cl₂ 9:1, 4:1, 7:3, 3:2, 1:1 y CH₂Cl₂, seguido de CH₂Cl₂-metanol 9:1, 4:1, 7:3, 3:2 y 1:1, por último se barrió con metanol como fase móvil, obteniendo un promedio de 100 fracciones de 100 mL.

6.6 ANÁLISIS QUÍMICO



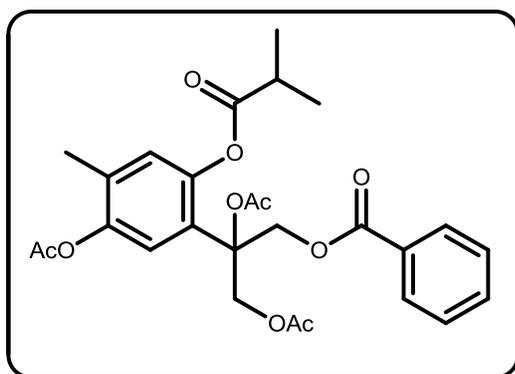
Palmitato de lupeilo (46). En la polaridad hexano-CH₂Cl₂ 4:1 se obtuvieron 61 mg de un sólido blanco ceroso. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 4.66 (1H, da, *J*= 2.4 Hz, H-29a), 4.53 (1H, dd, *J*= 2.4, 1.6 Hz, H-29b), 4.44 (1H, dt, *J*= 12.0, 6.0 Hz, H-3), 2.35 (1H, dt, *J*= 10.4, 5.0 Hz, H-19), 2.25 (2H, t, *J*= 7.4 Hz, H-2'), 1.65 (3H, sa, H-30), 1.00 (3H, s, H-28), 0.91 (3H, s,

H-27), 0.82 (6H, s, H-24, H-25), 0.75 (3H, s, H-23). RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ: 173.8 (C, R'COOR), 150.8 (C, C-20), 109.6 (CH₂, C-29), 80.5 (CH, C-3), 55.5 (CH, C-5), 50.4 (CH, C-9), 48.3 (CH, C-19), 48.0 (CH, C-18), 43.1 (C, C-17), 43.1 (C, C-14), 43.0 (C, C-8), 40.8 (CH₂, C-22), 40.0 (CH₂, C-1), 40.0 (C, C-4), 38.4 (CH, C-13), 37.1 (C, C-10), 36.6 (CH₂, C-16), 34.2 (CH₂, C-7), 29.9 (CH₂, C-21), 28.0 (CH₃, C-23), 27.5 (CH₂, C-15), 27.5 (CH₂, C-2), 25.2 (CH₂, C-12), 23.8 (CH₂, C-11), 19.3 (CH₃, C-30). EMIE [M]⁺ (%): 664 (4), 410 (7), 297 (5), 257(7), 229 (10), 216 (13), 203 (30), 189 (70), 175 (20), 161 (22), 147 (25), 135 (33), 121 (45), 109 (57), 95 (68), 81 (68), 67 (47), 57 (100), 55 (94).



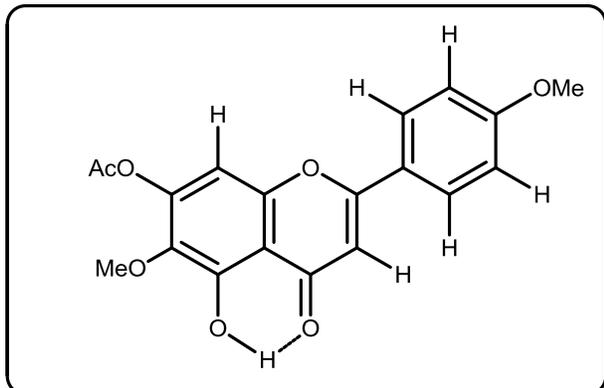
Peracetil neo-inositol (47). En la polaridad hexano-CH₂Cl₂ 1:1 se obtuvieron 35 mg de una miel verde claro. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 5.43 (2H, dd, *J* = 7.6, 3.0 Hz, H-1, H-4), 5.39 (2H, dd, *J* = 6.0, 3.0 Hz, H-2, H-5), 5.30 (1H, t, *J* = 3.0 Hz H-3), 5.28 (t, *J* = 3.0 Hz, H-6). RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 169.8 (C, OAc), 169.7 (C, OAc), 169.0 (C, OAc), 69.7 (CH, C-1, C-4), 68.8 (CH, C-2, C-5), 67.2 (CH, C-3, C-6), 20.7 (CH₃, Ac). 20.6 (CH₃, Ac). 20.5 (CH₃, Ac).

EIME [M+1]⁺ (%); 433 (0.1) 373 (0.1), 270 (3), 210 (29), 199 (6), 186 (1), 168 (44), 126 (25), 115 (19), 43 (100).

