



UNIVERSIDAD MICHOCANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA



AISLAMIENTO Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE TIMOLES FUNCIONALIZADOS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACOBIOLOGA

PRESENTA:

YESENIA ROMERO COLÍN

DIRECTORES DE TESIS:

D.Q. MARIO ARMANDO GÓMEZ HURTADO

M.C. HÉCTOR MANUEL ARREAGA GONZÁLEZ

MORELIA, MICHOCÁN

FEBRERO, 2016

DEDICATORIA

A mis padres **Jorge Romero** y **Verónica Colín**, por su apoyo incondicional, por darme el amor y las fuerzas necesarias para seguir adelante, por dejarme conocer y cumplir cada una de mis metas aunque eso implicara alejarme de ustedes, por cada palabra de aliento, los regaños, sonrisas, lágrimas, comprensión y porque gracias a ustedes he logrado todo lo que me he propuesto, palabras me hacen falta para expresar mi agradecimiento hacia ustedes, sin duda alguna mis triunfos siempre serán los suyos, de no ser por ustedes nada de esto sería posible y no habría llegado hasta aquí, los amo tanto papás y les estaré completamente agradecida toda la vida por el ejemplo que me han dado y cada enseñanza compartida para conmigo.

A mis hermanos **Tavo**, **Elizabeth** y **Wendy** por apoyarme, por estar siempre conmigo en las buenas, malas y tener ese don único de hacerme olvidar de la escuela con su forma tan característica que tiene cada uno, por ser cómplices en cada una de nuestras aventuras y enseñarme lo que es el significado de la palabra familia, los amo.

A mis sobrinos **Luis** y **Alyz** por estar siempre con una sonrisa y ganas de jugar cada que llegaba a casa y gracias a ello liberar mi estrés, por cada abrazo y beso tierno que me dieron mis niños los amo tanto y quisiera que nunca crecieran.

A mi compañero de vida **Elí Rivera** por ser testigo de cada momento de mi vida, darme tu amor y comprensión, por apoyarme con tu manera tan característica de decir las cosas, porque a pesar de la distancia siempre estuviste conmigo cuando lo necesite, gracias por cada instante mi oso te amo.

A **Diana Villalpando** una de mis personas favoritas en este mundo, mi hermana de vida y en múltiples ocasiones mi maestra, gracias por cada consejo que me diste, por escuchar horas y horas mis dramas, por tener esa cualidad tuya de sacar las mejores sonrisas incluso en la distancia, te quiero mucho y espero nuestra amistad sea eterna.

A **Paulina P.** por toda la paciencia que tuviste al ayudarme en el instituto, con mi compu y muchas cosas más, por aguantarme cuando enloquecía de estrés y por el apoyo brindado no sólo en este proyecto, mi hermana incondicional te quiero mucho.

AGRADECIMIENTOS

Principalmente agradezco a Dios por cada bendición otorgada y permitirme concluir una meta más en mi vida al lado de mi familia y seres queridos.

A mis asesores de tesis D.Q Mario Armando Gómez Hurtado y M.C. Héctor Manuel Arreaga González por el tiempo y apoyo brindados para conmigo y este proyecto, por compartir sus conocimientos, por cada enseñanza, además de su asesoría en mi estancia de verano y por todo el tiempo brindado hasta la culminación de este proyecto. Gracias.

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

A mis sinodales D.C. Rosa Elva del Río Torres, D.Q. Gabriela Rodríguez García, D.C. J. Betzabé González Campos, Q.F.B. Oscar Antonio Muños Lopes y Q.F.B. Carmen Adriana Tena Guido por el tiempo dedicado a la revisión de este documento, por cada observación que realizaron y que me ayudaron en la realización de este proyecto. Gracias.

Al Q.F.B. Oscar Antonio Muños Lopes porque además de ser mi sinodal y docente durante mi formación académica es un gran amigo que siempre está dispuesto a escuchar y compartir sus conocimientos, por todos los consejos, por cada momento compartido, las tardecitas del chal y comida “nutritiva”. Gracias Químico por cada momento que sin duda fue inolvidable.

A la Q.F.B Adriana Tena Guido por todo el apoyo brindado durante la realización de este proyecto, por su tan particular sentido del humor, por los abrazos llenos de tanto cariño y tener siempre una sonrisa en su rostro cada que la visitaba para darle lata, gracias por los consejos, usted y el Químico Oscar son unas personas que admiro y quiero mucho. Gracias.

Al M.C. Héctor M. Arreaga por el tiempo brindado, compartir sus conocimientos y principalmente por la paciencia sé que le era muy difícil explicarme con lo distraída que soy y por las canas verdes que seguro le salieron, gracias Maestro por permitir que fuera su primera alumna.

A la M.C. Karina Nava por todo el apoyo y por contestar mis múltiples preguntas a pesar de no ser de su área, por cambiar organización, dedicación y trabajo en el laboratorio por momentos de risa y pláticas divertidas, gracias Maestra por todos tus consejos sé que llegarás a ser grande, nunca te detengas.

A mis compañeros del instituto: Kary, Kareen, Jessie, Laura Itzel, Julio, Fer, Raquel, Ana Liz, Ana Laura, Sandra y todo el grupo de trabajo por hacer de mi estancia en el laboratorio un lugar agradable, gracias por compartir sus conocimientos y tiempo conmigo. Gracias.

A mi familia en general: tíos, primos, sobrinos por todo el apoyo incondicional, amor, comprensión, por estar presentes en cada paso que doy, agradezco cada momento que compartieron conmigo cada que tenía la oportunidad de verlos, gracias familia porque sin ustedes nada de esto sería posible.

Y como dejar de agradecer a un gran ser humano, un gran amigo con un corazón enorme José Antonio Ferreira espero la vida nos permita encontrarnos y verte convertido en un D.Q. sé que lo vas a lograr porque veo en ti un gran potencial y un gran amor por la química, las palabras me hacen falta para expresar mi agradecimiento hacia ti, muchisisimas gracias por todo lo que me ayudaste, por tu gran apoyo incondicional sobre todo con los puntos de fusión y por compartir tus conocimientos conmigo. Toñito más que compañero de trabajo eres una persona muy especial en mi vida al que quiero mucho. 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 del D.Q. Mario Armando Gómez Hurtado y el M.C. Héctor Manuel Arreaga González. Con el apoyo económico de CIC-UMSNH.

Parte de este trabajo se presentó en el 4° Verano Nicolaita de Investigación realizado del 22 de Junio al 14 de Agosto de 2015 organizado por la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo a través de la Coordinación de la Investigación Científica, la Academia Michoacana de Ciencia, A.C. y el Consejo Estatal de Ciencia, Tecnología e Innovación de Michoacán, en Morelia, Michoacán.

ÍNDICE

SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS.....	i
RESUMEN.....	iii
ABSTRACT.....	iv
1 INTRODUCCIÓN.....	1
2 ANTECEDENTES.....	3
2.1 LA FAMILIA ASTERACEAE.....	9
2.2 GÉNERO <i>AGERATINA</i>	12
2.3 <i>AGERATINA GLABRATA</i>	15
3 JUSTIFICACIÓN.....	19
4 HIPÓTESIS.....	20
5 OBJETIVOS.....	21
5.1 OBJETIVO GENERAL.....	21
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	21
6 METODOLOGÍA.....	22
7 DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	23
8 CONCLUSIONES.....	32
9 PARTE EXPERIMENTAL.....	33
9.1 GENERALIDADES.....	33
9.2 MATERIA VEGETAL.....	33
9.3 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS.....	33
9.4 ANÁLISIS QUÍMICO.....	34
9.5 ENSAYO DE CAPTURA DPPH.....	35
10 BIBLIOGRAFÍA.....	36

SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

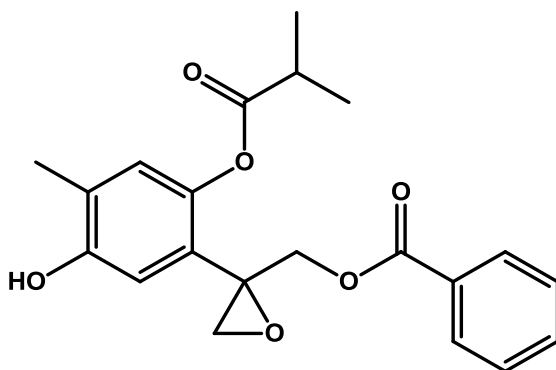
δ	Desplazamiento químico
$[\alpha]$	Rotación específica
$\lambda_{\text{máx}}$	Lambda máxima
μg	Microgramo
μL	Microlitro
AB	Sistema AB
a.C.	Antes de Cristo
ADN	Ácido Desoxiribonucleico
$^{\circ}\text{C}$	Grados Celsius
CE_{50}	Concentración efectiva
cm	Centímetros
d	Señal doble
dd	Señal doble de dobles
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
g	Gramos
Hz	Hertz
IR	Infrarrojo
J	Constante de acoplamiento
kg	Kilogramo
km	Kilómetro
MeOH	Metanol
mg	Miligramo
MHz	Megahertz
mL	Mililitro
m	Señal múltiple
min	Minutos
mm	Milímetros
mM	Milimolar

nm	Nanómetros
p.f.	Punto de fusión
ppm	Partes por millón
RMN de ^1H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
RMN de ^{13}C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono
s	Señal simple
sept	Señal séptuple
t	Señal triple
TMS	Tetrametilsilano
tt	Señal triple de triples
UV	Ultravioleta
ROS	Especies reactivas de oxígeno
NOS	Especies reactivas de nitrógeno

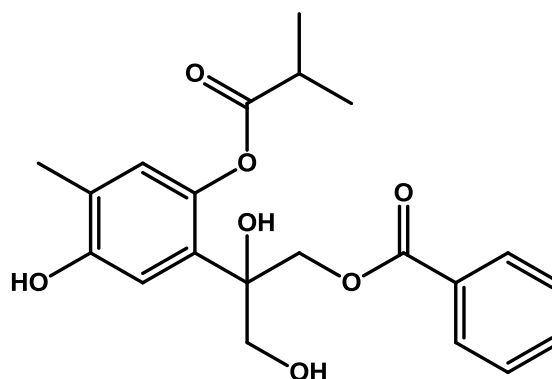
RESUMEN

Existen diversos compuestos que inactivan a las denominadas especies reactivas de oxígeno (ROS) y las especies reactivas de nitrógeno (NOS), estos compuestos son conocidos como antioxidantes los cuales pueden encontrarse de manera natural en una gran variedad de especies vegetales, entre ellas las especies de la familia Asteraceae. Dentro de esta familia, uno de los géneros más distribuido es *Ageratina*, en este género se encuentra *A. glabrata* de la cual se ha reportado el aislamiento de derivados de timol funcionalizados con un anillo de epóxido.

En el presente trabajo se aislaron por cromatografía en columna de fase directa dos derivados de timol funcionalizados de las partes aéreas de *Ageratina glabrata*, en base a sus datos de RMN, IR y UV, se determinaron sus estructuras como: isobutirato de 10-benzoiloxi-8,9-epoxi-6-hidroxitimilo (**19**) e isobutirato de 10-benzoiloxi-6,8,9-trihidroxitimilo (**22**), a los cuales se les realizó un ensayo de captura de radicales libres por el método DPPH, mostrando el compuesto **19** nula actividad antioxidante, mientras que el compuesto **22** mostró capacidad de neutralización de DPPH.



19



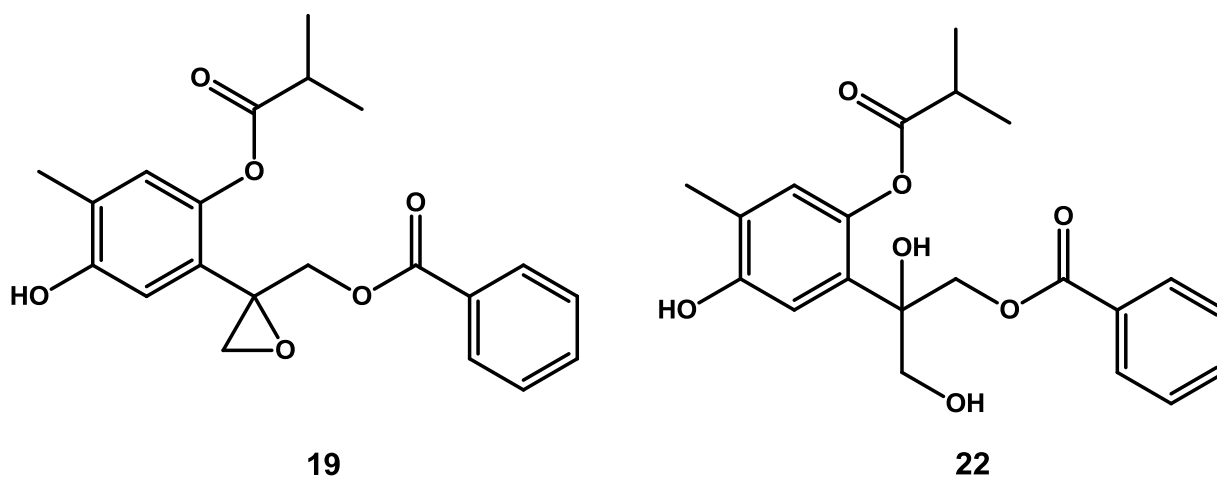
22

Palabras clave: *Ageratina glabrata*, derivados de timol, antioxidante.

