



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS
DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

“Determinación de la Configuración Absoluta de
Derivados del *p*-menteno de *Ageratina glabrata*
H.B.K.”

TESIS

Que para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS

Presenta:

M.C. Julio César Pardo Novoa

Directores:

Doctora en Ciencias Químicas: Rosa Elva Norma
del Río Torres

Doctor en Química: Mario Armando Gómez Hurtado

Morelia, Michoacán

Marzo 2018

Este trabajo está dedicado con infinito amor, a mi hijo Gael.

DEDICATORIA

A DIOS

Por permitirme despertar cada mañana e iluminarme día a día.

A MIS PADRES

Que son los pilares en mi vida.

***Esperanza Novoa Mendoza** por ser el mejor ejemplo en mi vida, así como brindarme todo su cariño y amor incondicional. Gracias.*

***Enrique Pardo Bautista** por ser el mejor ejemplo en mi vida, también por darme el apoyo moral. Gracias.*

A MI ESPOSA

*“**Gloria Rodríguez Moreno**, le doy gracias a Dios por haberte conocido y que día a día me brindas tu amor incondicional no tengo palabras para agradecerte todo lo que me has apoyado y la paciencia que has tenido para la culminación de este proyecto con mucho Cariño y Amor”*

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por brindarme la oportunidad y los medios para obtener el grado.

Al Instituto de Investigaciones Químico Biológicas por poner a la disposición las instalaciones para realizar el proyecto de investigación.

A CONACYT por la beca otorgada número 268710 para la realización y obtención del grado de Doctor en Ciencias Químicas.

A MIS DIRECTORES DE TESIS

*A la **D.C. Rosa Elva Norma Del Rio Torres** por guiarme, apoyarme y brindarme la oportunidad de estar en su grupo de trabajo para poder llevar a cabo la realización de mi tesis doctoral. Gracias.*

*Al **D.Q. Mario Armando Gómez Hurtado** por guiarme y apoyarme durante la realización del proyecto de tesis. Gracias.*

AL COMITÉ TUTORAL

Por el apoyo en cuanto a la revisión de la tesis y sus recomendaciones en cada seminario para la culminación de este proyecto y contribución en mi formación. Gracias.

D.C. Carlos Martín Cerda García Rojas

D.C. Juan Diego Hernández Hernández

D.C. Hugo Alejandro García Gutiérrez

El presente trabajo se llevó a cabo en los Laboratorios de Química de Productos Naturales del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo bajo la dirección de la D.C. Rosa Elva Norma del Río Torres y el D.Q. Mario Armando Gómez Hurtado. Con apoyo económico de la CIC-UMSNH.

Los resultados obtenidos en la tesis doctoral permitieron la generación de las siguientes publicaciones y participaciones en congresos:

1. "Absolute Configuration of Menthene Derivatives by Vibrational Circular Dichroism". Pardo-Novoa J.C., Arreaga-González H.M., Gómez-Hurtado M.A., Rodríguez-García G., Cerda-García-Rojas C.M., Joseph-Nathan P., del Río R.E. *Journal of Natural Products*. 2016. 79, 2570-2579.
DOI:10.1021/acs.jnatprod.6b00491.
2. "A Methodology for the Absolute Configuration Determination of Epoxythymols Using the Constituents of *Ageratina glabrata*". Arreaga-González H.M., Pardo-Novoa J.C., del Río R.E., Rodríguez-García G., Torres-Valencia J.M., Manríquez-Torres J.J., Cerda-García-Rojas C.M., Joseph-Nathan P., Gómez-Hurtado M.A. *Journal of Natural Products*. 2018. 81, 63-71.
DOI: 10.1021/acs.jnatprod.7b00637.
3. "Un nuevo derivado glucosilado del *p*-menteno de *Ageratina glabrata*". Pardo-Novoa J.C., Gómez-Hurtado M.A., Rodríguez-García G., Cerda-García-Rojas C.M., Joseph-Nathan P., del Río R.E. *Revista Latinoamericana Química Suplemento especial*. 2015. 43, 153.
4. "Determinación de la configuración absoluta de *p*-mentenos hidroxilados". Pardo-Novoa J.C., Gómez-Hurtado M.A., Rodríguez-García G., Cerda-García-Rojas C.M., Joseph-Nathan P., del Río R.E. *Revista Latinoamericana Química Suplemento especial*. 2016. 44, 69.
5. "Estudio de derivados glucosilados del mentol por resonancia magnética nuclear" en el foro titulado "30 años diseñando moléculas y formando investigadores Dra. Rosa Santillán" en la ciudad de Orizaba, Veracruz del 20 al 21 de octubre de 2016.

ÍNDICE

SÍMBOLOS, ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS	vii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	6
3. JUSTIFICACIÓN	13
4. OBJETIVO	14
4.1. Objetivos particulares	14
5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	15
6. CONCLUSIONES	72
7. PARTE EXPERIMENTAL	76
7.1. Generalidades	76
7.2. Material vegetal	76
7.3. Obtención de extractos	77
7.4. Cromatografía en columna	77
7.5. Tratamientos ácidos	80
7.6. Reacción general de aromatización con yodo	88
7.7. Método para calcular DCV	89
8. BIBLIOGRAFÍA	90

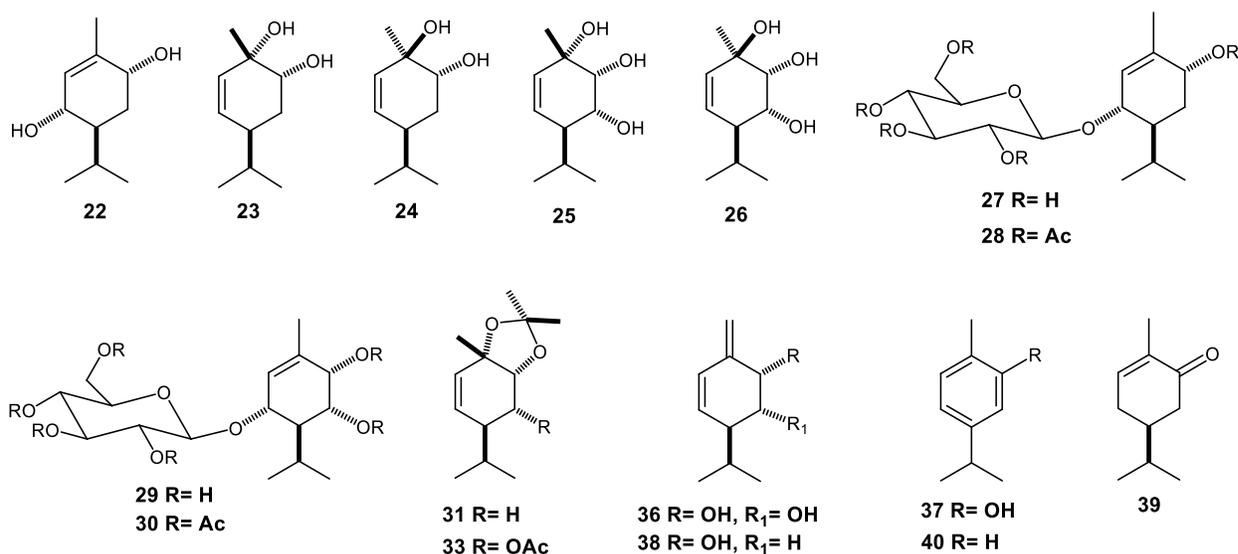
SÍMBOLOS, ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

%	Por ciento
[α]	Rotación específica
α	Alfa
β	Beta
δ	Desplazamiento químico
®	Marca registrada
°C	Grados Celsius
B3LYP	Becke, three-parameter, Lee-Yang-Parr
COSY	CORrelation SpectroscopY
DCV	Dicroismo Circular Vibracional
DFT	Density functional theory
DGDZVP	DGauss Double-Zeta Valence Polarization
HETCOR	HETeronuclear CORrelation
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
MMFF	Merch Molecular Force Field
NOESY	Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY
AcO	Acetoxi
AcOEt	Acetato de etilo
Anh.	Anhídrido
B.E.	Baja Energía
c	Concentración
cm	Centímetros
d	Señal doble
da	Señal doble ancha
dd	Señal doble de dobles
ddd	Señal doble de dobles de dobles

dddd	Señal doble de dobles de dobles de dobles
ddt	Señal doble de dobles de triples
dt	Señal doble de triples
dtd	Señal doble de triples de dobles
EMIE	Espectrometría de Masa por Impacto Electrónico
eV	Electrón volts
g	Gramos
h	Horas
Hz	Hertz
Int. Rel.	Intensidad relativa
m	Señal múltiple
<i>m/z</i>	Masa carga
MeOH	Metanol
mg	Miligramos
mL	Mililitros
ppm	Partes por millón
RMN de ¹³C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13
RMN de ¹H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
s	Señal simple
sa	Señal simple ancha
septd	Señal séptuple de dobles
t	Señal triple
ta	Señal triple ancha
THF	Tetrahidrofurano

RESUMEN

En el presente trabajo se describe el aislamiento de los glicósidos de *p*-menteno **27** y **29** a partir de las partes aéreas de *Ageratina glabrata*. La hidrólisis ácida de **27** y **29** permitió la obtención de los derivados del *p*-menteno **22-26**. Asimismo, se describe la preparación de los derivados acetilados **28** y **30**. La determinación de la configuración absoluta de la serie de compuestos **22-30**, se determinó mediante la comparación de los espectros experimentales de dicroísmo circular vibracional de los derivados **31** y **33** con sus espectros calculados por DFT. Además, los parámetros de Flack y Hooft de rayos X de **22** confirmaron la asignación de la configuración absoluta de los *p*-mentenos. Tratamientos ácidos subsecuentes a los derivados **22-26**, permitieron la obtención de los derivados de β -felandreno **36** y **38**, la cetona α,β -insaturada cíclica **39** y los productos de aromatización **37** y **40**, respectivamente. Estas transformaciones químicas llevadas a cabo contribuyen al conocimiento de la química de monoterpenos de la cual al momento no están establecidos los procesos por los cuales las plantas biosintetizan al carvacrol (**37**) y *p*-cymeno (**40**); no obstante, se establece su estrecha relación con derivados del *p*-menteno.



Palabras claves: *Ageratina glabrata*, *p*-mentenos, configuración absoluta, hidrólisis ácida, dicroísmo circular vibracional.

1. INTRODUCCIÓN

La necesidad de curar las enfermedades es tan antigua como la humanidad. Al surgir las grandes civilizaciones aparecieron también los primeros agentes terapéuticos, principalmente de origen natural. Con el paso del tiempo y conforme la humanidad comenzó a adquirir nuevos conocimientos en medicina y química se introdujeron los primeros productos de síntesis orgánica durante la primera mitad del siglo XIX; en la actualidad siguen siendo los productos naturales y la síntesis orgánica las principales fuentes de nuevos fármacos.¹ Los productos naturales ofrecen características complementarias a los compuestos sintéticos en cuanto a composición, peso, tamaño, grupos funcionales, complejidad molecular y estereoquímica.² En el periodo de 1981 al 2014 fueron introducidos en todo el mundo 1328 compuestos orgánicos como fármacos, de los cuales más del 40% tienen relación con moléculas de origen natural.³

Una propiedad remarcable que poseen numerosos productos naturales es la presencia de centros estereogénicos, es decir, son quirales. Sin embargo, la naturaleza es estereoespecífica y en la mayoría de los casos solo biosintetiza uno de los enantiómeros. Se sabe que los enantiómeros tienen iguales propiedades físicas y químicas pero difieren en dos aspectos, en el plano de rotación de la luz polarizada y en la reactividad frente a otras moléculas quirales, incluyendo su interacción en los sistemas biológicos.⁴

Por ejemplo, el limoneno un monoterpeno que lo podemos encontrar en el limón o la naranja y que dependiendo de la configuración de su único centro estereogénico para cada enantiómero posible va ser el responsable del olor de estas frutas, en el caso del (*R*) tiene olor a limón y el (*S*) a naranja,⁵ **Figura 1.**

Un solo cambio en la estereoquímica modifica la actividad de los pares enantioméricos, lo que se vuelve crítico en actividades farmacológicas, independientemente si la molécula es natural o sintética.

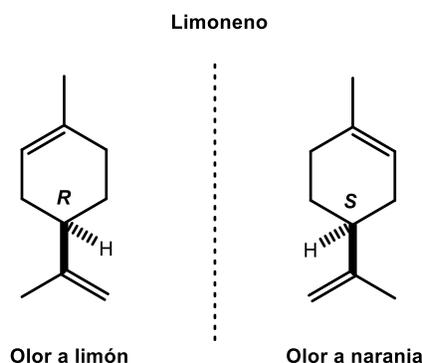


Figura 1. Enantiómeros del limoneno.

Determinar la configuración absoluta ha sido desde hace mucho tiempo un problema científico significativo, por lo que se han desarrollado diversos métodos que han ido evolucionando a lo largo de la historia. Desde 1815, cuando Jean Baptiste Biot descubrió que algunos compuestos orgánicos naturales rotaban el plano de la luz polarizada⁶ se marcó la pauta que trazaría la importancia de la estereoquímica de las moléculas orgánicas, años más tarde en 1848, Louis Pasteur observó que el tartrato de sodio y amonio existía como una mezcla de dos clases diferentes de cristales, separó los dos tipos de cristales cuidadosamente con pinzas y encontró que los cristales orientados a su derecha rotaban la luz polarizada en sentido de las manecillas del reloj, mientras que los orientados hacia su izquierda rotaban la luz polarizada hacia el lado contrario. Este descubrimiento lo llevó a crear las bases de la estereoquímica; planteó que al igual que los dos tipos de cristales, las moléculas que los conformaban eran imágenes especulares entre sí, es decir, había descubierto los enantiómeros. Los trabajos de Pasteur condujeron en 1874 a Van't Hoff y Le Bel a proponer que el carbono con cuatro sustituyentes se encuentra con una geometría tetraédrica, lo que confería a las moléculas orgánicas tridimensionalidad.⁷

Los rápidos avances de la difracción de rayos X, han permitido establecer la configuración absoluta empleado los parámetros Flack y Hooft^{8,9} en las mediciones cristalográficas para la determinación de la configuración absoluta. Sin embargo, este método requiere la obtención de un monocristal adecuado situación, que a veces es difícil de obtener con algunas moléculas.¹⁰ La configuración absoluta

también se puede obtener al determinar la estereoquímica de un sustituyente o compuesto de referencia del cual se conozca su configuración. Una variante de este método es que se pueden preparar derivados con auxiliares quirales que además puedan ayudar a la cristalización de la molécula.¹¹

En la década de 1970, el desarrollo del modulador fotoelástico de cuarzo con selenuro de zinc permitió generar longitudes de ondas circularmente polarizada en la región del espectro de infrarrojo (IR), logrando con esto la medición del Dicroísmo Circular Vibracional, (DCV). De manera conjunta, el desarrollo de métodos computacionales capaces de predecir el espectro teórico de DCV, hizo posible determinar la configuración absoluta por comparación entre ambos espectros, teórico y experimental.¹²

Todas las moléculas orgánicas absorben radiación IR por lo que las moléculas quirales generan espectros de IR_{DCV} y DCV el cual es estereoespecífico, puesto que los pares de enantiómeros tienen el mismo espectro de IR pero sus espectros de DCV son opuestos, es decir, con signos contrarios. La magnitud de las bandas en un espectro de DCV es aproximadamente 10,000 veces más pequeña que la de IR, cada banda de absorción en el espectro de IR tiene una correspondiente banda de DCV.¹³ Esta técnica ha sido recientemente utilizada para determinar la configuración absoluta tanto de moléculas sintéticas como de productos naturales.^{14,15}

Un ejemplo de este método es la determinación de la configuración absoluta del ácido catívico y ácido 13-*epi*-labdanólico obtenidos del extracto hexánico de *Ageratina jocosotepecana*, la presencia de los labdanos (13*R*) y (13*S*) en esta planta fue demostrada por la asignación de la configuración absoluta de los productos naturales utilizando espectroscopia de DCV en comparación con cálculos de DFT y con ayuda de transformaciones moleculares, **Figura 2**.

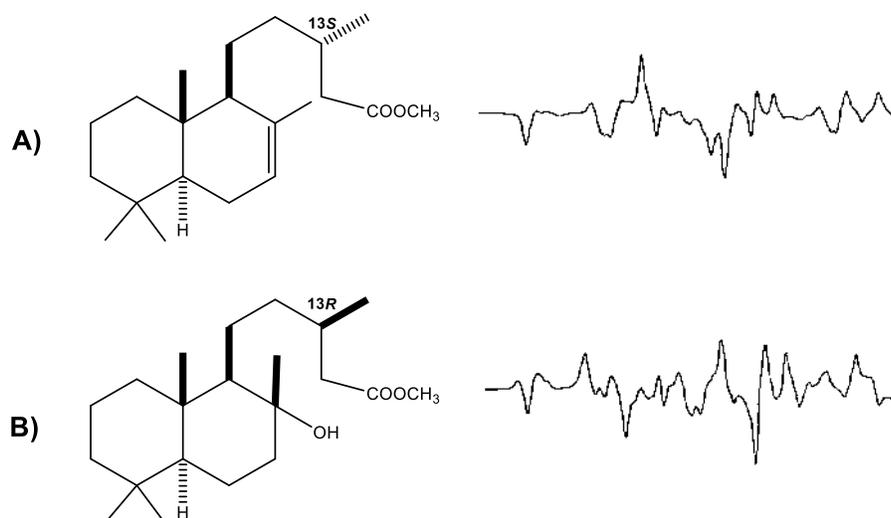


Figura 2. Espectros de DCV de; **A)** Éster metílico del ácido catívico y **B)** Éster metílico del ácido 13-*epi*-labdanólico nivel de cálculo B3LYP/DGDZVP.¹⁶

De igual manera por este método se ha comprobado la presencia de derivados de labdano y *ent*-clerodanos¹⁷ en especies de la familia Asteraceae, la cual ocupa un lugar preponderante en la flora de México, tanto a nivel de géneros como de especies y contribuye substancialmente a la enorme riqueza florística de nuestro País.¹⁸ Actualmente, se calcula para la República Mexicana un total de más 3,000 especies nativas de asteráceas, distribuidas en 392 géneros de los cuales 67 son endémicos, los Estados más ricos florísticamente en el sureste mexicano son Chiapas, Oaxaca y Veracruz, y en el oeste son Jalisco y Michoacán. Alrededor del 66% de las especies restringen su área de distribución al Territorio Nacional. Estas cifras aumentan continuamente, debido a la exploración de áreas hasta ahora poco colectadas.¹⁹

El género *Ageratina* pertenece a la familia Asteraceae y es un miembro de la tribu Eupatorieae que comprende cerca de 149 especies.²⁰ Se encuentra en las regiones tropicales y templadas de Europa y América, especialmente en México, con una amplia distribución que va desde San Luis Potosí hasta Oaxaca; habita en clima templado donde crece a orillas de los caminos, asociada a vegetación perturbada de pastizal, bosques de pino y encino y bosque mesófilo.²¹ En general, las especies del género *Ageratina* poseen propiedades terapéuticas, tales como el efecto analgésico y son utilizadas en la medicina tradicional en diferentes partes del mundo incluyendo

México. Actualmente, existen reportes de compuestos obtenidos de especies del género *Ageratina* que han demostrado actividad antimicrobiana y antiinflamatoria.²²

De los estudios fitoquímicos de *A. glabrata* se han reportado principalmente derivados del timol y un derivado glucosilado del *p*-menteno.³⁴ En el presente trabajo se realiza la determinación de la configuración absoluta de derivados del *p*-menteno de esta especie, también se describen las transformaciones biomiméticas llevadas a cabo a partir de los *p*-mentenos obtenidos y su relación estructural con derivados aromáticos como carvacrol y *p*-cymeno, donde al momento se desconocen los procesos por los cuales las plantas biosintetizan a estos compuestos.

2. ANTECEDENTES

El esqueleto de *p*-menteno se genera a partir del difosfato de geranilo, este contiene solamente un centro estereogénico en la posición C-4; sin embargo, mediante diferentes sustituciones pueden generarse más estereocentros. Muchos de estos derivados se han reportado en especies vegetales medicinales o de uso cotidiano.

Derivados glucosilados del *p*-menteno también se han aislado del fruto de *Cuminum cyminum* L., entre los que se encuentra el (4*S*)-4-*O*- β -D-glucopiranosiloxi-1-*p*-menten-6-ol (1) y (4*R*,6*S*)-4-*O*- β -D-glucopiranosiloxi-1-*p*-menten-7-ol (2),²³ **Figura 3**. La configuración de estos compuestos fue propuesta por análisis del espectro NOESY.

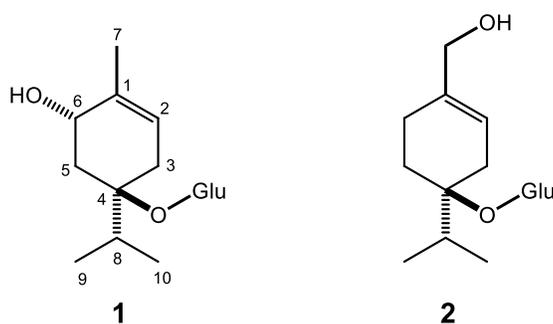


Figura 3. Derivados glicosilados del *p*-menteno aislados de *Cuminum cyminum* L.

Del extracto metanólico obtenido de las bayas de *Juniperus oxycedrus* L., realizaron una partición con *n*-butanol, del cual se obtuvo al glucósido del *p*-menteno 3. Este compuesto resultó activo contra células de cáncer de mama (MCF-7) y pulmón (H460),²⁴ **Figura 4**.

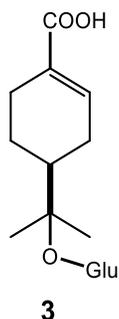


Figura 4. *p*-menteno aislado de *Juniperus oxycedrus* L.

De los derivados del *p*-menteno sin la función glicósido, se han reportado aplicaciones interesantes a nivel industrial y en el área farmacológica, así como en semisíntesis de nuevos productos de interés químico.

Uno de los estudios mostró que el (-)-mentol (**4**) presentó propiedades analgésicas a través de la activación selectiva del receptor *k*-opioide.²⁵ Otros terpenos naturales exhiben propiedades de sensación de frescura y son empleados en fragancias, como el (-)-isopulegol (**5**), *cis*-*p*-mentano-3,8-diol (**6a**) y *trans*-*p*-mentano-3,8-diol (**6b**), se venden bajo el nombre Coolact P (FEMA-2962) por Takasago International,²⁶⁻²⁹ **Figura 5.**

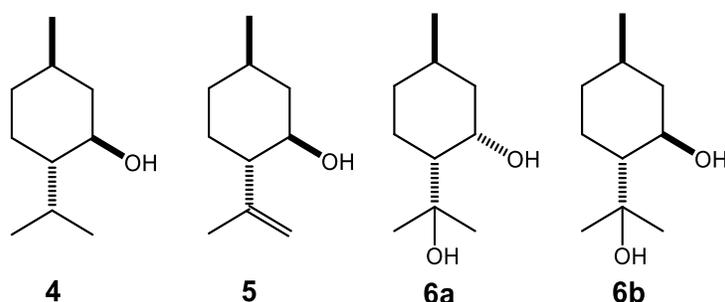


Figura 5. Compuestos derivados del mentol.

Esta clase de derivados del *p*-menteno se han aislado de *Brickellia rosmarinifolia* Vent., cuyos extractos de metanol de planta completa, presentaron potente actividad antifúngica contra *Colletotrichum musae* y *Peronophythora litchii*. Del fraccionamiento de los extractos metanólicos de esta especie encontraron tres compuestos monoterpénicos conocidos como (3*R*,4*R*,6*S*)-3,6-dihidroxi-1-menteno (**7**), (+)-(1*R*,3*S*,4*R*,6*S*)-6-hidroximentol (**8**) y 4-isopropil-1-metilciclohex-2-eno-1,6-diol (**9**),^{30, 31} **Figura 6.**

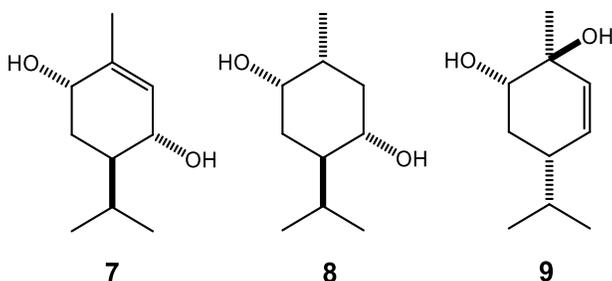


Figura 6. Derivados del mentol aislados de *B. rosmarinifolia*.

Derivados del *p*-menteno como yabunikkeol (**11**) y 5-*p*-menten-2-ona (**12**) se han obtenido a partir del (*R*)- α -felandreno (**10**) con el hongo *Corinespora cassiicola* DSM 62474. A partir del (*S*)- α -terpinen-4-ol (**13**) con el hongo *Gibberella cyanea* DSM 62719 obtuvieron los derivados (1*S*,2*S*,4*S*)-*p*-mentan-1,2,4-triol (**14**), 6-*p*-menten-2,4-diol (**15**) y (1*R*,2*R*,4*S*)-2-hidroxi-1,4-cineol (**16**),³² **Figura 7.**

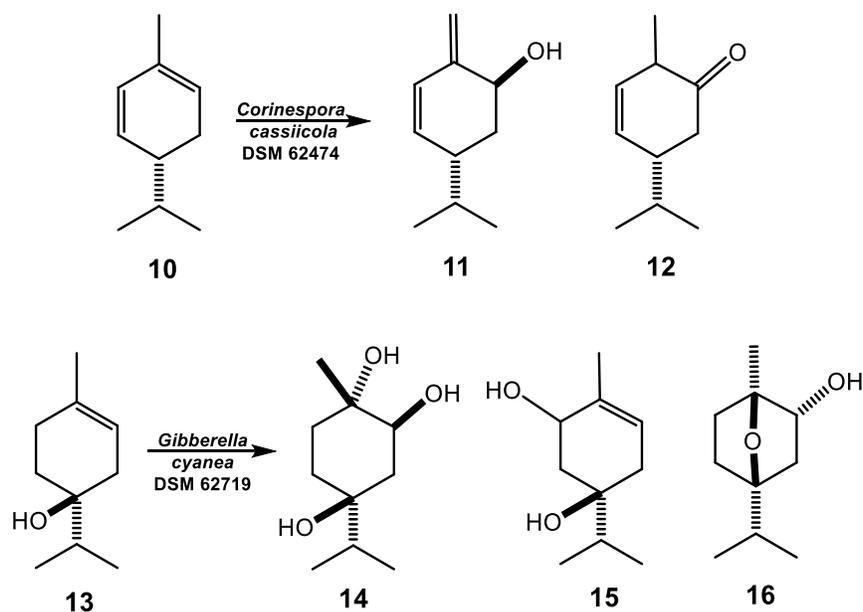


Figura 7. Derivados del *p*-menteno obtenidos con *C. cassiicola* y *G. cyanea*.

Muhammad y col., en 2010 prepararon cuatro derivados del (–)-mentol llamados WS-5 (**17**), CPS-125 (**18**), CPS-368 (**19**) y CPS-369 (**20**), los cuales demostraron ser agonistas selectivos y potentes del receptor transitorio potencial de Melastatina-8 (TRPM8), el cual es un canal iónico que se expresa en los nervios sensoriales ante una respuesta de frío; y la utilidad de estos menteno-derivados puede derivar a analgésicos eficaces y mediadores en respuestas inflamatorias,³³ **Figura 8.**

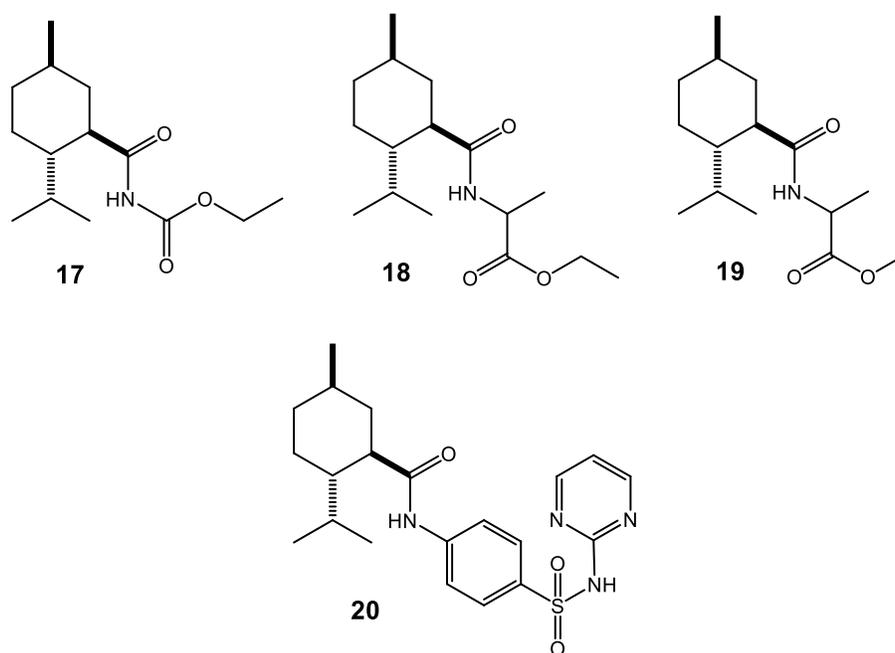


Figura 8. Derivados del mentol agonistas de TRPM8.

En un estudio preliminar de *A. glabrata* desarrollado por nuestro grupo de trabajo se reportó del extracto metanólico de hojas un derivado glucosilado del *p*-menteno conocido como 6-*O*- β -D-glucopiranosiloxi-1-*p*-menten-3-ol (**21**),³⁴ **Figura 9**. Este compuesto se caracterizó por RMN de ¹H y por la comparación de estos con los reportados.³⁵

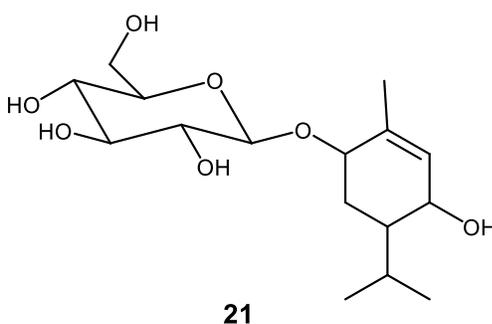


Figura 9. Derivado del *p*-menteno aislado de *A. glabrata*.

Continuando con estos estudios, se llevó a cabo el tratamiento ácido del extracto metanólico de las hojas de *A. glabrata*, esto condujo a la obtención de los derivados: 3,6-dihidroxi-1-menteno (**22**), 1,6-dihidroxi-2-menteno (**23**), 1,6-

dihidroxi-1-*epi*-2-menteno (**24**), 1,5,6-trihidroxi-2-menteno (**25**) y 1,5,6-trihidroxi-1-*epi*-2-menteno (**26**).³⁶ Del derivado **22** se obtuvieron cristales adecuados para su difracción de rayos X. Cabe mencionar que de ninguno de estos derivados se ha determinado su configuración absoluta a pesar de que los compuestos **22-24** ya han sido reportados.^{32,37,38} Los derivados **25** y **26** corresponden a estructuras novedosas, **Figura 10**.