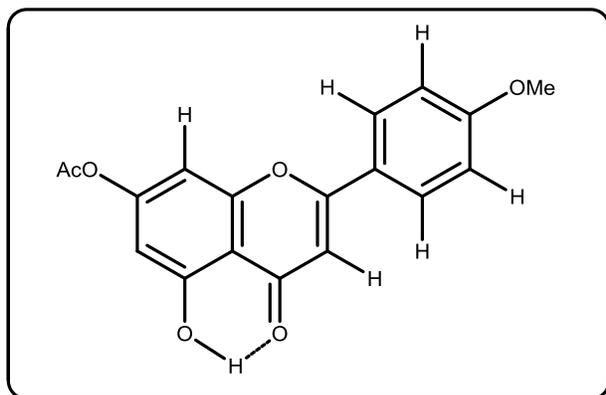


10-benzoiloxi-6,8,9-triacetoxi-3-isobutirato de timilo (45). En la polaridad hexano-CH₂Cl₂ 4:1 se obtuvieron 25 mg una miel verde viscosa. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.95 (2H, dd, *J* = 8.4, 1.3 Hz, H-3'', H-7''), 7.57 (1H, tt, *J* = 7.4, 1.3 Hz, H-5''), 7.44 (2H, ddd, *J* = 8.4, 7.4, 1.3 Hz, H-4'', H-6''), 7.16 (1H, s, H-5), 6.96 (1H, d, *J* = 0.7 Hz, H-2),

5.10 (1H, d, *J* = 11.3 Hz, H-10a), 4.96 (1H, d, *J* = 11.4 Hz, H-9a), 4.91 (1H, d, *J* = 11.3 Hz, H-10b), 4.80 (1H, d, *J* = 11.4 Hz, H-9b), 2.52 (1H, sept, *J* = 7.0 Hz, H-2'), 2.38 (3H, s, OAc), 2.32 (3H, s, OAc), 2.17 (3H, sa, H-7), 2.00 (3H, s, OAc), 1.10 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, H-3'), 1.08 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, H-4'). RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ: 176.1 (C, C-1'), 169.3 (C, OAc), 168.7 (C, OAc), 168.6 (C, OAc), 165.6 (C, C-1''), 146.8 (C, C-6), 145.1 (C, C-3), 133.2 (CH, C-5''), 132.2 (C, C-2''), 129.6 (CH, C-3''), 129.6 (CH, C-7''), 129.3 (C, C-4), 128.4 (CH, C4''), 128.4 (CH, C-6''), 127.4 (C, C-1), 126.5 (CH, C-2), 121.6 (CH, C-5), 80.5 (C, C-8), 63.3 (CH₂, C-10), 62.6 (CH₂, C-9), 33.8 (CH, C-2'), 21.2 (CH₃, OAc), 21.1 (CH₃, OAc), 20.7 (CH₃, OAc), 18.7 (CH₃, C-3'), 18.6 (CH₃, C-4'), 15.9 (CH₃, C-7).



7-acetil-pectolarinigenina (56). En la polaridad hexano-CH₂Cl₂ 1:1 se obtuvieron 25 mg de una miel verde. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 13.03 (1H, s, OH-5), 7.84 (2H, d, *J*= 9.0 Hz, H-2', H-6'), 7.03 (2H, dd *J*= 9.0 Hz, H-3', H-5'), 6.78 (1H, s, H-8), 6.63 (1H, s, H-3), 3.94 (3H, s, OMe), 3.90 (3H, s, OMe), 2.39 (3H, s, OAc).



7-acetil-acacetina (57). En la polaridad hexano-CH₂Cl₂ 1:1 se obtuvieron 5 mg de una miel verde. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 12.83 (1H, s, OH-5), 7.85 (2H, d, *J*= 9.0 Hz, H-2', H-6'), 7.03 (2H, d, *J*= 9.0 Hz, H-3', H-5'), 6.84 (1H, d *J*= 2 Hz, H-8), 6.64 (1H, s, H-3), 6.56 (1H, d, *J*= 2 Hz, H-6), 3.9(3H, s, OMe), 2.34 (3H, s, OAc).

7 BIBLIOGRAFÍA

Ávalos García A., Pérez-Urria Carril E., *Metabolismo secundario de plantas*. REDUCA (Biología). Serie Fisiología Vegetal, (2009) **2**: 119-145.

Arango Acosta G. J., *Alcaloides y compuestos nitrogenados*, Universidad de Antioquia, Facultad de Química Farmacéutica, Medellín, (2008) 12-14.

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.

Bohlmann F., Jakupovic J., Lonitz M., *Über Inhaltsstoffe der Eupatorium-Gruppe*. Chemische Berichte, (1976) **110**: 301-314.

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.

Colares M. N., Tesis de Maestría para optar al grado de Magister en Plantas Medicinales (2010) UNLP. *Mikania cordifolia y Mikania micrantha (Asteraceae): Especies medicinales nativas de las Reservas Naturales de Punta Lara e Isla Martín García, Buenos Aires, Argentina Anatomía, ensayos fitoquímicos y actividades biológicas*.