ABSTRACT

Several compounds are capable to inactivate both the reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (NOs); and these chemical compounds are known as antioxidants of which can be found naturally in a wide variety of plants including those from the Asteraceae family. One extensively and distributed genus of this family is *Ageratina*, and in this genus is *A. glabrata*, from which the isolation of thymol derivatives functionalized with an epoxide ring have been reported.

In the present work, from the aerial parts of *Ageratina glabrata* two thymol derivatives were isolated by column chromatography. By its NMR, IR and UV, data their structures were determined as 10-benzoyloxy-8,9-epoxy-6-hydroxythymyl isobutyrate (**19**) and 10-benzoyloxy-6,8,9-trihydroxythymyl isobutyrate (**22**). Which underwent a capture assay of free radicals by DPPH method, showing that the compound **19** showed no antioxidant activity, whereas **22** showed an interesting capability in DPPH neutralization.



Keywords: *Ageratina glabrata*, thymol derivatives, antioxidant.

1 INTRODUCCIÓN

El timol (2-isopropil-5-metil fenol) es un compuesto de origen natural que se puede encontrar comúnmente en los géneros *Thymus* y *Origanum*, está constituido por un tolueno funcionalizado con un grupo isopropilo en posición 4 y un hidroxilo en posición 3, es usado en la industria cosmética, alimenticia y farmacéutica por sus diversas aplicaciones como antimicrobiano, analgésico y su capacidad de neutralización de radicales libres,¹ los cuales están estrechamente relacionados con los procesos de inflamación que se considera como una respuesta del sistema inmunológico frente al crecimiento y propagación de invasores extraños como virus y bacterias donde participan células especializadas que pueden eliminar a dichos agentes patógenos.²

Diversos estudios han demostrado que los procesos inflamatorios están estrechamente relacionados con las denominadas especies reactivas de oxígeno (ROS) y las especies reactivas de nitrógeno (NOS), las cuales causan peroxidación lipídica, uniones cruzadas de proteínas y oxidaciones de los enlaces peptídicos produciendo debilitamiento en las proteínas estructurales y/o rompimiento de la cadena simple de ADN.³

Existen diversos compuestos que inactivan a estas especies reactivas y son conocidas como antioxidantes las cuales pueden encontrarse de manera natural en una gran variedad de especies vegetales utilizadas por el hombre desde tiempos remotos y cuyo uso se ha transmitido a través de las generaciones;⁴ entre ellas, las especies de la familia Asteraceae,⁵ las cuales se pueden encontrar en casi todas las altitudes y regiones climáticas del mundo dada su alta capacidad de adaptación. En México se encuentran representadas casi todas estas regiones climáticas por lo cual la familia de las asteráceas está ampliamente distribuida principalmente en los Estados de Chiapas, Jalisco, Veracruz, Michoacán, Guerrero y Oaxaca, se estima que en México se pueden encontrar más de 22,411 especies de plantas vasculares que comprenden aproximadamente el 10% de la flora del mundo, lo que lo coloca en los primeros lugares dentro de la clasificación de la flora global, solo por debajo de Brasil con alrededor de 56,000 especies, Colombia con 50,000 y China con 27,000; dentro

de esta familia uno de los géneros más distribuido es *Ageratina*⁶ cuyas especies se caracterizan por ser arbustos de hasta dos metros de altura con tallos cilíndricos, leñosos, hojas opuestas, glabras y aserradas e inflorescencias en forma de corimbos que van de colores blanco a rosado.⁷

Desde el año 1969 se han reportado derivados de timol de especies del género *Ageratina* como: *A. espinosara*, *A. glechonophylla*, *A. ibanguensis*, *A. adenophora* y *A. cylindrica* funcionalizados con diferentes ésteres como benzoato, isobutirato, cinamato y angelato, por mencionar algunos. Los cuales han mostrado actividad como agentes antimicrobianos, antiinflamatorios, antibacterianos, antiprotozoarios, citotóxicos.¹ Dentro de este género encontramos a la especie *Ageratina glabrata*, la cual es conocida en la medicina tradicional mexicana como chamizo blanco, hierba de la mula, hilo y es empleada como analgésico para mitigar los síntomas de contusiones, entre los que se encuentra el dolor y la inflamación.⁷⁻⁹

En nuestro grupo de trabajo se ha demostrado el efecto analgésico del extracto total de hojas de *A. glabrata* el cual fue probado en animales de experimentación bajo los métodos de plato caliente y retirada de la cola,¹⁰ también se ha reportado el aislamiento de derivados de timol funcionalizados con diferentes ésteres y un anillo de epóxido, así como un derivado de cadena abierta y su respectivo derivado acetilado.^{11,12}

En el presente trabajo se describe el aislamiento, purificación y caracterización de los componentes mayoritarios de las hojas de *Ageratina glabrata* y su potencial de captura de radicales libres por el método DPPH.

2 ANTECEDENTES

El timol (Figura 1) al igual que su isómero posicional, carvacrol, funcionan como marcadores principales para definir la calidad de aceites esenciales de especies de orégano en el mundo.¹³

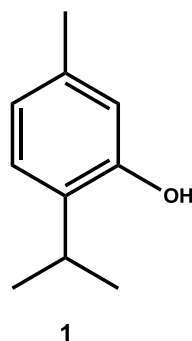


Figura 1. Estructura del timol.

Este monoterpreno se biosintetiza a través de la vía del difosfato de dimetilalilo y difosfato de isopentenilo. Biogenéticamente está relacionado con el *p*-cimeno y otros derivados con esqueleto de *p*-menteno, sugiriendo su formación a partir de enolizaciones y deshidrataciones (Figura 2).¹⁴

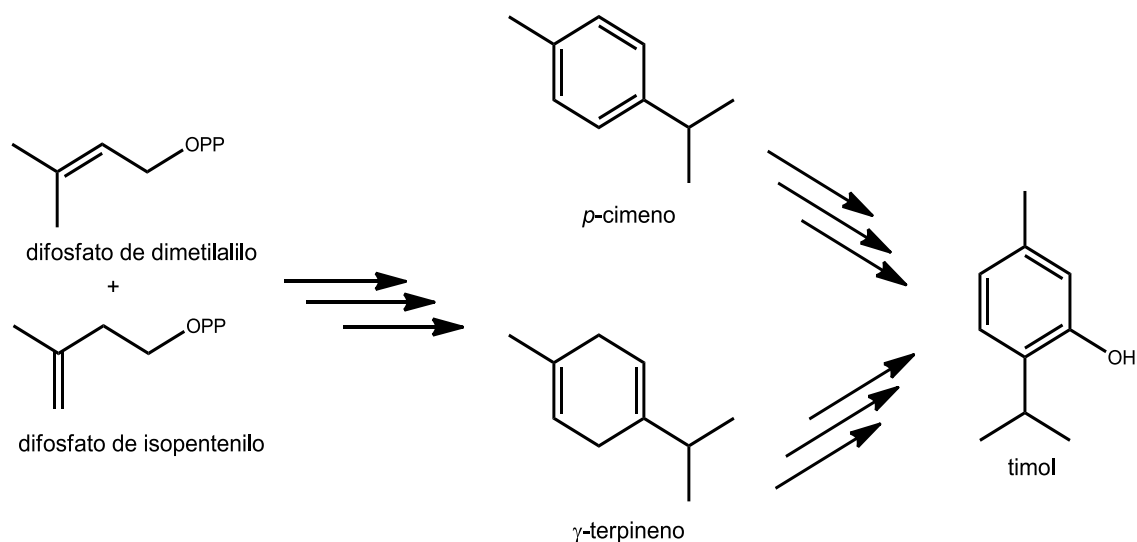


Figura 2. Biogénesis del timol.

En la industria, el timol se utiliza como un aditivo en diversos productos comerciales (Imagen 1), incluyendo productos alimenticios: utilizándose en la producción de bebidas refrescantes y en general como aditivo alimentario, cosméticos: utilizado en jabones, lociones para después del afeitado y artículos de tocador, productos farmacéuticos: en la formulación de enjuagues bucales, pastas de dientes, formando parte de linimentos antiinflamatorios, jarabes, entre otros.¹⁵



Imagen 1. Ejemplos de productos comerciales que contienen timol.

La actividad antioxidante del timol es una cualidad de interés en la farmacología ya que toda sustancia que retrasa o previene el deterioro, daño o destrucción provocados por una oxidación puede prevenir enfermedades degenerativas como el cáncer.

Además de buen antioxidante, los estudios biológicos han demostrado la relevancia de timol como agente antimicrobiano, antiinflamatorio, antibacteriano, antiprotozoario, citotóxico o agentes alelopáticos, siendo la última la actividad más ensayada.

Existen diversas formas para clasificar a los antioxidantes, desde una perspectiva de su origen y su presencia en el organismo, es posible distinguir entre aquellos antioxidantes que son normalmente biosintetizados por el organismo (endógenos) y aquellos que ingresan a éste a través de la dieta (exógenos).¹⁶ Ejemplos de estos se aprecian en la tabla 1.

Tabla 1. Clasificación de los antioxidantes.

Exógenos	Endógenos
Vitamina E	Glutación
Vitamina C	Ácido tiótico
Betacaroteno	Coenzima Q
Flavonoides	Superóxidodismutasa
Licopeno	Glutaciónperoxidasa

La actividad antioxidante de los fenoles depende de la aromaticidad, de los efectos de los sustituyentes en el anillo y la fuerza de interacciones de enlaces de hidrógeno entre el fenol y el disolvente. El mecanismo de reacción de los compuestos fenólicos generalmente se asocia a la labilidad del enlace oxígeno-hidrógeno del hidroxilo en el fenol; la ruptura de este enlace es homolítica, donde el radical hidrógeno es capaz de estabilizar al radical libre, mientras que el grupo fenóxido, por su estabilidad puede mantenerse hasta encontrar otra molécula análoga para reaccionar y neutralizarse por completo.¹⁷

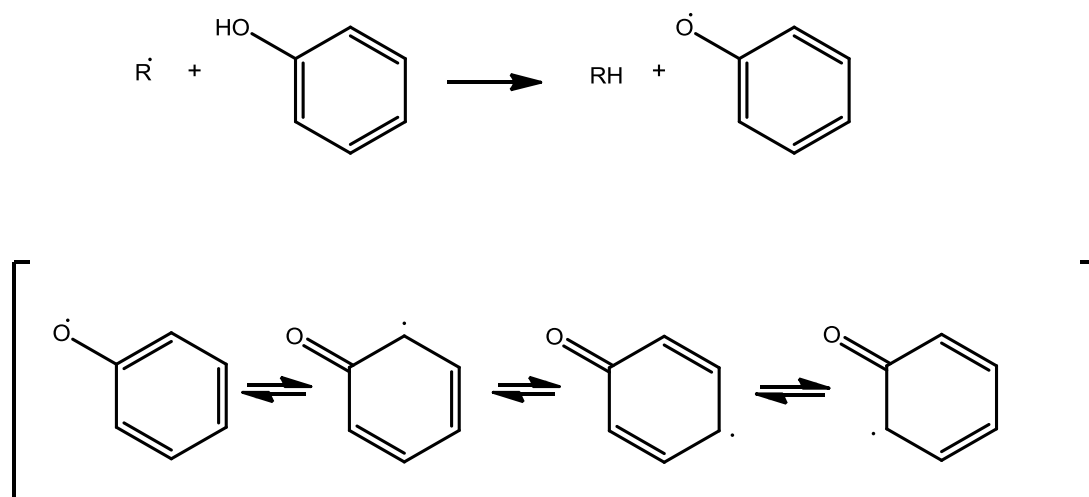


Figura 3. Esquema de reacción radicalaria de compuestos fenólicos antioxidantes.

Por otra parte, los radicales libres son moléculas o fragmentos moleculares que tienen un electrón no apareado en su órbita externa. Este es inestable y da lugar a la reactividad de radicales libres. Las especies reactivas de oxígeno incluyen grupos superóxido, hidroxilo, peroxilo. Mientras que los radicales libres de nitrógeno involucran grupos óxido nítrico y dióxido de nitrógeno. Los radicales libres de oxígeno y nitrógeno se pueden convertir fácilmente a otras especies reactivas no radicales que también son peligrosos para la salud como peróxido de hidrógeno, ozono, ácido hipocloroso, ácido nitroso, peroxinitrito, trióxido de dinitrógeno, lípido peróxido, que son radicales no libres y generalmente llamados oxidantes que pueden conducir fácilmente a reacciones de radicales libres en los organismos vivos. Por lo tanto, ROS y NOS pueden incluir especies radicales y no radicales.¹⁸ Estas especies se producen en animales y seres humanos bajo condiciones fisiológicas y patológicas. Los radicales libres pueden generarse como sustancias endógenas su producción en el cuerpo es continua y una parte normal de nuestra fisiología.¹⁶ El proceso biológico asociado con la generación de radicales libres involucra los siguientes aspectos (Imagen 2).¹⁸



Imagen 2. Factores que favorecen la producción de especies reactivas de Oxígeno y Nitrógeno. Tomado de *British medical bulletin* (1999).