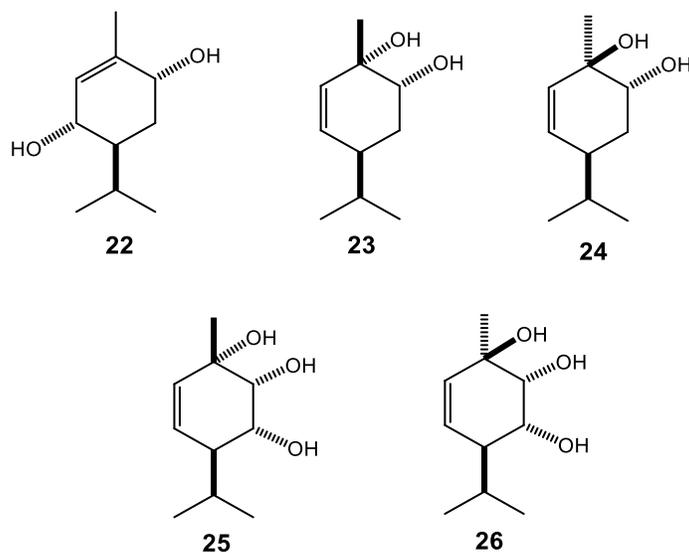
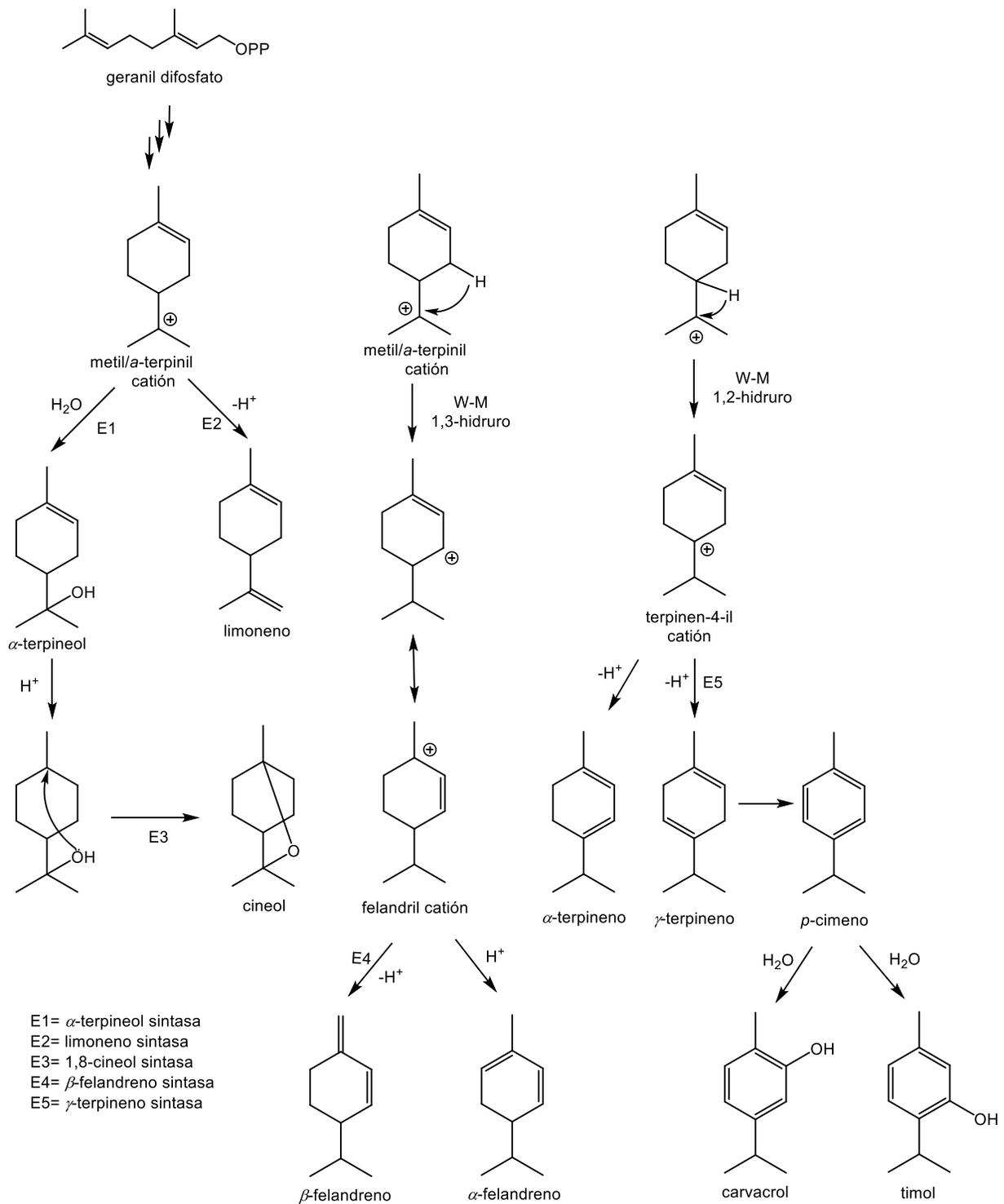


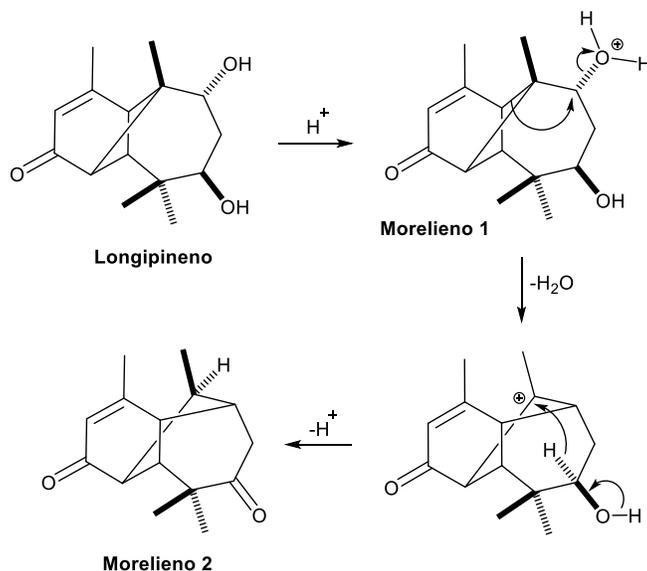
Figura 10. Derivados del *p*-menteno obtenidos mediante tratamiento ácido del extracto metanólico de hojas de *A. glabrata*.

La reactividad de los terpenos es muy característica y se aprecia en su biosíntesis en la generación de derivados de *p*-menteno vía carbocationes, esta incluye: inactivación de nucleófilos utilizando agua, pérdida de un protón, ciclización y en algunos casos la posibilidad de reordenamientos tipo Wagner-Meerwein. En el **Esquema 1**, se muestran algunos ejemplos de los distintos productos de formación a partir del catión terpinil el cual es el responsable de la formación de diversas estructuras monoterpénicas cíclicas.³⁹



Esquema 1. Biosíntesis de monoterpénos cíclicos vía carbocationes.

Por otro lado, la generación de carbocationes en especies terpénicas puede llevarse a cabo experimentalmente en el laboratorio **Esquema 2**, esto con la finalidad de conocer la naturaleza reactiva de dichas sustancias,⁴⁰ así como para generación de derivados de interés químico, biológico o industrial.



Esquema 2. Generación de carbocationes en especies terpénicas.

La formación de carbocationes es bien conocida en sistemas biológicos, sin embargo, explorar este tipo de reactividad experimentalmente resulta de interés, lo cual puede ayudar en el entendimiento de la naturaleza reactiva de estas sustancias y de la diversidad estructural de estas.

3. JUSTIFICACIÓN

Existen derivados del *p*-mentano con diferentes actividades biológicas obtenidas de fuentes naturales, modificaciones químicas, así como por biotransformaciones que no ha sido determinada su configuración absoluta.

Resulta interesante realizar una búsqueda exhaustiva de los derivados *p*-mentenos **22-26**, en los extractos metanólicos de *A. glabrata* para ver si estos derivados se encuentran de manera natural o si son producto del tratamiento ácido durante el proceso de extracción y por último determinar su configuración absoluta. El aislamiento de nuevos metabolitos secundarios contribuirá al conocimiento de sustancias polares que no han sido descritas dentro de *A. glabrata*.

4. OBJETIVO

Determinar la configuración absoluta de derivados del *p*-menteno de *A. glabrata*.

4.1. Objetivos particulares

1. Obtener los extractos metanólicos de *A. glabrata*.
2. Aislar los derivados de *p*-menteno de los extractos metanólicos de las diferentes partes de la planta.
3. Demostrar la procedencia de los derivados de *p*-menteno **22-26**.
4. Caracterizar por métodos físicos, químicos y espectroscópicos los *p*-mentenos obtenidos.
5. Determinar la configuración absoluta de los *p*-mentenos aislados.

5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los extractos metanólicos fueron obtenidos por medio del método de maceraciones sucesivas de las partes aéreas de *A. glabrata*, se procedió a realizar un análisis preliminar por RMN de ^1H con la finalidad de identificar señales características de los derivados de *p*-menteno y seleccionar aquellos extractos que presenten señales típicas de estos derivados entre 5.70 - 5.50 ppm, bases de heteroátomo entre 4.50 - 3.00 ppm en mayor proporción y grupos isopropilo entre 1.00 - 0.70 ppm, **Figura 11**, por lo que cada uno de estos extractos se llevó a purificación por medio de cromatografía en columna.

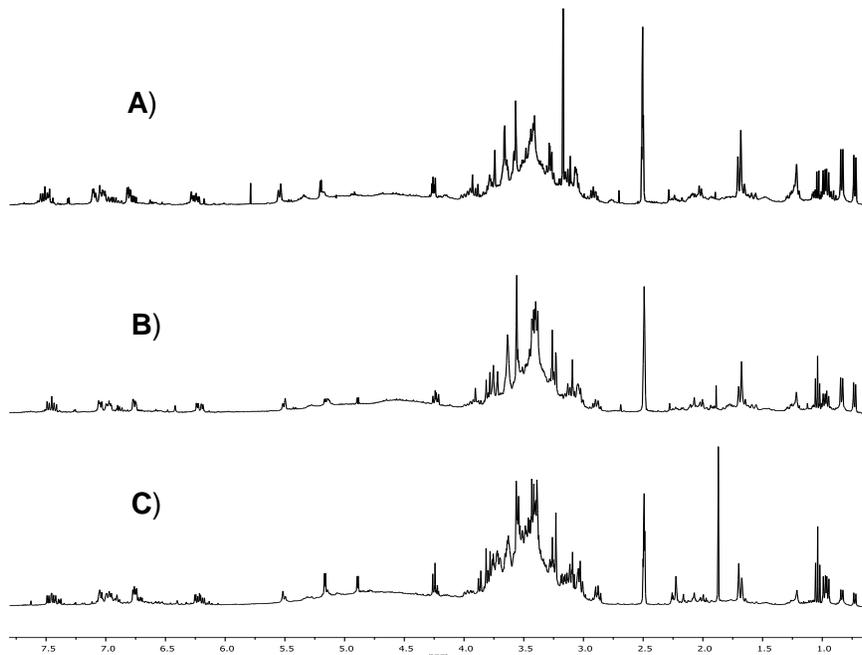


Figura 11. Espectros de RMN de ^1H en DMSO-d_6 de los extractos metanólicos de; **A)** hoja, **B)** flor y **C)** tallo.

Un lote de 50 g de extracto metanólico de flor fue llevado a columna cromatográfica para su purificación, donde tras sucesivas cromatografías se lograron aislar e identificar dos compuestos glicosilados. En el espectro de RMN de ^1H del primer compuesto se observa una señal triple ancha con $J = 1.6$ Hz en 5.67 ppm, correspondiente al protón vinílico H-2, además una señal doble ancha en 4.11 ppm con $J = 8.8$ Hz, correspondiente al protón base de éter en

la posición H-3, en 3.92 ppm se distingue una señal triple ancha con $J = 3.4$ Hz, correspondiente al protón base de alcohol en la posición H-6. En 2.19 ppm se aprecia una señal séptuple de dobles con $J = 7.0$ y 3.2 Hz, correspondiente al protón metínico H-8 de isopropilo; en 1.78 ppm se encuentra una señal simple ancha, correspondiente al metilo vinílico CH₃-7, y en 1.75 ppm se observa una señal múltiple, correspondiente al protón metínico H-4 base de isopropilo. También en 1.74 ppm se observa una señal múltiple para el protón geminal H-5 α y en 1.45 ppm se aprecia una señal doble de triples, correspondiente al protón geminal H-5 β con $J = 14.0, 4.0$ Hz. En 0.93 y 0.83 ppm se observan dos señales dobles características de metilos de isopropilo etiquetados como CH₃-9 y CH₃-10 con una $J = 7.0$ Hz, respectivamente. Por último, se aprecia en 4.40 ppm una señal doble con $J = 8.0$ Hz, correspondiente al protón anomérico de la glucosa H-1' y las demás señales características de los protones bases de oxígeno pertenecientes a la glucosa entre 3.84 - 3.17 ppm, **Figura 12**. En el espectro de RMN de ¹³C, **Figura 13**, se observan señales características de glucosa entre 102.1 – 62.9 ppm, además 10 carbonos que indica la presencia de una porción terpénica; se aprecian dos señales en 138.5 y 127.1 ppm, correspondientes a los carbonos vinílicos C-1 y C-2, respectivamente. Las señales encontradas en 76.4 y 68.2 ppm corresponden a los carbonos base de oxígeno C-3 y alcohol C-6, respectivamente, mientras que en 40.8 y 26.3 ppm las señales, correspondientes a los carbonos metínicos C-4 y C-8, respectivamente. En 30.5 ppm se aprecia la señal de un metileno, correspondiente al carbono C-5, además de la señal de un metilo vinílico en 20.7 ppm, correspondiente al C-7 y las señales características de los metilos de isopropilo se observan en 21.4 y 17.1 ppm. Se realizó una búsqueda en la literatura y se encontró que este compuesto ya había sido reportado como 3,6-dihidroxi-1-menteno 3-O- β -D-glucopiranosido.⁴¹ En la **Tabla 1**, se muestra la comparación de los desplazamientos (δ) de RMN ¹H en CD₃OD del compuesto **27** con respecto al reportado en literatura. Cabe mencionar que los desplazamientos reportados para el grupo isopropilo H-9 y H-10 aparecen en 0.93 y 0.83 ppm, respectivamente, a diferencia de los reportados en la literatura

que aparecen en 1.93 y 1.83 ppm, de igual manera el desplazamiento químico del metilo vinílico H-7 fue de 1.78 ppm, mientras que el reportado aparece en 1.88 ppm, por lo que estos datos deben ser revisados. A partir del experimento HMBC se logró asignar la posición de la glucosa la cual se encuentra sustituida en el C-3 de la aglicona y no en la posición C-6 como se había propuesto anteriormente en el compuesto **21**.

Tabla 1. Comparación de los δ en ppm de RMN de ^1H para el 3,6-dihidroxi-1-menteno 3-O- β -D-glucopiranosido (**27**) en CD_3OD .

Posición	δ ^1H Experimental	δ ^1H Literatura ⁴¹
1
2	5.67 (ta), $J = 1.6$ Hz.	5.66 (sa)
3	4.11 (da), $J = 8.8$ Hz.	4.11 (da), $J = 9.0$ Hz.
4	1.75 (m)
5α	1.74 (m)	1.75 (m)
5β	1.45 (dt), $J = 14.0, 4.0$ Hz.	1.45 (dt), $J = 14.0$ Hz.
6	3.92 (ta), $J = 3.4$ Hz.	3.92 (ta), $J = 3.0$ Hz.
8	2.19 (dsep), $J = 7.0$ y 3.2 Hz.	2.18 (m)
9	0.93 (d), $J = 7.0$ Hz.	1.93 (d), $J = 7.0$ Hz.
10	0.83 (d), $J = 7.0$ Hz.	1.83 (d), $J = 7.0$ Hz.
7	1.78 (sa)	1.88 (sa)
1'	4.40 (d), $J = 8.0$ Hz.	4.40 (d), $J = 8.0$ Hz.
2'	3.17 (t), $J = 8.0$ Hz.	3.30 (m)
3'	3.38 (t), $J = 8.6$ Hz.
4'	3.31 (d), $J = 8.6$ Hz.
5'	3.25 (ddd), $J = 7.8, 5.4$ y 2.3 Hz.	3.30 (m)
6'b	3.68 (dd), $J = 11.7$ y 5.4 Hz.	3.67 (dd), $J = 12.0$ y 5.5 Hz.
6'a	3.84 (dd), $J = 11.7$ y 2.3 Hz.	3.84 (dd), $J = 12.0$ y 2.5 Hz.

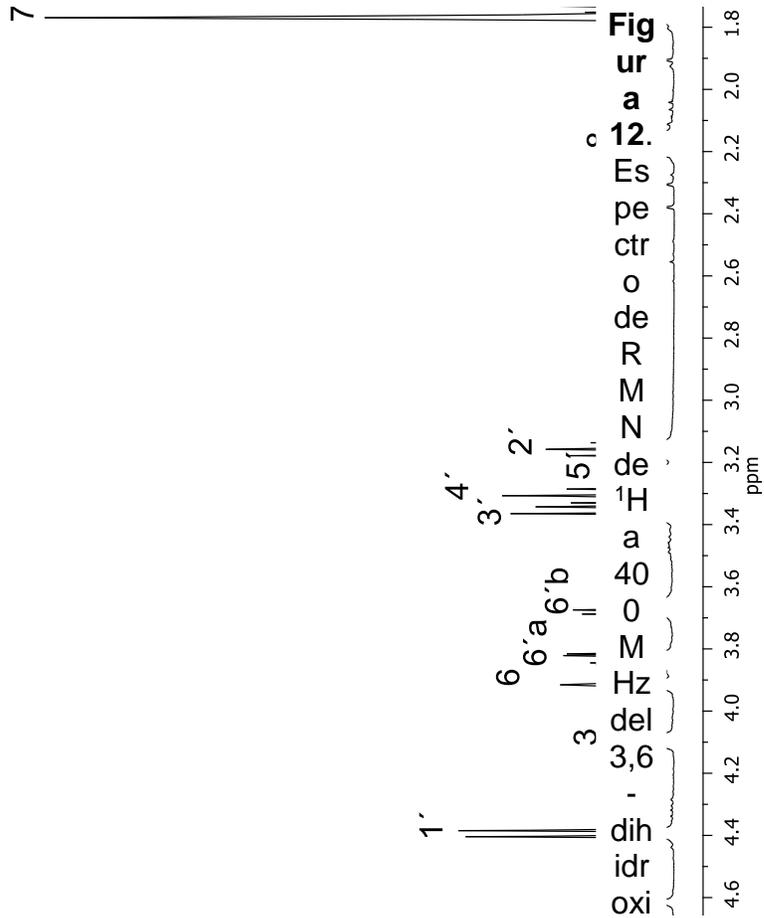
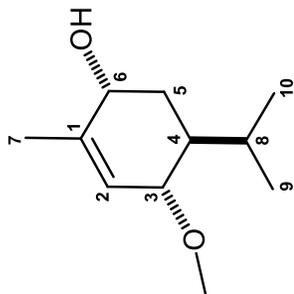
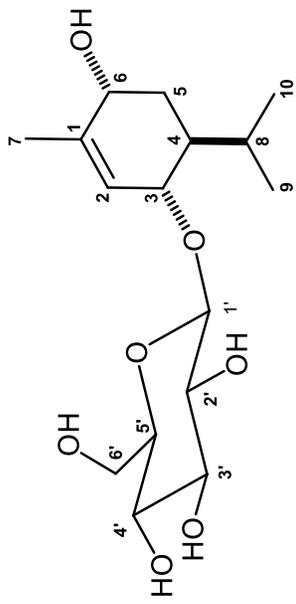
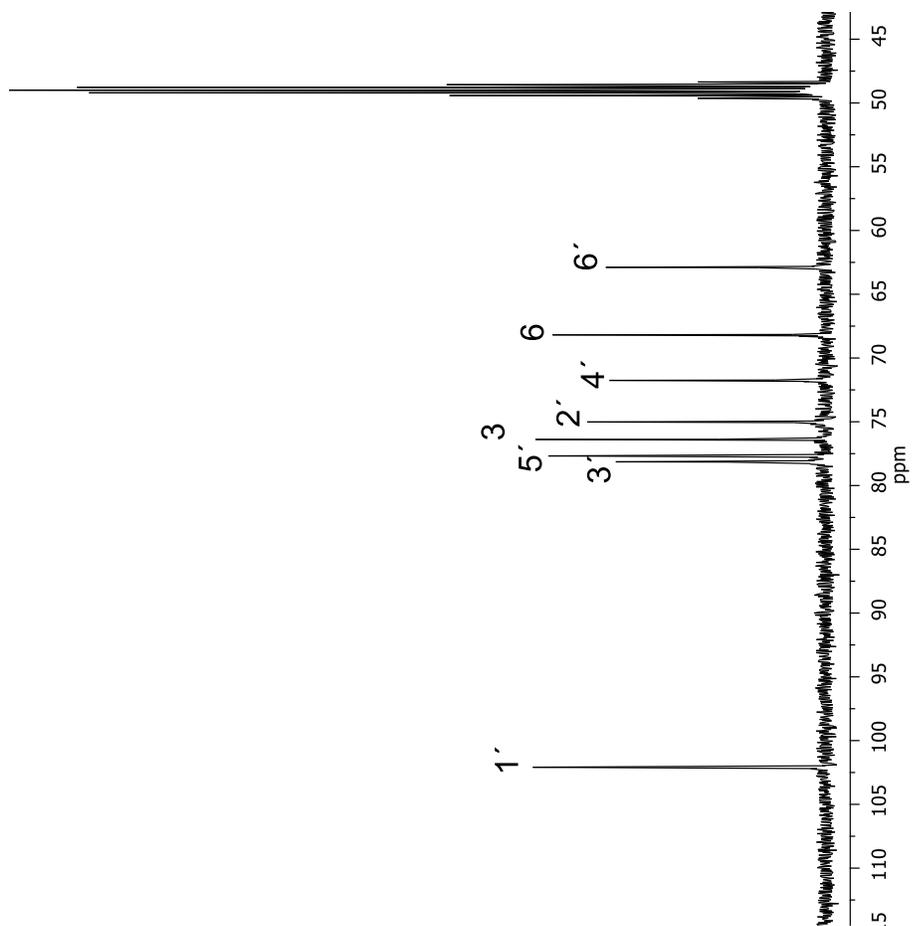
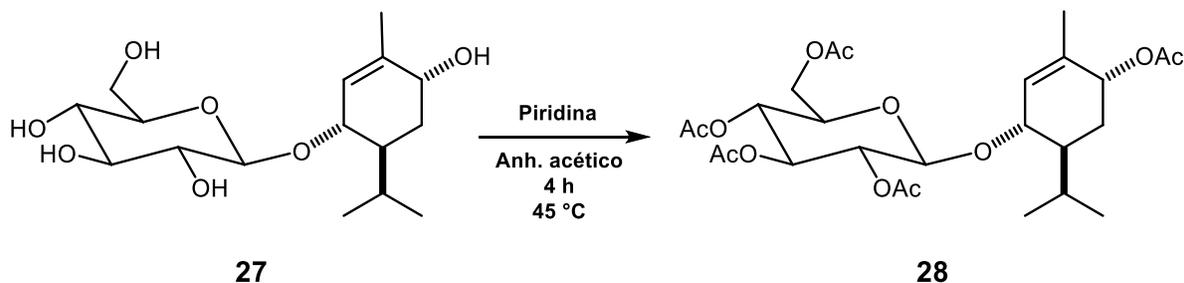


Figura 12. Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz del 3,6-dihidroximecano-3-O-β-D-glucopiranosido (27) en CD₃OD. oxim-1-ment



Para demostrar la presencia de los grupos hidroxilo, se llevó a cabo la reacción de acetilación del 3,6-dihidroxi-1-menteno 3-O- β -D-glucopiranosido (**27**) utilizando anhídrido acético con piridina, la mezcla de reacción se calentó a 45 °C por un periodo de 4 horas, obteniendo el derivado peracetilado **28**, **Esquema 3**.



Esquema 3. Obtención del derivado peracetilado **28**.

En el espectro de RMN de ^1H para el derivado **28** podemos observar cinco señales simples, correspondientes a los metilos de acetilo entre 2.08 - 2.01 ppm, asignadas a CH_3 -14', CH_3 -10', CH_3 -8', CH_3 -12' y CH_3 -12; cuatro grupos acetilo se incorporaron a la glucosa y uno al monoterpeno, respectivamente. La aparición de estas nuevas señales en el espectro de RMN de ^1H indica la formación del glucósido de *p*-menteno peracetilado **28**, **Figura 14**. En el espectro de RMN de ^{13}C , **Figura 15**, se aprecian 26 señales correspondientes a **28**; se encuentran cinco señales de carbonilo de acetilo entre 171.0 - 169.3 ppm, correspondientes a los carbonos C-13', C-9', C-11, C-11' y C-7', además cinco señales de los metilos de acetilo entre 21.2 - 20.56 ppm, correspondientes a los carbonos C-14', C-10', C-8', C-12' y C-12. La asignación total de la estructura se llevó a cabo mediante el experimento HMBC (Ver parte experimental).

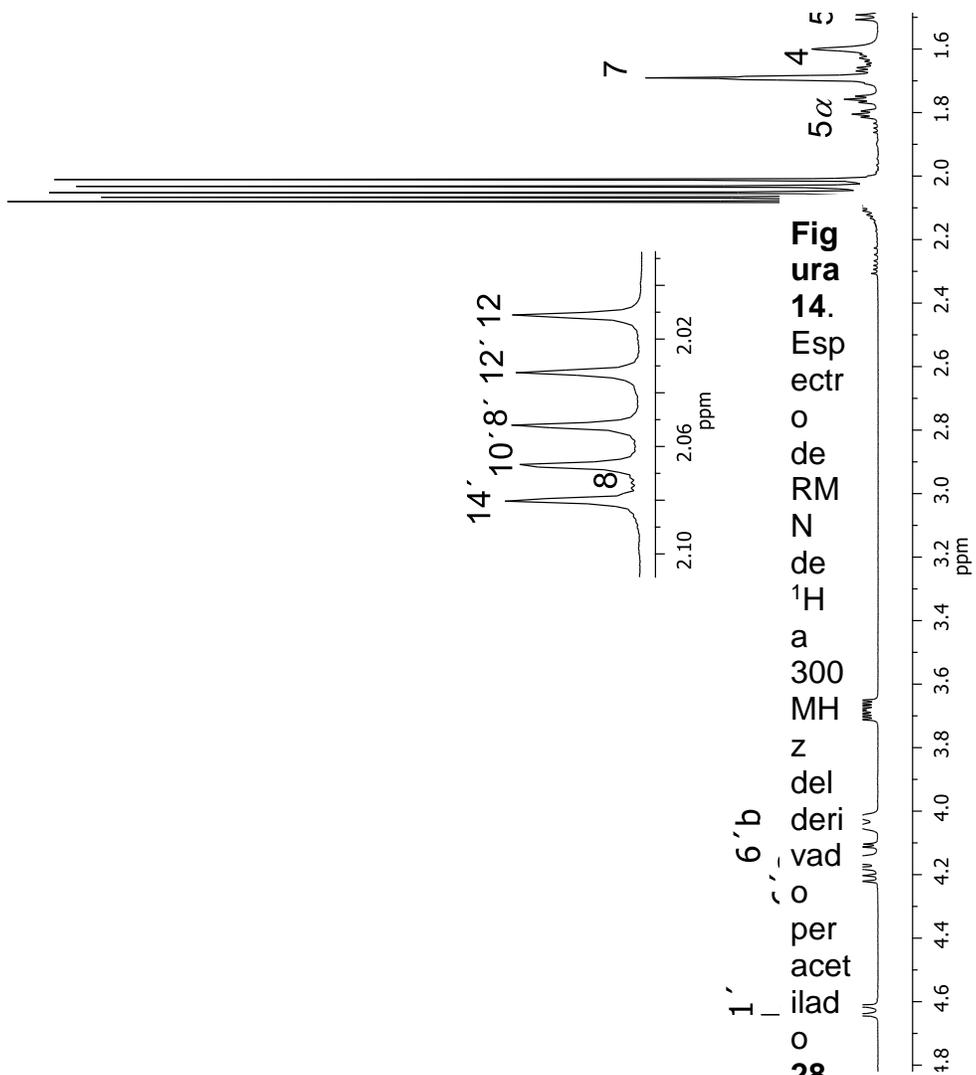
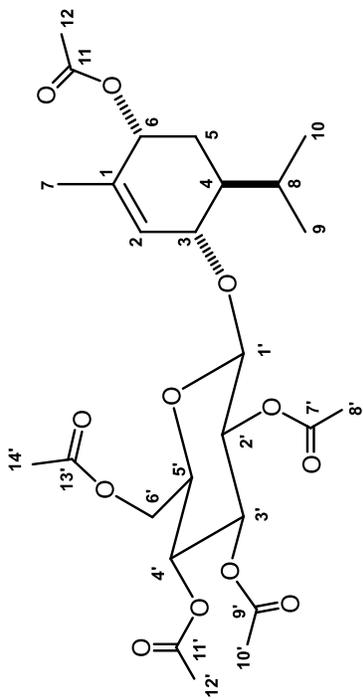
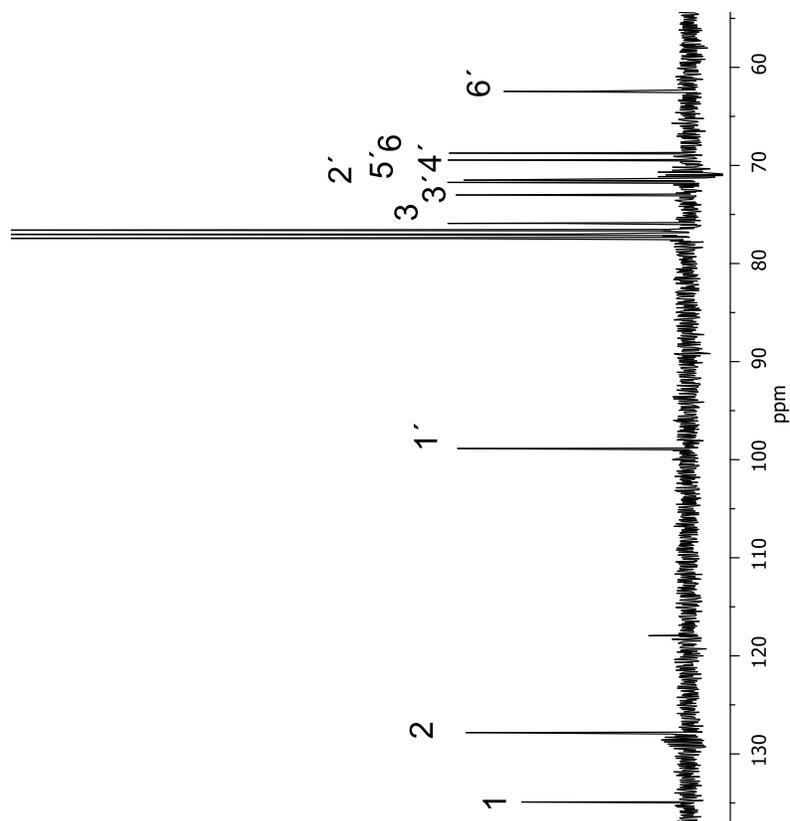


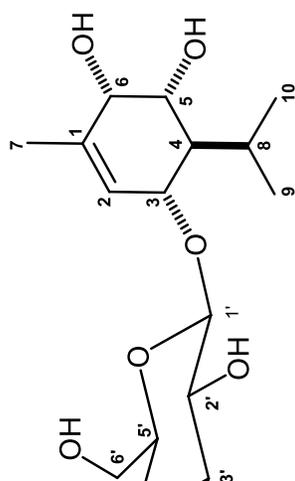
Figura 14. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz del derivado peracetilado **28** en CDCl_3 .

Espectro de RMN de ^{13}C a 75.4 MHz



El segundo compuesto aislado muestra espectros de RMN similares al glucósido **27**, lo que permite proponer que ambos tienen estructuras químicas muy cercanas. Se observa una señal múltiple en 5.69 ppm, correspondiente al protón vinílico H-2, además en 4.19 ppm aparece una señal doble ancha con una $J = 7.9$ Hz, correspondiente al protón base de oxígeno en la posición H-3 y en 3.81 ppm se muestra una señal doble con una $J = 3.8$ Hz, correspondiente al protón base de alcohol en la posición H-6, adicionalmente, en 3.55 ppm se aprecia una señal doble de dobles con $J = 10.5$ y 3.8 Hz, correspondiente a un protón base de alcohol en la posición H-5, además entre 2.17 – 1.05 ppm se observan el resto de las señales, correspondientes al metilo vinílico CH₃-7 y a los protones del grupo isopropilo. Por último, se aprecia en 4.43 ppm una señal doble con $J = 8.0$ Hz, correspondiente al protón anomérico de la glucosa H-1' y las demás señales características de los protones bases de oxígeno pertenecientes a la glucosa entre 3.86 - 3.15 ppm, **Figura 16**. En el espectro de RMN de ¹³C, **Figura 17**, se observan señales características de glucosa entre 101.6 - 63.0 ppm, además de 10 carbonos lo que indican que la aglicona corresponde a un monoterpreno, se observan dos señales en 137.7 y 125.7 ppm, correspondientes a los carbonos vinílicos C-1 y C-2,

respectivamente. Las señales encontradas en 75.0, 71.6 y 70.8 ppm, corresponden a los carbonos base de oxígeno C-3, C-6 y C-5, respectivamente. En 46.5 y 27.0 ppm se aprecian las señales de los carbonos metínicos C-4 y C-8, respectivamente. Además, en 20.8 ppm la señal del metilo vinílico C-7 y las señales características de los metilos de isopropilo en 21.4 y 19.3 ppm.