CONABIO-CONANP-SEMARNAT Estrategia Mexicana para la Conservación Vegetal, (2008). [revisado el 21 de Mayo de 2013] <http://www.biodiversidad.gob.mx/pais/pdf/EMCV.pdf>.

del Barrio G., Spengler I., García T., Roque A., Alvarez Á., Calderón J., Parra F.,
*Antiviral activity of Ageratina havanensis and major chemical compounds
from the most active fraction.* Revista Brasileira de Farmacognosia, (2011)
21: 915-920.

Dewick P. *Medicinal Natural Products A Biosynthetic approach*. 3er Ed. Wiley
United Kingdom (2009) 7-33.

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.

He L., Hou J., Gan M., Shi J., Chantrapromma S., Fun H., Williams I., Sung H. H.
Cadiane Sesquiterpenes from the leaves of Eupatorium Adenophorum.
Journal of Natural Products (2008) **71**: 1485-1488.

Hipps P., Sehgal R., Holland W., Sherman W., Identification and Partial
Characterization of Inositol: NAD⁺ Epimerase and Inositol: NAD (P) H
Reductase from the Fat Body of the American Cockroach, *Periplaneta
Americana L.*, Biochemistry, (1973) **12**: 405-408

King M. R., Robinson H. *Phytology: Studies in the Eupatoriae (Compositae)*,
(1970) **20**: 196-209

León S. N., V. L. F., Chávez F J., Quispe P., *Estudio preliminar de la actividad
antiinflamatoria del extracto etanolico de los tallos de Ageratina
sternbergiana (DC.) R.M. King & H. Rob "Zun Zun"* Revista ECIPERÚ,
(2011) **8**: 245-252.

Magaña P., Villaseñor J. L. *La flora de México ¿Se podrá conocer
completamente?*, Revista de cultura científica de la Facultad de Ciencias de
la Universidad Nacional Autónoma de México, (2002) **66**: 24-26.

- Oladejo O. W., Imosemi I. O., Osuagwu F.C., Oluwadara O. O., Adewoyin, O A. A., Ekpo O.E., Oyedele O. O., E. E. U Akang. *Enhancement of cutaneous wound healing by methanolic extracts of Ageratum conyzoides in the wistar rats*. Africal Journal Of Biomedical Research. (2003) **6**: 27-31.
- Pardo Novoa Julio César, *Escrutinio Fitoquímico y Antimicrobiano de Eupatorium glabratum H.B.K.*, Tesis de Licenciatura (2011), Morelia, Michoacán, México.
- Pinzon Lunesa C. Uy Mylene M., Sze Kung Hong, Wang Mingfu, Chu Ivan Keung. Isolation and characterization of antimicrobial, anti-inflammatory and chemopreventive flavones from *Premna odorata* Blanco. Journal of Medicinal Plants Research (2011) **5**: 2729-2735.
- P. Sujatha, G. Sreekanth, S. Khasim, Rao B. Venkatrao Adavi, B.Ravi Kumar Rao A. Venkata Narasimha Appa. *Flavonoids of Dikamali: A phytochemical reinvestigation*. Natural Products Research. (2013) (en prensa).
- Rzedowski Jerzy, *Diversidad y orígenes de la flora Fanerogamica de México*, Revista ciencias (1992) 47-56.
- Romero-Cerecero O. O., A. Zamilpa-Álvarez A. A., Jiménez-Ferrer E. E., Tortoriello J., *Exploratory study on the effectiveness of a standardized extract from Ageratina pichichensis in patients with chronic venous leg ulcers*. Plant. Med. (2012) **78**: 304-310.
- 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.

- Sepúlveda Jiménez G., Porta Ducoing H., Rocha Sosa, M., *La participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas*, Revista Mexicana de fitopatología (2003) **21**: 355-363.
- Serreqi A. N., Leone R., Del Rio L. F., Mei S., Fernandez M., Breuil C., *Identification and Quantification of Important Steryl Esters in Aspen Wood*, Journal of the American Oil Chemists' Society, (2000) **77**: 413-418.
- Talavera Alemán Armando, Componentes minoritarios de *Ageratina glabrata* Tesis de Licenciatura (2012) Morelia, Michoacán, México.
- Tapia Muñoz J.L., *La familia Asteraceae*, Herbario CICY, centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. (CICY) (2010), consultado el 21 de Mayo de 2013, http://www.cicy.mx/SITIOS/desde_herbario/index.php?option=com_content&view=article&id=127&Itemid=222,.
- Toledo V., La diversidad Biológica de México. Nuevos retos para la investigación en los noventas, Revista de cultura científica de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México, (1994) **3**: 44-57
- Turner Billie L., *Four new species of Ageratina (Asteraceae: Eupatorieae) from Oaxaca, Mexico*, Phytologia, (2010) **92**: 388-399.
- Villaseñor J. L., *Los Géneros de las Plantas Vasculares de la flora de México*, Boletín de la Sociedad Botánica de México (2004) **75**: 105-135.