Sistema inmune: las células del sistema inmunológico generan oxi-radicales y especies reactivas de oxígeno en respuesta a patógenos.

Proceso metabólico: los radicales libres se pueden generar durante el metabolismo de formación del ácido araquidónico, plaquetas, macrófagos y células musculares lisas. La peroxidación lipídica es una importante fuente de radicales libres y pueden formarse a partir de varias fuentes como la citocromo oxidasa mitocondrial, xantina oxidasa y mieloperoxidasa (neutrófilos). Las mitocondrias generan de forma continua y abundante oxi-radicales y especies reactivas de oxígeno como residuos tóxicos a través de una serie de procesos metabólicos.

La inflamación libera citoquinas, activa neutrófilos y macrófagos para producir radicales libres.

El estrés mental y del cuerpo pueden desencadenar la producción de radicales libres como un subproducto tóxico. Además, las hormonas que median la reacción de estrés en el cuerpo como cortisol y las catecolaminas pueden degenerarse a radicales libres destructivos.

Contaminación: contaminantes del aire (amianto, benceno, monóxido de carbono, cloro, formaldehído, ozono y tolueno). Disolventes químicos (productos de limpieza, disolventes de pegamento, pinturas, perfumes y pesticidas), y los contaminantes del agua (cloroformo y otros trihalometanos), son todos generadores potentes de radicales libres. La quema de materia orgánica durante la cocción, los incendios forestales, y las actividades volcánicas.

Radiación: las radiaciones UV, rayos X médicos dentales, rayos gamma, y radiación de microondas.

Factores dietéticos: aditivos alimenticios, el alcohol, los alimentos de origen animal, alimentos que han sido asados a la parrilla o cocidos a altas temperaturas, quemados o dorados, aceites vegetales hidrogenados, azúcar y procesados de alimentos que contienen altos niveles de peróxidos de lípidos.

Las toxinas y drogas: el tetracloruro de carbono, anilina, colorantes, tolueno y drogas como adriamicina, mitomicina C, nitrofurantoína, clorpromazina, entre otras.

Otros factores: humo producido por los automóviles, fumar productos de tabaco.¹⁸

Entre los métodos para determinar el potencial de las moléculas para la captación de radicales libres, se encuentran aquellos que emplean radicales libres estables como indicadores.¹⁹ El poder antioxidante depende del método elegido, la concentración y la naturaleza de las propiedades fisicoquímicas de los antioxidantes estudiados.¹⁷ El DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) es un radical libre que se reduce en presencia de antioxidantes manifestándose un cambio de color en la solución cuando se mezcla con una sustancia que puede donar uno o varios átomos de hidrógeno, la concentración del radical DPPH disminuye mientras que aparece la forma reducida DPPH-H provocando un cambio de coloración de morado a amarillo (Figura 4).²⁰ Este es un método colorimétrico conveniente cuando la capacidad de captación de radicales libres de los compuestos se investigan químicamente.

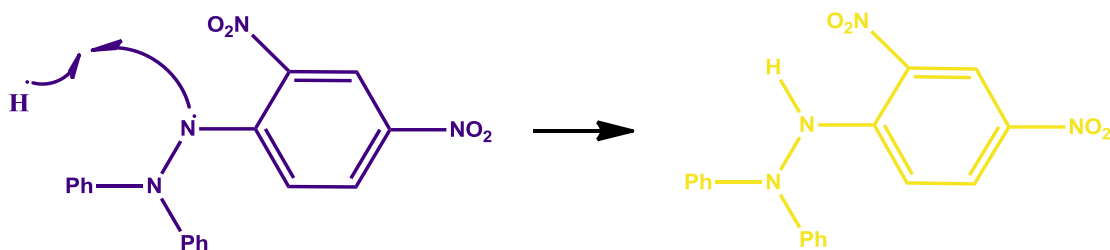


Figura 4. Mecanismo de reacción de DPPH.

Especies capaces de neutralizar radicales libres pueden encontrarse de forma abundante en la naturaleza, incluyendo especies del reino vegetal.

2.1 LA FAMILIA ASTERACEAE

Teofrasto, verdadero padre de la botánica, estableció la existencia de varios cientos de especies vegetales y de algunas familias cuyo sistema de clasificación se basaba en el modo de crecimiento, de hecho nosotros aun reconocemos algunos de los géneros que el introdujo como *Narcissus*, *Crocus* y *Cornus*, posteriormente Dioscórides se ocupó de agrupar las especies conocidas por sus propiedades medicinales.²¹



Imagen 3. Representación de Cátedra de botánica por Teofrasto

Otros intentos por introducir cierto orden en la clasificación de las especies vegetales sucedieron siglos después. En la edad moderna, el primero que trató de establecer una clasificación fue Joseph Pitton de Tournefort (1656-1708) mediante la

introducción de un sistema clasificatorio natural basado en la «realidad objetiva de las especies, los géneros y las clases». Casi simultáneamente, John Ray redactó su obra monumental, *Historia plantarum generalis* (1686-1704), en la que intentó distribuir de una manera racional las plantas y definir con precisión, básicamente, la noción de especie a través del establecimiento de sus relaciones con una comunidad de origen. En 1731, Carl von Linné desarrolló un sistema de nomenclatura binomial que se convertiría en clásico, basado en la utilización de un primer término, escrito en letras mayúsculas, indicativa del género y una segunda parte, correspondiente al nombre específico de la especie descrita, escrita en letra minúscula. Por otro lado, agrupó los géneros en familias, las familias en clases, las clases en tipos (fila) y los tipos en reinos.²²

A lo largo de la historia, para el establecimiento de la familia Asteraceae diversas adecuaciones han sido propuestas. Pese a las aportaciones de Teofrasto en el siglo cuarto a.C. sobre las asteráceas, las verdaderas contribuciones respecto al conocimiento y sistemática de la familia comenzaron con el francés Henri Cassini mediante numerosas publicaciones durante el periodo 1812-1831 las cuales incluían descripciones muy detalladas de la morfología de las asteráceas y en 1816 estableció 19 tribus en la familia. En 1822 el Código internacional de nomenclatura botánica permitió también el uso del nombre Asteraceae Dumortier nombre asignado a la familia.²³ Lessing en 1832 redujo a ocho el número de tribus y de Candolle en 1838 a tres. Otro contribuyente al conocimiento de ésta familia fue George Bentham quien en 1873 trató a las asteráceas en su obra *Genera Plantarum* (1862-1883) junto con Joseph Dalton Hooker. Fue Bentham quien estableció 13 tribus, que son las que tradicionalmente se usan hoy, como se observa en la tabla 2.^{23,24} Para 1972 se estableció el nombre de Compositae por Giseke.

La familia Asteraceae forma parte del grupo vegetal más diverso de las plantas vasculares, su distribución es prácticamente cosmopolita, es una de las familias más comunes, ya que se encuentran en la mayor parte de los hábitats y presentan una amplia variedad en cuanto a formas de vida, estructura floral, mecanismos de polinización y dispersión de semillas. La riqueza a nivel mundial de esta familia se

estima entre 1,500 y 1,700 géneros y entre 24,000 y 30,000 especies, con centros de diversificación en el Mediterráneo en el viejo mundo, la región del Cabo en África, Australia, México y la Cordillera de los Andes en Sudamérica.⁶ En el caso particular de México se señala la existencia de 361 géneros y 3,012 especies, siendo una de las familias más abundantes debido a la situación geográfica, clima, orografía, geología y suelos que generan una importante riqueza florística y de comunidades vegetales donde prácticamente existen todos los climas descritos a nivel mundial. Esto ha influido en que sean de gran importancia botánica, química y farmacológica, ya que se han empleado miembros de ésta familia para el tratamiento de diversos malestares y padecimientos que afectan a los seres humanos.^{24,25}

Tabla 2. Variedad de Tribus y subespecies de la familia Asteraceae.

Tribu	Género	Especie	Subespecie	Total
Arthemideae	13	26	1	27
Asterae	38	338	42	380
Calenduleae	1	1	0	1
Cardueae	4	47	2	49
Eupatorieae	61	589	51	640
Heliantheae	171	1175	180	1355
Inuleae	15	70	3	73
Lactuceae	25	75	6	81
Liabeae	3	23	0	23
Mutisieae	8	90	11	101
Seneciioneae	19	228	15	243
Tageteae	19	128	20	148
Vernonieae	10	71	11	82

2.2 GÉNERO *AGERATINA*

El género *Ageratina* se distribuye en todos los continentes, excepto en la Antártida; en el continente Americano pueden encontrarse desde el norte a sur, incluyendo el Caribe; es posiblemente el más distribuido de la familia Asteraceae en México, el cual posee 149 especies (Imagen 4).²³ Los miembros de este género son especies vegetales que van desde hierbas hasta árboles con hojas simples, regularmente opuestas, los márgenes enteros o dentados y superficies con o sin pelos, las inflorescencias son terminales y generalmente tienen flores que van de blanco a lila.²⁴



Imagen 4. Mapa de distribución global del género *Ageratina*.

Las plantas de éste género se caracterizan por poseer gran variedad de metabolitos secundarios como compuestos fenólicos y terpenos derivados de timol. Este último se ha encontrado como esqueleto base funcionalizado con diferentes ésteres para dar lugar a una interesante variedad de derivados de mayor complejidad, incluso algunos de ellos con centros estereogénicos. Derivados de timol funcionalizados se han encontrado en 88 especies vegetales distribuidas en 38 géneros de la familia Asteraceae incluyendo *Ageratina*.¹

En 1977, Bohlmann *et al*, reportaron tres derivados de timol (**2-4**) de la raíz de *Ageratina espinosara*,²⁶ de los cuales **2** y **3** se encuentran funcionalizados con un grupo hidroxilo en las posiciones 2 y 7 respectivamente, **4** presenta un grupo acetato

en la posición 7, además estos derivados se encuentran funcionalizados con grupos metoxilo en las posiciones 6 y 3 (Figura 5).

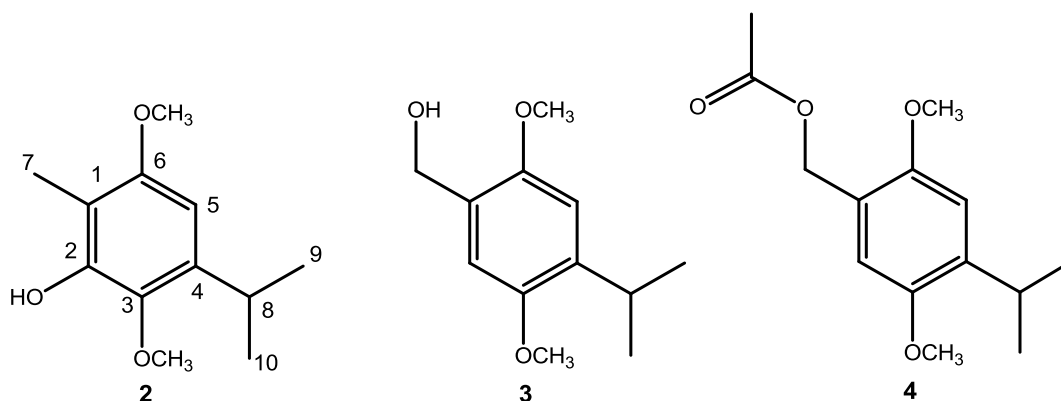


Figura 5. Derivados de timol aislados de *A. espinosara*.

Del extracto etanólico de tallos de *Ageratina glechonophylla* aislaron los derivados de timol **5-7**,²⁷ **5** se encuentra funcionalizado con un grupo isobutirato en la posición 3 y acetilado en la posición 10, los autores sugirieron que el derivado **6** podría ser un artefacto de **5**, producto de la apertura del epóxido presente en su estructura; por su parte, **7** se encuentra funcionalizado en las posiciones 3,9 y 10 con grupos hidroxilo (Figura 6).

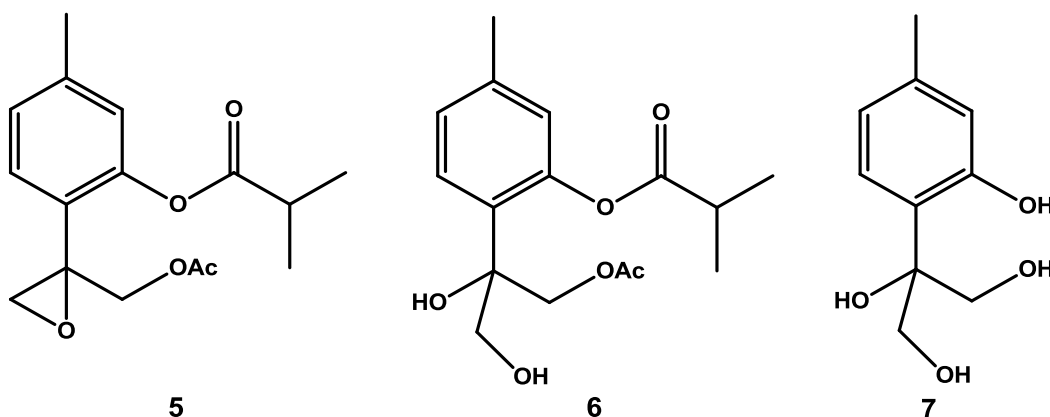


Figura 6. Derivados de timol de *A. glechonophylla*.