**Fi
g
u
r
a
1
6.
E
s
p
e
c
t
r
o
d
e
R
M
N
d**

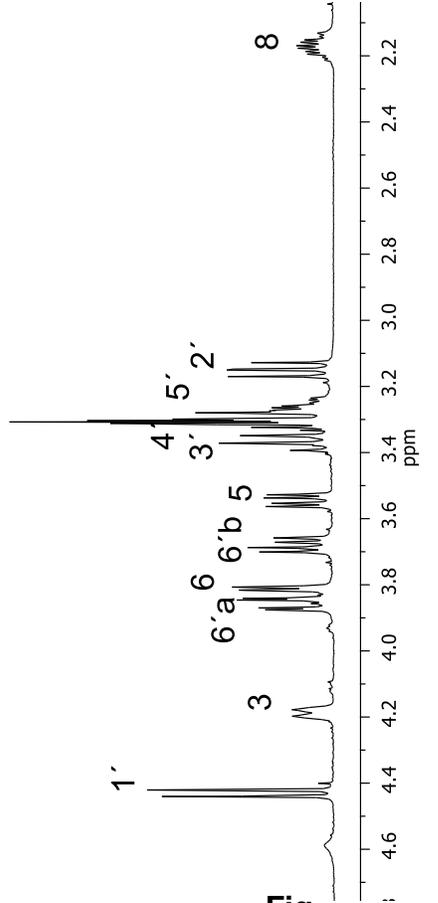
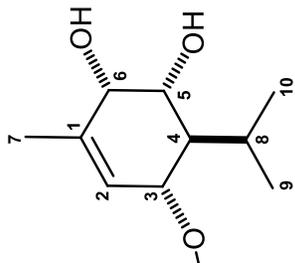
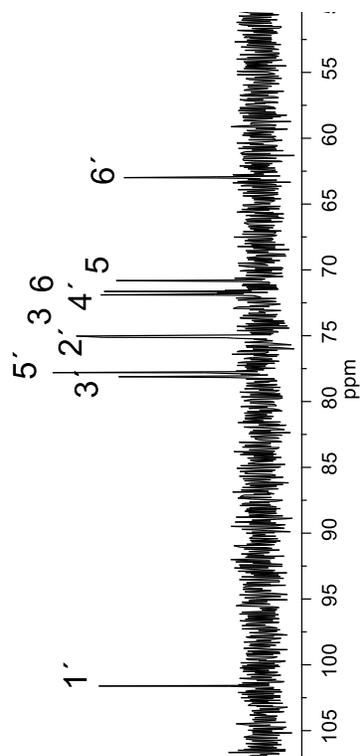


Figura 17. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del 3,5,6-trihidroxi-1-metilciclohexano.



Para confirmar la asignación del espectro de RMN de ^1H del compuesto **29** se llevó a cabo el experimento COSY, **Figura 18**. Se puede observar que el hidrógeno base de oxígeno H-3 correlaciona con el hidrógeno vinílico H-2 en 5.69 ppm y también con el hidrógeno metínico base de isopropilo H-4 en 1.84 ppm. También se puede apreciar la correlación del hidrógeno base de alcohol H-5 con el hidrógeno base de alcohol H-6 en 3.81 ppm.

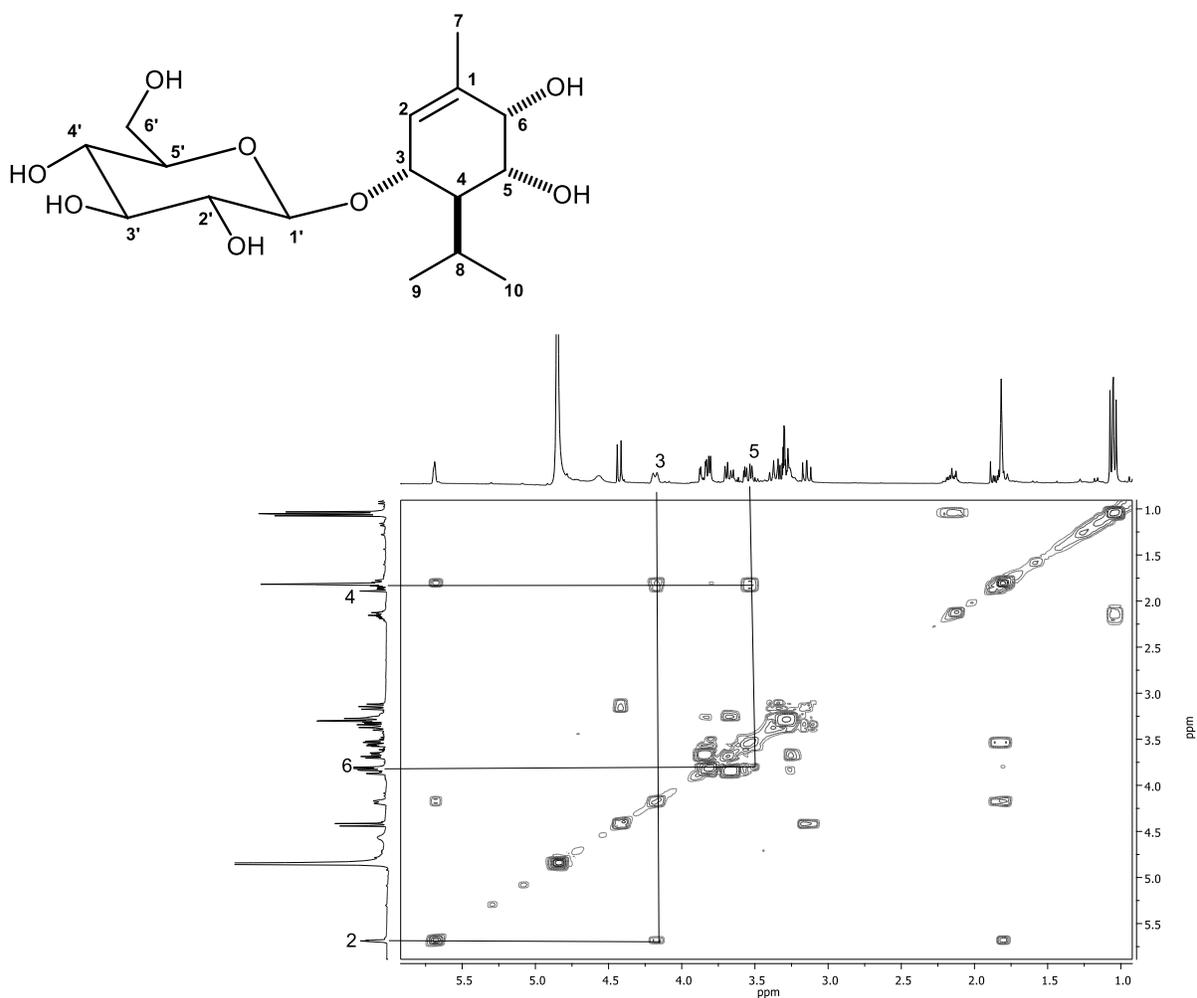


Figura 18. Espectro COSY del 3,5,6-trihidroxi-1-menteno 3-O- β -D-glucopiranosido (**29**).

El espectro de RMN de ^{13}C del compuesto **29** fue asignado en base al experimento HSQC, **Figura 19**. Se puede apreciar que la señal en 4.19 ppm en la escala de hidrógeno asignada para el hidrógeno base de éter H-3 correlaciona con la señal en 75.0 ppm en escala de carbono, por lo que esta señal corresponde a C-3. De la misma manera la señal en 3.81 ppm correspondiente al hidrógeno base de hidroxilo H-6 correlaciona con la señal en 71.6 ppm por lo tanto a esta señal se le asigna al C-6. Por último, se observa que la señal en 3.55 ppm en la escala de hidrógeno asignada para el hidrógeno base de hidroxilo H-5 correlaciona con la señal en 70.8 ppm en escala de carbono, por lo que esta señal corresponde a C-5.

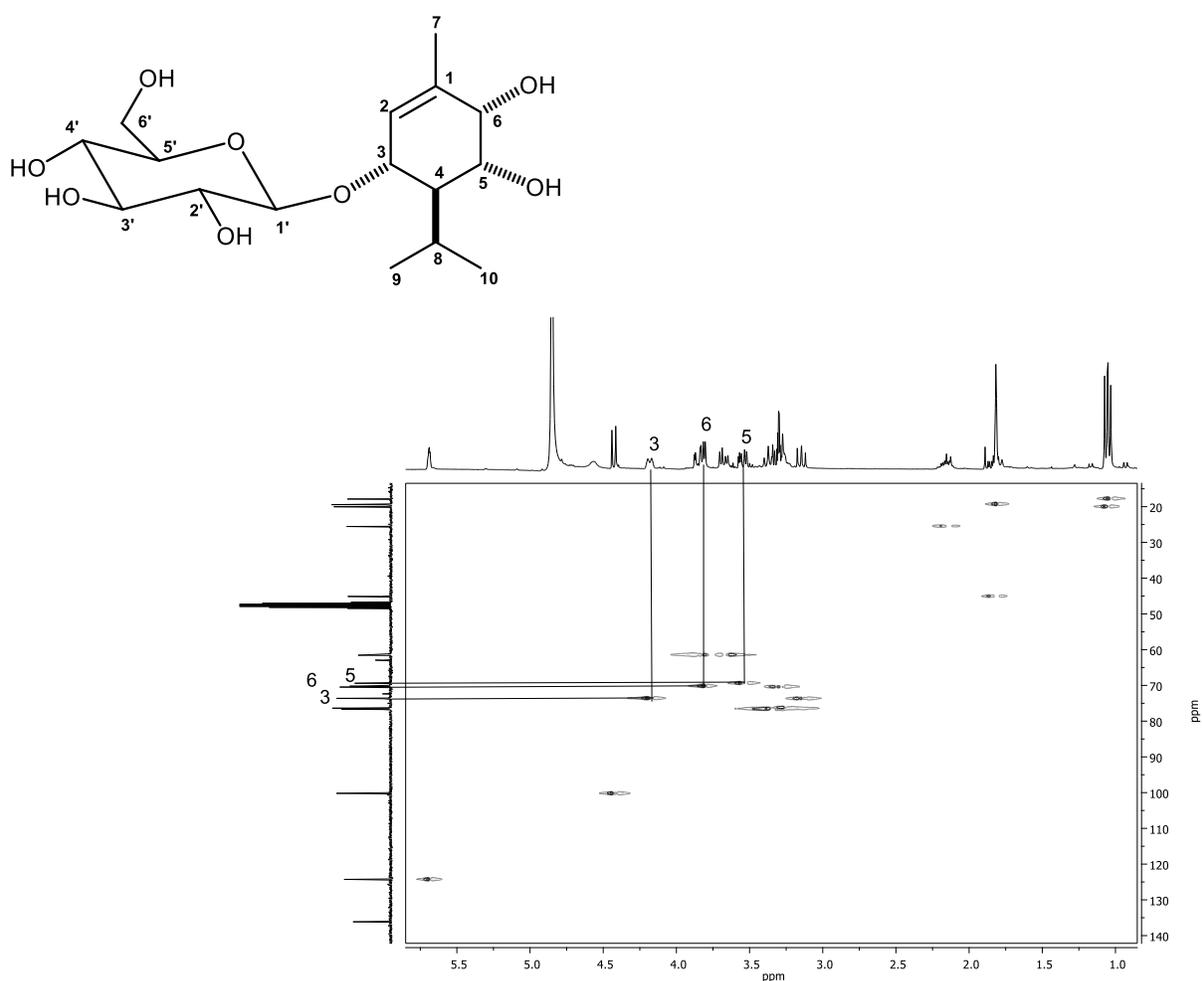


Figura 19. Espectro HSQC del 3,5,6-trihidroxi-1-menteno 3-O-β-D-glucopiranosido (**29**).

En el experimento HMBC del compuesto **29**, se pueden observar las correlaciones del hidrógeno base de oxígeno H-3 que se encuentra en 4.19 ppm con el carbono vinílico C-2 en 125.7 ppm y con el carbono base de isopropilo C-4 en 46.5 ppm, también se observa la correlación con el carbono anomérico de la glucosa C-1' en 101.6 ppm, lo que indica que la glucosa se encuentra sustituida en el carbono C-3, **Figura 20**.

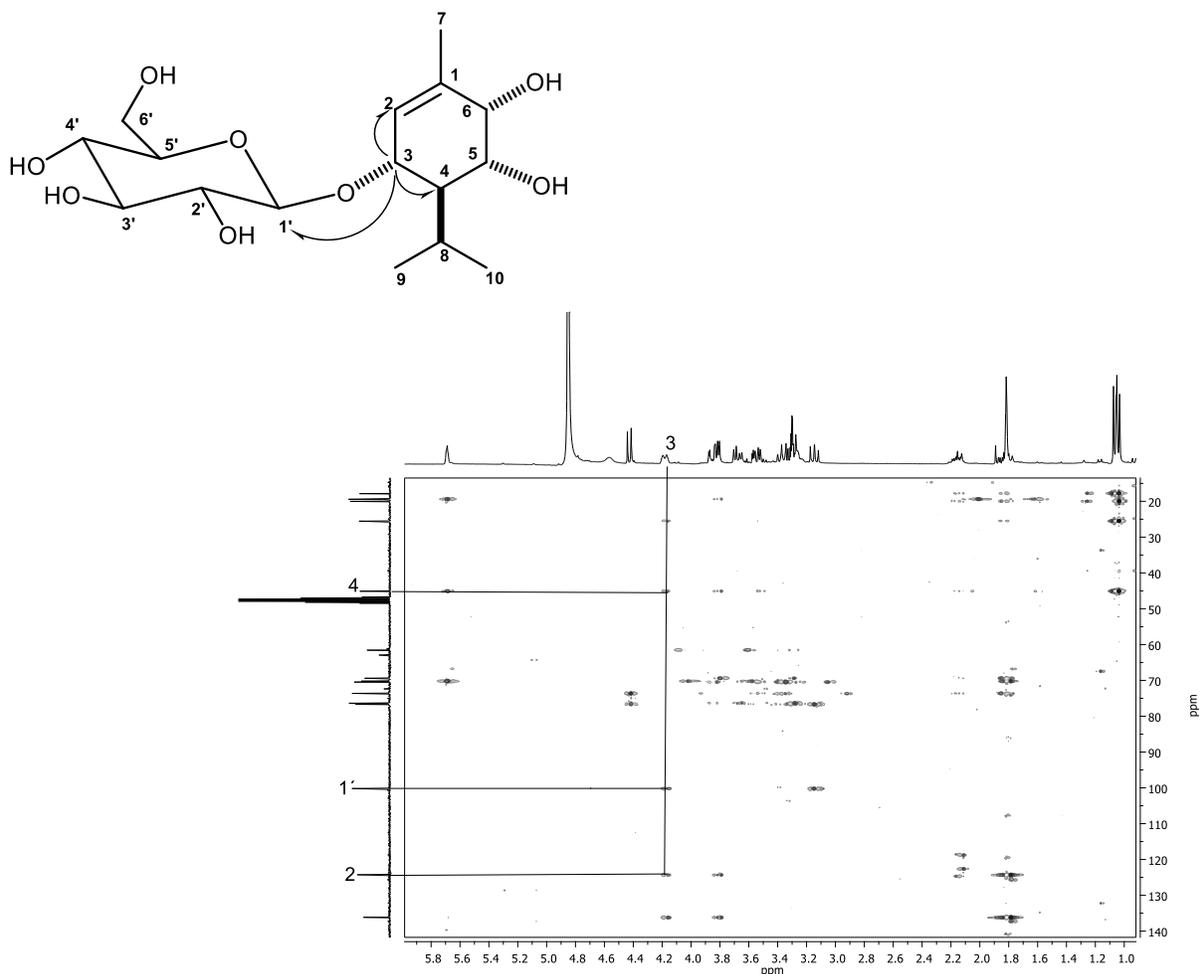


Figura 20. Espectro HMBC del 3,5,6-trihidroxi-1-menteno 3-O-β-D-glucopiranosido (**29**).

Con ayuda del experimento NOESY, **Figura 21**, se propuso la configuración relativa del compuesto **29**, ya que se puede observar que la señal que aparece en 3.55 ppm asignada para el hidrógeno base de alcohol H-5 correlaciona en 3.81 ppm con la señal del hidrógeno base de alcohol asignado en la posición H-6 y con el hidrógeno base de oxígeno H-3 en 4.19 ppm, por lo tanto, los grupos funcionales alcohol y oxígeno de éter se proponen en posición α , ya que no se observa correlación con el hidrógeno metínico H-4 el cual se propone en posición β .

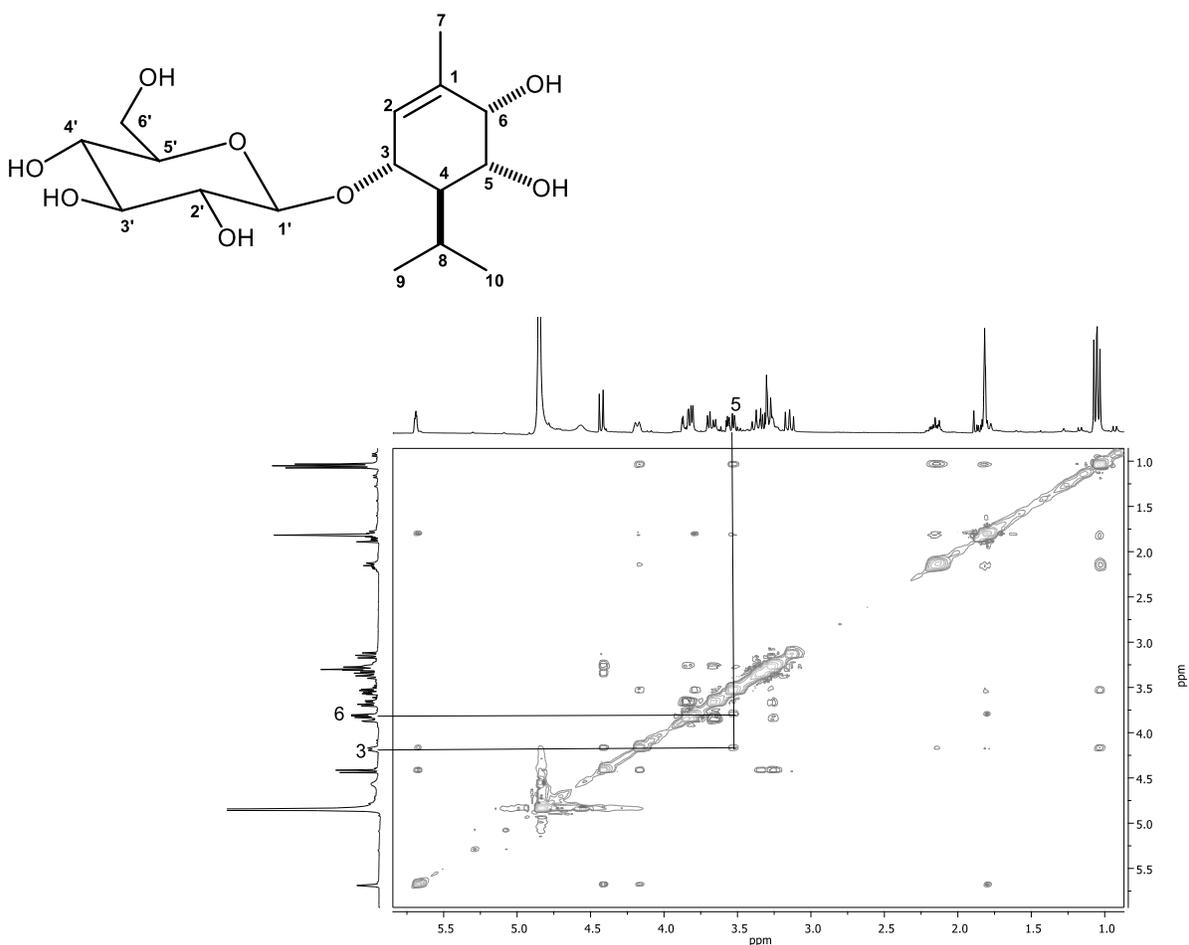
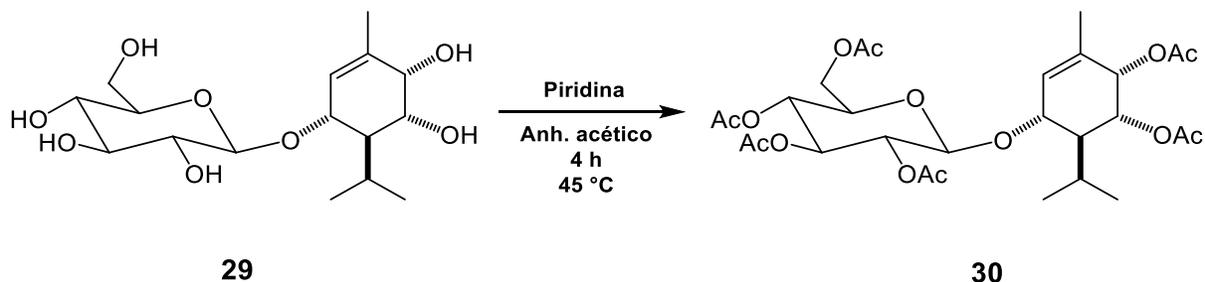


Figura 21. Espectro NOESY del 3,5,6-trihidroxi-1-menteno 3-O- β -D-glucopiranosido (**29**).

En base a los datos de RMN de 1D y 2D obtenidos se propone la estructura del compuesto **29** el cual corresponde al 3,5,6-trihidroxi-1-menteno 3-O- β -D-glucopiranosido, llevando a cabo una búsqueda en la literatura se encontró que **29**, corresponde a un compuesto novedoso.

La peracetilación del 3,5,6-trihidroxi-1-menteno 3-O- β -D-glucopiranosido (**29**) se llevó a cabo bajo las condiciones descritas en el **Esquema 3**, obteniendo así el derivado acetilado **30**, **Esquema 4**.



Esquema 4. Obtención del derivado peracetilado **30**.

En el espectro de RMN de ^1H , **Figura 22**, para el derivado peracetilado **30** se aprecian seis señales simples de metilos de acetilo entre 2.12 - 2.00 ppm, asignadas a $\text{CH}_3\text{-14}$, $\text{CH}_3\text{-10}'$, $\text{CH}_3\text{-12}'$, $\text{CH}_3\text{-14}'$, $\text{CH}_3\text{-12}$ y $\text{CH}_3\text{-8}'$; cuatro a la glucosa y dos al monoterpeno, respectivamente. La aparición de estas nuevas señales en el espectro de RMN de ^1H confirma la formación de **30**. En el espectro de RMN de ^{13}C , **Figura 23**, se observan 28 señales; se aprecian seis señales de carbonilo de acetilo en 170.9 - 169.3 ppm, correspondientes a los carbonos C-13, C-13', C-9', C-11, C-11' y C-7', además seis señales de los metilos de acetilo en 20.97 - 20.60 ppm, correspondientes a los carbonos C-14, C-10', C-12', C-14', C-12 y C-8'. La asignación total de la estructura se llevó a cabo mediante el experimento HMBC. (Ver parte experimental).

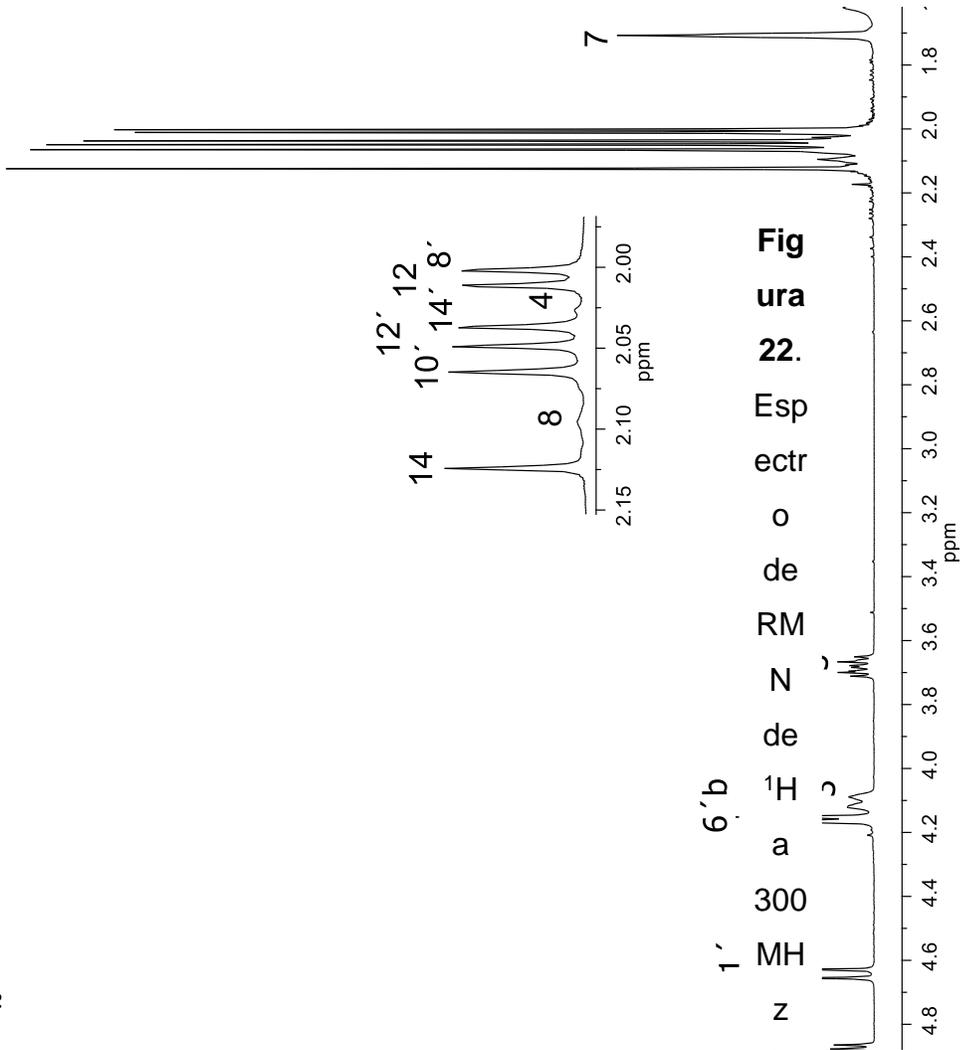
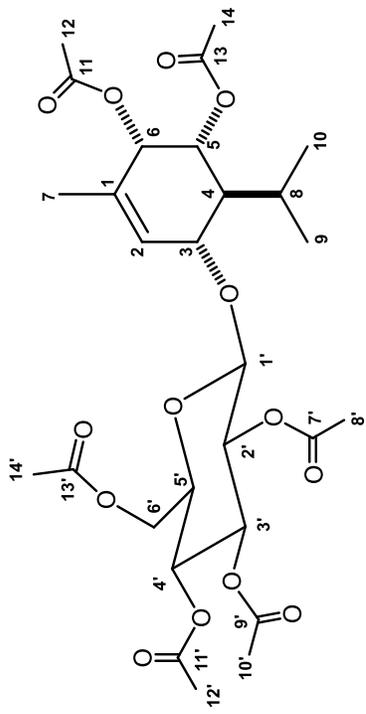
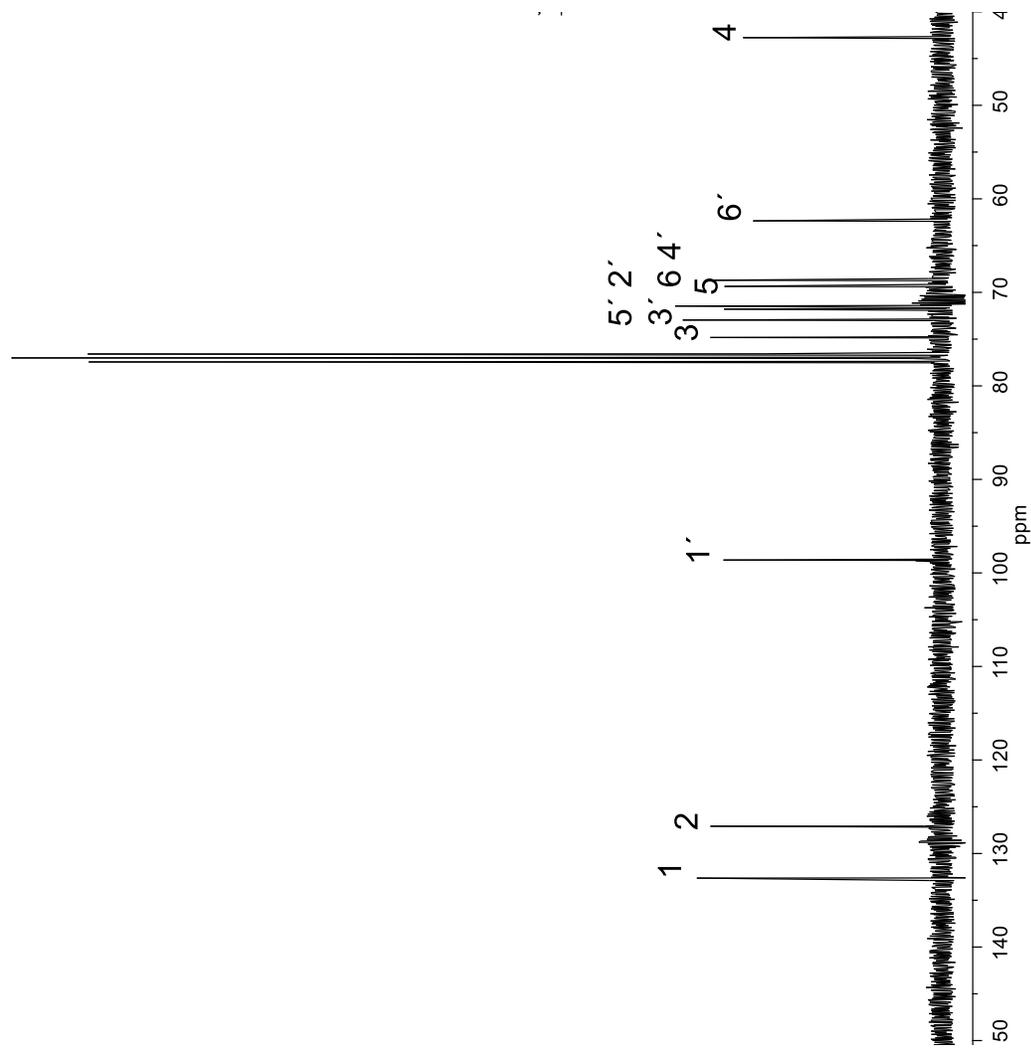


Figura 22. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz del derivado peracilado

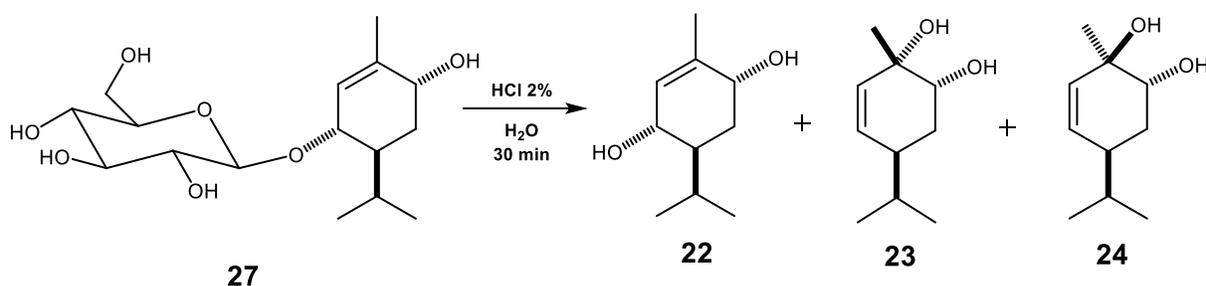
Figura 23. Espectro de RMN de



Del extracto metanólico de flores de *A. glabrata* únicamente se encontraron los *p*-mentenos **27** y **29**, por lo que se continuó con la búsqueda exhaustiva de *p*-mentenos en los extractos metanólicos de hojas y tallos.

Como resultado de la purificación se obtuvieron e identificaron nuevamente a **27** y **29** por lo que se procedió a la búsqueda de **22-26** mediante la reactividad de los *p*-mentenos naturales obtenidos bajo condiciones ácidas.

El tratamiento ácido para el 3,6-dihidroxi-1-menteno 3-*O*- β -D-glucopiranosido (**27**) se llevó a cabo en las mismas condiciones que se llevó a cabo el tratamiento ácido del extracto metanólico, el crudo de reacción fue purificado en columna cromatográfica donde se obtuvieron e identificaron al 3,6-dihidroxi-1-menteno (**22**), 1,6-dihidroxi-2-menteno (**23**) y 1,6-dihidroxi-1-*epi*-2-menteno (**24**), **Esquema 5**.



Esquema 5. Tratamiento ácido de **27**.

En los espectros de RMN de ^1H , **Figura 24**, del crudo de reacción (**A**), así como de los derivados del *p*-menteno; **22** (**B**), **23** (**C**) y **24** (**D**), podemos apreciar entre 5.71 - 5.53 ppm las señales de protones vinílicos, además entre 4.01 - 3.75 ppm se observan señales de protones bases de oxígenos y también entre 2.24 - 0.82 ppm señales de protones; metínicos, metilenos y metilos. Cabe mencionar que los derivados del *p*-menteno **22-26** fueron iguales con los reportados en un estudio anterior,³⁶ estos resultados concuerdan con los datos de RMN de 1D y 2D, por lo que se trata de las mismas estructuras químicas anteriormente caracterizadas. Por lo tanto, queda demostrado que el derivado glicosilado del *p*-menteno **27** da origen a los productos **22-24** mediante tratamiento ácido.