Del extracto etanólico de *Ageratina ibanguensis* aislaron timol (**1**) y carvacrol (**8**) (Figura 7); los cuales fueron probados contra bacterias *Gram* positivas, *Gram*

negativas, hongos filamentosos y levaduras, demostrando que los compuestos son responsables de la actividad antimicrobiana en los extractos de hojas y flor.²⁸

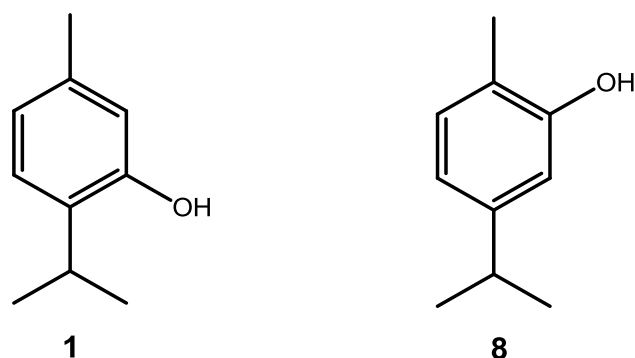


Figura 7. Timol y carvacrol.

De *Ageratina adenophora* aislaron tres derivados de timol **9-11** los cuales presentaron actividad biológica, afectando la germinación y el crecimiento de *Arabidopsis thaliana* (Figura 8).²⁹

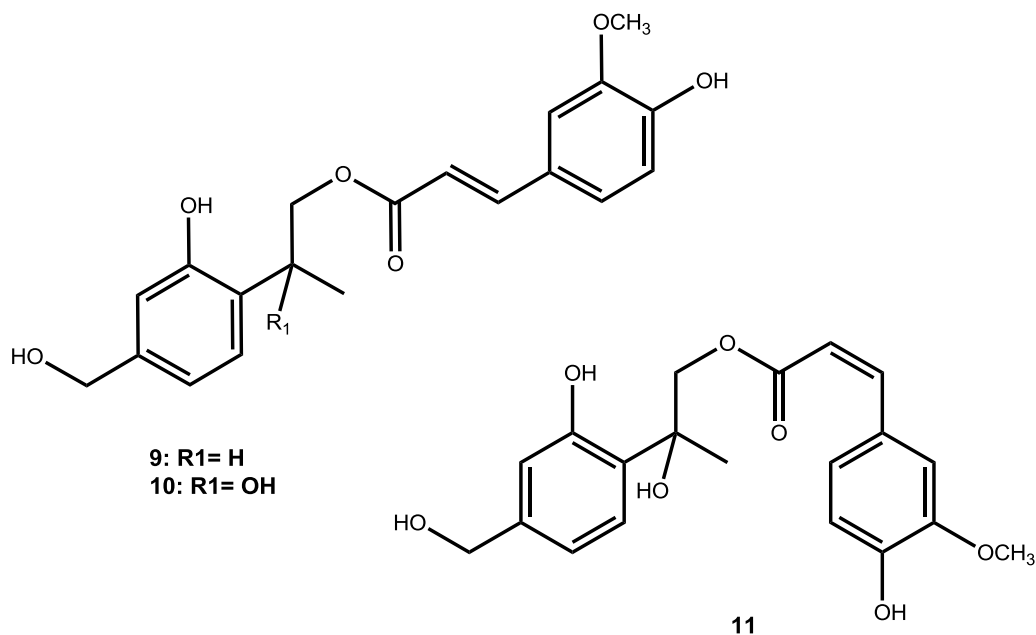


Figura 8. Derivados de timol aislados de *Ageratina adenophora*.

De las hojas de *Ageratina cylindrica* aislaron al derivado de timol **12** (Figura 9) funcionalizado con un grupo isobutirato en la posición 3, un grupo aldehído en 7 y un grupo benzoato en la posición 10, que mostró ligera actividad antiprotozoaria contra

Entamoeba histolytica y trofozoitos de *Giardia lamblia* y un alto efecto inhibitor sobre el movimiento hiperpropulsivo del intestino delgado en ratas. Este es el primer reporte de la configuración absoluta del único centro estereogénico de un derivado de timol.⁵

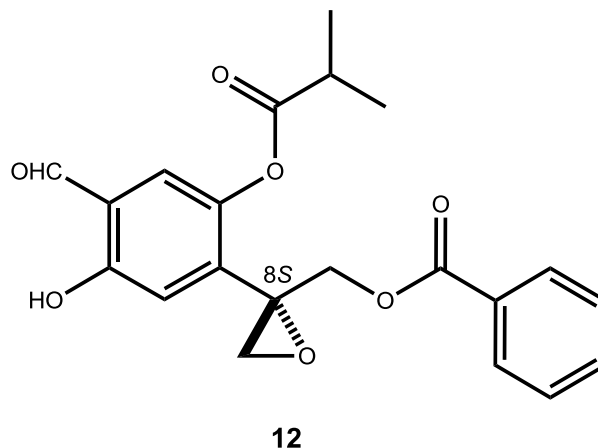


Figura 9. Derivado de timol aislado de *Ageratina cylindrica*.

2.3 AGERATINA GLABRATA

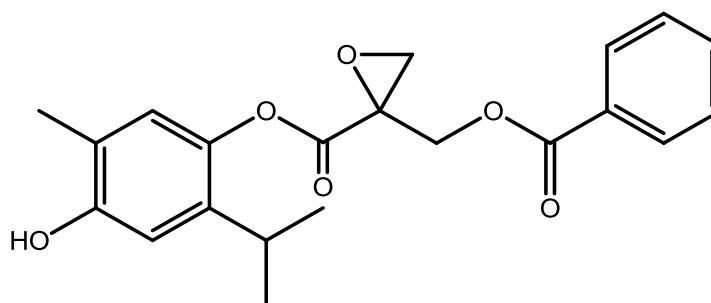
Ageratina glabrata es un arbusto de hasta de 2.5 m de altura; tallos leñosos, cilíndricos, de 2 a 3 mm de diámetro hacia la parte superior, estriados, amarillentos, glabros, a veces algo resinoso-lustrosos; hojas opuestas, peciolo de 0.5 a 2 cm de largo, glabro, lámina oblonga, de 1.5 a 8 cm de largo por 0.5 a 4 cm de ancho, ápice agudo u obtuso, borde aserrado o subentero, base cuneada, haz glabro, envés glabro y glanduloso-punteado, frecuentemente resinoso-lustroso, a veces algo blanquecino, uninerve desde la base, membranácea o algo subcoriácea; numerosos capítulos de 7 a 15 mm de largo dispuestos en corimbos compuestos terminales, pedicelos glabros, resinoso-lustrosos; involucre campanulado, de 5 mm de largo por 4 mm de ancho, cubriendo menos de la mitad del largo de las corolas, sus brácteas dispuestas en 3 series algo desiguales, oblongas u ovado-lanceoladas, agudas u obtusas, verdes, a veces algo oscuras o con tinte rojizo en el ápice, glabras, estriadas y algo resinoso-lustrosas; flores 15 a 18; corola de 7 mm de largo, blanca, a veces con tinte rosado en los lóbulos, glabra; aquenio de 3 mm de largo, algo piloso especialmente hacia el ápice, vilano casi del largo de la corola, cerdas blancas.³⁰

En la medicina tradicional *Ageratina glabrata* (Imagen 5) es conocida como “chamizo blanco”, “hierba del golpe” y/o “hierba de la mula”.⁸ Se emplea como analgésico para el tratamiento de golpes y fracturas.³¹



Imagen 5. *Ageratina glabrata*.

En 1971, en un estudio químico de *Ageratina glabrata* realizado por Romo de Vivar *et al*, reportaron del extracto etanólico de la planta completa un derivado de timol al que denominaron eupablabrina (**13**),³² cuya estructura fue establecida solamente con base en los desplazamientos de RMN de ¹H (Figura10).



13

Figura 10. Derivados de timol reportados de *A. glabrata*.

En 1977, Bohlmann *et al*, aislaron de los extractos de éter de petróleo de las partes aéreas y raíces de *A. glabrata* ocho derivados de timol con un grupo epóxido en el C-8 (Figura 11). Seis de estos derivados correspondieron a estructuras nuevas,

mientras que el compuesto **15** lo reportaron por primera vez de *Wedelia forsteriana*³³ y el derivado **16** se encontró en las raíces de *Helenium mexicanum*.³⁴

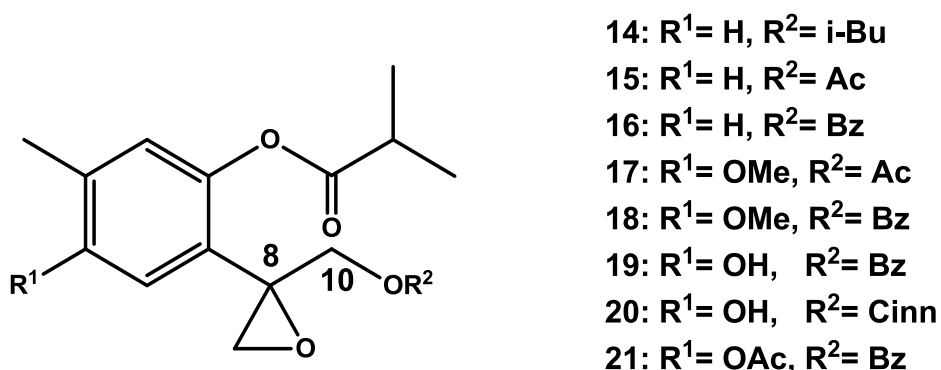


Figura 11. Derivados de timol aislados de *A. glabrata*.

En nuestro grupo de trabajo se han llevado estudios farmacológicos preliminares en *A. glabrata*, encontrando capacidad analgésica de los extractos de cloruro de metileno³⁵ y microbicida del extracto metanólico de las hojas³⁶ comprobando dichos efectos según su aplicación etnofarmacológica. De los estudios químicos de *A. glabrata* se aisló del extracto de cloruro de metileno de las hojas el derivado del timol **16** funcionalizado en la posición 3 con un grupo isobutirato y en la posición 10 con un grupo benzoato (Figura 12).³⁷

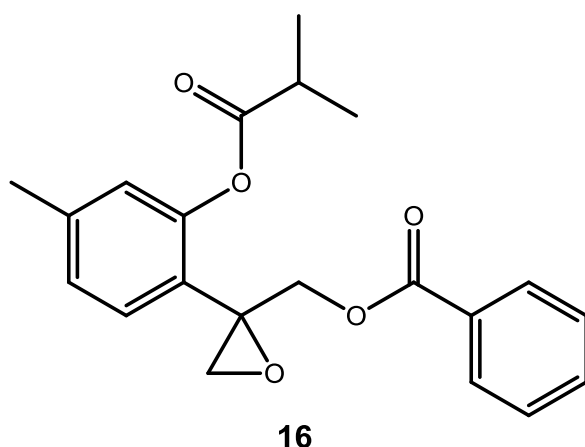


Figura 12. Epoxitimidol aislado de hojas de *A. glabrata*.