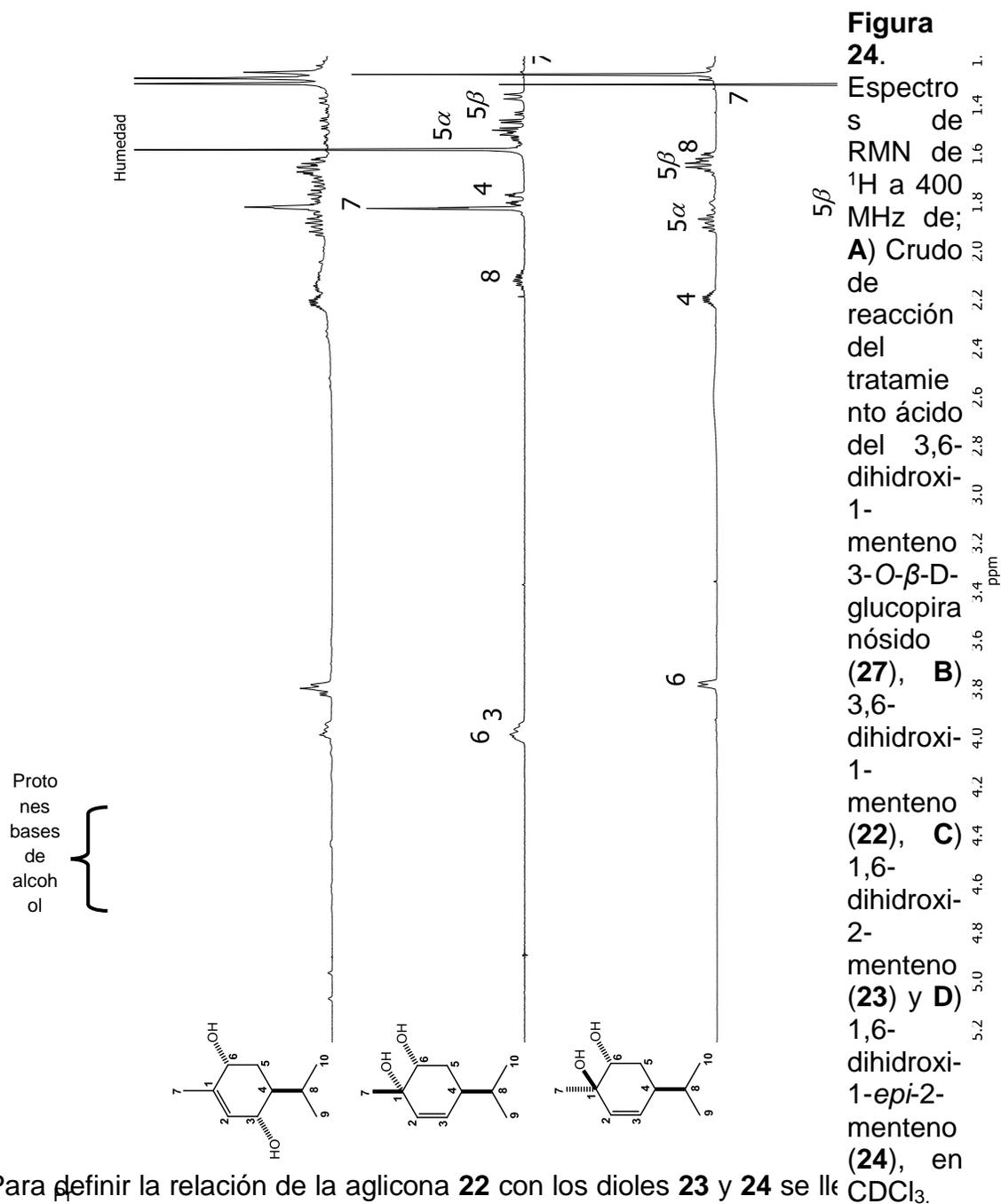
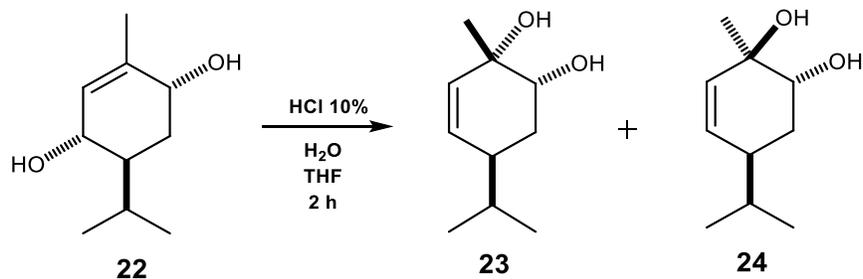


Figura 24.

Espectros de RMN de ^1H a 400 MHz de; **A)** Crudo de reacción del tratamiento ácido del 3,6-dihidroxi-1-menteno 3-O- β -D-glucopiranosido (**27**), **B)** 3,6-dihidroxi-1-menteno (**22**), **C)** 1,6-dihidroxi-2-menteno (**23**) y **D)** 1,6-dihidroxi-1-*epi*-2-menteno (**24**), en CDCl_3 .

Para definir la relación de la aglicona **22** con los dioles **23** y **24** se llevó a cabo un tratamiento ácido para este compuesto bajo las condiciones descritas en el **Esquema 6**. En la **Figura 25** se muestra el espectro de RMN de ^1H de la reacción donde se observa la materia de partida **22**, así como las señales de los productos de reacción **23** y **24**, en proporción 7:10:7, respectivamente. Este procedimiento permitió establecer a **22** como intermediario en la formación de **24**.



Esquema 6. Tratamiento ácido del 3,6-dihidroxi-1-menteno (**22**).

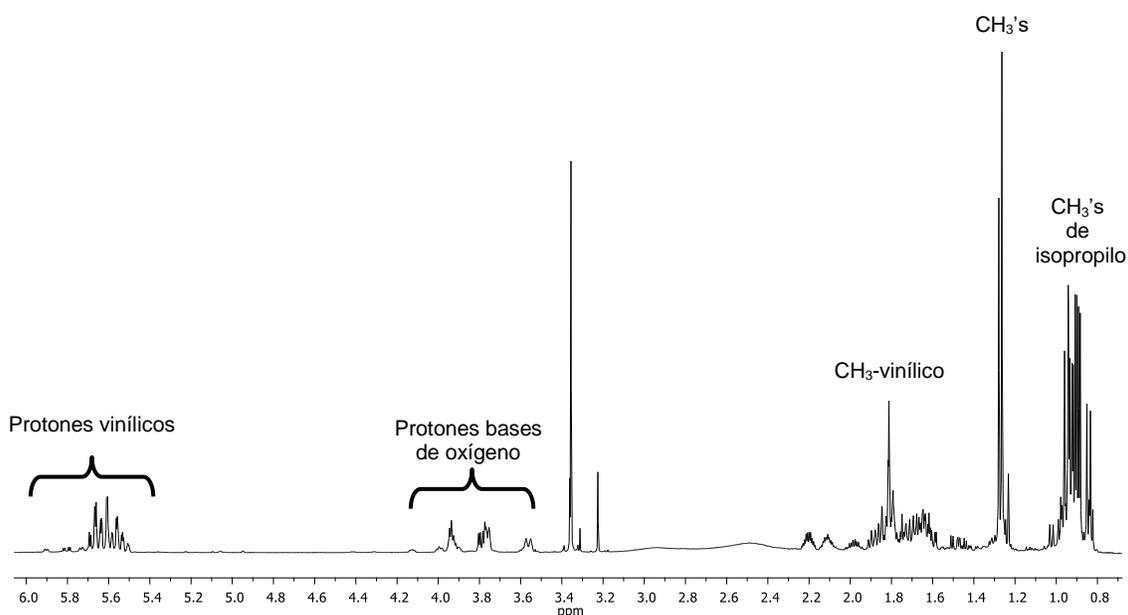
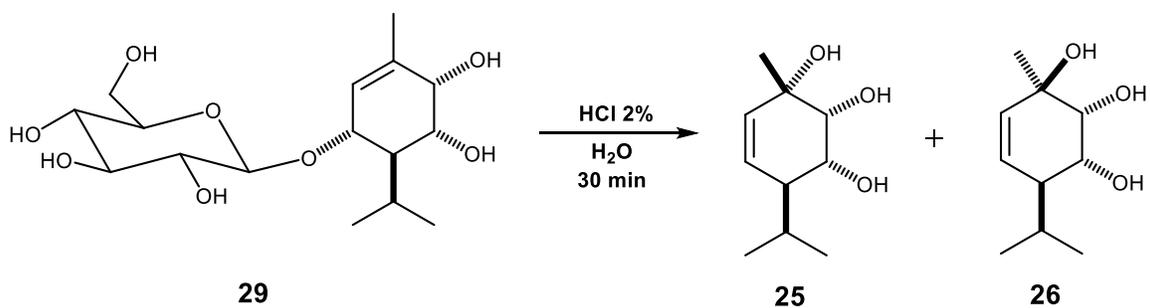


Figura 25. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del crudo de reacción del tratamiento ácido del 3,6-dihidroxi-1-menteno (**22**) en CD_3OD .

De la misma manera que para el glucósido **27**, se llevó a cabo el tratamiento ácido para el 3,5,6-trihidroxi-1-menteno 3-*O*- β -D-glucopiranosido (**29**) bajo las condiciones descritas en el **Esquema 7**, el crudo de reacción fue purificado en columna cromatográfica donde se obtuvieron a los derivados 1,5,6-trihidroxi-2-menteno (**25**) y 1,5,6-trihidroxi-1-*epi*-2-menteno (**26**), en proporción 1:1, respectivamente.



Esquema 7. Tratamiento ácido de **29**.

En los espectros de RMN de ¹H, **Figura 26**, del crudo de reacción (**A**), así como de los derivados del *p*-menteno **25** (**B**) y **26** (**C**) se observan entre 5.70 - 5.58 ppm las señales de protones vinílicos, además entre 4.00 - 3.65 ppm aparecen señales de protones bases de oxígeno, también entre 2.22 - 1.76 ppm se encuentran señales de protones metínicos y entre 1.42 - 0.83 ppm señales de metilos. Estos datos fueron iguales con los reportados en un estudio anterior,³⁶ por lo que se tratan de las mismas estructuras químicas. Con estos resultados se establece que el derivado glucosilado del *p*-menteno **29** da origen a los productos **25** y **26** mediante tratamiento ácido.

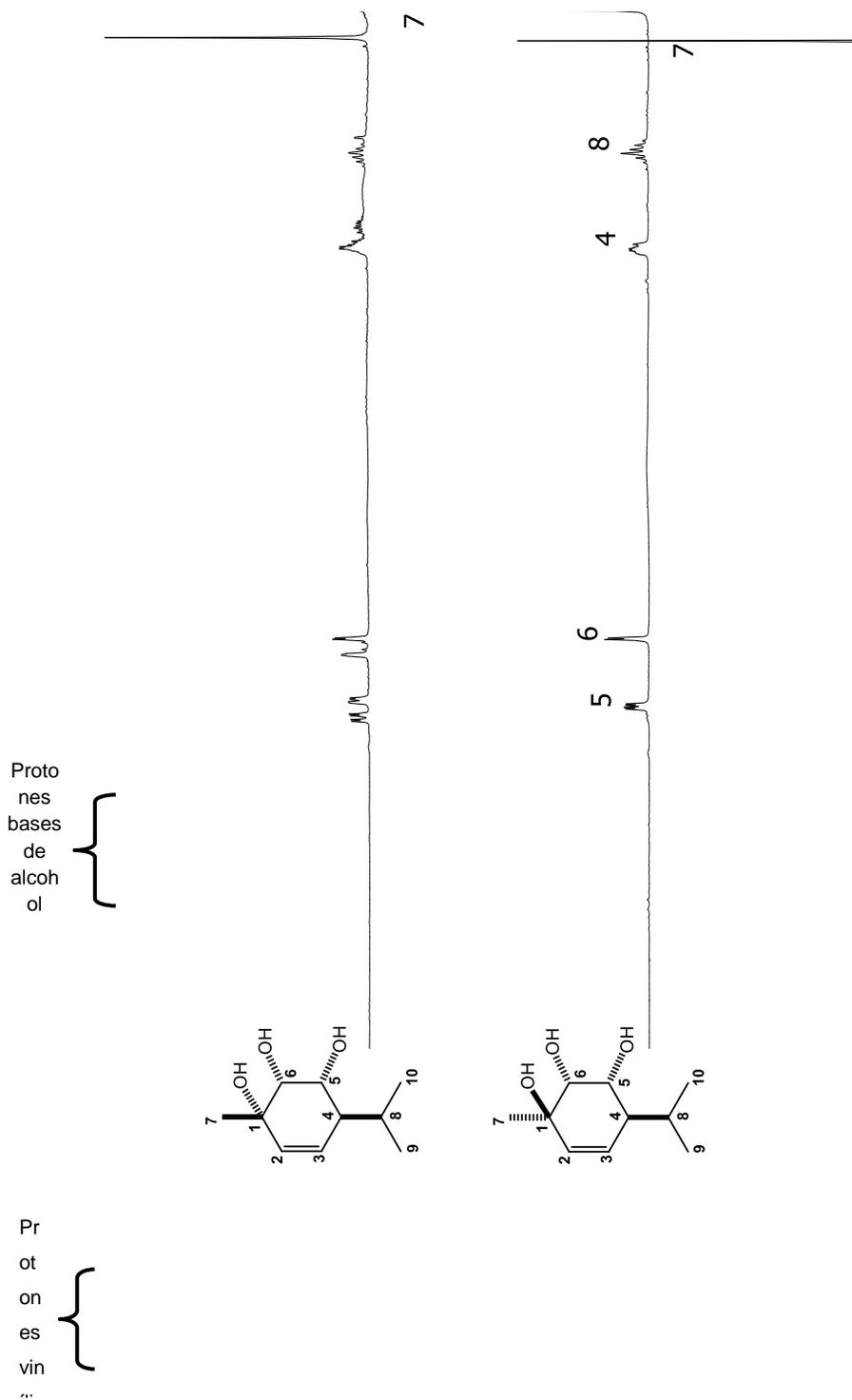
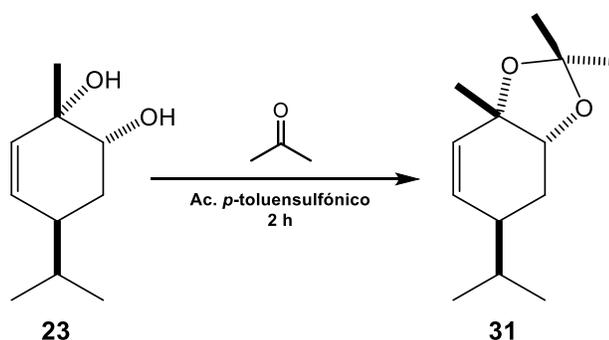


Figura 26. Espectros de RMN de ^1H a 400 MHz de; **A)** Crudo de reacción del tratamiento o ácido del 3,5,6-trihidroxi-1-menteno 3-O- β -D-glucopiranosido (**29**), **B)** 1,5,6-trihidroxi-2-menteno (**25**) y **C)** 1,5,6-trihidroxi-1-*epi*-2-menteno (**26**), en CDCl_3 .

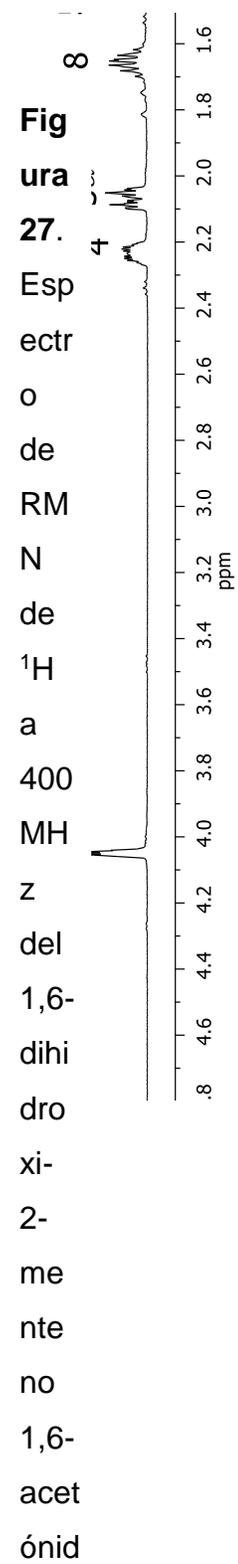
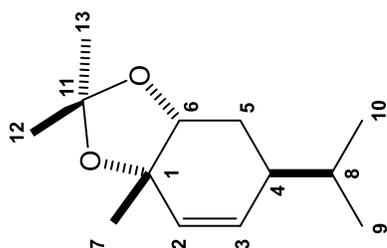
Establecida la procedencia de los *p*-mentenos **22-26**, se inició el estudio de la determinación de la configuración absoluta de estos y de los *p*-mentenos naturales **27** y **29**, por Dicroísmo Circular Vibracional (DCV). Empleando derivados estratégicos se decidió preparar al acetónido **31** a partir del epímero **23** ya que este posee los 1,6-dioles en posición *cis* y genera restricción conformacional.

La preparación del acetónido **31** se llevó a cabo con acetona y ácido *p*-toluensulfónico mediante agitación a temperatura ambiente obteniendo una miel incolora, **Esquema 8**.



Esquema 8. Derivado acetónido del 1,6-dihidroxi-2-menteno (**23**).

En su espectro de RMN ^1H del 1,6-dihidroxi-2-menteno 1,6-acetónido (**31**), **Figura 27**, se observa en 4.05 ppm la señal del H-6 base de acetónido y la aparición de dos señales en 1.38 y 1.36 ppm, correspondientes a los metilos del acetónido, respectivamente. El resultado obtenido del espectro de masa de alta resolución (HREIMS) correspondió a la masa esperada para el acetónido **31**, con una m/z 195.1387 $[\text{M} - \text{CH}_3]^+$ (calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{O}_2^+$, 195.1380). Los datos espectroscópicos fueron iguales a los reportados en un trabajo previo.³⁶



Del 1,6-dihidroxi-2-menteno 1,6-acetónido (**31**), se obtuvieron sus espectros experimentales de IR y DCV. De manera conjunta se llevaron a cabo los cálculos computacionales para la obtención de sus espectros teóricos de IR y DCV. Para esto, se modeló a **31** con base en la configuración relativa establecida por NOESY.

La búsqueda de los conformeros para **31**, se realizó mediante el programa Spartan'04, con mecánica molecular por el método MMFF donde se obtuvieron seis conformeros. Posteriormente, fue optimizada la energía de los seis conformeros, usando teoría de funcionales de la densidad (DFT), con el método B3LYP, y un nivel de teoría 6-31G**. Se seleccionaron a aquellos conformeros ubicados en una ventana energética de 0-3 kcal/mol (**31a-31c**). Estos conformeros fueron optimizados en geometría para finalmente obtener las frecuencias de DCV e IR. En la **Figura 28**, se muestran los conformeros más estables, así como su distribución de Boltzmann para cada conformero. En la **Tabla 2**, se muestra el análisis termoquímico llevado a cabo para **31**.

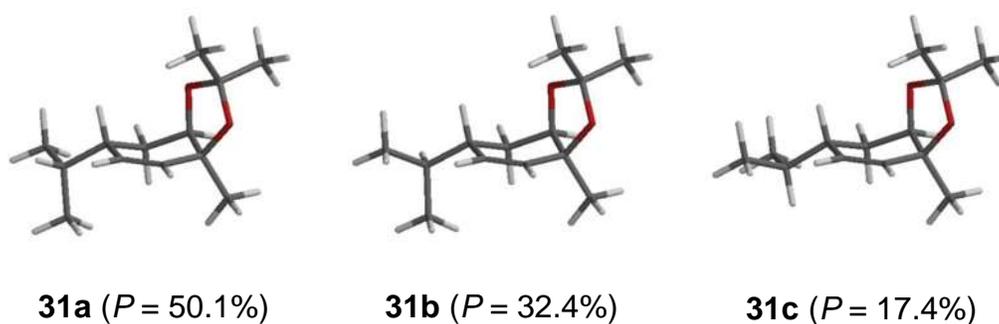


Figura 28. Conformeros poblacionales del 1,6-dihidroxi-2-menteno 1,6-acetónido (**31**).

Tabla 2. Análisis Termoquímico del 1,6-dihidroxi-2-menteno 1,6-acetónido (**31**).

Confórmero	ΔE_{MMFF}^a	%MMFF ^b	ΔE_{DFT}^c	%DFT ^d	ΔG_{OPT}^e	%OPT ^{f,g}
31a	0.00	47.1	0.00	42.3	0.00	50.1
31b	0.07	41.2	0.05	38.4	0.25	32.4
31c	0.85	11.2	0.47	19.0	0.62	17.4

^aMecánica molecular energías relativas a **31a** con $E_{MMFF} = 37.924$ kcal/mol.

^bPoblación en % calculada a partir de las energías MMFF según $\Delta E_{MMFF} \approx -RT \ln K$.

^cSingle-point B3LYP/6-31G(d) energías relativas a **31a** con $E_{6-31G(d)} = -413573.847$

kcal/mol. ^dPoblación en % calculada a partir de las energías de B3LYP/6-31G(d)

según $\Delta E_{6-31G(d)} \approx -RT \ln K$. ^eEnergías libres de Gibbs relativas a **31a** con

$G_{DFT/B3LYP/DGDZVP} = -413441.275$ kcal/mol. ^fPoblación en % calculada a partir de las

energías libres de Gibbs de acuerdo con $\Delta G = -RT \ln K$. ^g Los tres confórmeros

principales representan el 99.9% del total de la distribución de Boltzmann.

Los datos de las frecuencias calculadas fueron comparados estadísticamente con los datos experimentales en el programa CompareVOA, desarrollado por Biotools. Este programa nos permitió cuantificar el nivel de concordancia entre los espectros experimentales y calculados.

La comparación del espectro experimental y calculado (B3LYP/DGDZVP) del (+)-(1*S*,4*S*,6*R*)-1,6-dihidroxi-2-menteno 1,6-acetónido (**31**), proporcionó un factor de anarmonicidad anH = 0.98, la similitud espectral de DCV para el enantiómero correcto de 85.4% e incorrecto de 8.0%, el nivel de similitud entre los espectros de IR fue de 92.6%. El nivel de confianza para la determinación de la configuración absoluta fue del 100%.

En la **Figura 29**, se muestran las gráficas de los datos procesados de los espectros calculados y corregidos con el factor de anarmonicidad, así como la comparación entre espectros teóricos de IR y DCV con los espectros experimentales de **31**.

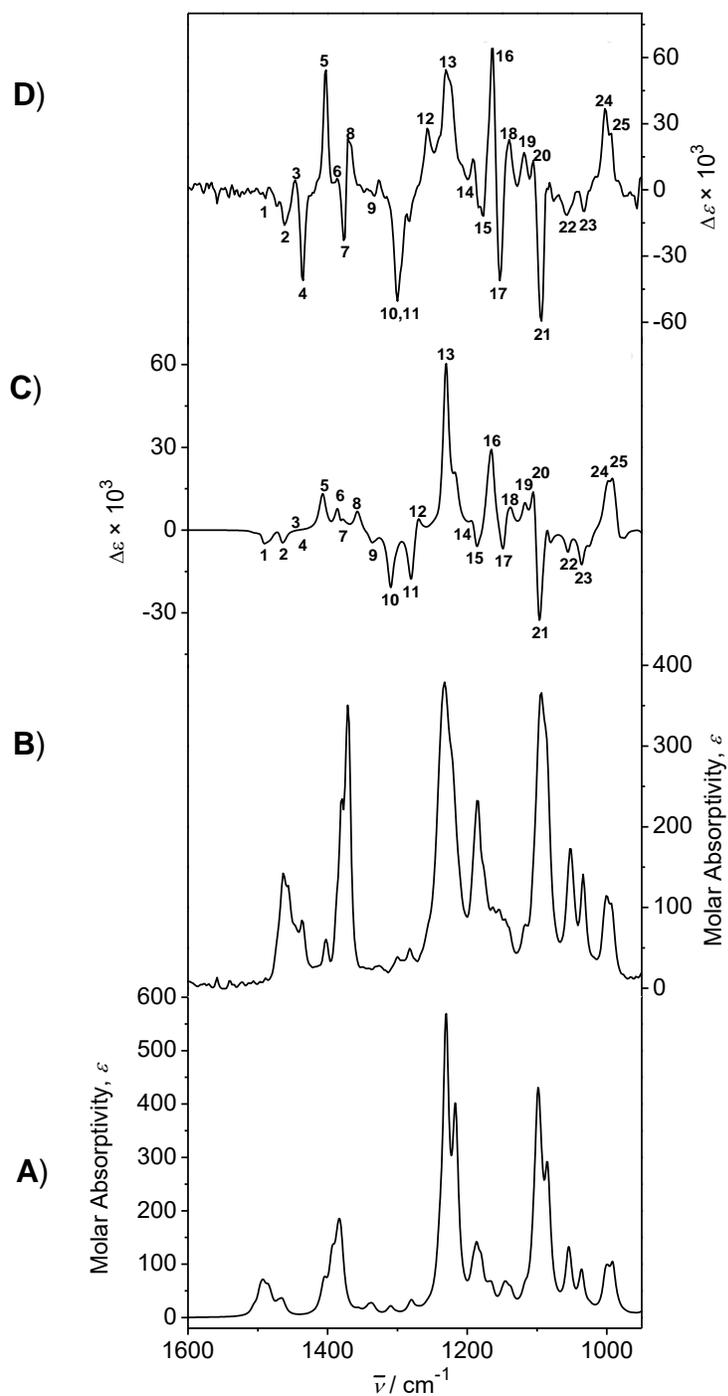


Figura 29. Espectros; **A)** IR teórico (B3LYP/DGDZVP, DFT), **B)** IR experimental, **C)** DCV teórico (B3LYP/DGDZVP, DFT) y **D)** DCV experimental del (+)-(1*S*,4*S*,6*R*)-1,6-dihidroxi-2-menteno 1,6-acetonido (**31**).

Con la configuración absoluta del (+)-(1*S*,4*S*,6*R*)-1,6-dihidroxi-2-menteno 1,6-acetónido (**31**) pudimos establecer la configuración absoluta de **23** como (+)-(1*S*,4*S*,6*R*)-1,6-dihidroxi-2-menteno (**23**) y de su epímero **24** como (+)-(1*R*,4*S*,6*R*)-1,6-dihidroxi-2-menteno (**24**), **Figura 30**.

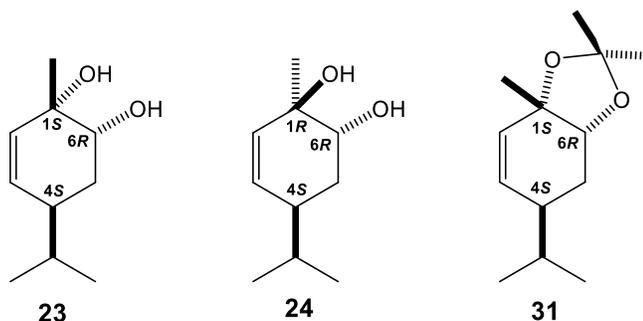


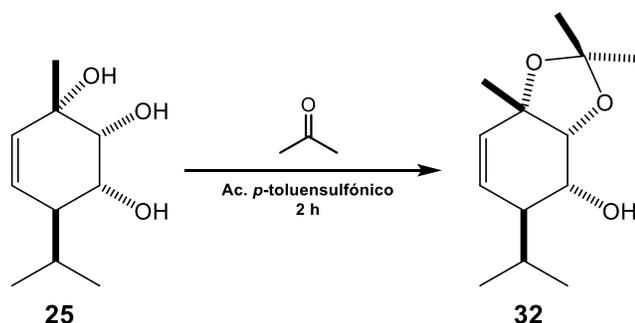
Figura 30. Configuración absoluta del acetónido **31** y los epímeros **23** y **24**.

El (+)-(1*S*,4*S*,6*R*)-1,6-dihidroxi-2-menteno (**23**) ha sido reportado previamente del aceite esencial de *Chenopodium multifidum*,³⁸ en este trabajo se describió la configuración absoluta de este compuesto mediante el método de Dicroísmo circular (DC), y los resultados reportados concordaron con el estudio de DCV.

Cabe mencionar que del derivado (+)-(1*R*,4*S*,6*R*)-1,6-dihidroxi-2-menteno (**24**) aislado de *Cacalia tangutica*⁴² proponen la misma estereoquímica que para **24** y el valor de la rotación específica descrita en este estudio fue de $[\alpha]_{\text{Na}} = -24$, mientras que la rotación específica reportada en este trabajo es de $[\alpha]_{\text{Na}} = +58$. Además, los autores proponen la estructura basándose en un estudio anterior donde la rotación específica reportada fue de $[\alpha]_{\text{Na}} = -23.7$, para el **ent-24**, aislado de *Alpinia densibracteata*,⁴³ por lo tanto se tratan de esteroestructuras distintas.

Por su parte la determinación de la configuración absoluta de los epímeros **25** y **26** se estableció por DCV a partir del acetato-acetónido **33**, empleando como precursor a **32**.

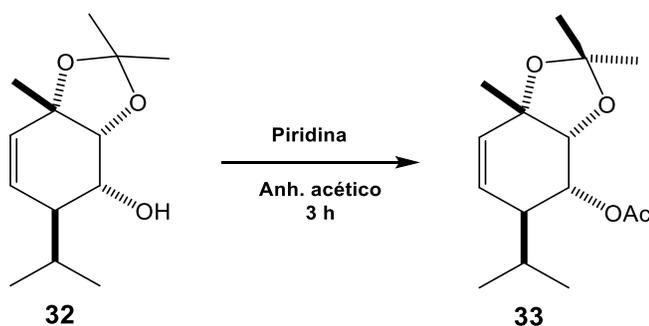
La preparación del acetónido **32** se llevó a cabo con una solución del triol **25** en acetona y ácido *p*-toluensulfónico mediante agitación a temperatura ambiente, obteniendo una miel incolora, **Esquema 9**.



Esquema 9. Derivado acetónido del 1,5,6-trihidroxi-2-menteno (**25**).

En su espectro de RMN de ^1H del 1,5,6-trihidroxi-2-menteno 1,6-acetónido (**32**), **Figura 31** se observa en 4.12 ppm la señal del protón H-6 base de acetónido y en 3.58 ppm se aprecia la señal del hidrógeno base de alcohol H-5, además en 1.41 y 1.38 ppm se encontraron las señales de los metilos del acetónido. Los datos espectroscópicos fueron iguales a los reportados en un trabajo previo.³⁶

A partir del derivado **32** se preparó su derivado acetilado **33**, utilizando piridina y anhídrido acético obteniéndose en forma de miel incolora, **Esquema 10**.



Esquema 10. Derivado acetilado del 1,5,6-trihidroxi-2-menteno 1,6-acetónido (**32**).

En el espectro de RMN de ^1H del 1,5,6-trihidroxi-2-menteno 5-acetoxi-1,6-acetónido (**33**), **Figura 32**, se aprecia un corrimiento de la señal del H-5 base de acetato observándose a campo bajo en 4.99 ppm como una señal doble de dobles con $J = 10.6$ y 2.4 Hz, lo que indica que se llevó a cabo la acetilación en la posición C-5. En 2.16 ppm se aprecia una señal simple correspondiente al metilo de acetilo. La aparición de estas nuevas señales en el espectro de RMN de ^1H indica la formación del derivado **33**.

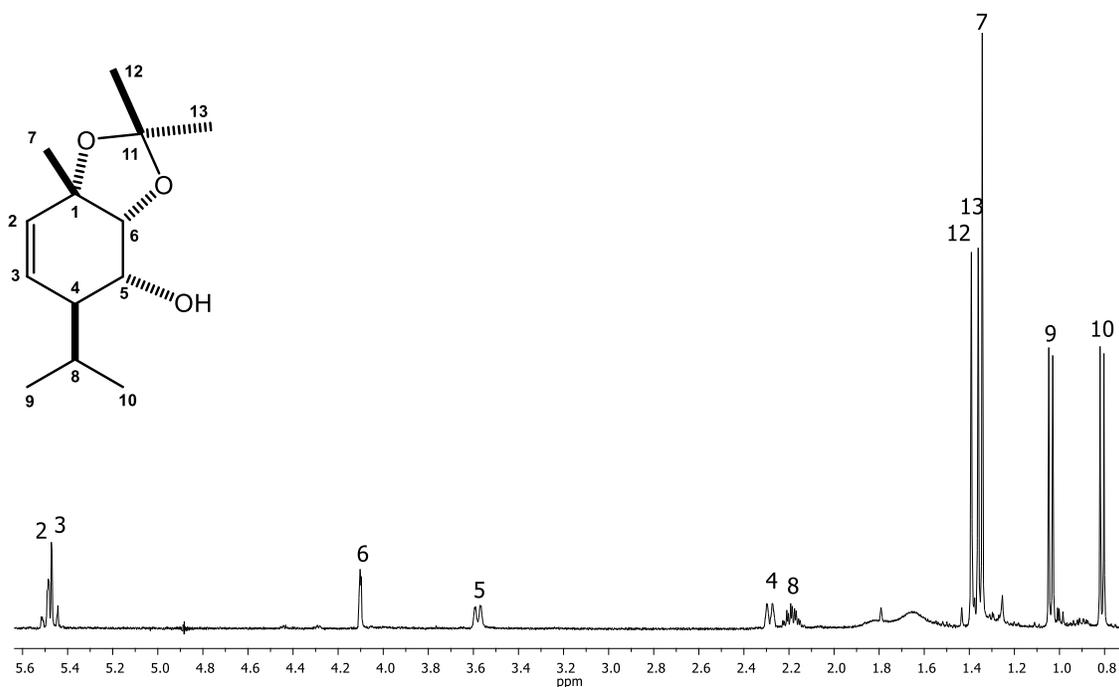


Figura 31. Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz del 1,5,6-trihidroxi-2-menteno 1,6-acetonido (**32**) en CDCl₃.

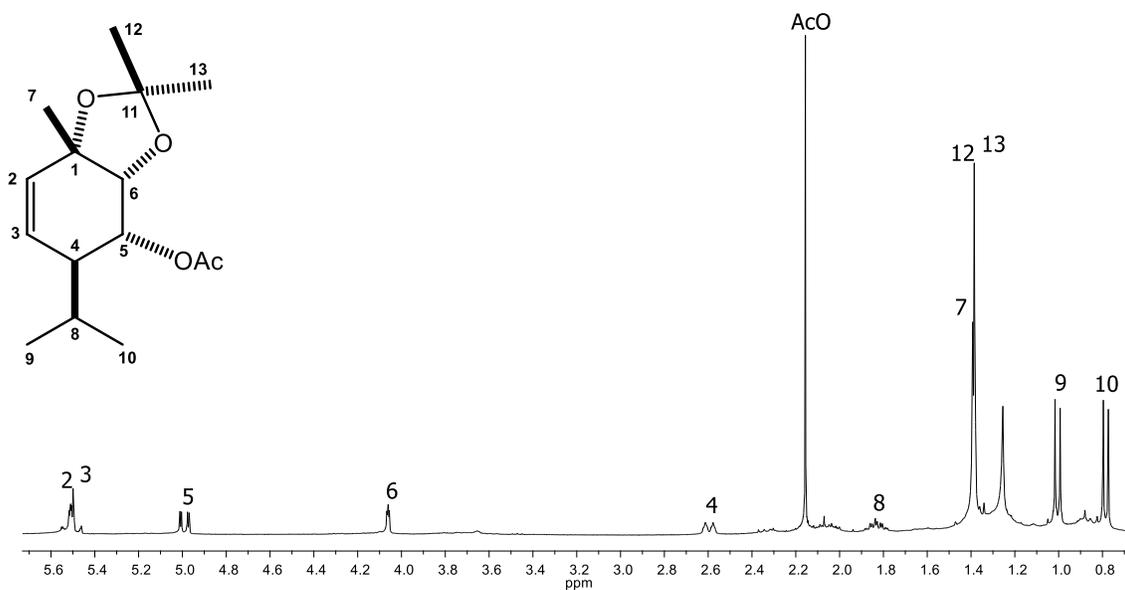


Figura 32. Espectro de RMN de ¹H a 300 MHz del 1,5,6-trihidroxi-2-menteno 5-acetoxi-1,6-acetonido (**33**) en CDCl₃.

Del 1,5,6-trihidroxi-2-menteno-5-acetoxi-1,6-acetónido (**33**), se obtuvieron sus espectros experimentales de IR y DCV. De manera conjunta se llevaron a cabo los cálculos computacionales para la obtención de sus espectros teóricos de IR y DCV. Para esto, se modeló a **33** con base en la configuración relativa establecida por NOESY.

La búsqueda de los conformeros para **33**, se realizó mediante el programa Spartan'04, con mecánica molecular por el método MMFF donde se obtuvieron nueve conformeros. Posteriormente, fue optimizada la energía de los nueve conformeros, usando teoría de funcionales de la densidad (DFT), con el método B3LYP, y un nivel de teoría 6-31G**. Se seleccionaron a aquellos conformeros ubicados en una ventana energética de 0-3 kcal/mol (**33a-33c**). Estos conformeros fueron optimizados en geometría para finalmente obtener las frecuencias de DCV e IR. En la **Figura 33**, se muestran los conformeros más estables, así como su distribución de Boltzmann para cada conformero. En la **Tabla 3** se muestra el análisis termoquímico llevado a cabo para **33**.

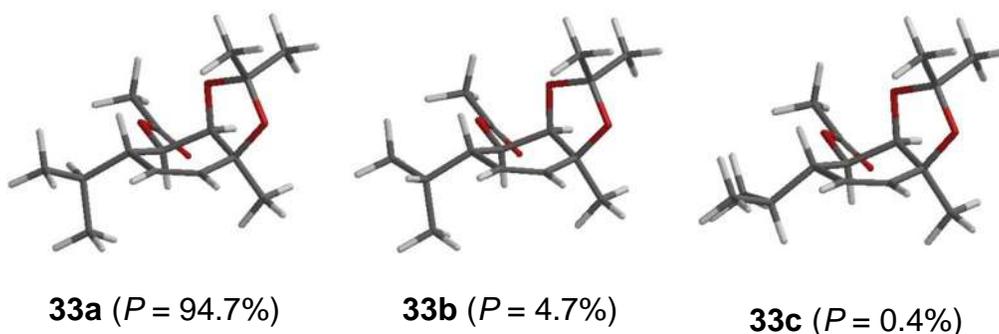


Figura 33. Conformeros poblacionales del 1,5,6-trihidroxi-2-menteno 5-acetoxi-1,6-acetónido (**33**).

Tabla 3. Análisis Termoquímico del 1,5,6-trihidroxi-2-menteno 5-acetoxi-1,6-acetónido (**33**).

Confórmero	ΔE_{MMFF}^a	%MMFF ^b	ΔE_{DFT}^c	%DFT ^d	ΔG_{OPT}^e	%OPT ^{f,g}
33a	0.00	80.6	0.00	88.6	0.00	94.7
33b	0.89	17.8	1.26	10.4	1.76	4.7
33c	2.35	1.5	2.70	0.9	3.19	0.4

^aMecánica molecular energías relativas a **33a** con $E_{\text{MMFF}} = 42.183$ kcal/mol.

^bPoblación en % calculada a partir de las energías MMFF según $\Delta E_{\text{MMFF}} \approx -RT \ln K$.

^cSingle-point B3LYP/6-31G(d) energías relativas a **33a** con $E_{6-31G(d)} = -556589.884$ kcal/mol.

^dPoblación en % calculada a partir de las energías de B3LYP/6-31G(d) según $\Delta E_{6-31G(d)} \approx -RT \ln K$.

^eEnergías libres de Gibbs relativas a **33a** con $G_{\text{DFT/B3LYP/DGDZVP}} = -556438.652$ kcal/mol.

^fPoblación en % calculada a partir de las energías libres de Gibbs de acuerdo con $\Delta G = -RT \ln K$.

^gLos tres confórmeros principales representan el 99.8% del total de la distribución de Boltzmann.

La comparación del espectro experimental y calculado (B3LYP/DGDZVP) del (+)-(1*S*,4*S*,5*R*,6*R*)-1,5,6-trihidroxi-2-menteno 5-acetoxi-1,6-acetónido (**33**), proporcionó un factor de anarmonicidad anH = 0.98, la similitud espectral de DCV para el enantiómero correcto de 81.7% e incorrecto de 11.9%, el nivel de similitud entre los espectros de IR fue de 96.5%. El nivel de confianza para la determinación de la configuración absoluta fue del 100%.

En la **Figura 34** se muestran las gráficas de los datos procesados de los espectros calculados y corregidos con el factor de anarmonicidad, así como la comparación entre espectros teóricos de IR y DCV con los espectros experimentales de **33**.

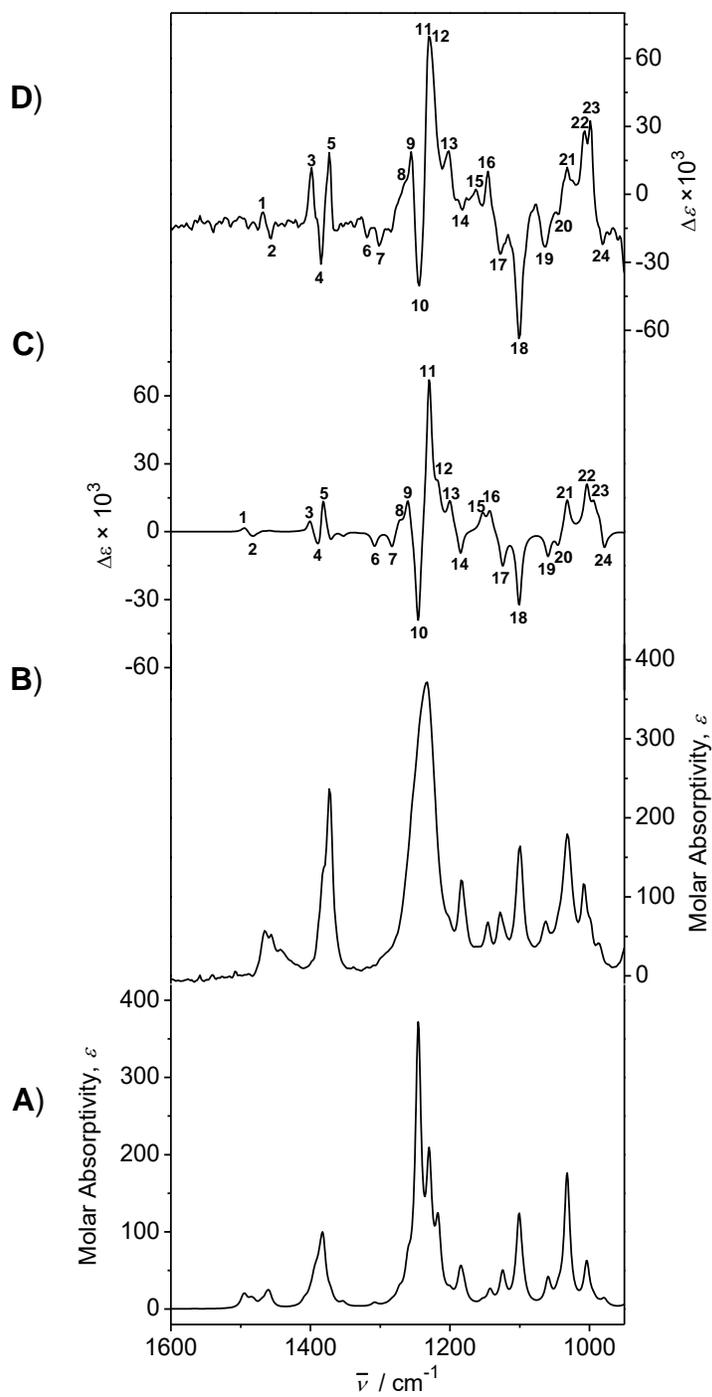


Figura 33. Espectros; **A)** IR teórico (B3LYP/DGDZVP, DFT), **B)** IR experimental, **C)** DCV teórico (B3LYP/DGDZVP, DFT) y **D)** DCV experimental del (+)-(1S,4S,5R,6R)-1,5,6-trihidroxi-2-menteno 5-acetoxi-1,6-acetonido (**33**).

Con la configuración absoluta del (+)-(1*S*,4*S*,5*R*,6*R*)-1,5,6-trihidroxi-2-menteno 5-acetoxi-1,6-acetónido (**33**) se estableció la configuración absoluta de **25** como (+)-(1*S*,4*S*,5*R*,6*R*)-1,5,6-trihidroxi-2-menteno (**25**) y de su epímero **26** como (+)-(1*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-1,5,6-trihidroxi-2-menteno (**26**), **Figura 35**.

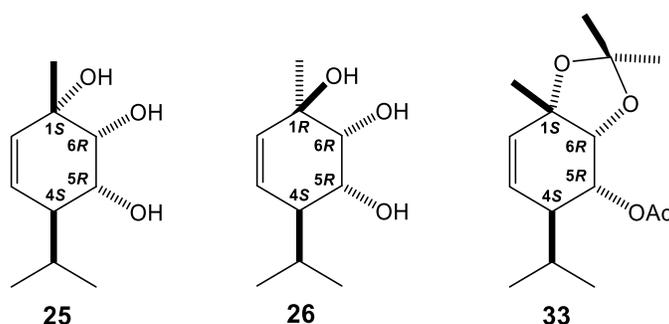


Figura 35. Configuración absoluta de **33** y los epímeros **25** y **26**.

A partir de la configuración absoluta de los epímeros **25** y **26**, fue posible determinar la configuración absoluta del glucósido **29** como (-)-(3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-3,5,6-trihidroxi-1-menteno 3-*O*- β -D-glucopiranosido (**29**), **Figura 36**.

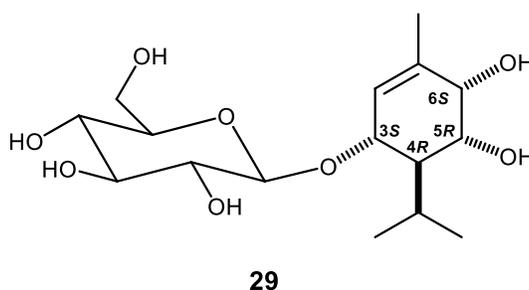


Figura 36. Configuración absoluta de **29**.

Adicionalmente se lograron obtener cristales del 3,6-dihidroxi-1-menteno (**22**) adecuados para su difracción de rayos X y mediante los parámetros Flack y Hooft,^{8,9} se determinó su configuración absoluta. La estructura molecular fue resuelta por métodos directos y refinada a un índice de discrepancia del 3.3%. El valor del parámetro Flack $x=0.0(3)$ y Hooft $y=0.09(10)$ resultó para el enantiómero correcto, mientras que para la configuración opuesta mostró valores Flack $x=1.0(3)$ y Hooft $y=0.91(10)$, estos parámetros fueron calculados con el programa Olex2 v1.1.5. El

análisis de los parámetros Flack y Hooft permitió definir la configuración absoluta como (3*S*,4*S*,6*R*)-3,6-dihidroxi-1-menteno (**22**), como se muestra en la **Figura 37**.

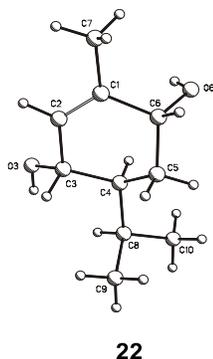
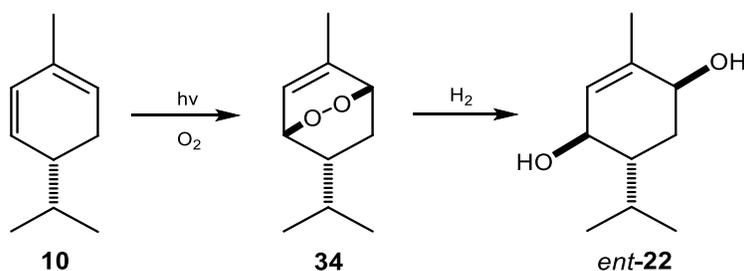


Figura 37. Configuración absoluta de **22**.

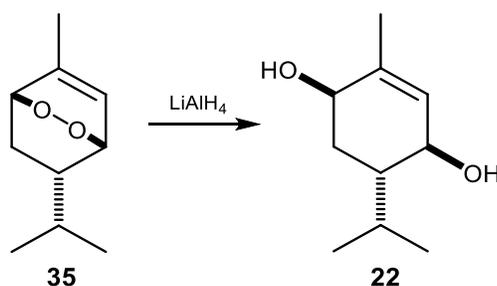
Realizando una búsqueda en la literatura se encontró que Schenck (1957)⁴⁴ describe por primera vez la obtención del *ent*-**22**, a partir del (*R*)- α -felandreno (**10**) aislado de *Eucalyptus dives*. Mediante la fotooxidación de **10** generó el endoperóxido **34** y finalmente, por hidrogenación la obtención del *ent*-**22**, **Esquema 11**.



Esquema 11. Obtención del *ent*-**22** a partir del (*R*)- α -felandreno (**10**).

Más tarde Blumann,³⁷ Stolow^{45,46} y Turner⁴⁷ se apoyaron en la secuencia de oxidación propuesta por Schenck, para determinar la configuración absoluta de derivados semisintéticos del *p*-menteno. Cabe resaltar que el valor de la rotación específica descrita en estos estudios osciló alrededor de $[\alpha]_{589} = -18$. Posteriormente, Pascual (1981)⁴⁸ reportó por primera vez la estereoestructura del *p*-ment-1-eno-3,6-diol (**22**) a partir de la reducción del precursor natural **35** aislado de *Chenopodium multifidum*, donde ahora la rotación específica fue de $[\alpha]_{589} = +28.4$. Con este valor, el autor establece la estereoquímica de **22** por comparación de la rotación específica con respecto a la reportada por Schenck, **Esquema 12**. Igualmente, Delgado⁴⁹

reporta este compuesto aislado de *Chrysactinia mexicana*, tomando el mismo criterio de Pascual para proponer la estereoquímica.



Esquema 12. Obtención de **22** a partir de la reducción del endoperoxido **35**.

Por su parte, de la Cuenca y colaboradores reportan de *Mikania saltensis*⁵⁰ al *ent-22*; para el que describen la rotación específica $[\alpha]_{\text{Hg}} = +114$, la cual es de signo opuesto en comparación con la descrita previamente por otros autores para ese compuesto. Publicaciones posteriores se han apoyado en este trabajo para la caracterización del *ent-22*,^{30,51-54} es importante mencionar que en estas publicaciones se describe el potencial biológico del derivado del *p*-menteno como antibacteriana,⁵¹ antifúngica³⁰ y antiinflamatoria⁵³. Aunque la difracción de rayos X ha sido descrita⁵⁵ la configuración absoluta del 3,6-dihidroxi-1-menteno (**22**) no había sido determinada, lo cual fue posible en este trabajo.

Establecida la configuración absoluta **22**, fue posible asignar la estereoquímica del glucósido **27**, la cual no había sido determinada a pesar de que este metabolito ha sido descrito previamente de las partes aéreas de *Ageratina anisochroma*,⁴¹ estableciendo su configuración absoluta como $(-)-(3S,4S,6R)$ -3,6-dihidroxi-1-menteno 3-*O*- β -D-glucopiranosido (**27**), **Figura 38**.

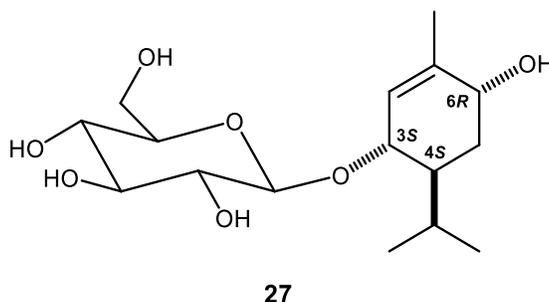


Figura 38. Configuración absoluta de **27**.

Los estudios configuracionales permitieron la elucidación total de los *p*-mentenos obtenidos de manera natural y por reacciones químicas, concluyendo con esto los objetivos planteados en este proyecto.

Al realizar un análisis minucioso de los espectros de RMN de ^1H de los crudos de reacción del tratamiento ácido de **29** se apreciaron señales de protones vinílicos entre 5.40 - 5.00 ppm atribuidas a compuestos minoritarios. Con el fin de determinar la naturaleza de estos compuestos se plantearon condiciones de deshidratación para favorecer su formación y relacionarlos con los *p*-mentenos obtenidos.

El *p*-menteno **29** se sometió a tratamiento ácido durante 1 hora con HCl al 2%. De este proceso se apreció por RMN de ^1H la formación de **25** y **26** y la aparición de señales minoritarias entre 7.20 - 6.20 ppm, y dos señales simples en 5.26 y 5.12 ppm. Para incrementar la concentración de estos compuestos se aumentó el tiempo de reacción a 5 horas, **Figura 39**. El crudo de reacción se sometió a separación cromatográfica donde se obtuvieron a los compuestos **25**, **26** y dos compuesto adicionales **36** y **37**.

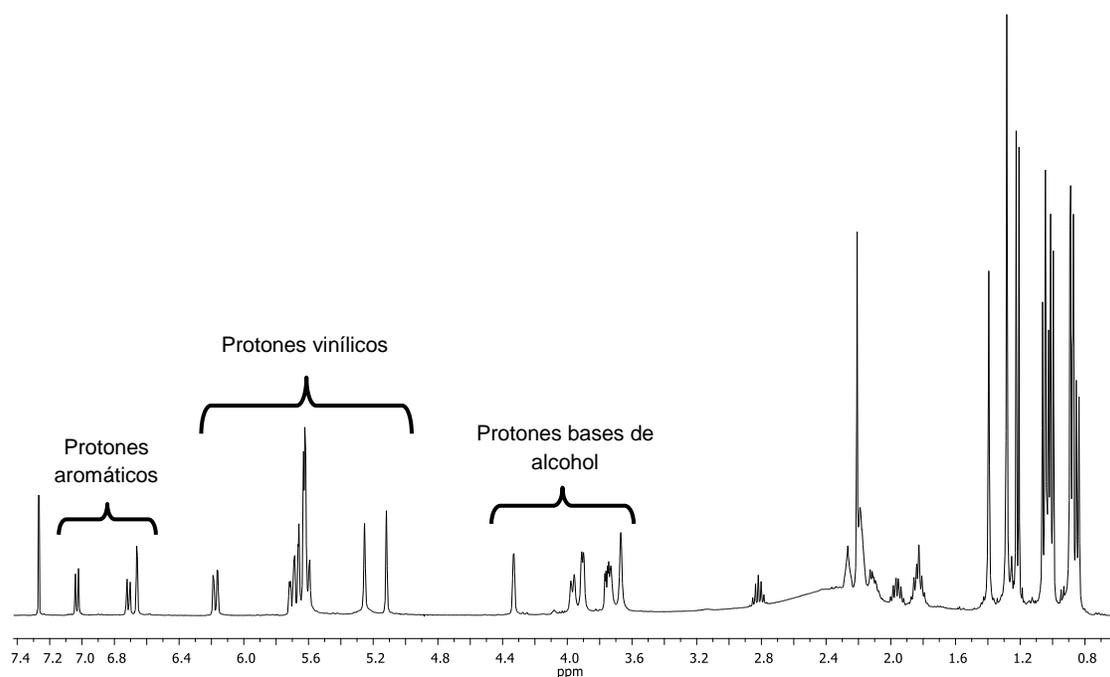


Figura 39. Espectro de RMN de ^1H del crudo de reacción del tratamiento ácido de **29** a 5 h.

En el espectro de RMN de ^1H del compuesto **36**, **Figura 40**, se observan dos señales dobles de dobles en 6.18 y 5.70 ppm con $J = 10.0$ y 2.1 Hz y $J = 10.0$ y 2.6 Hz correspondientes a los hidrógenos vinílicos del doble enlace endocíclico H-3 y H-2, respectivamente, también se aprecia la aparición de dos señales simples anchas correspondientes a los hidrógenos de un enlace exocíclico H-7 y H-7' en 5.26 y 5.12 ppm, respectivamente, además en 4.33 y 3.75 ppm se observa una señal simple ancha y una señal triple ancha con $J = 5.5$ Hz, correspondientes a los hidrógenos bases de alcohol H-6 y H-5, respectivamente; en 2.29 ppm se aprecia una señal múltiple correspondiente al hidrógeno base de isopropilo H-4; por último en 1.05 y 0.89 ppm se observan las dos señales dobles de los metilos de isopropilo H-9 y H-10 con $J = 6.8$ Hz.

En el espectro de RMN de ^{13}C , **Figura 41**, se observan 10 señales correspondientes a la estructura propuesta para el derivado **36**. Se aprecian dos nuevas señales de carbonos vinílicos en 143.5 y 115.2 ppm, correspondientes a los carbonos C-1 y C-7, respectivamente, además se mantienen las señales de los carbonos vinílicos C-2 y C-3 en 129.0 y 127.3 ppm, lo que indica la presencia de un dieno en las posiciones C-7 y C-2. Las demás señales restantes que aparecen entre 71.8 – 18.5 ppm corresponden a la estructura propuesta.

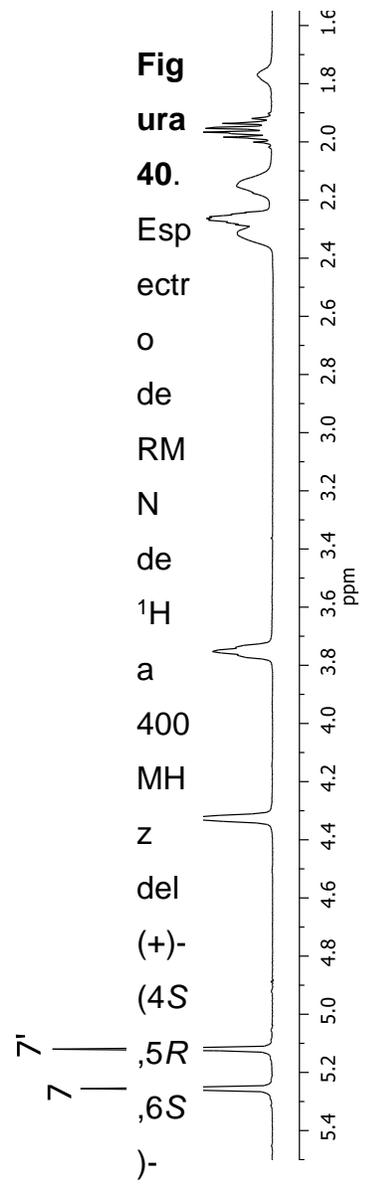
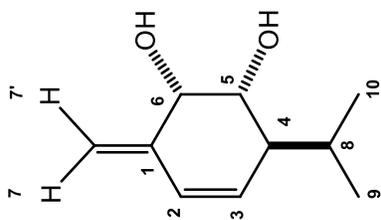
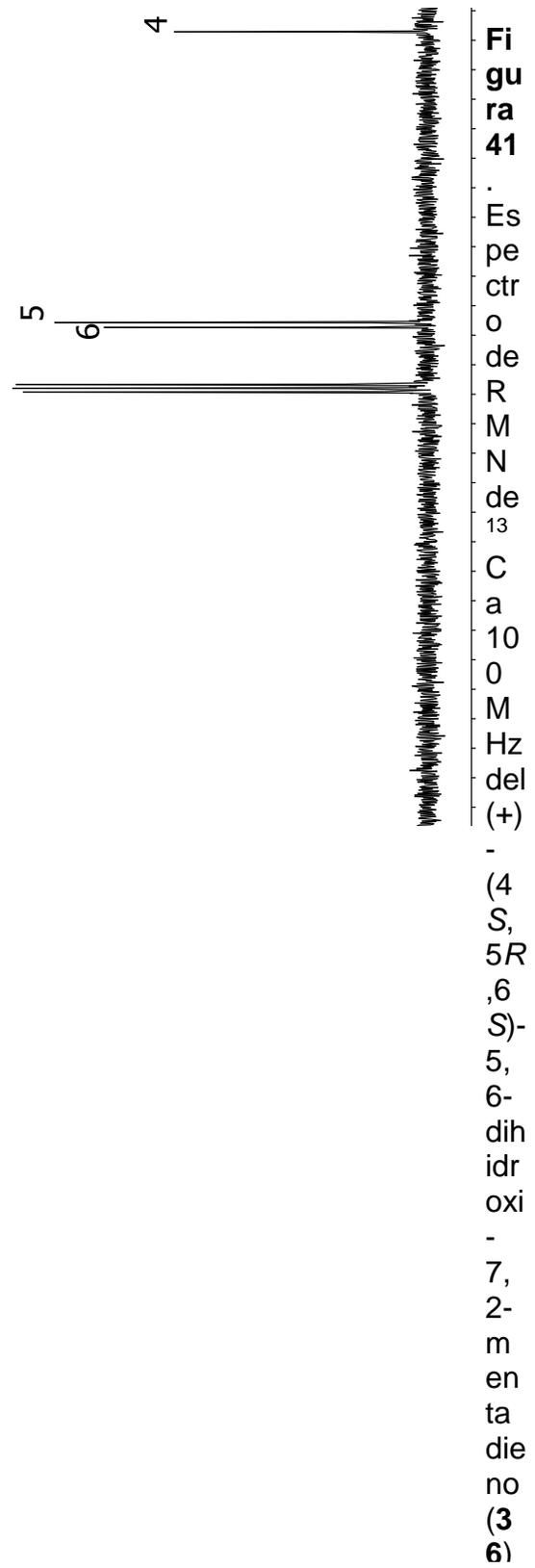
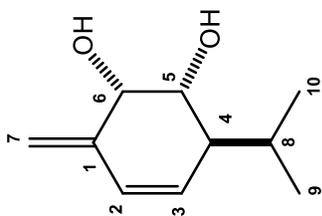


Fig
ura
40.
Esp
ectr
o
de
RM
N
de
¹H
a
400
MH
z
del
(+)-
(4S
,5R
,6S
)-
5,6-
dih
dro
xi-
7,2-
me
nta
die



Para confirmar la asignación del espectro de RMN de ^1H del compuesto **36** se llevó a cabo el experimento COSY, **Figura 42**. Se puede observar que el hidrógeno base de alcohol H-5 correlaciona con el hidrógeno base de alcohol H-6 en 4.33 ppm y también con el hidrógeno base de isopropilo H-4 en 2.29 ppm. También se puede apreciar la correlación del hidrógeno vinílico H-2 con el hidrógeno vinílico H-3 en 6.18 ppm y con los hidrógenos geminales H-7 y H-7' en 5.26 y 5.12 ppm, respectivamente.

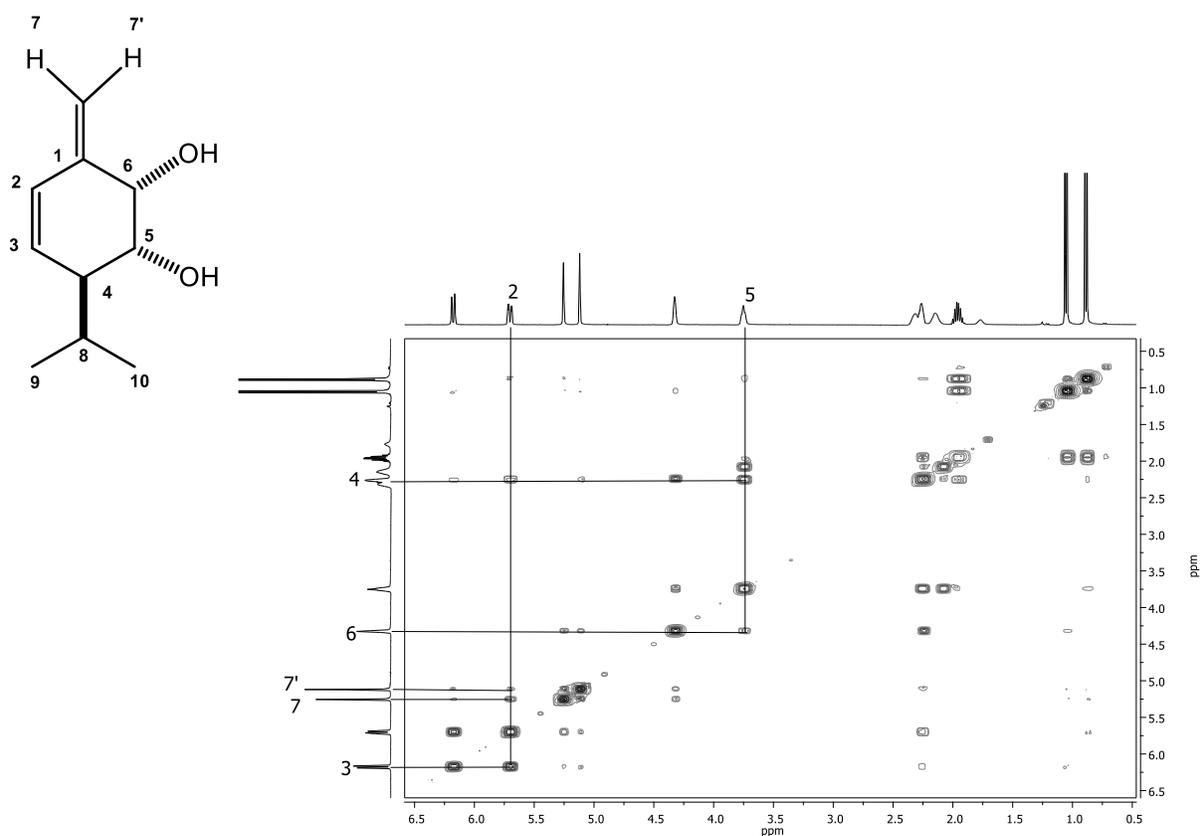


Figura 42. Espectro COSY del (+)-(4S,5R,6S)-5,6-dihidroxi-7,2-mentadieno (**36**).

El espectro de RMN de ^{13}C fue asignado en base al experimento HETCOR, **Figura 43**. Se puede apreciar que las señales en 6.18 y 5.70 ppm en la escala de hidrógeno asignadas para los hidrógenos vinílicos H-3 y H-2, respectivamente, correlacionan con las señales en 127.3 y 129.0 ppm, en la escala de carbono, por lo que estas señales corresponden a C-3 y C-2, respectivamente, además se aprecian las señales en 5.26 y 5.12 ppm en la escala de hidrógeno asignadas para los hidrógenos geminales H-7 y H-7', respectivamente, correlacionan con la señal en 115.2 ppm en escala de carbono, por lo que esta señal corresponde a C-7. Por último, se observa que las señales en 4.33 y 3.75 ppm en la escala de hidrógeno asignadas para los hidrógenos base de alcohol H-6 y H-5, respectivamente, correlacionan con las señales en 71.8 y 71.4 ppm, en escala de carbono, por lo que estas señales corresponden a C-6 y C-5, respectivamente.