Del extracto de cloruro de metileno de hoja de *A. glabrata* se aisló un derivado de timol **19**, con las mismas funciones que el derivado **16**, adicionalmente un grupo

hidroxilo en la posición 6. Por otra parte del extracto metanólico de hojas de se obtuvo un derivado de timol de cadena abierta **22** que al ser tratado con anhídrido acético y piridina dio como resultado un derivado peracetilado **23** Figura 13.^{11, 12}

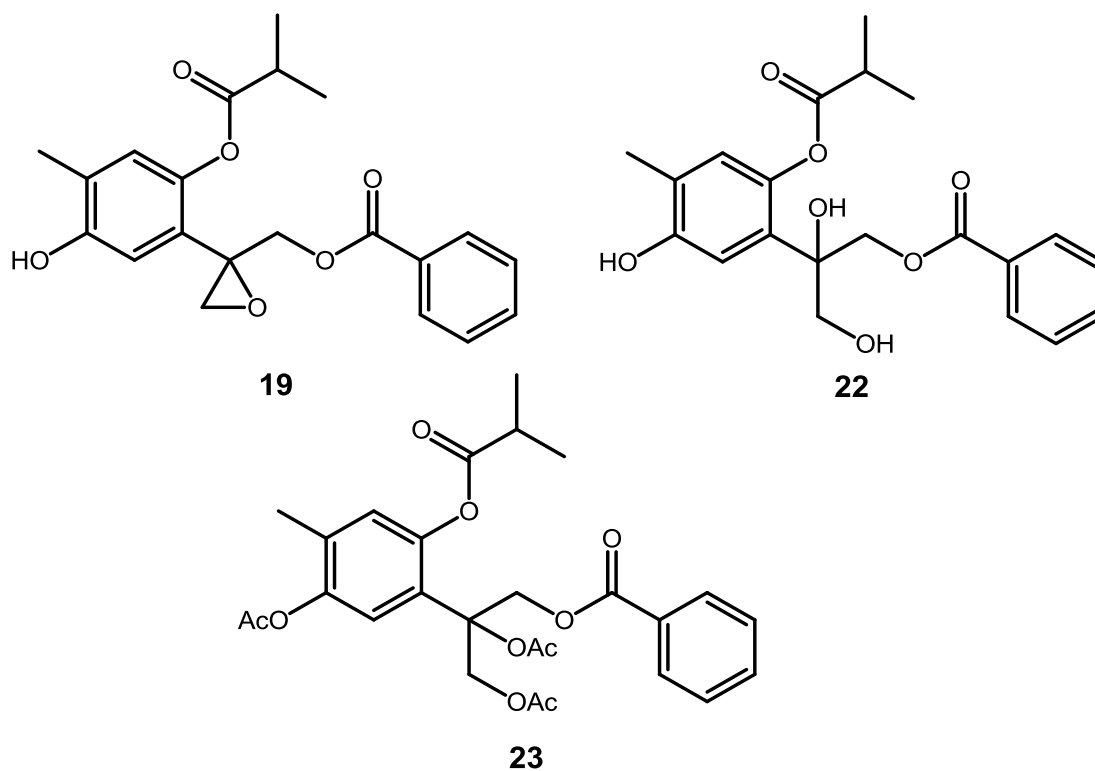


Figura 13. Derivados de timol aislados de hojas de *A. glabrata*.

3 JUSTIFICACIÓN

La inflamación y el cáncer están estrechamente relacionados con los radicales libres, los cuales, por su reactividad modifican químicamente las proteínas, lípidos, hidratos de carbono y ácidos nucleicos de las células promoviendo un funcionamiento inadecuado. Se sabe que el timol es un antioxidante de origen vegetal que se encuentra de forma natural en muchas especies vegetales. En *Ageratina glabrata* se han reportado derivados de timol como componentes mayoritarios, por lo que es necesario aislar derivados de timol y realizar un ensayo de captura de radicales libres mediante el método DPPH para determinar la posible actividad antioxidante de los mismos.

4 HIPÓTESIS

Los componentes mayoritarios **19** y **22** presentes en *Ageratina glabrata* pueden presentar actividad antioxidante, ya que existen reportes de que los compuestos fenólicos tienen la capacidad de capturar radicales libres.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

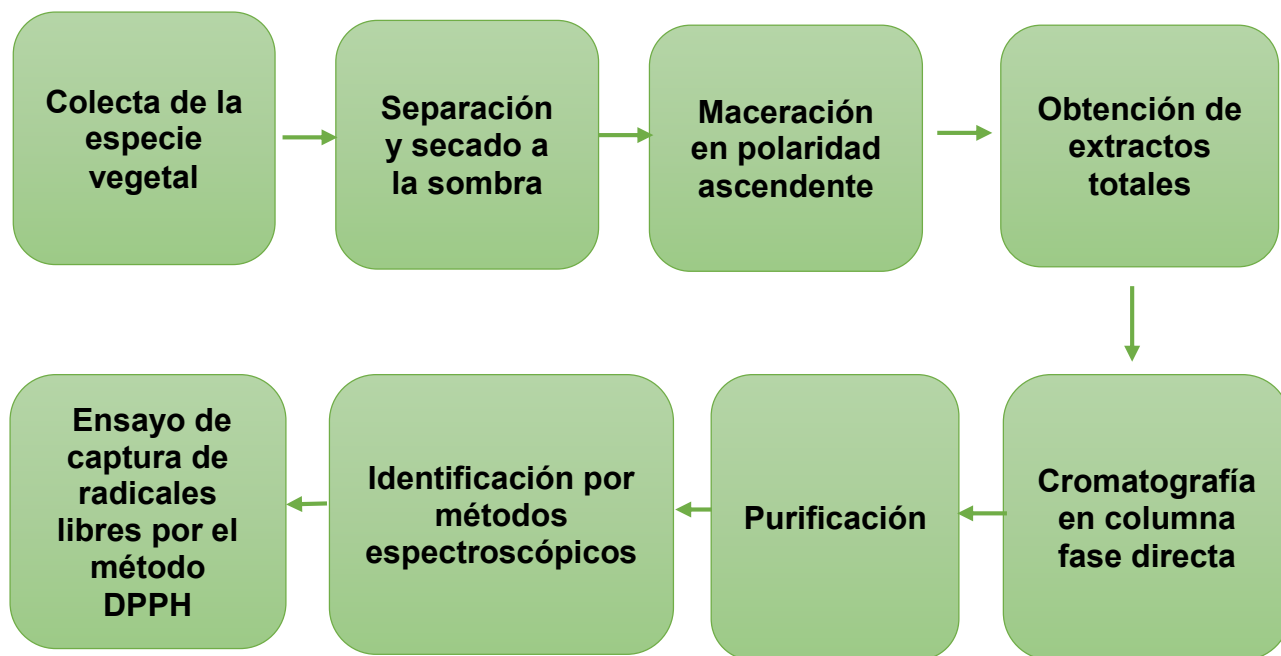
Evaluar la capacidad antioxidante de los derivados de timoles mayoritarios aislados de *Ageratina glabrata*.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Aislar mediante técnicas cromatográficas derivados de timol mayoritarios de *Ageratina glabrata*.
- Caracterizar las estructuras mediante métodos físicos y espectroscópicos.
- Realizar un ensayo de captura de radicales libres por el método de DPPH.

6 METODOLOGÍA

La metodología a seguir para el desarrollo de este proyecto se resume en el esquema 1.



Esquema 1. Diagrama de la metodología empleada.

7 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se realizó la colecta de *Ageratina glabrata* en la desviación a Cuanajo a 1 Km de la carretera Pátzcuaro-Santa Clara del Cobre el 2 de Marzo del 2015. La especie vegetal se separó en sus diferentes partes: raíz, hoja, tallo, flor, se secaron a la sombra durante dos semanas a temperatura ambiente, transcurrido ese tiempo, cada una de las distintas partes se maceraron a temperatura ambiente de manera secuencial con hexanos, cloruro de metileno, acetato de etilo y metanol.

Un lote de 1,464 g de hoja se maceró a temperatura ambiente en orden de polaridad ascendente con hexanos, cloruro de metileno, acetato de etilo y metanol. Del macerado de cloruro de metileno se obtuvieron 25 g de extracto total los cuales se sometieron a cromatografía en columna empleando gel sílice como fase estacionaria, hexanos y mezcla de hexanos-acetona como fase móvil. En la polaridad hexanos-acetona (17:3) se obtuvieron 0.90 g de cristales incoloros en forma de aguja con punto de fusión de 112-114 °C. En el espectro de RMN de ^1H (Figura 14) se observó en 7.97 ppm una señal doble de dobles con $J = 7.8$ y 1.4 Hz que integró para dos protones, correspondientes a los protones aromáticos H-3" y H-7", en 7.55 ppm se apreció una señal triple de triples con $J = 7.8$ y 1.4 Hz para el protón aromático H-5", en 7.42 ppm apareció una señal triple con $J = 7.8$ Hz correspondiente a los protones aromáticos H-4" y H-6", este grupo de señales característico de un grupo benzoato; en 6.93 y 6.81 ppm se observaron dos señales simples para los protones H-5 y H-2 de las posiciones *para* del anillo de timol. En 4.77 y 4.47 ppm se mostraron dos señales dobles con $J = 12.2$ Hz asignados a los protones H-10a y H-10b, mientras que en 3.11 y 2.85 ppm se encontraron dos señales dobles con $J = 5.2$ Hz para los protones base de epóxido H-9a y H-9b, en 2.83 ppm se observó una señal séptuple con $J = 7.2$ Hz para el protón metínico H-2' de isopropilo, en 2.21 ppm se apreció la señal simple de los protones del metilo de la posición H-7, en 1.31 y 1.30 ppm se observaron dos señales dobles con $J = 7.2$ Hz correspondientes a los metilos de isopropilo de las posiciones H-3' y H-4'. En el espectro de RMN de ^{13}C (Figura 15) se observaron en 175.8 y 166.0 ppm las señales de carbonilo de ésteres C-1' y C-1", respectivamente; en 151.6 y 141.6 ppm se mostraron dos señales para los carbonos cuaternarios base de oxígeno de las

posiciones C-6 y C-3, respectivamente; en 133.1 ppm se mostró la señal del carbono C-5", en 129.6 ppm se encontraron los carbonos aromáticos C-3" y C-7", en 129.5 ppm se observó la señal para el carbono cuaternario C-4, en 128.3 ppm aparecieron las señales para los carbonos *meta* al carbonilo de benzoato C-4" y C-6", respectivamente; en 127.2, 125.7, 124.6 y 114.6 ppm se observaron el resto de las señales pertenecientes a carbonos aromáticos asignados a C-2", C-1, C-2 y C-5, respectivamente; en 65.4 ppm apareció la señal correspondiente al carbono C-10 base de benzoato, mientras que en 56.9 ppm y 51.1 ppm se observaron las señales para los carbonos de oxirano C-8 y C-9, en 34.1 ppm se mostró la señal para el carbono metínico C-2', en 19.0 y 18.9 ppm se encontraron las señales para los carbonos pertenecientes a los metilos de isopropilo C-3' y C-4', respectivamente; en 15.7 ppm se observó la señal correspondiente al carbono de metilo de la posición C-7.

Este análisis espectroscópico reveló la presencia del derivado de timol denominado isobutirato de 10-benzoiloxi-8,9-epoxi-6-hidroxitimilo (**19**), cuyos datos fueron iguales a los descritos por nuestro grupo de trabajo.¹²

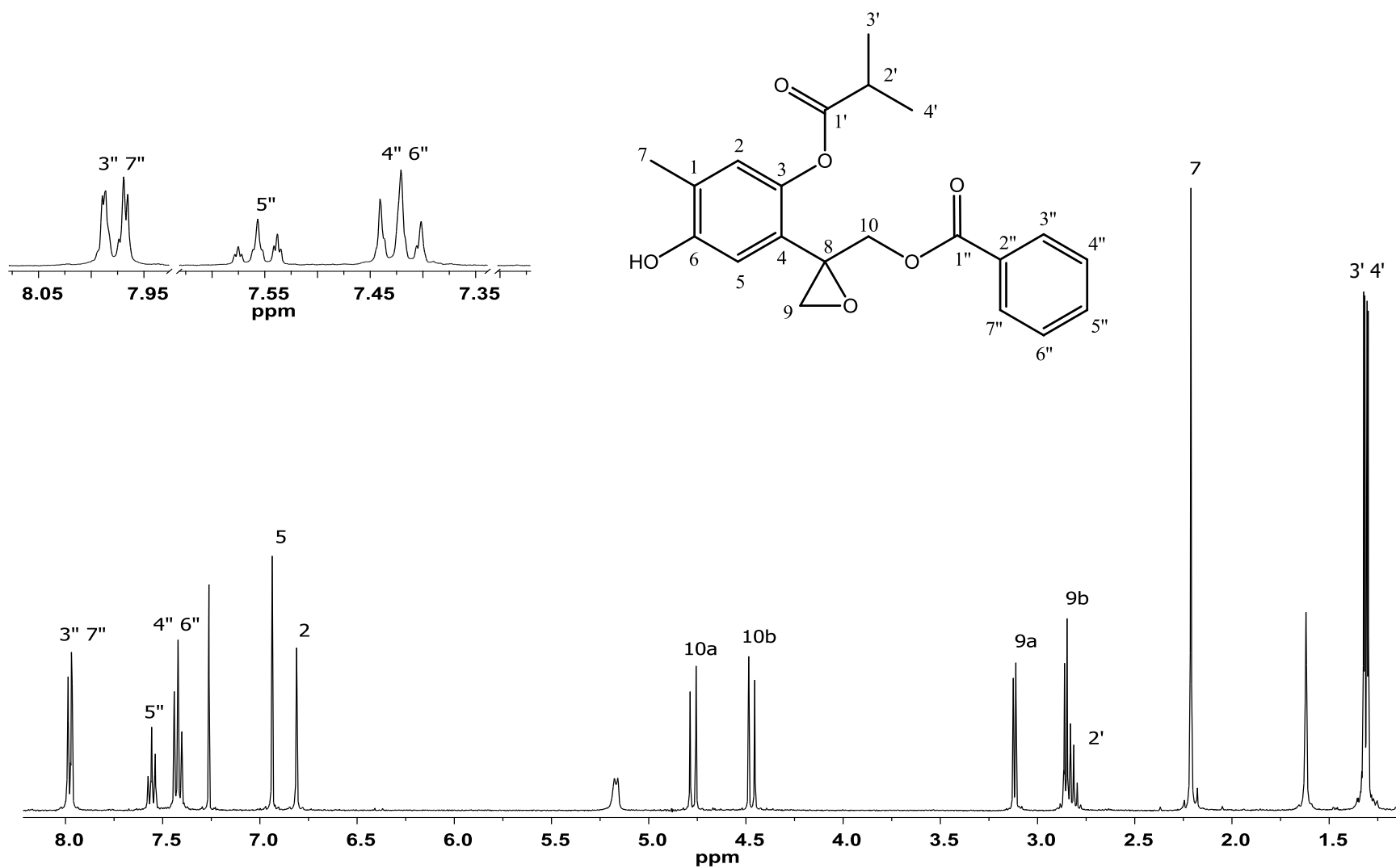


Figura 14. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 del isobutirato de 10-benzoiloxy-8,9-epoxi-6-hidroxitimilo (**19**).

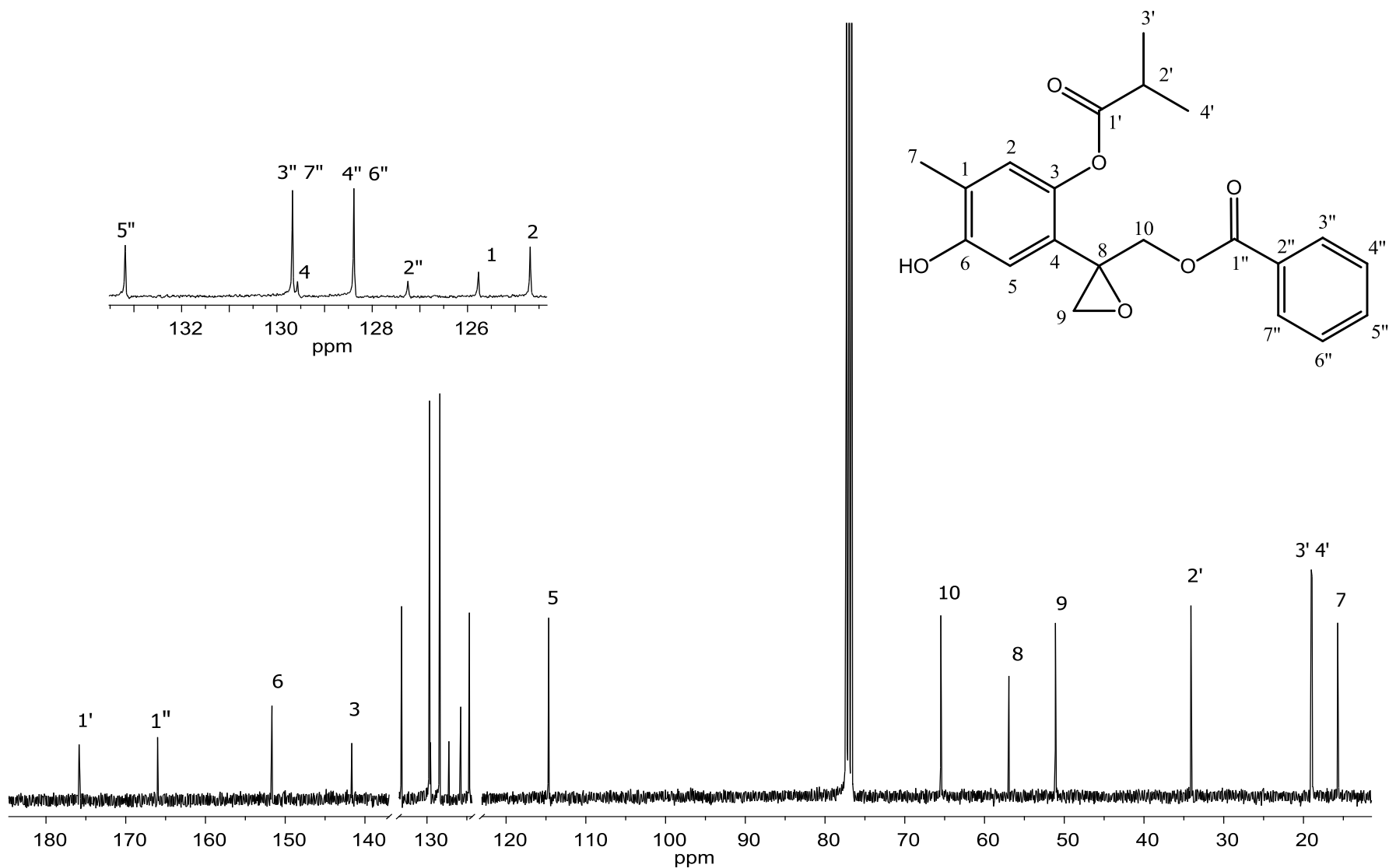


Figura 15. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz en CDCl_3 del isobutirato de 10-benzoiloxi-8,9-epoxi-6-hidroxitimilo (**19**).

Por otra parte, un lote de 26 g de extracto metanólico de hojas se sometió a cromatografía en columna fase directa, en la polaridad hexanos-acetona (7:3) se obtuvieron 0.89 g de una miel marrón, los cuales se analizaron por RMN de ^1H . En el espectro de RMN de ^1H (Figura 16) se observó en 7.98 ppm una señal doble de dobles con $J = 8.2$ y 1.2 Hz, correspondiente a los protones aromáticos de la posición H-3'' y H-7'', en 7.56 ppm se apreció una señal triple de triples con $J = 7.4$ y 1.2 Hz para el protón aromático H-5'', en 7.41 ppm se encontró una señal triple con $J = 7.6$ Hz para los protones aromáticos H-4'' y H-6'', en 6.66 ppm se observó una señal simple para el protón aromático de la posición H-2, en 6.59 ppm se mostró una señal simple correspondiente al protón aromático de la posición H-5, en 4.65 ppm se observó un sistema AB con $J = 12.2$ Hz correspondiente a los protones H-9a y H-9b, en 4.58 y 4.51 ppm se apreciaron dos señales dobles con $J = 12.0$ Hz para los protones H-10a y H-10b base de benzoato, en 2.53 ppm se encontró la señal séptuple con $J = 7.0$ Hz para el protón metínico de la posición H-2' en 2.17 ppm se mostró la señal simple para el metilo H-7, en 1.09 ppm se observó una señal doble con $J = 7$ Hz de los metilos de isopropilo H-3' y H-4'. En el espectro de RMN de ^{13}C (Figura 17) se encontraron entre 177.7 y 166.8 ppm las señales de carbonilo de los ésteres C-1' y C-1'' respectivamente, en 149.6 y 146.9 ppm se observaron dos señales para los carbonos cuaternarios base de oxígeno de las posiciones C-6 y C-3 respectivamente, en 133.5 ppm se apreció la señal del carbono C-5'', entre 129.7 y 112.8 ppm se localizaron las señales de los carbonos aromáticos de la molécula, en 78.1 ppm se observó la señal para el carbono cuaternario base de alcohol C-8, en 67.9 ppm se encontró la señal del carbono base de oxígeno en C-9, en 67.3 ppm se mostró la señal del carbono base de éster C-10, en 33.9 ppm se encontró la señal del carbono terciario base de isopropilo de la posición C-2', en 18.7 ppm se observaron las señales traslapadas para los carbonos de metilo de las posiciones C-3' y C-4'; finalmente, en 15.5 ppm se localizó la señal correspondiente al carbono de metilo de la posición C-7. El análisis espectroscópico reveló la presencia del derivado de timol denominado isobutirato de 10-benzoiloxi-6,8,9-trihidroxitimilo (**22**), cuyos datos fueron iguales a los descritos por nuestro grupo de trabajo.¹²

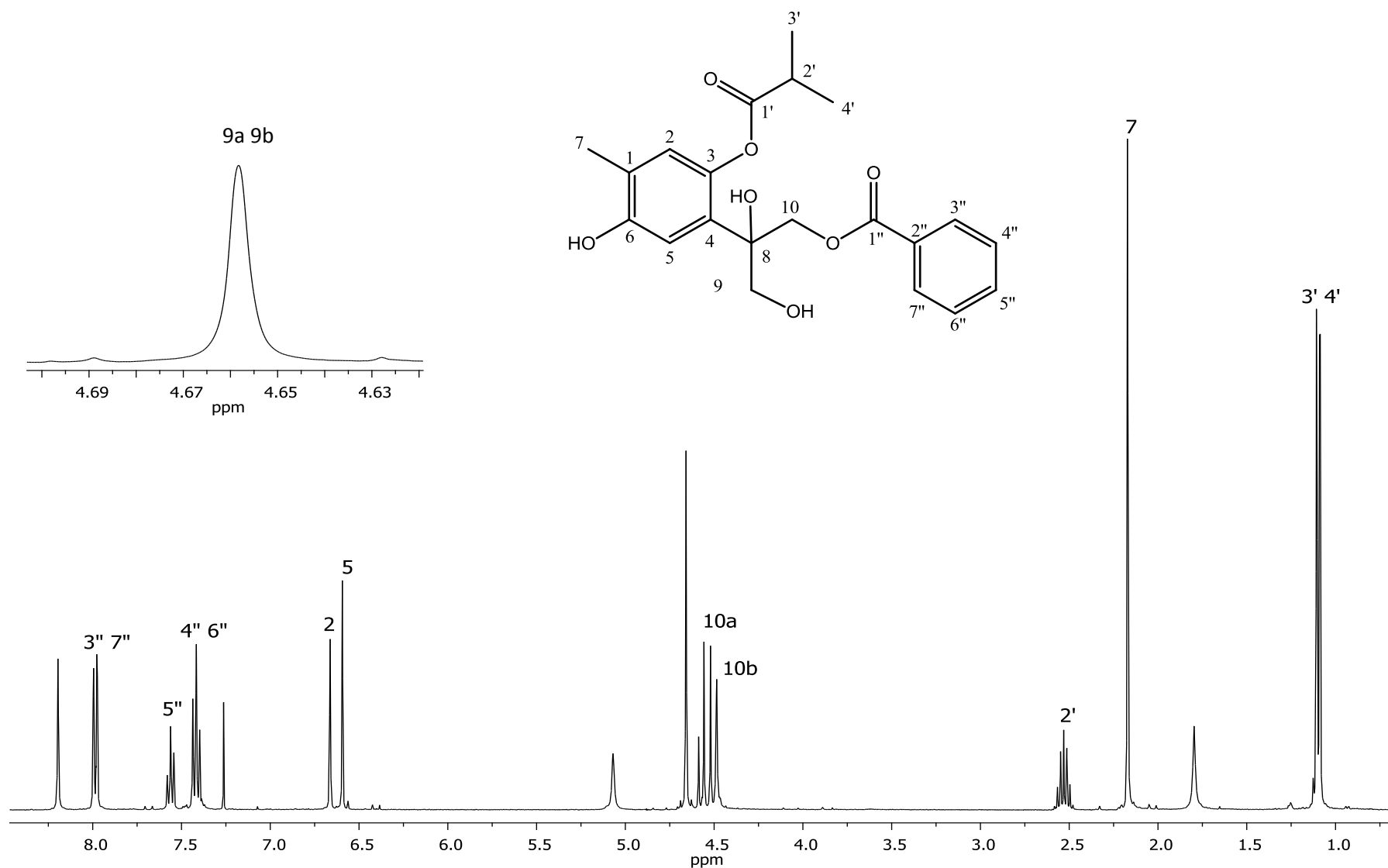


Figura 16. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 del isobutirato de 10-benzoiloxy-6,8,9-trihidroxitimilo (**22**).