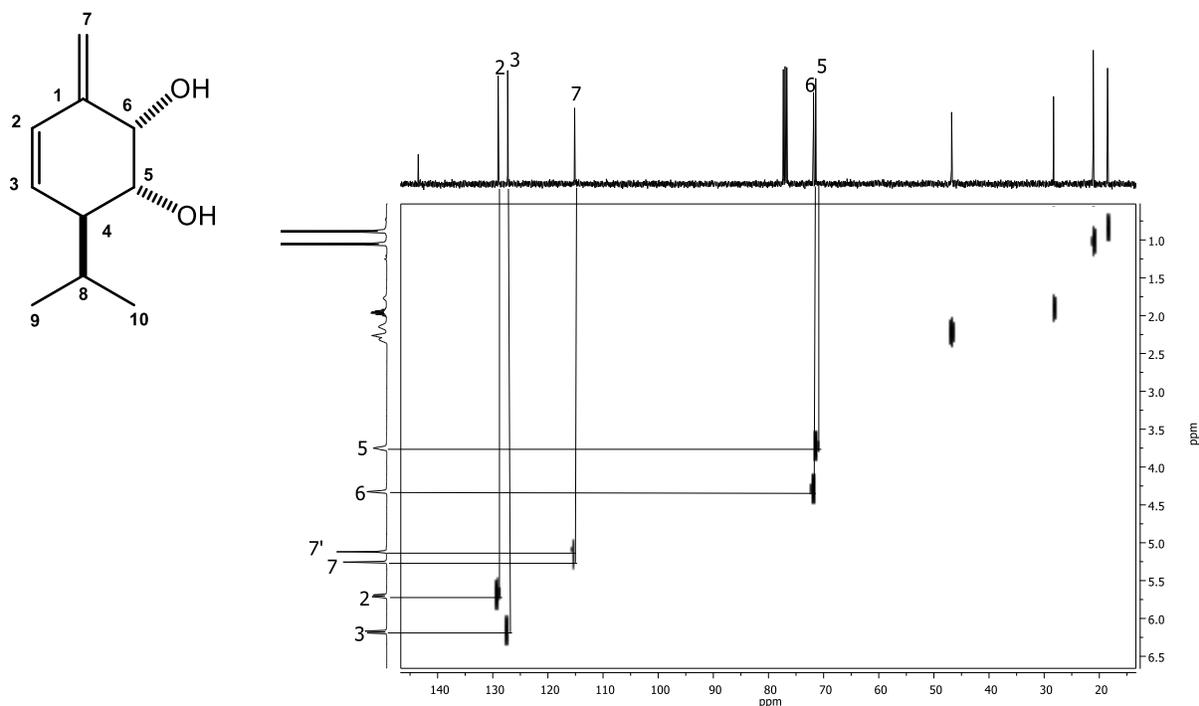
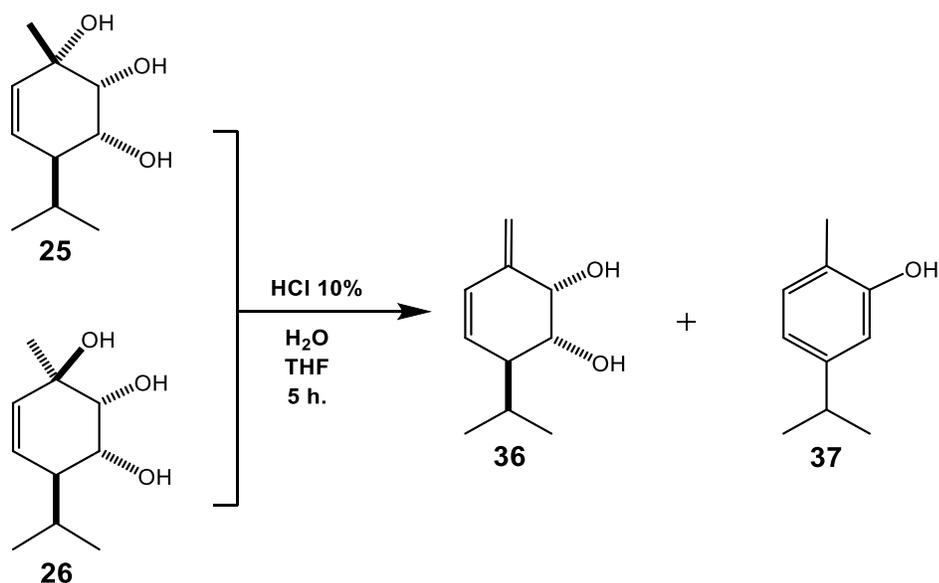


Figura 43. Espectro HETCOR del (+)-(4*S*,5*R*,6*S*)-5,6-dihidroxi-7,2-mentadieno (**36**).

En base a los datos de RMN de 1D y 2D obtenidos se propuso la estructura del compuesto **36** el cual correspondió al (+)-(4*S*,5*R*,6*S*)-5,6-dihidroxi-7,2-mentadieno. Realizando una búsqueda en la literatura se encontró que el derivado **36** corresponde a un compuesto novedoso.

El otro compuesto obtenido fue el carvacrol (**37**), es un compuesto ampliamente reportado y reconocido por exhibir distintas propiedades biológicas tales como: antifúngica, antimicrobiana, antiviral, analgésica, antiinflamatoria, cardioprotector, hepatoprotector, neuroprotector, entre otras actividades.⁵⁶ Los datos espectroscópicos de ^1H y ^{13}C reportados en la literatura⁵⁷ para el compuesto **37**, concordaron con los experimentales por lo que podemos concluir que se trata del mismo compuesto. En las **Figuras 44** y **45**, se muestran los espectros de RMN ^1H y ^{13}C , respectivamente.

Para establecer la relación de **36** con los derivados de *p*-menteno **25** y **26**, se decidió realizar un tratamiento ácido por separado, empleando las condiciones descritas en el **Esquema 13**. Los crudos de reacción fueron purificados en columna cromatográfica donde se obtuvieron e identificaron a **36** y **37**, en proporción 2:1, respectivamente.



Esquema 13. Tratamiento ácido de los trioles epímeros **25** y **26**.

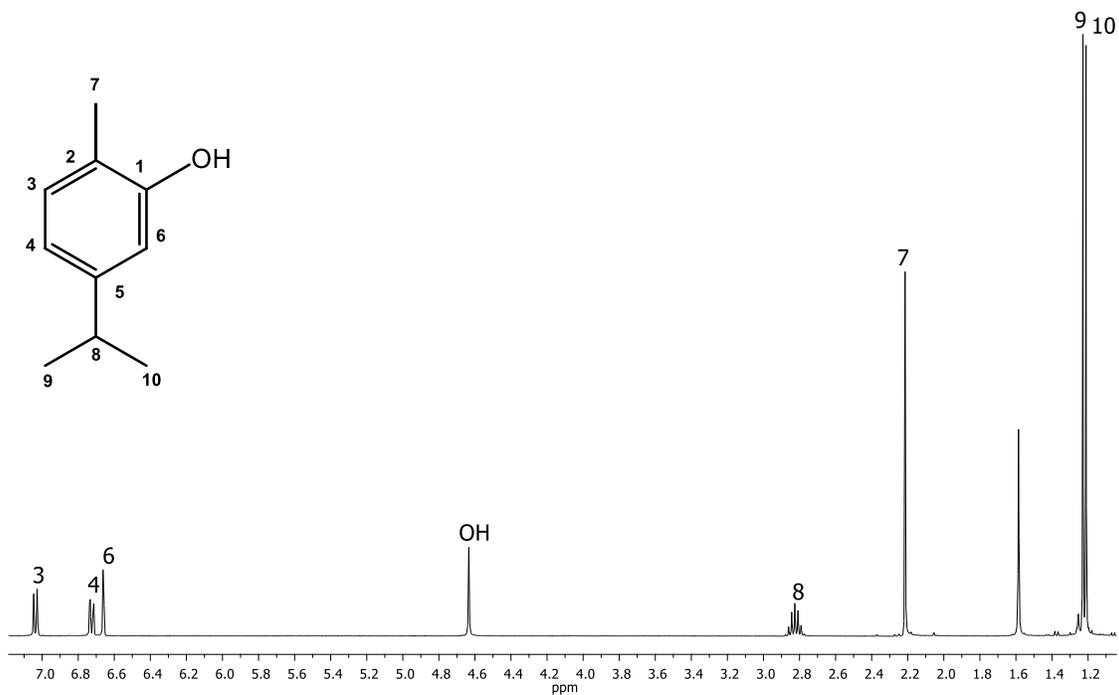


Figura 44. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del carvacrol (**37**) en CDCl_3 .

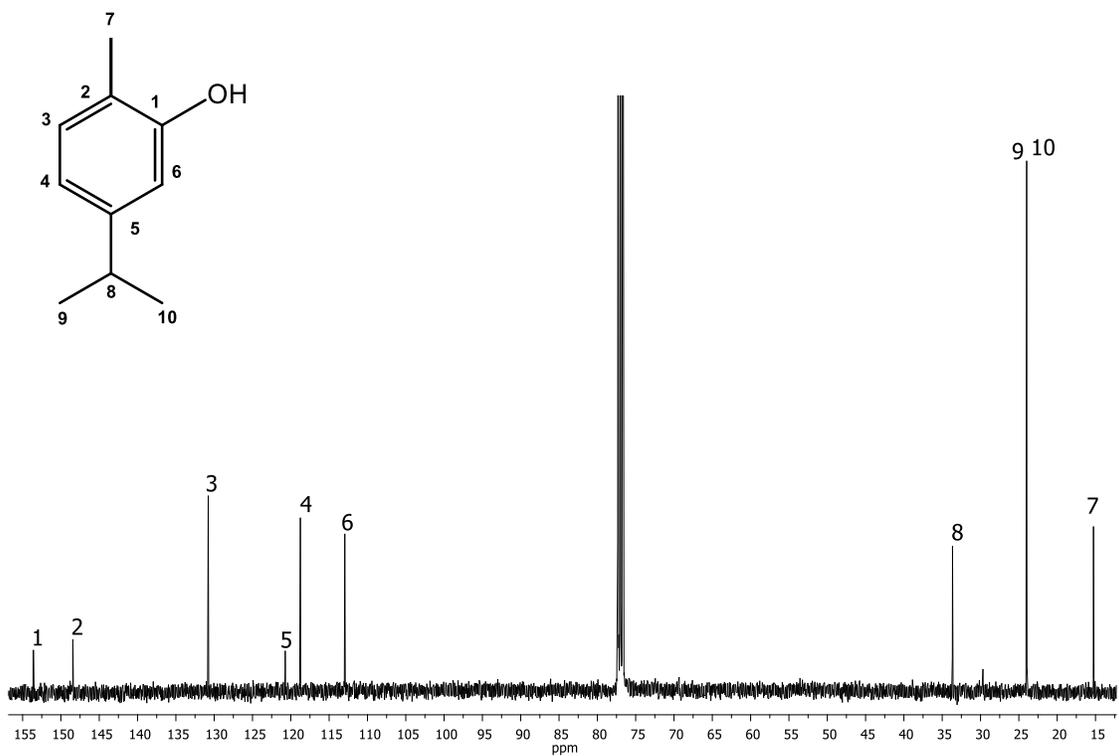
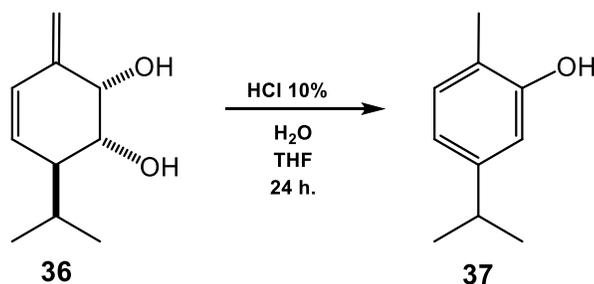


Figura 45. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del carvacrol (**37**) en CDCl_3 .

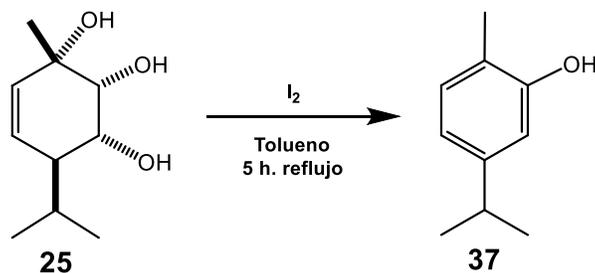
De igual manera se exploró si **36** funciona como un intermediario de reacción en la formación de carvacrol (**37**) bajo las condiciones establecidas en el **Esquema 14** fue posible llegar al producto **37**. Cabe mencionar que bajo estas condiciones de reacción no se llevó a cabo la total transformación de **36** por lo que se decidió elevar el tiempo de reacción a 24 h, siendo estas las condiciones donde se logró obtener la mayor cantidad del compuesto **37**, en proporción 1:3, respectivamente.



Esquema 14. Tratamiento ácido del derivado **36**.

Posteriormente se decidió llevar a cabo reacciones de aromatización con yodo con la finalidad de obtener distintos derivados aromáticos a los ya obtenidos por tratamiento ácido, siguiendo la metodología de Barrero y col.,⁵⁸ donde reportan buenos resultados para aromatizar estructuras de tipo *p*-menteno.

La reacción de aromatización se llevó a cabo con el triol **25** bajo las condiciones establecidas en el **Esquema 15**, obteniendo como único producto de reacción al carvacrol (**37**).



Esquema 15. Aromatización del derivado **25**.

En el **Esquema 16** se muestra el mecanismo de reacción que sugiere la obtención de **37**, comenzando con la protonación del oxígeno en el C-3 de **29** y la subsecuente ruptura del enlace glucosídico con la salida de glucosa y la formación de la aglicona (**I**) donde se observa que el hidroxilo en la posición C-5 podría favorecer la conjugación del orbital p del C-3 que se forma en el estado de transición con el orbital σ del enlace C-O en la posición C-5, lo que favorece una rápida deshidratación en el C-3 y la subsecuente formación del carbocatión alílico (**II**) susceptible a un ataque nucleofílico por parte del agua para generar a los trioles epímeros **25** y **26**, posteriormente la protonación del grupo hidroxilo terciario en la posición C-1 de **25** ó **26** y la consiguiente deshidratación para generar el intermediario de reacción (**III**) que es estabilizado a partir de la desprotonación del C-7 produciendo al derivado **36**. A partir de este diol estable es posible llevar a cabo otra deshidratación en la posición C-5 proporcionando un carbocatión conjugado dieno **38** que implica la desprotonación del C-6 seguido de la protonación en C-7 y la desprotonación en C-4 para generar carvacrol (**37**). Se propone una deshidratación regioselectiva, al realizar un cálculo conformacional para el compuesto **36** con nivel de teoría B3LYP-6-31G** se obtuvieron 22 conformeros y el 74% de la población correspondió al conformero más estable (**IV**) donde se observa al grupo hidroxilo en C-5 y el grupo isopropilo en C-4 en una conformación *trans*-diaxial ($\approx 160^\circ$), favoreciendo las interacciones σ - σ^* lo que aumenta la reactividad del OH-5 y dirige la regioselectividad para favorecer la formación de **38**. Además el medio prótico de la reacción estabiliza al OH-6 en una conformación ecuatorial debido a una interacción dipolo-dipolo con el doble enlace endocíclico.

La obtención de **37** a partir de la reacción de aromatización con yodo comienza a partir de la formación del complejo de coordinación de yodo en el intermediario (**V**) y la subsecuente deshidratación y estabilización al intermediario (**VI**) con la formación del doble enlace en C-1 y C-6, se espera la tautomería ceto-enol de (**VII**) al intermediario (**VIII**) que promueve la desactivación del OH-6 dando como resultado la deshidratación de OH-5 con la entrada de yodo (**IX**) para producir a **37**.

Utilizando las mismas condiciones de deshidratación empleadas para el *p*-menteno **29** para favorecer la formación de otros monoterpenos minoritarios se llevó a cabo de igual forma para el *p*-menteno **27**.

El *p*-menteno **27** se sometió a tratamiento ácido durante 5 horas con HCl al 2%. De este proceso se apreció por RMN de ^1H la formación de **22**, **23** y **24**, además de la aparición de señales entre 7.30 - 6.70 ppm, y dos señales simples entre 5.10 y 4.90 ppm, **Figura 46**. El crudo de reacción se sometió a separación cromatográfica donde se obtuvieron a los compuestos **22**, **23**, **24** y adicionalmente a **38**, **39** y **40**.

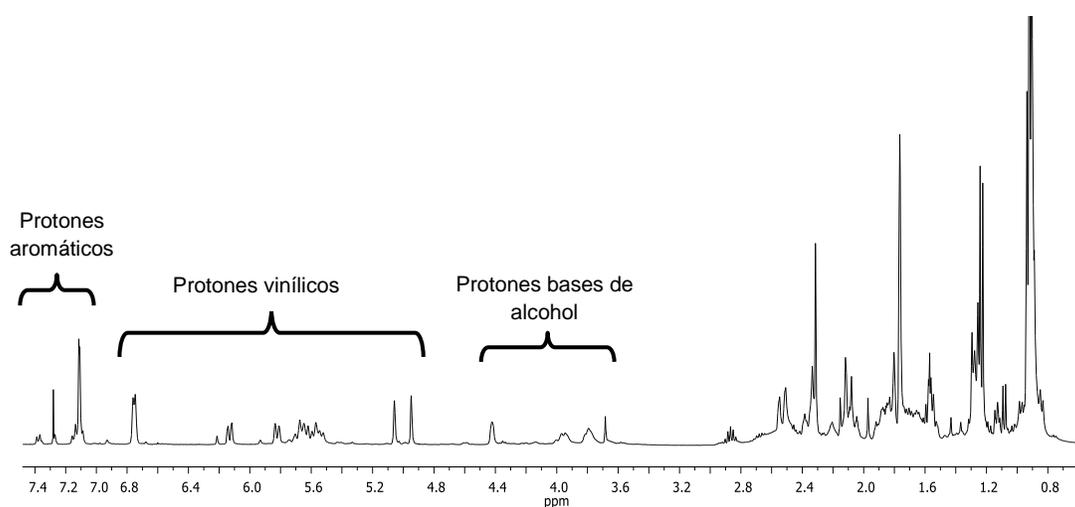


Figura 46. Espectro de RMN de ^1H del tratamiento ácido de **27** a 5 h.

El compuesto **38**, fue identificado como un derivado del β -felandreno conocido como (4*S*,6*R*)-6-hidroxi-7,2-mentadieno (**38**), de este compuesto ya existen reportes previos en la literatura⁵⁹ y los datos espectroscópicos de ^1H y ^{13}C de la estructura **38**, concordaron con los experimentales por lo que podemos concluir que se trata del mismo compuesto. En las **Figuras 47** y **48**, se muestran los espectros de RMN ^1H y ^{13}C , respectivamente.

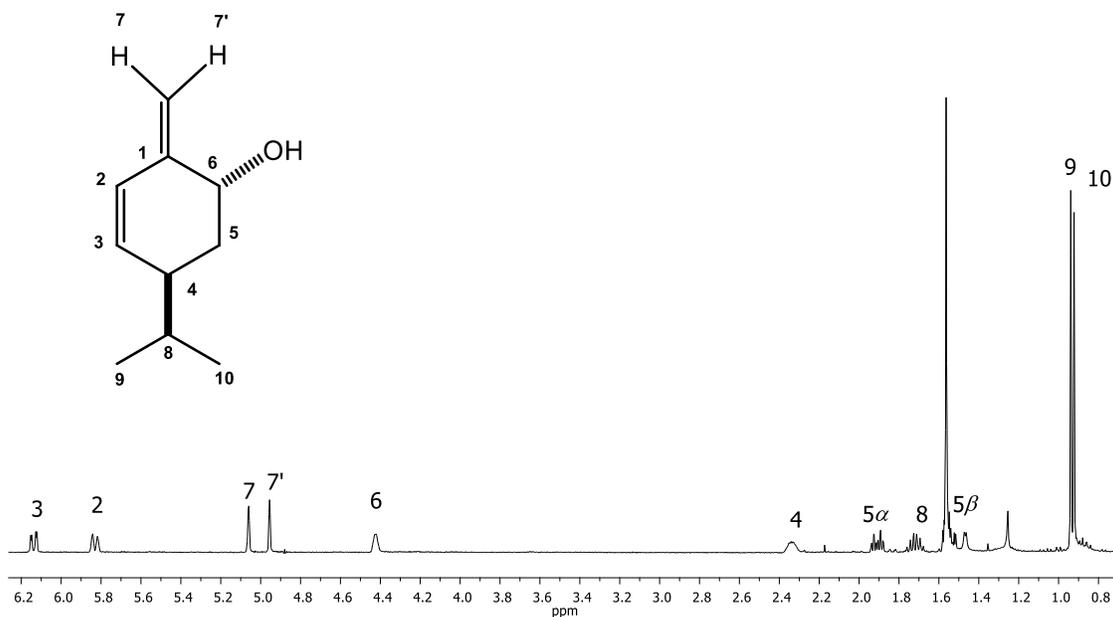


Figura 47. Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz del (4S,6R)-6-hidroxi-7,2-mentadieno (38) en CDCl₃.

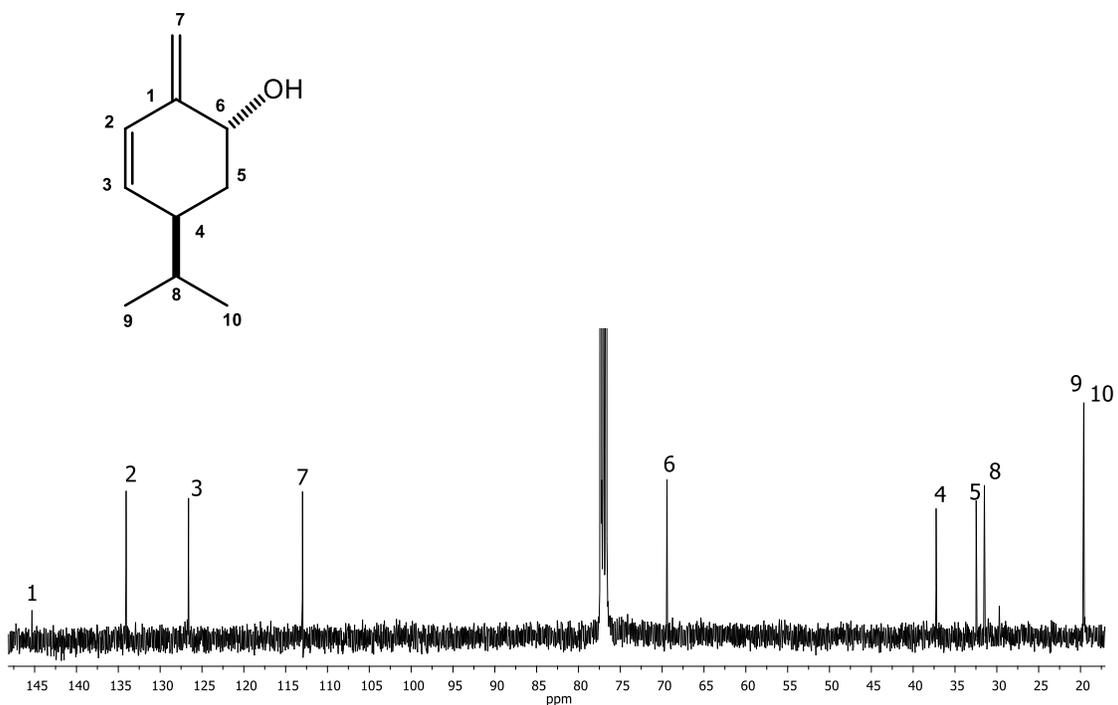
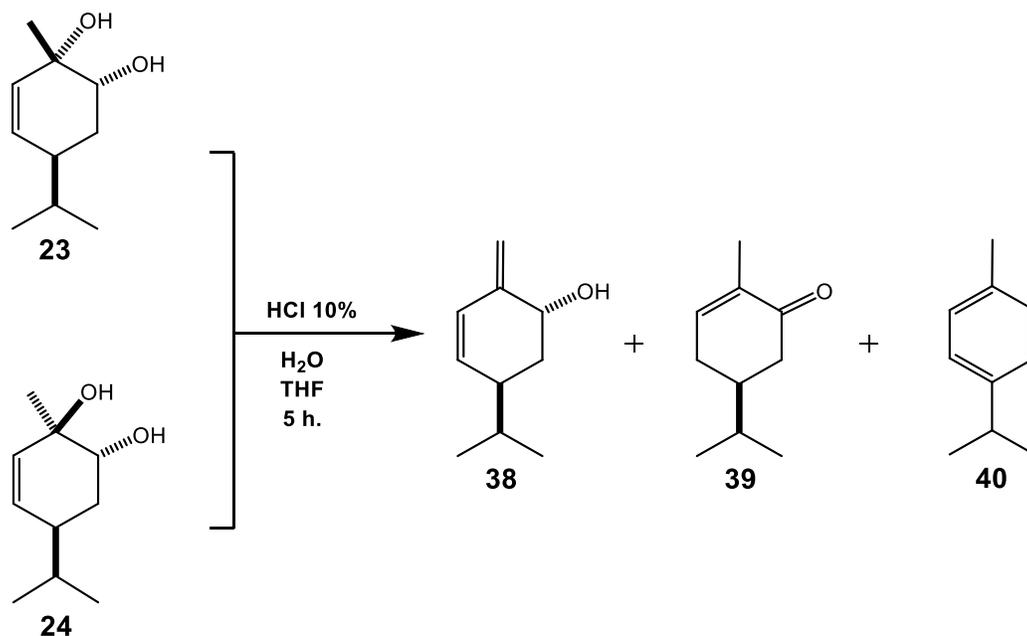


Figura 48. Espectro de RMN de ¹³C a 100 MHz del (4S,6R)-6-hidroxi-7,2-mentadieno (38) en CDCl₃.

El compuesto **39**, mostró señales características de ^1H y ^{13}C correspondientes a una cetona cíclica α,β -insaturada conocida como carvotanacetona (**39**). Los datos espectroscópicos experimentales de ^1H y ^{13}C fueron comparados con los reportados en la literatura,⁶⁰ lo que nos sugiere que se trata del mismo compuesto. En las **Figuras 49 y 50**, se muestran los espectros de RMN ^1H y ^{13}C , respectivamente.

El último compuesto obtenido fue el *p*-cymeno (**40**), compuesto ampliamente conocido en la literatura.⁶¹ Los desplazamientos de ^1H y ^{13}C reportados concordaron con los experimentales. En las **Figuras 51 y 52**, se muestran los espectros de RMN ^1H y ^{13}C , respectivamente.

Para establecer la relación de **40** con los derivados de *p*-menteno **23** y **24**, se decidió ahora realizar un tratamiento ácido, por separado como se muestra en el **Esquema 17**, donde se obtuvieron e identificaron a **38**, **39** y **40**, en proporción 1:10:4, respectivamente.



Esquema 17. Tratamiento ácido de los dioles epímeros **23** y **24**.

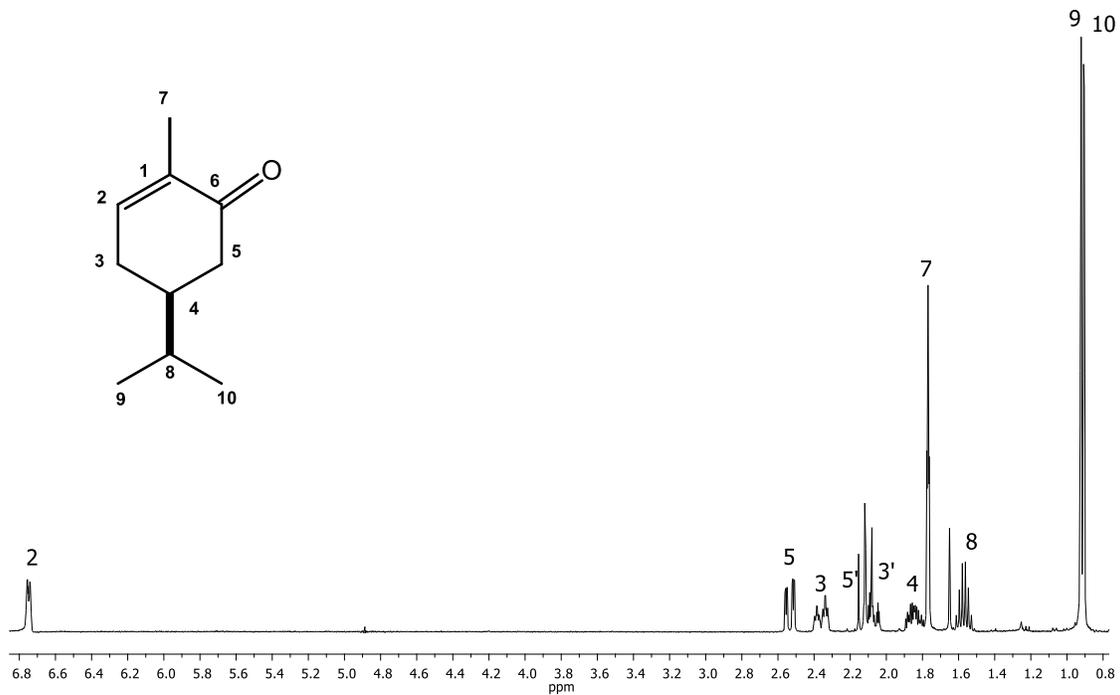


Figura 49. Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz de carvotanacetona (39) en CDCl₃.

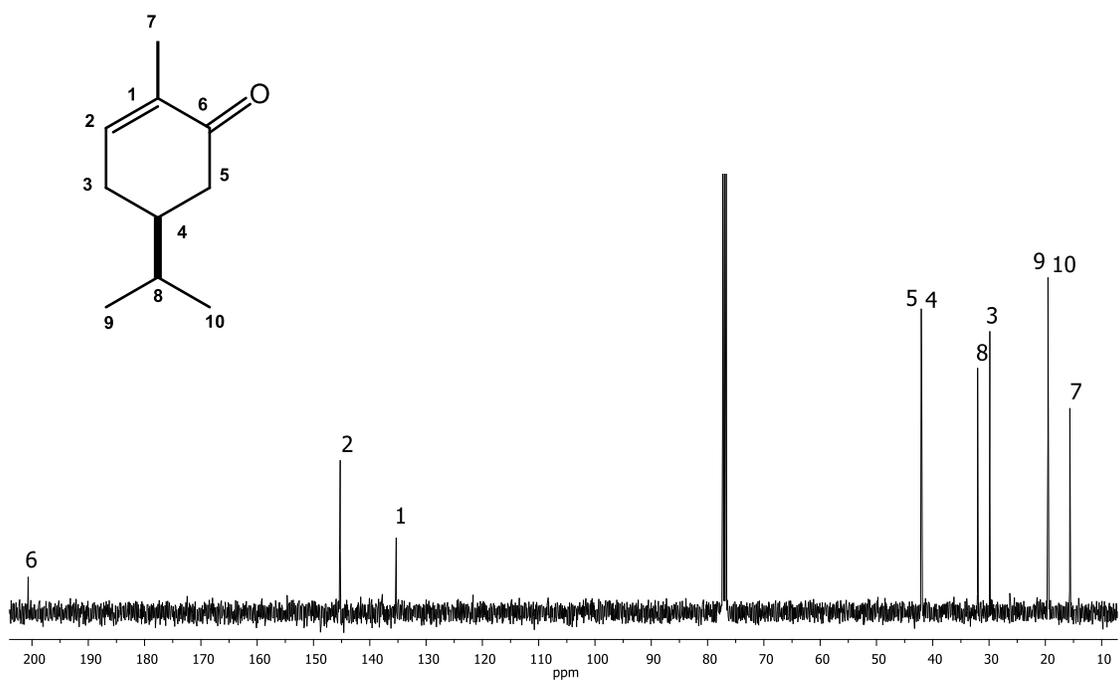


Figura 50. Espectro de RMN de ¹³C a 100 MHz de carvotanacetona (39) en CDCl₃.