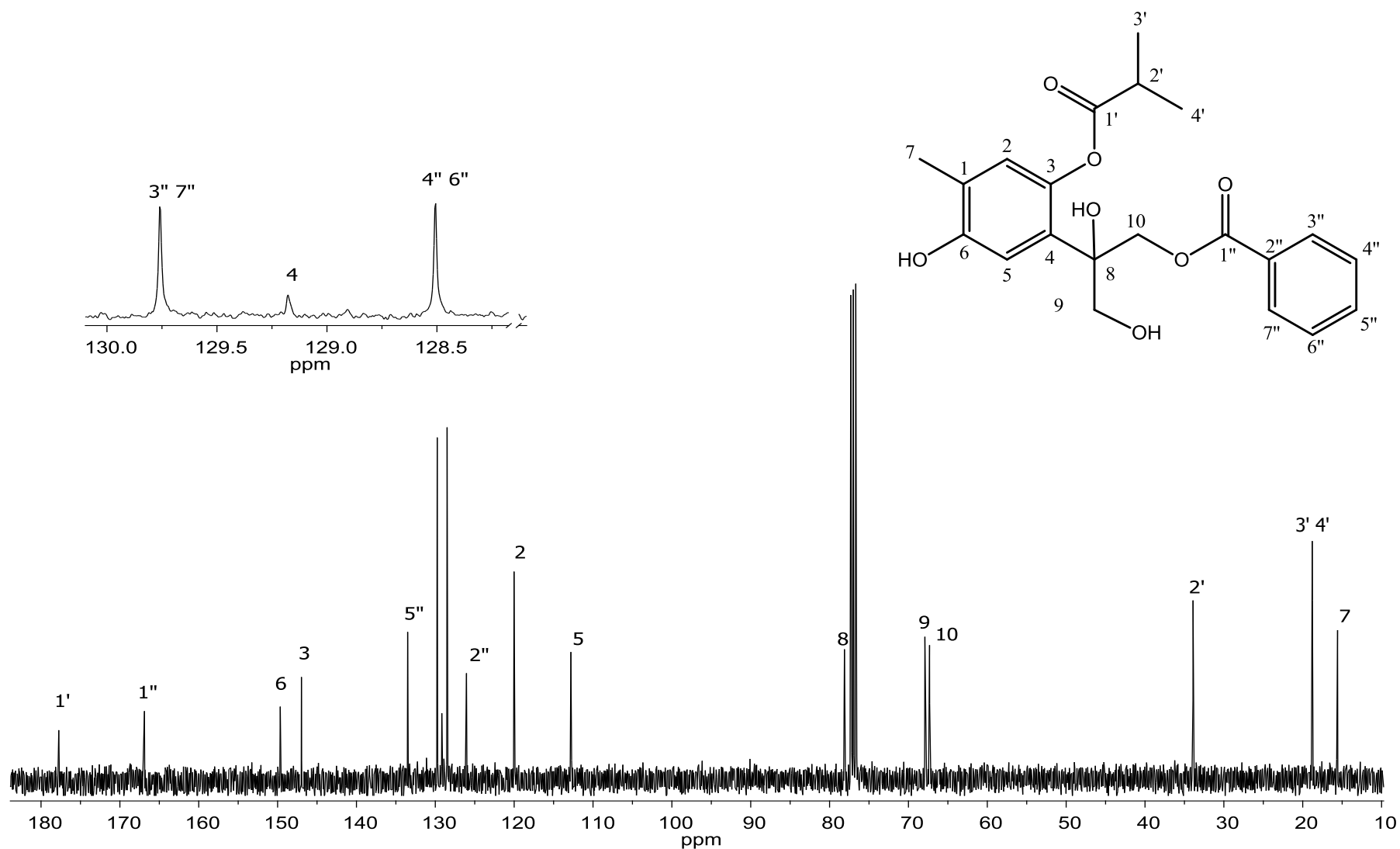


Figura 17. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz en CDCl_3 del isobutirato de 10-benzoiloxy-6,8,9-trihidroxitimilo (**22**).

Con los compuestos aislados **19** y **22** se realizó un ensayo de captura de radicales libres por el método de DPPH. Se ensayó una curva control empleando ácido ascórbico a concentraciones de 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 y 3.125 $\mu\text{g/mL}$ disuelto en DMSO. Por otra parte se realizó el ensayo para los compuestos **19** y **22**, a las mismas concentraciones descritas anteriormente, estas diluciones fueron preparadas en una placa de 96 pocillos, posteriormente se agregaron 5 μL de DPPH• 5mM, se incubaron durante 20 min en obscuridad permitiendo así que se llevara por completo la reacción, finalmente se midió la absorbancia a 515 nm. Los resultados obtenidos mostraron que el compuesto **19** (isobutirato de 10-benzoiloxi-8,9-epoxi-6-hidroxitimilo) presentó nula actividad antioxidante, mientras que el compuesto **22** (isobutirato de 10-benzoiloxi-6,8,9-trihidroxitimilo) presentó moderada capacidad de neutralización de DPPH pues la CE_{50} calculada fue de 167.42 μM . Cabe mencionar que los ensayos se llevaron a cabo por triplicado y se validaron a partir de curvas obtenidas con el ácido ascórbico cuya CE_{50} fue de 22.14 μM . (Tabla 3 y gráfico 1). Debido a que la actividad antioxidante depende de los distintos grupos de compuestos y del número de hidroxilos sustituyentes, de acuerdo a la facilidad con la que el átomo de hidrógeno desde el grupo hidroxilo puede ser donado a la especie radical la estructura química del compuesto **22** es propicia para secuestrar radicales libres, por lo tanto se puede decir que este compuesto al presentar el anillo del epóxido abierto (glicol) y tener mayor número de sustituyentes hidroxilo presenta una mayor capacidad de neutralización de radicales libres, mostrando mayor actividad antioxidante en comparación con el compuesto **19** que contiene sólo un sustituyente hidroxilo en su anillo aromático. Al presentar **19** y **22** diferencias de funcionalidades únicamente en las posiciones 8 y 9, y de que **19** presentó nula capacidad de neutralización de radicales libres, podemos proponer entonces que la presencia de los grupos hidroxilo OH-8 y OH-9 en **22** son importantes para observar dicha actividad.

Tabla 3. Resultados obtenidos en el ensayo de captura de radicales libres por DPPH.

Muestra	Captación de radicales libres DPPH CE ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	Captación de radicales libres DPPH CE ₅₀ (μM)
Ácido ascórbico (Curva control)	3.90	22.14
Compuesto 22	64.7	167.42

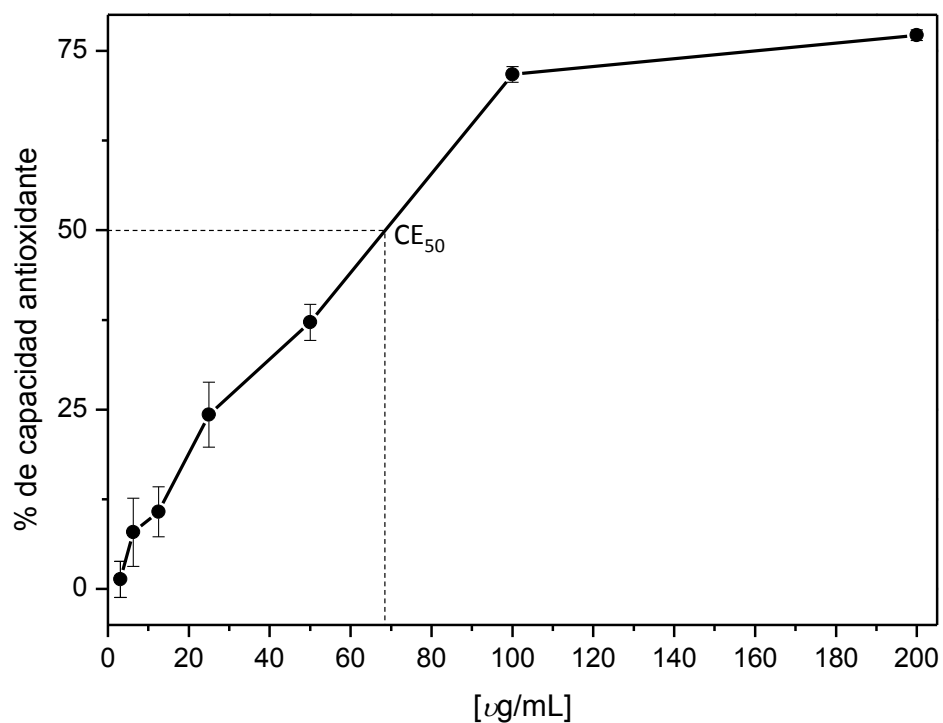
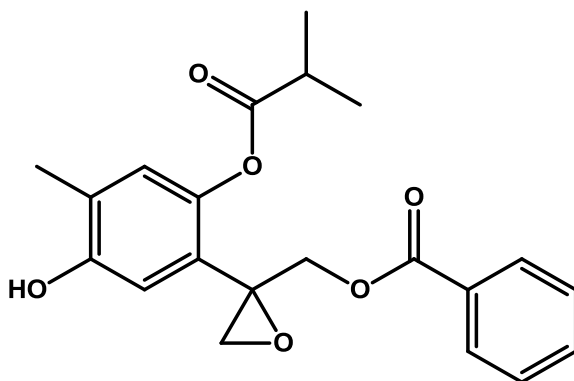


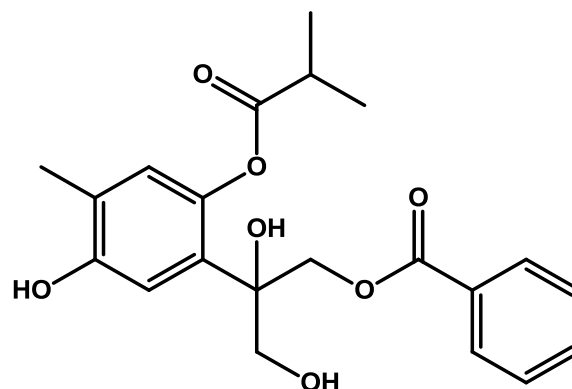
Gráfico 1. Representación de la captación de DPPH del compuesto 22.

8 CONCLUSIONES

Del extracto de cloruro de metileno de las hojas de *Ageratina glabrata* se aisló al isobutirato de 10-benzoiloxi-8,9-epoxi-6-hidroxitimilo (**19**) y del extracto metanólico de hoja se aisló al isobutirato de 10-benzoiloxi-6,8,9-trihidroxitimilo (**22**).



19



22

A estos compuestos se les realizó un ensayo de captura de radicales libres por DPPH, de los cuales el compuesto **19** mostró nula actividad antioxidante y el compuesto **22** mostró moderada actividad de neutralización de DPPH pues la CE_{50} calculada para este compuesto fue de 167.42 μ M.

9 PARTE EXPERIMENTAL

9.1 GENERALIDADES

Los espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H a 400 MHz y de RMN de ^{13}C a 100 MHz, se determinaron en un espectrómetro Varian Mercury Plus-400. En todas las determinaciones se utilizó como disolvente deuterocloroformo (CDCl_3) y como referencia interna se utilizó tetrametilsilano (TMS). Los espectros fueron procesados empleando el programa MestRE Nova.

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

Los valores de rotación específica se determinaron en CHCl_3 en un polarímetro Perkin-Elmer 341.

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

Las mediciones del potencial antioxidante fueron realizadas en un espectrofotómetro de luz Ultravioleta-visible, Biotek[®] modelo ELx808, a una longitud de onda de 515 nm, operado por el programa de computo Gen 5 versión 2.01.14. Los parámetros estadísticos de las absorbancias medidas, se determinaron, utilizando una hoja de cálculo Microsoft Office Excel[®] 2010. OriginPro 8

9.2 MATERIA VEGETAL

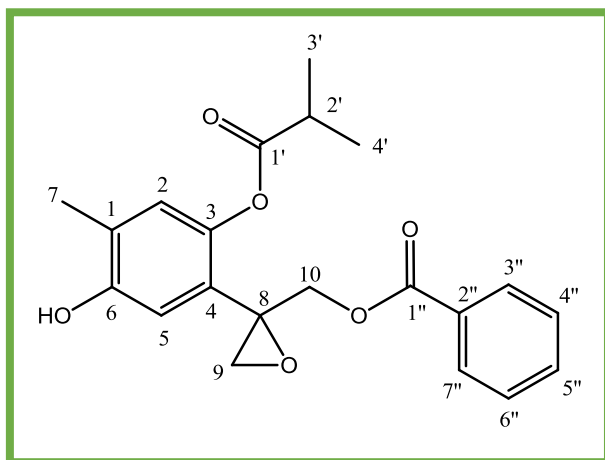
Ageratina glabrata fue colectada en la desviación a Cuanajo a 1 Km de la carretera Pátzcuaro-Santa Clara del Cobre el 2 de Marzo del 2015.

9.3 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS

Ageratina glabrata, se separó en sus partes: raíces, tallos, hojas y flores, se secaron a la sombra por dos semanas, posteriormente se maceraron durante tres días por separado en polaridad ascendente y por triplicado con hexanos, cloruro de metileno y metanol obteniendo los extractos correspondientes.

9.4 ANÁLISIS QUÍMICO

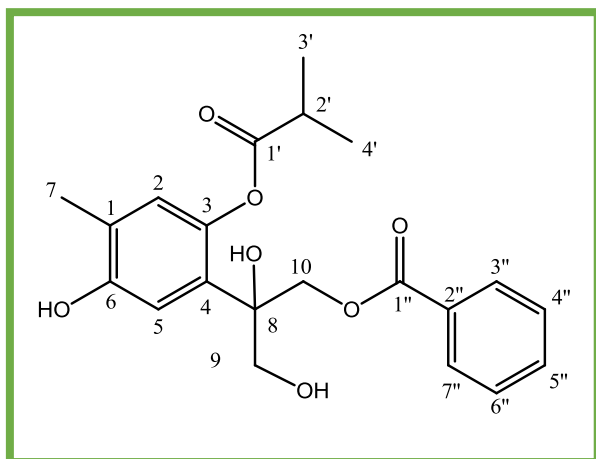
Isobutirato de 10-benzoiloxi-8,9-epoxi-6-hidroxitimilo (19)



Del extracto de cloruro de metileno de hojas de *Ageratina glabrata* se obtuvieron 900 mg de cristales incoloros p.f. 112-114°C $[\alpha]_{589}^{20} +9.9$, $[\alpha]_{578}^{20} +10.0$, $[\alpha]_{436}^{20} +17.1$, (c 0.8, CHCl₃); UV(EtOH) $\lambda_{\max}$ nm: 228; IR (CHCl₃) $\nu_{\max}$ cm⁻¹: 3595, 3446, 2983, 1749, 1722, 1453, 1273, 1119 RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.97 (2H, dd, J = 7.8, 1.4 Hz, H-3'', H-7''),

7.55 (1H, tt, J = 7.8, 1.4 Hz, H-5''), 7.42 (2H, t, J = 7.8 Hz, H-4'', H-6''), 6.93 (1H, s, H-5), 6.81 (1H, s, H-2), 4.77 (1H, d, J = 12.2 Hz, H-10a), 4.77 (1H, d, J = 12.2 Hz, H-10b), 3.11 (1H, d, J = 5.2 Hz, H-9a), 2.85 (1H, d, J = 5.2 Hz, 9-b), 2.83 (1H, sept, J = 7.2 Hz, H-2'), 2.21 (3H, s, H-7), 1.31 (3H, d, J = 7.2 Hz, H-3'), 1.30 (3H, d, J = 7.2 Hz, H-4'). RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ : 175.8 (C, C-1'), 166.0 (C, C-1''), 151.6 (C, C-6), 141.6 (C, C-3), 133.1 (CH, C-5''), 129.6 (CH, C-3'', C-7''), 129.5 (C, C-4), 128.3 (CH, C-4'', C-6''), 127.2 (C, C-2''), 125.7 (C, C-1), 124.6 (CH, C-2), 114.6 (CH, C-5), 65.4 (CH₂, C-10), 56.9 (C, C-8), 51.1 (CH₂, C-9), 34.1 (CH, C-2'), 19.0 (CH₃, C-3'), 18.9 (CH₃, C-4'), 15.7 (CH₃, C-7).

Isobutirato de 10-benzoiloxi-6,8,9-trihidroxitimilo (22)



Del extracto metanólico de hojas de *Ageratina glabrata* se obtuvieron 890 mg de una miel marrón, $[\alpha]_{589}^{20} -1.0$, $[\alpha]_{578}^{20} -1.2$, $[\alpha]_{546}^{20} -1.5$, $[\alpha]_{436}^{20} -3.2$, $[\alpha]_{365}^{20}$ BE (c 2.46, CHCl₃), UV (EtOH) $\lambda_{\max}$ nm: 296, 228; IR: (CHCl₃) $\nu_{\max}$ cm⁻¹: 3604, 3425, 1715, 1470, 1272, 1158; RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.98 (2H, dd, J = 8.2, 1.2 Hz, H-3'', H-7''), 7.56 (1H, tt, J = 7.4, 1.2 Hz, H-

5"), 7.41 (2H, t, $J = 7.6$ Hz, H-4", H-6"), 6.66 (1H, s, H-2), 6.59 (1H, s, H-5), 4.65 (2H, AB, $J = 12.2$ Hz, H-9a, H-9b), 4.53 (1H, d, $J = 12$ Hz, H-10a), 4.51 (1H, d, $J = 12$ Hz, H-10b), 2.53 (1H, sep, $J = 7$ Hz, H-2'), 2.17 (3H, s, H-7), 1.09 (6H, d, $J = 7$ Hz, H-3', H-4'). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 177.7 (C, C-1'), 166.8 (C, C-1"), 149.6 (C, C-6), 146.9 (C, C-3), 133.5 (CH, C-5"), 129.7 (CH, C-3", C-7"), 129.1 (C, C-4), 128.5 (CH, C-4", C-6"), 126.0 (C, C-2"), 120.0 (C, C-1), 120.0 (CH, C-2), 112.8 (CH, C-5), 78.1 (C, C-8), 67.9 (CH_2 , C-9), 67.3 (CH_2 , C-10), 33.9 (CH, C-2'), 18.7 (CH_3 , C-3', C-4'), 15.5 (CH_3 , C-7).

9.5 ENSAYO DE CAPTURA DPPH

Se pesaron 10 mg del compuesto **19** y del compuesto **22**, posteriormente se colocaron en un tubo Eppendorf y se disolvieron en 500 μL de metanol, de igual manera se pesaron 10 mg de ácido ascórbico se colocaron en un tubo Eppendorf y se disolvieron en 500 μL DMSO, quedando así cada uno de los compuestos en una concentración 20,000 $\mu\text{g/mL}$. De esta dilución se tomaron 100 μL se colocaron en otro tubo Eppendorf y se diluyeron en 900 μL de MeOH teniendo en ellos una concentración de 2,000 $\mu\text{g/mL}$. Se tomaron 40 μL de muestra de cada uno de los compuestos y se colocaron en la primera fila de una placa de 96 pocillos, posteriormente se colocaron 20 μL de MeOH en las siguientes seis filas de canales de la placa, se tomaron 20 μL de muestra de la primera fila y se fueron pasando a las posteriores 5 filas, en la sexta se desecharon quedando de tal manera nuestras seis filas con 20 μL de muestra las cuales se disolvieron con 175 μL de MeOH y en la fila número siete se colocaron 195 μL de MeOH siendo esta nuestro control negativo. Se adicionó a cada canal de nuestras siete filas 5 μL de DPPH• 5 mM, quedando en diluciones de 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 y 3.125 $\mu\text{g/mL}$, se dejó la placa sobre hielo cubriéndola de la luz por 20 min, una vez transcurrido ese tiempo se tomó la lectura de absorbancia a 515 nm.

10 BIBLIOGRAFÍA

1. Talavera Alemán A., Rodríguez García G., López Y., García Gutiérrez H. A., Torres Valencia M., del Río Torres R. E., Cerda García R., Joseph Nathan P., Gómez Hurtado M. A., Systematic evaluation of functionalized thymol derivatives. *Phytochemistry reviews*. (2015) DOI: 10.1007/s11101-015-9416-6.
2. Lin W, Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation and cancer. *The Journal of Clinical Investigation*. (2007). **117**: 1175-83.
3. Tsao, R., & Deng, Z. Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. *Journal of Chromatography B*. **812**: 85-99.
4. Mosquera, O. M., Corraera, Y. M., Niño, J. (2009). Antioxidant activity of plant extracts from Colombian flora. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. (2004). **19**: 382-387.
5. Bustos-Brito C., Sánchez-Castellanos M., Esquivel B., S. Calderón J., Calzada, F., Yopez-Mulia, L.,... & Quijano, L. Structure, Absolute Configuration and Antidiarrheal Activity of a Thymol Derivative from *Ageratina cylindrica*. *Journal of Natural Products*. (2014) **77**: 358-363.
6. García-Sánchez C. A., Sánchez-González A., Villaseñor J. L., La familia Asteraceae en el Parque Nacional Los Mármoles, Hidalgo, México. *Acta Botánica Mexicana*. (2014). **106**: 97-116.
7. Granados-Sánchez D., Germán-H. R., López-Ríos G. F., Estudio ecológico florístico del Municipio de Cuatepec de Hinojosa, Hidalgo, México. *Revista de Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*. (2000) **6**: 103-112.
8. Sánchez-González A., Granados-Sánchez D., Nabor S., Uso medicinal de las plantas por los Otomíes del Municipio de Nicolás Flores, Hidalgo, México. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. (2008) **14**: 271-279.
9. García R. A., Geoecología del paisaje vegetal en el occidente de la ciudad de México. *Anales de Geografía de la Universidad Complutense*. (1998) **18**: 115-137.

10. García, P. G., García S., Martínez, G., Scior, T. R., Salvador, J. L., Martínez, P.,... & Río, R. E. D. Analgesic effect to leaf extract from *Ageratina glabrata* in the hot plate test. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. (2011) **21**: 928-935.
11. Arreaga González H. M., Estudio químico de los extractos metanólicos de *Ageratina glabrata*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Químico Farmacobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. (2013) Morelia, Michoacán, México.
12. Arreaga González H. M., Determinación estructural de derivados de timol de *Ageratina glabrata*. Tesis de Maestría. Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. (2015) Morelia, Michoacán, México.
13. Lukas, B., Schmiderer, C., & Novak, J. "Essential oil diversity of European *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae)", *Phytochemistry*. (2015) **119**: 32-40.
14. Polouse, A.J., Croteau, R. Biosynthesis of aromatic monoterpenes: conversion of γ -terpinene to *p*-cymene and thymol in *Thymus vulgaris* L. *Arch Biochem Biophys*. (1978) **187**: 307–314.
15. Vargas, Geilin. Medicinas. [En línea] medicina.saludeestetica.org/timol/. <http://medicina.saludeestetica.org/timol/>. 20 de Octubre de 2015.
16. Portal antioxidantes [En línea] [portalantioxidantes.com](http://www.portalantioxidantes.com/antioxidantes/). <http://www.portalantioxidantes.com/antioxidantes/>. 23 de Agosto de 2015.
17. Mastelic J., Jerkovic I., Blazevic I., Poljak-Blazi M., Borovic S., Ivancic-Bace I., Smrecki V., Zarkovic N., Brcic-Kostic K., Vikic-Topic D., Muller Zagreb N., Comparative Study on the Antioxidant and Biological Activities of Carvacrol, Thymol and Eugenol Derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (2008) **56**: 3989-3996.
18. Saikat S., Raja C., Creative Educational Sociaty's. College of Pharmacy [En línea] Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. <http://pubs.acs.org/>. 23 de Octubre de 2015.
19. Muñoz Muñoz J. L., García Molina F., Varón R., Quantification of the Antioxidant Capacity of Different Molecules and Their Kinetic Antioxidant

- Efficiencias. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (2010) **58**: 2062-2070.
20. J. H., Mier G., Cáez R. G., Contenido de polifenoles, carotenos y capacidad antioxidante en frutos de uchuva (*Physalis peruviana*) en relación a su estado de maduración. *Recitela*. (2011) **11**: 105.
21. Marzocca A., Desarrollo de los sistemas de clasificación. Nociones básicas de Taxonomía Vegetal. San José, Costa Rica. (1985) **62**: 16.
22. Lombardi, G., Echeverri, J. G. U., Salazar, J. F. P., Cano, J. M. U., Castaño, J. F. L., & Zuluaga, L. A. R. El sujeto contemporáneo: Una perspectiva analítico filosófica. Editorian Universidad de Antioquia. 1ed. Medellín, Colombia. (2009) 62-63.
23. Katinas L., G. Gutiérrez D., A. Grossi M., V. Crisci J., Panorama de la familia Asteraceae (=Compositae) en la República Argentina. *Sociedad Argentina de Botánica*. (2007) **42**: 113-129.
24. Porras Ramírez J., Aislamiento e identificación de derivados de timol, obtenidos de la planta *Ageratina cylindrica*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Veracruzana, (2011) Orizaba, Veracruz, México.
25. Delgado de Cantú G. M., Flora de México, México estructuras política, economía y social. Trillas, México Pearson Prentice Hall. 2° Edición. (1993) 77.
26. Bohlmann F., Mahan P. K., Swuita A., Natsu A. A., Zdero C., Dorner W., Ehlers D., Grenz M., Neue sesquiterpenlactone und andere inhaltsstoffe aus vertretern der *Eupatorium*-gruppe. (1977) **16**: 1973-1981.
27. Delle Monache G., Delle Monache F., Becerra J., Silva M., Menichinni F., Thymol derivatives from *Eupatorium glechonophyllum*. *Phytochemistry*. (1984) **23**: 1947-1950
28. 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.

29. Zhou Z. Y., Liu W. X., Pei G., Wang J., Xu Q. L., Xie H. H., Wan F. T., Tan J. W., Phenolics from *Ageratina adenofora* roots and their phytotoxic effects on *Arabidopsis thaliana* seed germination and seedling growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (2013) **61**: 11792-11799.
30. 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.
31. 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.
32. Romo de Vivar A., Cuevas L. A., Guerrero C., Eupaglabrina, un nuevo terpeno aislado de *Eupatorium glabratum*. *Revista Latinoamericana de Química*. (1971) **2**: 32-34.
33. Bohlmann F., Zdero C., Notiz Über neue Inhaltsstoffe aus *Wendelia fosteriana* Endl., Chemische Berichte. (1976) **109**: 791-792.
34. Bohlmann F., Niedballa U., Schulz J., Über einige Thymol derivative aus *Gaillardia*- und *Helenium*-Arten. *Chemische Berichte*. (1969) **102**: 864-871.
35. 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 modelos térmicos de dolor agudo. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. (2011) **42**: 45-51.
36. Pardo Novoa J. C., Escrutinio fitoquímico y antimicrobiano de *Eupatorium glabratum* H.B.K. Tesis de Licenciatura. Facultad de Químico Farmacobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. (2011) Morelia, Michoacán, México.
37. Talavera Alemán A., Componentes minoritarios de *Ageratina glabrata*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Químico Farmacobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. (2012) Morelia, Michoacán, México.