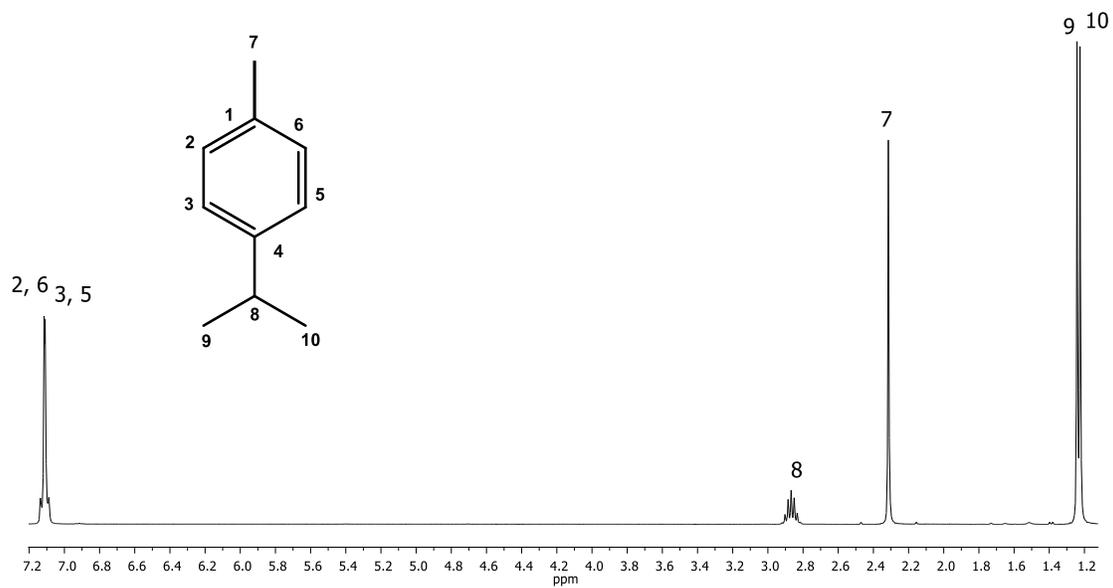


Figura 51. Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz del *p*-cymeno (**40**) en CDCl₃.

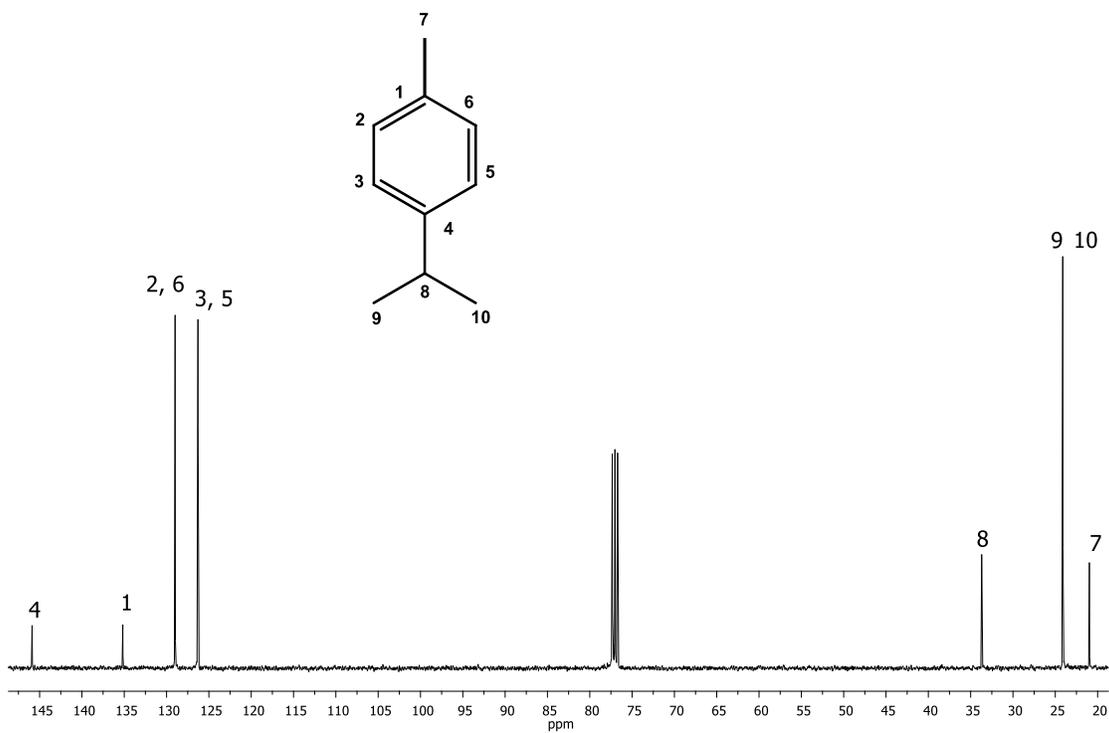
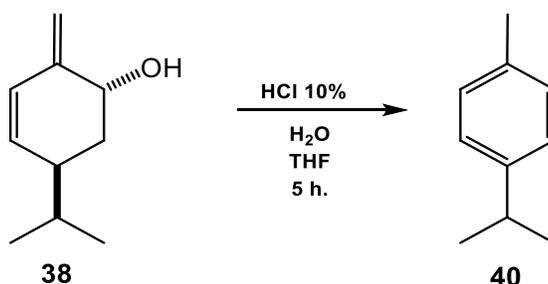


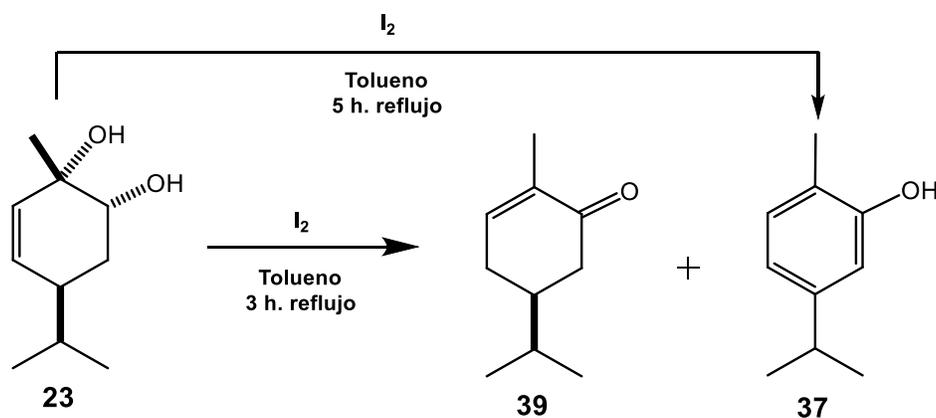
Figura 52. Espectro de RMN de ¹³C a 100 MHz del *p*-cymeno (**40**) en CDCl₃.

También se exploró si **38** funciona como un intermediario de reacción en la formación de *p*-cymeno (**40**) bajo las condiciones establecidas en el **Esquema 18** fue posible llegar a **40** como único producto de reacción.



Esquema 18. Tratamiento ácido del derivado **38**.

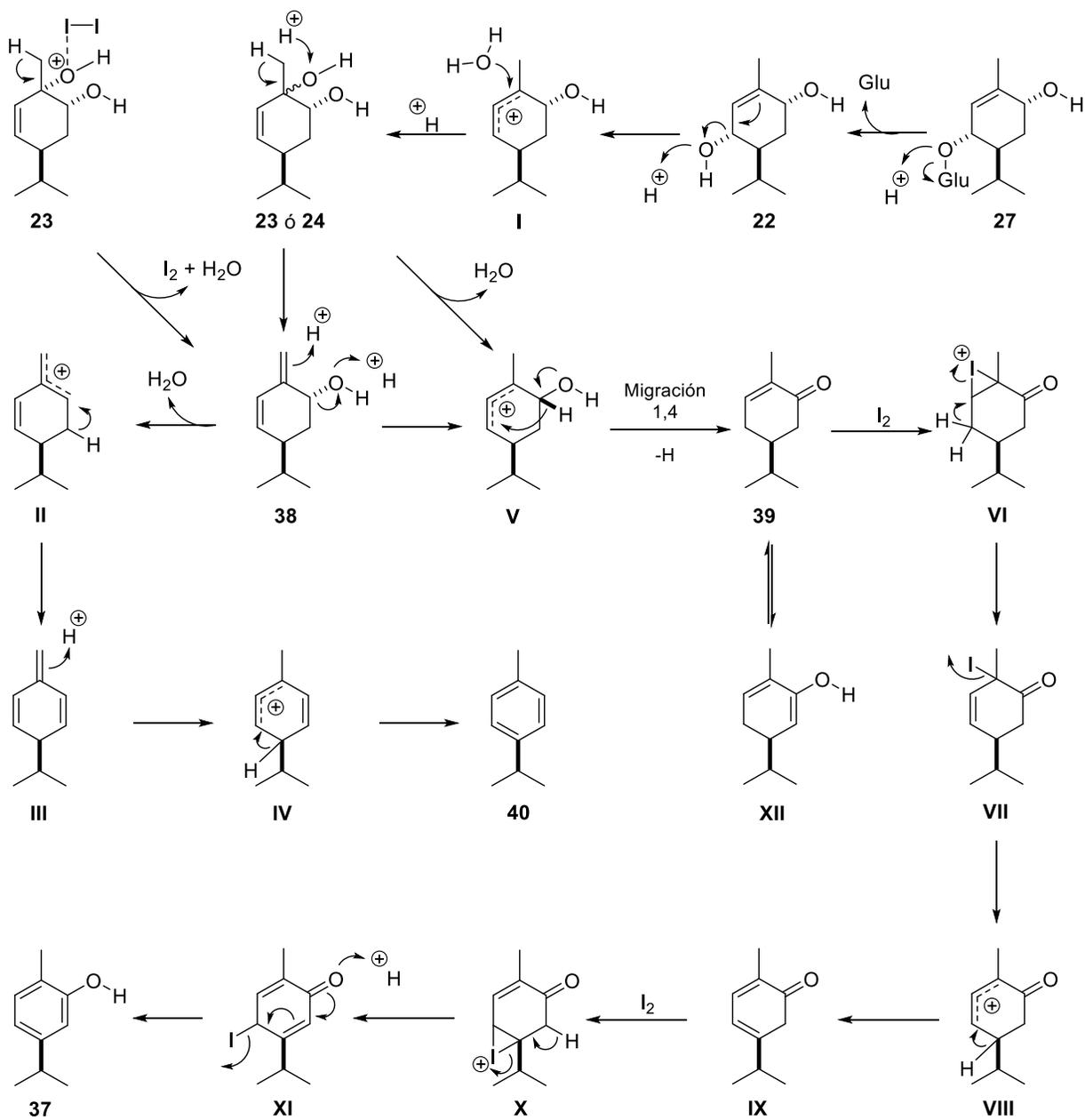
Bajo las condiciones descritas anteriormente, también se llevó a cabo la reacción de aromatización para el diol **23**, empleando yodo y tolueno, la mezcla de reacción se dejó a reflujo por 3 horas el crudo de reacción fue purificado en columna cromatográfica donde se obtuvo e identificó a **39** y **37**, en proporción 1:2, respectivamente. Posteriormente se aumentó el tiempo de reacción a 5 horas obteniendo como único producto a **37**, **Esquema 19**.



Esquema 19. Aromatización de **23**.

En el **Esquema 20** se muestra el mecanismo de reacción que sugiere la obtención de **40** a partir de **27**. Comenzando con la protonación del oxígeno en el C-3 de **27** y la subsecuente ruptura del enlace glucosídico con la salida de glucosa y la formación del compuesto **22**, para posteriormente ser protonado el OH-3 con la posterior deshidratación en el C-3 y la formación del carbocatión alílico (**I**) susceptible a un ataque nucleofílico por parte del agua para generar a los dioles epímeros **23** y **24**, donde posteriormente el grupo hidroxilo terciario favorece la deshidratación en el C-1, más tarde la pérdida de hidrógeno en C-7 genera a **38**, la desprotonación del C-5 (**II**) proporciona al trieno no conjugado (**III**) cuya protonación en C-7 favorece la formación del carbocatión endocíclico (**IV**) y la pérdida de protón en C-4 para dar *p*-cymeno (**40**). La formación de carvotanacetona (**39**) partiendo de **23** ó **24**, un carbocatión alílico formado por la eliminación de agua en C-1 facilita la migración de hidruro 1,4 de C-6 a C-3 (**V**) con asistencia anquimérica del hidroxilo en C-6 para formar la cetona α,β -insaturada **39**.

La obtención de **39** y carvacrol (**37**), a partir de la reacción de aromatización con yodo comienza con la formación del complejo de coordinación con yodo al grupo hidroxilo terciario de **23** que facilita la deshidratación y la formación de **38** cuya protonación en el C-7 por HI favorece la formación del carbocatión (**V**), con la posterior migración 1,4 de hidruro de C-6 a C-3 proporcionando a **39**. Posteriormente la formación de la especie de yodonio (**VI**) cuya ruptura del enlace C-2-I, permite la formación del doble enlace en C-2 y C-3 en el intermediario (**VII**) y el yodo posterior genera la formación de un carbocatión alílico cuya neutralización por desprotonación en C-4 (**VIII**) puede ocurrir, permitiendo el dieno endocíclico (**IX**). La formación de una nueva especie de yodonio en el C-3 y C-4 (**X**) permite la formación del doble enlace en C-4 y C-5 (**XI**). Por consiguiente la eliminación de yodo y la protonación del oxígeno favorece la aromatización para la obtención de carvacrol (**37**).

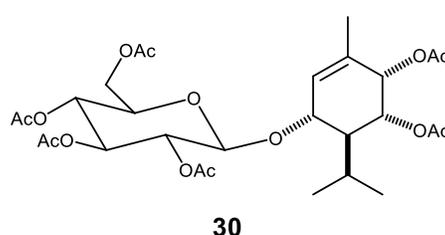
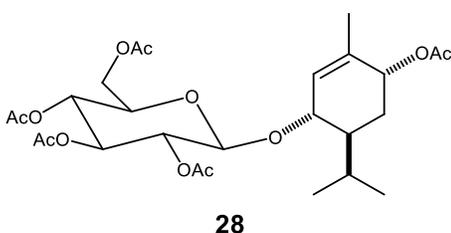
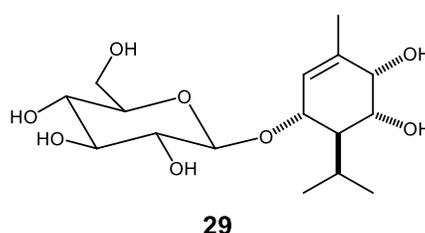
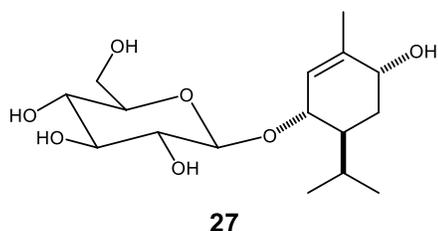


Esquema 20. Propuesta del mecanismo de reacción para la obtención de **40**.

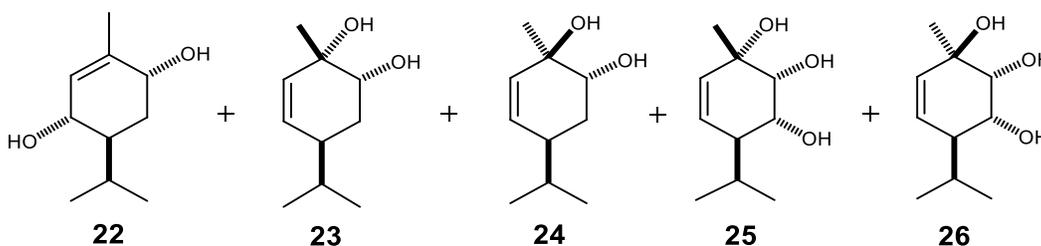
Con los resultados obtenidos podemos proponer una relación biomimética a partir de los tratamientos ácidos administrados a los glucósidos de *p*-menteno **27** y **29**, ya que a través de ellos se pueden obtener diferentes derivados más simples del *p*-menteno. Es posible llegar a la obtención de carvacrol (**37**) por la transformación química del glucósido **29** (aromatización) generando intermediarios estables (**25**, **26**, **36**) y también es posible obtener *p*-cymeno (**40**) por la transformación química de **27** (aromatización) generando intermediarios estables (**23**, **24** y **39**). Estos resultados sugieren dos nuevas rutas para la obtención de carvacrol (**37**) y *p*-cymeno (**40**), respectivamente. Por último mediante la reacción de aromatización con yodo a partir del diol **23** y triol **25** es posible obtener selectivamente al compuesto aromático carvacrol (**37**). Estas transformaciones biomiméticas llevadas a cabo en el laboratorio contribuyen al conocimiento de la química de monoterpenos. Actualmente, no están completamente establecidos los procesos por los cuales las plantas biosintetizan al carvacrol (**37**); no obstante, se establece su estrecha relación con derivados del *p*-menteno, como se estableció aquí. Es remarcable mencionar que en la literatura se ha establecido la relación entre derivados glicosilados como moléculas de almacenamiento y sus correspondientes agliconas como componentes de los aceites esenciales en las plantas.⁶² Con base en los resultados obtenidos de los tratamiento ácidos a **27** y **29** se puede proponer que un glicósido podría generar a más de un componente de aceites esenciales en una planta.

6. CONCLUSIONES

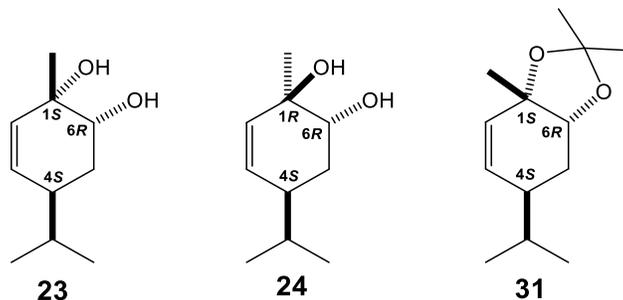
De los extractos metanólicos de las partes aéreas de *A. glabrata* se aislaron e identificaron a los derivados glucosilados del *p*-menteno **27** y **29**, los cuales fueron caracterizados por RMN de 1D y 2D, además de la preparación de sus derivados acetilados **28** y **30**.



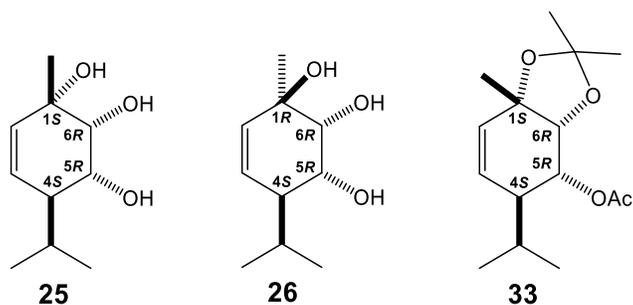
El tratamiento ácido de **27** y **29** demostró la procedencia de los derivados del *p*-menteno **22-26**, respectivamente.



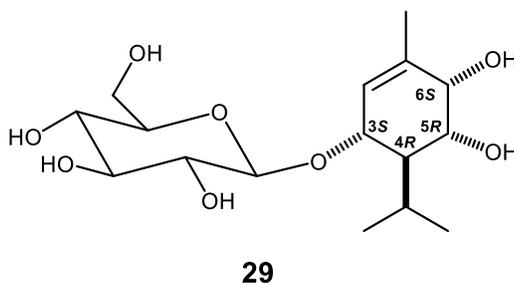
Con estudios de DCV se logró establecer la configuración absoluta de los dioles epimeros **23** y **24** a partir del estudio con el acetónido **31**, logrando establecer la configuración absoluta como: (+)-(1*S*,4*S*,6*R*)-1,6-dihidroxi-2-menteno (**23**), (+)-(1*R*,4*S*,6*R*)-1,6-dihidroxi-2-menteno (**24**) y (+)-(1*S*,4*S*,6*R*)-1,6-dihidroxi-2-menteno 1,6-acetónido (**31**).



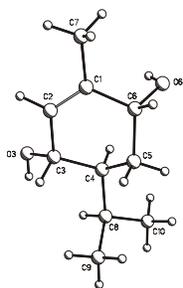
A partir de DCV se estableció la configuración absoluta de los trioles epímeros **25** y **26** a partir del estudio con el derivado **33**, logrando establecer la configuración absoluta como; (+)-(1S,4S,5R,6R)-1,5,6-trihidroxi-2-menteno (**25**), (+)-(1R,4S,5R,6R)-1,5,6-trihidroxi-2-menteno (**26**) y (+)-(1S,4S,5R,6R)-1,5,6-trihidroxi-2-menteno 5-acetoxi-1,6-acetonido (**33**).



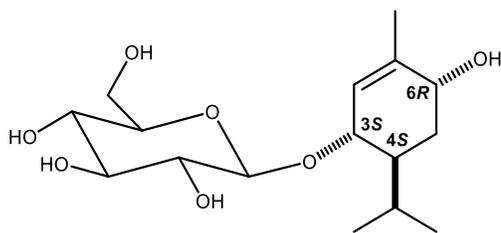
La determinación de la configuración absoluta de **29** se determinó a partir de los epímeros **25** y **26**. Quedando como (-)-(3S,4R,5R,6S)-3,5,6-trihidroxi-1-menteno 3-O-β-D-glucopiranosido (**29**).



Mediante los parámetros de Flack y Hoofstede se determinó la configuración absoluta del (+)-(3S,4S,6R)-3,6-dihidroxi-1-menteno (**22**). La determinación de la configuración absoluta del *p*-menteno **22** sirvió como base para establecer la configuración absoluta del (-)-(3S,4S,6R)-3,6-dihidroxi-1-menteno 3-O-β-D-glucopiranosido (**27**), ya que la aglicona **22** es producto del tratamiento ácido.



22

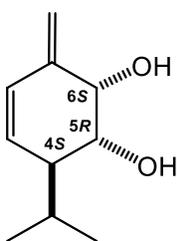


27

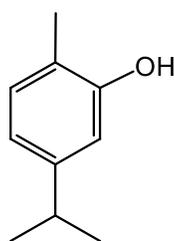
Aunque los derivados del *p*-menteno **22**, **27** y **29**, son conocidos no se había establecido su configuración absoluta, lo que en este trabajo fue posible. De los derivados **23** y **31**, existen reportes en la literatura y la configuración absoluta fue determinada mediante el método de Dicroísmo circular (DC) y los resultados reportados concordaron con el estudio de DCV realizado.

De los derivados del *p*-menteno; **24**, **25**, **26**, **29**, **30**, **32**, **33** y **36** hasta el momento no existen reportes en la literatura que los describan por lo que se tratan de compuestos novedosos.

El tratamiento ácido de los trioles epímeros **25** y **26** condujo a la obtención de los derivados; (+)-(4*S*,5*R*,6*S*)-5,6-dihidroxi-10,2-mentadieno (**36**) y carvacrol (**37**).

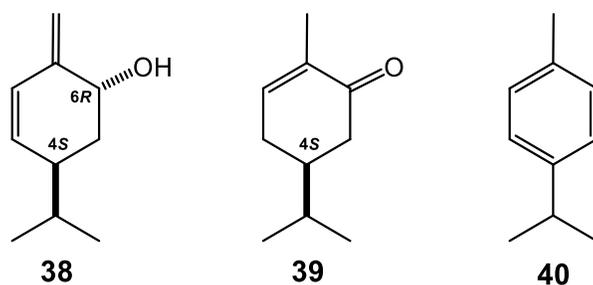


36



37

El tratamiento ácido de **22** condujo a la formación de los dioles epímeros **23** y **24**. Un siguiente tratamiento ácido llevado a cabo por separado para **23** y **24** dio origen a la formación de; (4*S*,6*R*)-6-hidroxi-10,2-mentadieno (**38**), (+)-(4*S*)-carvotanacetona (**39**) y *p*-cymeno (**40**). Se demostró que **22** funciona como un intermediario de reacción en la formación de **23** y **24**, también se demostró que **38** funciona como intermediario de reacción en la formación de *p*-cymeno (**40**).



Se propusieron mecanismos de reacción que justifican la formación de los monoterpenos **22-40**.

De las reacciones de aromatización con yodo para el diol **23** y triol **25**, se obtuvo como único producto al carvacrol (**37**).

Estas transformaciones químicas llevadas a cabo en el laboratorio contribuyen al conocimiento de la química de monoterpenos de la cual al momento no están establecidos los procesos por los cuales las plantas biosintetizan al carvacrol (**37**) y *p*-cymeno (**40**), no obstante, se estableció su estrecha relación con derivados del *p*-menteno.

7. PARTE EXPERIMENTAL

7.1. Generalidades

Los espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H a 400 MHz y de ^{13}C a 100 MHz, así como los espectros bi-dimensionales de correlación $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ (HETCOR), $^1\text{H}/^1\text{H}$ (COSY) y $^1\text{H}/^1\text{H}$ (NOESY) se determinaron en un espectrómetro Varian Mercury Plus-400 y los $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ (HSQC) y $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ (HMBC) se determinaron en un espectrómetro Varian Mercury Plus-300. Se utilizó como disolvente metanol deuterado (CD_3OD) o cloroformo deuterado (CDCl_3) y como referencia interna se utilizó tetrametilsilano (TMS). Los espectros fueron procesados mediante el programa MestRenova.

Los espectros de IR se midieron en solución de cloroformo empleando un espectrofotómetro marca Buck 500.

La rotación óptica se midió a cinco longitudes de onda: 589, 578, 546, 436 y 365 nm, utilizando un polarímetro Perkin Elmer modelo 341 y empleando soluciones clorofórmicas filtradas.

Los espectros de masa de baja resolución se midieron en un equipo Varian Saturn 2000 mediante impacto electrónico.

Para las separaciones cromatográficas se utilizó gel de sílice Merck 230-400 mallas.

La obtención de los espectros de IR y VCD se realizaron en un espectrofotómetro BioTools, Inc. (Jupiter, FL) PEMdual Chiral IR FT-VCD empleando como disolvente CDCl_3 .

El análisis de rayos X se llevó a cabo en un difractómetro Bruker-Nonius CAD4 con radiación de Cu K_α

La planta fue autenticada taxonómicamente por el Dr. Jerzy Rzedowski conservándose un ejemplar en del Instituto de Ecología A.C. en Pátzcuaro, Mich.

7.2. Material vegetal

Ageratina glabrata fue colectada en diferentes épocas de los años 2014 al 2017, a orilla de la carretera del km 4.5 de la carretera federal No 200, Pátzcuaro-Santa Clara del Cobre, en las coordenadas N19° 29.516', W101° 35.273' a 2285 m sobre el nivel del mar. Se dejó secar a la sombra por un periodo de diez días

trascurrido este periodo se llevó a cabo la separación en sus distintas partes; flor, hoja y tallo.

7.3. Obtención de extractos

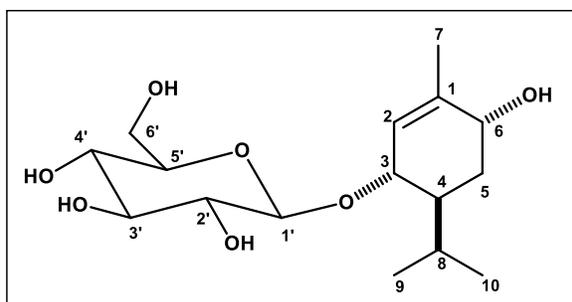
Un lote de 460 g de flor de *A. glabrata* se pusieron a macerar con 2.5 L a temperatura ambiente durante tres días, transcurrido este tiempo se concentró en un rotavapor repitiendo este proceso tres veces; obteniendo 16 g (3.5% de rendimiento) del extracto hexánico. Se continuó la maceración utilizando diclorometano como segundo disolvente obteniendo 35 g (7.6% de rendimiento) de este extracto, por último, se utilizó metanol como disolvente, repitiendo el procedimiento anteriormente descrito obteniendo 83 g (18% de rendimiento) del extracto metanólico.

7.4. Cromatografía en columna

Un lote de 50 g de extracto metanólico de flor fue llevado a separación cromatográfica empleando una columna de cristal de 4 cm de diámetro y 40 cm de altura empacada con gel de sílice 230-400 mallas y como fase móvil mezclas de CH₂Cl₂-AcOEt y AcOEt-MeOH en orden de polaridad creciente, colectando fracciones de 20 mL. Después de varias recromatografías sucesivas se obtuvieron los siguientes derivados:

(-)-(3S,4S,6R)-3,6-dihidroxi-1-menteno 3-O-β-D-glucopiranosido (27)

De las fracciones eluidas con la polaridad AcOEt-MeOH (4:1) se obtuvo una miel color amarillo para el derivado del *p*-menteno glicosilado **27**.



$[\alpha]_{589} -58$, $[\alpha]_{578} -61$, $[\alpha]_{546} -69$ (c 1.6, CH₃OH).

IR (CH₃OH) ν_{\max} 3383, 2953, 1646 cm⁻¹.

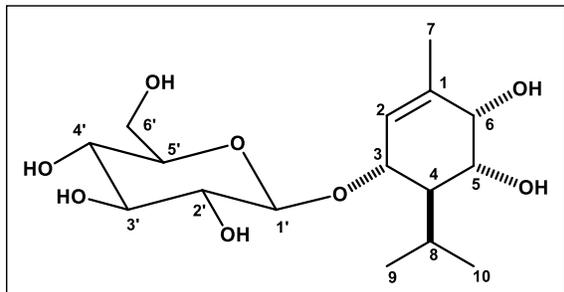
HRESI/APCIMS m/z 355.1735 (calculado para C₁₆H₂₈O₇ + Na⁺, 355.1727).

RMN de ¹H (Ver **Tabla 1**)

RMN de ¹³C (100 MHz, CD₃OD) δ ppm 138.5 (C, C-1), 127.1 (CH, C-2), 102.1 (CH, C-1'), 78.2 (CH, C-3'), 77.7 (CH, C-5'), 76.4 (CH, C-3), 75.0 (CH, C-2'), 71.8 (CH, C-4'), 68.2 (CH, C-6), 62.9 (CH₂, C-6'), 40.8 (CH, C-4), 30.5 (CH₂, C-5), 26.3 (CH, C-8), 21.4 (CH₃, C-9), 20.7 (CH₃, C-7), 17.1 (CH₃, C-10).

(-)-(3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-3,5,6-trihidroxi-1-menteno 3-*O*- β -D-glucopiranosido (**29**)

De las fracciones eluidas con la polaridad AcOEt-MeOH (7:3) se obtuvo una miel color marrón para el derivado del *p*-menteno glicosilado **28**.



$[\alpha]_{589} -39$, $[\alpha]_{578} -41$, $[\alpha]_{546} -49$ (*c* 0.9, CH₃OH).

IR (CH₃OH) ν_{\max} 3372, 2922, 1652 cm⁻¹.

HRESI/APCIMS *m/z* 371.1678 (calculado para C₁₆H₂₈O₈ + Na⁺, 371.1676).

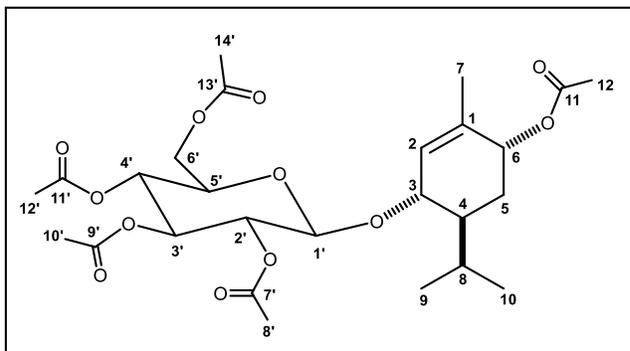
RMN de ¹H (400 MHz, CD₃OD) δ ppm

5.69 (1H, m, H-2), 4.43 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-1'), 4.19 (1H, da, *J* = 7.9 Hz, H-3), 3.86 (1H, dd, *J* = 11.7, 2.2 Hz, H-6'a), 3.81 (1H, d, *J* = 3.8 Hz, H-6), 3.68 (1H, dd, *J* = 11.7, 2.2 Hz, H-6'b), 3.55 (1H, dd, *J* = 10.5, 3.8 Hz, H-5), 3.37 (1H, dd, *J* = 9.0, 8.8 Hz, H-3'), 3.31 (1H, m, H-4'), 3.26 (1H, m, H-5'), 3.15 (1H, dd, *J* = 9.0, 8.0 Hz, H-2'), 2.17 (1H, septd, *J* = 7.0, 3.3 Hz, H-8), 1.84 (1H, m, H-4), 1.82 (3H, t, *J* = 1.4 Hz, CH₃-7), 1.06 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, CH₃-9), 1.05 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, CH₃-10).

RMN de ¹³C (100 MHz, CD₃OD) δ ppm 137.7 (C, C-1), 125.7 (CH, C-2), 101.6 (CH, C-1'), 78.1 (CH, C-3'), 77.8 (CH, C-5'), 75.1 (CH, C-2'), 75.0 (CH, C-3), 71.9 (CH, C-4'), 71.6 (CH, C-6), 70.8 (CH, C-5), 63.0 (CH₂, C-6'), 46.5 (CH, C-4), 27.0 (CH, C-8), 21.4 (CH₃, C-9), 20.8 (CH₃, C-7), 19.3 (CH₃, C-10).

Derivado peracetilado **28**

A una solución de 50 mg de (-)-(3*S*,4*S*,6*R*)-3,6-dihidroxi-1-menteno 3-*O*- β -D-glucopiranosido (**27**) en 1 mL de piridina, se le adicionó 1 mL de anhídrido acético, la mezcla de reacción se calentó a 45 °C por un periodo de 4 h. Transcurrido este tiempo se vertió sobre hielo, se extrajo con diclorometano, la fase orgánica se lavó tres veces con ácido clorhídrico al 5%, dos veces con agua, tres con solución saturada de bicarbonato de sodio y dos con agua, se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró en rotavapor, obteniéndose 45 mg del crudo de reacción como una miel verde oscuro. El crudo de reacción fue purificado por cromatografía con gel de sílice y como fase móvil mezclas de hexanos-AcOEt (9:1) de la cual se obtuvieron 40 mg (44% de rendimiento) de un sólido color blanco de **28**.



Sólido amorfo de, p.f 108-110 °C

$[\alpha]_{589} -35$, $[\alpha]_{578} -48$, $[\alpha]_{546} -56$, $[\alpha]_{436} -90$, $[\alpha]_{365} -133$ (c 0.6, CHCl_3).

IR (CHCl_3) ν_{max} 1752 (OAc) cm^{-1} .

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ ppm
 5.49 (1H, sa, H-2), 5.23 (1H, t, $J = 9.5$ Hz, H-3'), 5.16 (1H, t, $J = 3.3$ Hz,

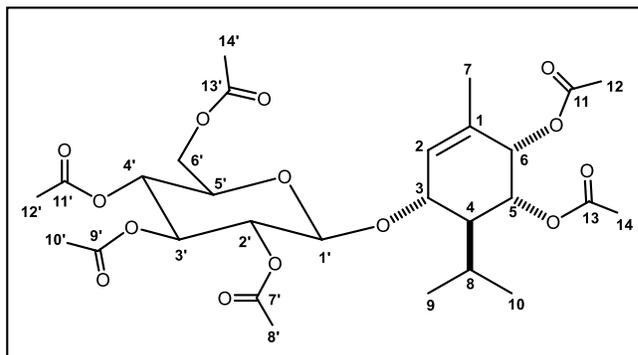
H-6), 5.06 (1H, dd, $J = 10.0, 9.5$ Hz, H-4'), 4.97 (1H, dd, $J = 9.6, 8.0$ Hz, H-2'), 4.62 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-1'), 4.19 (1H, dd, $J = 12.1, 5.5$ Hz, H-6'b), 4.13 (1H, dd, $J = 12.1, 2.6$ Hz, H-6'a), 4.03 (1H, da, $J = 8.8$ Hz, H-3), 3.06 (1H, m, H-5'), 2.08 (3H, s, AcO-14'), 2.06 (3H, s, AcO-10'), 2.05 (3H, s, AcO-8'), 2.05 (1H, m, H-8), 2.03 (3H, s, AcO-12'), 2.01 (3H, s, AcO-12), 1.78 (1H, dt, $J = 14.6, 2.8, 2.8$ Hz, H-5 α), 1.69 (3H, s, CH_3 -7), 1.64 (1H, m, H-4), 1.45 (1H, ddd, $J = 14.6, 12.4, 4.3$ Hz, H-5 β), 0.88 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, CH_3 -9), 0.77 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, CH_3 -10).

RMN de ^{13}C (75.4 MHz, CDCl_3) δ ppm 171.0 (C, AcO-13'), 170.6 (C, AcO-9'), 170.4 (C, AcO-11), 169.4 (C, AcO-11'), 169.3 (C, AcO-7'), 134.9 (C, C-1), 127.8 (CH, C-2), 98.8 (CH, C-1'), 75.9 (CH, C-3), 73.0 (CH, C-3'), 71.7 (CH, C-5'), 71.5 (CH, C-2'), 69.4 (CH, C-6), 68.7 (CH, C-4'), 62.4 (CH_2 , C-6'), 40.0 (CH, C-4), 26.4 (CH_2 , C-5), 25.0 (CH, C-8), 21.24 (CH_3 , AcO-14'), 20.71 (CH_3 , AcO-10'), 20.68 (CH_3 , AcO-8'), 20.62 (CH_3 , AcO-12'), 20.60 (CH_3 , AcO-12), 20.64 (CH_3 , C-9), 20.3 (CH_3 , C-7), 16.4 (CH_3 , C-10).

Derivado peracetilado 30

A una solución de 20 mg de (-)-(3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-3,5,6-trihidroxi-1-menteno 3-*O*- β -D-glucopiranosido (**29**) en 1 mL de piridina, se le adicionó 1 mL de anhídrido acético, la mezcla de reacción se calentó a 45 °C por un periodo de 4 h. Transcurrido este tiempo se vertió sobre hielo, se extrajo con diclorometano, la fase orgánica se lavó tres veces con ácido clorhídrico al 5%, dos veces con agua, tres con solución saturada de bicarbonato de sodio y dos con agua, se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró en rotavapor, obteniéndose 17 mg del crudo de reacción como una miel verde obscuro. El crudo de reacción fue purificado por cromatografía con gel de sílice y como fase móvil mezclas de hexanos-AcOEt

(4:1) de la cual se obtuvieron 15 mg (44% de rendimiento) de una miel incolora de **30**.



$[\alpha]_{589} -9$, $[\alpha]_{578} -9$, $[\alpha]_{546} -10$, $[\alpha]_{436} -16$, $[\alpha]_{365} -20$ (*c* 0.6, CHCl₃).

IR (CHCl₃) ν_{\max} 1754 (OAc) cm⁻¹.

HRESI/APCIMS *m/z* 623.2322 (calculado para C₂₈H₄₀O₁₄ + Na⁺, 623.2310).

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ ppm

5.64 (1H, dd, *J* = 2.4, 1.5 Hz, H-2), 5.39 (1H, da, *J* = 4.1 Hz, H-6), 5.22 (1H, t, *J* = 9.4 Hz, H-3'), 5.05 (1H, dd, *J* = 10.0, 9.4 Hz, H-4'), 4.96 (1H, dd, *J* = 9.4, 8.2 Hz, H-2'), 4.89 (1H, dd, *J* = 11.4, 4.1 Hz, H-5), 4.64 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, H-1'), 4.16 (1H, m, H-6'b), 4.15 (1H, m, H-6'a), 4.10 (1H, da, *J* = 9.4 Hz, H-3), 3.68 (1H, m, H-5'), 2.12 (3H, s, AcO-14), 2.10 (1H, m, H-8), 2.06 (3H, s, AcO-10'), 2.04 (3H, s, AcO-12'), 2.03 (3H, s, AcO-14'), 2.03 (1H, m, H-4), 2.01 (3H, s, AcO-12), 2.00 (3H, s, AcO-8'), 1.71 (3H, sa, CH₃-7), 0.98 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, CH₃-9), 0.89 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, CH₃-10).

RMN de ¹³C (75.4 MHz, CDCl₃) δ ppm 170.9 (C, AcO-13), 170.6 (C, AcO-13'), 170.3 (C, AcO-9'), 170.2 (C, AcO-11), 169.4 (C, AcO-11'), 169.3 (C, AcO-7'), 132.6 (C, C-1), 127.1 (CH, C-2), 98.6 (CH, C-1'), 74.8 (CH, C-3), 73.0 (CH, C-3'), 71.8 (CH, C-5'), 71.5 (CH, C-2'), 69.4 (CH, C-5), 68.7 (CH, C-6), 68.6 (CH, C-4'), 62.4 (CH₂, C-6'), 42.8 (CH, C-4), 25.2 (CH, C-8), 20.97 (CH₃, AcO-14), 20.94 (CH₃, AcO-10'), 20.72 (CH₃, AcO-12'), 20.67 (CH₃, AcO-14'), 20.60 (CH₃, AcO-12), 20.60 (CH₃, AcO-8'), 20.78 (CH₃, C-9), 20.2 (CH₃, C-7), 17.7 (CH₃, C-10).

7.5. Tratamientos ácidos

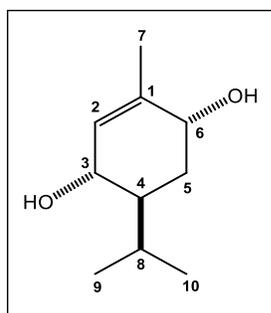
Tratamiento ácido de 27

Un lote de 60 mg de (-)-(3*S*,4*S*,6*R*)-3,6-dihidroxi-1-menteno 3-*O*- β -D-glucopiranosido (**27**) fue disuelto en 3 mL de ácido clorhídrico al 2%, la mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente por un periodo de 30 min. Transcurrido este tiempo la mezcla se extrajo con diclorometano por tres ocasiones, la fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y concentró en el rotavapor de la cual se obtuvieron 35 mg del crudo de reacción como una miel color amarilla. El

crudo de reacción fue purificado por cromatografía con gel de sílice y como fase móvil mezclas de hexanos-AcOEt en orden de polaridad creciente. De este proceso se obtuvieron los dioles **22-24**.

(+)-(3S,4S,6R)-3,6-dihidroxi-1-menteno (22)

De las fracciones eluidas con la polaridad hexanos-AcOEt (2:3) se obtuvieron 15 mg (49% de rendimiento) de cristales incoloros para el diol **22**.



Agujas incoloras de, p.f 166-168 °C.

$[\alpha]_{589} +10$ (c 0.5, CH₃OH).

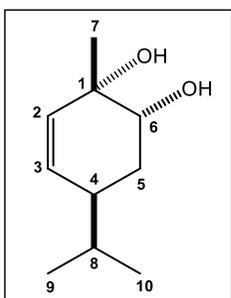
EMIE 70 eV *m/z* (Int. Rel.) [M-CH₃]⁺ 155 (5), 142 (1), 127 (18), 110 (9), 93 (8), 78 (3), 71 (100), 55 (34) y 42 (12).

RMN de ¹H (400 MHz, CD₃OD) δ ppm 5.44 (1H, sa, H-2), 3.89 (1H, ta, *J* = 4.1 Hz, H-6), 3.82 (1H, da, *J* = 9.2 Hz, H-3), 2.09 (1H, dsept, *J* = 6.8, 2.8 Hz, H-8), 1.74 (3H, s, CH₃-7), 1.69 (1H, ddd, *J* = 13.5, 2.8, 2.8 Hz, H-5 α), 1.56 (1H, dddd, *J* = 13.1, 9.2, 2.8, 2.8 Hz, H-4), 1.36 (1H, ddd, *J* = 13.5, 13.1, 4.1 Hz, H-5 β), 0.95 (1H, d, *J* = 6.8 Hz, CH₃-9), 0.80 (1H, d, *J* = 6.8 Hz, CH₃-10).

RMN de ¹³C (100 MHz, CD₃OD) δ ppm 137.3 (C, C-1), 130.9 (CH, C-2), 69.8 (CH, C-3), 68.3 (CH, C-6), 42.7 (CH, C-4), 30.7 (CH₂, C-5), 26.8 (CH, C-8), 21.3 (CH₃, C-9), 20.7 (CH₃, C-7), 17.0 (CH₃, C-10).

(+)-(1S,4S,6R)-1,6-dihidroxi-2-menteno (23)

De las fracciones eluidas con la polaridad hexanos-AcOEt (3:2) se obtuvieron 8 mg (26% de rendimiento) de una miel incolora correspondiente al diol **23**.



$[\alpha]_{589} +43$, $[\alpha]_{578} +45$, $[\alpha]_{546} +52$ (c 0.7, CHCl₃).

IR (CHCl₃) ν_{\max} 3590, 2963, 2876, 1653 cm⁻¹.

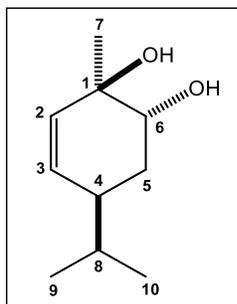
EMIE 70 eV *m/z* (Int. Rel.) [M-OH]⁺ 153 (2), 135 (90), 111 (100), 93 (37) y 43 (39).

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 5.65 (1H, ddd, *J* = 10.4, 2.8, 1.0 Hz, H-3), 5.55 (1H, ddd, *J* = 10.4, 2.8, 1.6 Hz, H-2), 3.76 (1H, dt, *J* = 5.6, 1.6, 1.6 Hz, H-6), 2.19 (1H, ddt, *J* = 14.4, 5.6, 2.8 Hz, H-4), 1.88 (1H, dtd, *J* = 14.2, 5.8, 1.0 Hz, H-5 α), 1.63 (1H, t, *J* = 14.2 Hz, H-5 β), 1.62 (1H, m, H-8), 1.26 (3H, s, CH₃-7), 0.88 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, CH₃-9), 0.87 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, CH₃-10).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 131.9 (CH, C-2), 131.1 (CH, C-3), 72.7 (CH, C-6), 70.2 (C, C-1), 37.5 (CH, C-4), 31.5 (CH, C-8), 29.3 (CH_2 , C-5), 27.0 (CH_3 , C-7), 19.6 (CH_3 , C-9), 19.4 (CH_3 , C-10).

(+)-(1*R*,4*S*,6*R*)-1,6-dihidroxi-2-menteno (**24**)

De las fracciones eluidas con la polaridad hexanos-AcOEt (1:1) se obtuvieron 7 mg (23% de rendimiento) de una miel incolora para el diol **24**.



$[\alpha]_{589} +58$, $[\alpha]_{578} +61$, $[\alpha]_{546} +69$, $[\alpha]_{436} +122$ (c 0.9, CHCl_3).

IR (CHCl_3) ν_{max} 3600, 2961, 2874 cm^{-1} .

HRESI/APCIMS m/z 188.1637 (calculado para $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_2 + \text{NH}_4^+$, 188.1645).

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 5.71 (1H, dd, $J = 10.0$, 3.0 Hz, H-3), 5.62 (1H, ddd, $J = 10.0$, 2.4, 0.8 Hz, H-2), 3.80 (1H, dd, $J = 7.6$, 3.2 Hz, H-6), 2.14 (1H, ddt, $J = 12.4$, 6.8, 3.0 Hz, H-4), 1.83 (1H, ddd, $J = 13.6$, 6.8, 3.2 Hz, H-5 α), 1.73 (1H, td, $J = 13.6$, 7.6 Hz, H-5 β), 1.70 (1H, m, H-8), 1.30 (3H, s, CH_3 -7), 0.93 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, CH_3 -9), 0.92 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, CH_3 -10).

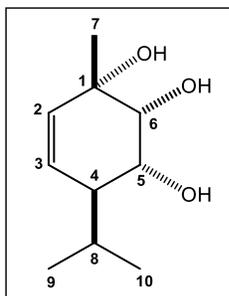
RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 132.1 (CH, C-3), 131.9 (CH, C-2), 73.4 (CH, C-6), 70.9 (C, C-1), 38.4 (CH, C-4), 31.8 (CH, C-8), 28.7 (CH_2 , C-5), 23.5 (CH_3 , C-7), 19.9 (CH_3 , C-9), 19.8 (CH_3 , C-10).

Tratamiento ácido de **29**

Un lote de 45 mg de (-)-(3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-3,5,6-trihidroxi-1-menteno 3-*O*- β -D-glucopiranosido (**29**) fue disuelto en 3 mL de ácido clorhídrico al 2%, la mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente por un periodo de 30 min. Transcurrido este tiempo la mezcla se extrajo con diclorometano por tres ocasiones, la fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y concentró en el rotavapor de la cual se obtuvieron 25 mg del crudo de reacción como una miel color amarilla. El crudo de reacción fue purificado por cromatografía con gel de sílice y como fase móvil mezclas de hexanos-AcOEt en orden de polaridad creciente. De este proceso se obtuvieron a los trioles **25-26**. Con estas condiciones de reacción en un tiempo de 5 h se obtuvieron a **36** y **37**.

(+)-(1S,4S,5R,6R)-1,5,6-trihidroxi-2-menteno (**25**)

De las fracciones eluidas con la polaridad hexanos-AcOEt (1:4) se obtuvieron 10 mg (41% de rendimiento) de una miel incolora para el triol **25**.



$[\alpha]_{589} +64$, $[\alpha]_{578} +66$, $[\alpha]_{546} +75$ (c 0.7, CHCl_3).

IR (CHCl_3) ν_{max} 3416, 2963, 2875, 1625 cm^{-1} .

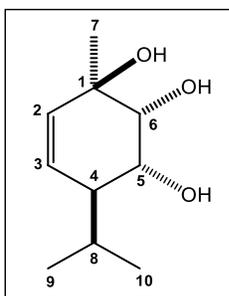
HRESI/APCIMS m/z 209.1156 (calculado para $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_3 + \text{Na}^+$, 209.1148).

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 5.65 (1H, dd, $J = 10.4, 1.2$ Hz, H-2), 5.62 (1H, dd, $J = 10.4, 2.8$ Hz, H-3), 3.92 (1H, dd, $J = 5.6, 2.4$ Hz, H-5), 3.66 (1H, da, $J = 2.4$ Hz, H-6), 2.19 (1H, m, H-4), 1.83 (1H, dsept, $J = 6.8$ y 1.2 Hz, H-8), 1.29 (3H, s, CH_3 -7), 1.00 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, CH_3 -9), 0.89 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, CH_3 -10).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 132.4 (CH, C-2), 127.1 (CH, C-3), 75.0 (CH, C-6), 71.0 (CH, C-5), 71.1 (C, C-1), 47.4 (CH, C-4), 28.6 (CH, C-8), 26.6 (CH_3 , C-7), 21.2 (CH_3 , C-9), 19.0 (CH_3 , C-10).

(+)-(1R,4S,5R,6R)-1,5,6-trihidroxi-2-menteno (**26**)

De las fracciones eluidas con la polaridad hexanos-AcOEt (1:4) se obtuvieron 9 mg (37% de rendimiento) de una miel incolora para el triol **26**.



$[\alpha]_{589} +33$, $[\alpha]_{578} +34$, $[\alpha]_{546} +38$, $[\alpha]_{436} +64$ (c 0.3, CHCl_3).

IR (CHCl_3) ν_{max} 3605, 2964, 2875, 1635, 1051 cm^{-1} .

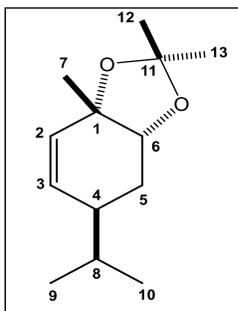
HRESIMS m/z 186.1256 (calculado para $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_3^+$, 186.1251).

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 5.68 (1H, dd, $J = 10.1, 2.1$ Hz, H-3), 5.62 (1H, ddd, $J = 10.1, 2.2, 1.4$ Hz, H-2), 3.97 (1H, dd, $J = 8.4, 2.7$ Hz, H-5), 3.73 (1H, dd, $J = 2.6, 1.3$ Hz, H-6), 2.16 (1H, m, H-4), 2.11 (1H, m, H-8), 1.40 (3H, s, CH_3 -7), 1.04 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, CH_3 -9), 0.85 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, CH_3 -10).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 131.0 (CH, C-2), 129.4 (CH, C-3), 77.1 (CH, C-6), 71.3 (CH, C-1), 68.4 (CH, C-5), 44.6 (CH, C-4), 27.0 (CH, C-8), 25.5 (CH_3 , C-7), 20.8 (CH_3 , C-9), 17.7 (CH_3 , C-10).

(+)-(1S,4S,6R)-1,6-dihidroxi-2-menteno 1,6-acetónido (31)

A una solución de 20 mg de (+)-(1S,4S,6R)-1,6-dihidroxi-2-menteno (**23**) en 2 mL de acetona, se le adicionaron 8 mg de ácido *p*-toluensulfónico la mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente por un periodo de 2 h. Transcurrido este tiempo la mezcla se vertió sobre hielo y se extrajo con diclorometano, la fase orgánica se lavó tres veces con agua destilada, se secó la muestra con Na₂SO₄ anhidro; se filtró, se concentró en rotavapor, obteniéndose 11 mg (45% de rendimiento) de una miel incolora de **31**.



$[\alpha]_{589} +13$, $[\alpha]_{578} +14$, $[\alpha]_{546} +16$, $[\alpha]_{436} +31$ (c 0.6, CHCl₃).

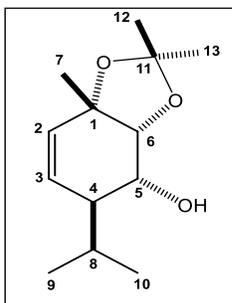
HREIMS m/z 195.1387 [M - CH₃]⁺ (calculado para C₁₂H₁₉O₂⁺, 195.1380).

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 5.58 (1H, dt, $J = 10.4, 1.6$ Hz, H-3), 5.48 (1H, ddd, $J = 10.4, 2.7, 1.7$ Hz, H-2), 4.05 (1H, dt, $J = 3.7, 2.0$ Hz, H-6), 2.23 (1H, m, H-4), 2.07 (1H, dddd, $J = 14.0, 5.1, 3.7, 2.0$ Hz, H-5 α), 1.66 (1H, septd, $J = 6.7, 1.8$ Hz, H-8), 1.42 (1H, ddd, $J = 14.0, 11.4, 2.0$ Hz, H-5 β), 1.38 (3H, d, $J = 0.4$ Hz, CH₃-12), 1.36 (3H, d, $J = 0.4$ Hz, CH₃-13), 1.29 (3H, s, CH₃-7), 0.90 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, CH₃-9), 0.88 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, CH₃-10).

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 130.9 (CH, C-2), 130.2 (CH, C-3), 107.3 (C, C-11), 78.5 (CH, C-6), 77.5 (C, C-1), 35.6 (CH, C-4), 31.2 (CH, C-8), 27.6 (CH₃, C-12), 27.5 (CH₃, C-13), 26.6 (CH₂, C-5), 24.8 (CH₃, C-7), 19.3 (CH₃, C-9), 19.0 (CH₃, C-10).

(+)-(1S,4S,5R,6R)-1,5,6-trihidroxi-2-menteno 1,6-acetónido (32)

A una solución de 25 mg de (+)-(1S,4S,5R,6R)-1,5,6-trihidroxi-2-menteno (**25**) en 2 mL de acetona, se adicionaron 8 mg de ácido *p*-toluensulfónico. La mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 2 h. Transcurrido este tiempo la mezcla de reacción se vertió sobre hielo y se extrajo con diclorometano, la fase orgánica se lavó tres veces con agua destilada, posteriormente se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró en rotavapor, obteniéndose 20 mg (65% de rendimiento) de una miel incolora para **32**.



$[\alpha]_{589} +34$, $[\alpha]_{578} +35$, $[\alpha]_{546} +38$, $[\alpha]_{436} +69$ (c 0.1, CHCl_3).

IR (CHCl_3) ν_{max} 3585, 2958, 2854, 1098, 1003 cm^{-1} .

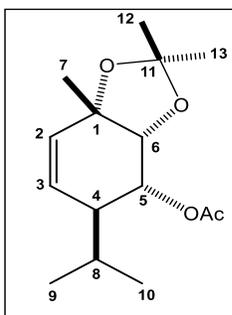
HRESIMS m/z 244.1908 $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$ (calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{O}_3 + \text{NH}_4^+$, 244.1907).

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 5.51 (1H, dd, $J = 10.4, 1.4$ Hz, H-2), 5.47 (1H, da, $J = 10.4$ Hz, H-3), 4.12 (1H, ta, $J = 1.6$ Hz, H-6), 3.58 (1H, da, $J = 9.9$ Hz, H-5), 2.28 (1H, da, $J = 9.9$ Hz, H-4), 2.20 (1H, septd, $J = 7.0, 2.5$ Hz, H-8), 1.41 (3H, s, CH_3 -12), 1.38 (3H, s, CH_3 -13), 1.36 (3H, s, CH_3 -7), 1.05 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, CH_3 -9), 0.83 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, CH_3 -10).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 131.3 (CH, C-2), 125.0 (CH, C-3), 108.6 (C, C-11), 82.4 (CH, C-6), 80.0 (C, C-1), 69.3 (CH, C-5), 43.7 (CH, C-4), 27.7 (CH_3 , C-12), 27.5 (CH_3 , C-13), 25.9 (CH, C-8), 24.9 (CH_3 , C-7), 20.8 (CH_3 , C-9), 17.0 (CH_3 , C-10).

(+)-(1S,4S,5R,6R)-1,5,6-trihidroxi-2-menteno 5-acetoxi-1,6-acetónido (33)

A una solución de 20 mg de (+)-(1S,4S,5R,6R)-1,5,6-trihidroxi-2-menteno 1,6-acetónido (**32**) se le adicionaron 1 mL de piridina y 1 mL de anhídrido acético, la mezcla de reacción se dejó en agitación por un periodo de 3 h, a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se vertió sobre hielo, se extrajo con diclorometano, la fase orgánica se lavó tres veces con ácido clorhídrico al 5%, dos veces con agua, tres con solución saturada de bicarbonato de sodio y dos con agua, se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró en rotavapor, obteniéndose 11 mg (46% de rendimiento) de un aceite incoloro de **33**.



$[\alpha]_{589} +62$, $[\alpha]_{578} +64$, $[\alpha]_{546} +73$, $[\alpha]_{436} +124$ (c 0.6, CHCl_3).

IR (CHCl_3) ν_{max} 2958, 2925, 2869, 2851, 1730, 1465 cm^{-1} .

HRESI/APCIMS m/z 286.2001 (calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_4 + \text{NH}_4^+$, 286.2013).

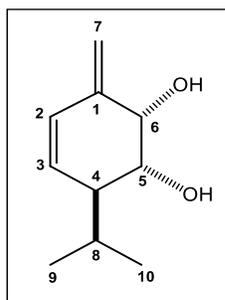
RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ ppm 5.53 (1H, m, H-2), 5.48 (1H, dd, $J = 10.5, 1.1$ Hz, H-3), 4.99 (1H, dd, $J = 10.4, 2.2$ Hz, H-5), 4.06 (1H, ta, $J = 2.2$ Hz, H-6), 2.60 (1H, da, $J = 10.5$ Hz, H-4), 2.16 (3H, s, AcO), 1.40 (3H, s, CH_3 -12), 1.39 (3H, s, CH_3 -13), 1.38 (3H, s, CH_3 -7), 1.83 (1H, septd, $J = 7.0, 2.8$ Hz, H-8), 1.00 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, CH_3 -9), 0.78 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, CH_3 -10).

RMN de ^{13}C (75.4 MHz, CDCl_3) δ ppm 170.8 (C, AcO), 131.6 (CH, C-2), 124.7 (CH, C-3), 109.0 (C, C-1), 80.2 (C, C-11), 80.0 (CH, C-6), 70.6 (CH, C-5), 40.3 (CH, C-4), 27.7 (CH_3 , C-12), 27.5 (CH_3 , C-13), 26.1 (CH, C-8), 24.4 (CH_3 , C-7), 20.5 (CH_3 , C-9), 17.0 (CH_3 , C-10).

Tratamiento ácido de **25**, **26** y **36**

A una solución de **25** y **26** (90 mg) en 1 mL tetrahidrofurano, se le adicionaron 10 mL de ácido clorhídrico al 10%, respectivamente, la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 5 h. Transcurrido este tiempo la mezcla se extrajo con AcOEt por tres ocasiones, la fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y concentró en el rotavapor. Los crudos de reacción fueron purificados por cromatografía con gel de sílice y como fase móvil mezclas de hexanos- CH_2Cl_2 como eluyente. De las fracciones 22-25 (hexanos- CH_2Cl_2 , 3:2) se obtuvo a **37** (20 mg) y las fracciones 28-32 (CH_2Cl_2 - CH_3OH , 1:4) dio a **36** (30 mg). Bajo las mismas condiciones de reacción descritas anteriormente fue tratado el derivado **36** (40 mg), cambiando únicamente el tiempo de reacción a 24 h. El crudo de reacción fue purificado por cromatografía con gel de sílice y como fase móvil mezclas de hexanos- CH_2Cl_2 en orden de polaridad creciente y en las fracciones 5-7 (hexanos- CH_2Cl_2 , 3:2) se obtuvo a **37** (28 mg).

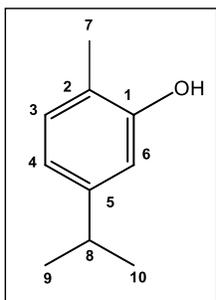
(+)-(4*S*,5*R*,6*S*)-5,6-dihidroxi-10,2-mentadieno (**36**)



RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 6.18 (1H, dd, $J = 10.0, 2.1$ Hz, H-3), 5.70 (1H, dd, $J = 10.0, 2.6$ Hz, H-2), 5.26 (1H, sa, H-7), 5.12 (1H, sa, H-7'), 4.33 (1H, sa, H-6), 3.75 (1H, ta, $J = 5.5$, H-5), 2.29 (1H, m, H-4), 1.96 (1H, septd, $J = 6.8, 1.7$ Hz, H-8), 1.05 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-9), 0.89 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-10);

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 143.5 (C, C-1), 129.0 (CH, C-2), 127.3 (CH, C-3), 115.2 (CH_2 , C-10), 71.8 (CH, C-6), 71.4 (CH, C-5), 46.8 (CH, C-4), 28.3 (CH, C-7), 21.1 (CH_3 , C-8), 18.5 (CH_3 , C-9).

Carvacrol (37)



IR (CHCl₃) ν_{\max} 3394, 3018, 2959, 2927, 2869 cm⁻¹.

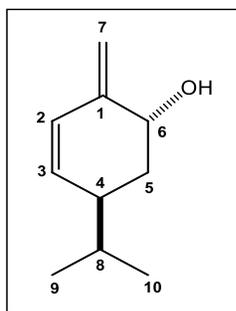
RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 7.04 (1H, d, J = 7.6 Hz, H-3), 6.73 (1H, dd, J = 7.6, 1.6 Hz, H-4), 6.66 (1H, da, J = 1.6 Hz, H-6), 2.83 (1H, sept, J = 6.8 Hz, H-7), 2.21 (3H, s, H-10), 1.22 (3H, d, J = 6.8 Hz, H-8 y H-9).

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 153.6 (C, C-1), 148.5 (C, C-2), 130.8 (CH, C-3), 120.7 (C, C-5), 118.8 (CH, C-4), 113.0 (CH, C-6), 24.0 (CH₃, C-8 y C-9), 15.3 (CH₃, C-10).

Tratamiento ácido de 23, 24 y 38

A una solución de **23** y **24** (100 mg) en 1 mL de tetrahidrofurano, se le adicionaron 10 mL de ácido clorhídrico al 10%, respectivamente, la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 5 h. Transcurrido este tiempo la mezcla se extrajo con AcOEt por tres ocasiones, la fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y concentró en el rotavapor. Los crudos de reacción fueron purificados por cromatografía con gel de sílice y como fase móvil mezclas de hexanos-CH₂Cl₂ como eluyente. De las fracciones 4-7 (hexanos-CH₂Cl₂, 4:1) se obtuvo a **40** (15 mg), de las fracciones 8-12 (hexanos-CH₂Cl₂, 1:1) se obtuvo a **38** (30 mg) y las fracciones 15-17 (CH₂Cl₂-CH₃OH, 3: 7) dio a **39** (6 mg). Las mismas condiciones de reacción descritas anteriormente se utilizaron para tratar al derivado **38** (20 mg). El crudo de reacción fue purificado por cromatografía con gel de sílice y como fase móvil mezclas de hexanos-CH₂Cl₂ en orden de polaridad creciente y en las fracciones 3-6 (hexanos-CH₂Cl₂, 4:1) se obtuvo a **40** (7 mg).

(4S,6R)-6-hidroxi-10,2-mentadieno (38)

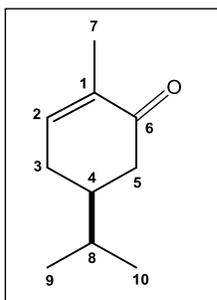


IR ν_{\max} 3410, 2957, 2924, 2871, 1674 cm⁻¹.

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 6.14 (1H, dd, J = 10.1, 1.9 Hz, H-3), 5.83 (1H, dd, J = 10.1, 1.0 Hz, H-2), 5.06 (1H, sa, H-7), 4.96 (1H, sa, H-7'), 4.42 (1H, m, H-6), 2.34 (1H, m, H-4), 1.91 (1H, dtd, J = 13.3, 5.0, 1.1 Hz, H-5 α), 1.72 (1H, septd, J = 6.8, 1.1 Hz, H-8), 1.55 (1H, ddd, J = 13.3, 10.0, 2.8 Hz, H-5 β), 0.93 (6H, da, J = 6.8 Hz, H-9-10).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 145.3 (C, C-1), 134.1 (CH, C-2), 126.6 (CH, C-3), 113.0 (CH_2 , C-7), 69.4 (CH, C-6), 37.2 (CH, C-4), 32.5 (CH_2 , C-5), 31.5 (CH, C-8), 19.61 (CH_3 , C-9), 19.59 (CH_3 , C-10).

(+)-(4S)-Carvotanacetona (39)



$[\alpha]_{589} +43$, $[\alpha]_{578} +45$, $[\alpha]_{546} +53$, (*c* 0.9, CHCl_3)

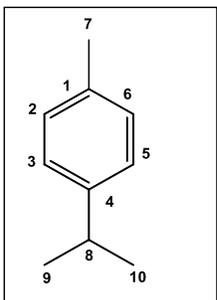
IR ν_{max} 2960, 2926, 2875, 1671 cm^{-1} .

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 6.75 (1H, ddd, $J = 6.0, 2.4, 1.3$ Hz, H-2), 2.53 (1H, ddd, $J = 16.1, 3.7, 1.7$ Hz, H-5), 2.36 (1H, m, H-3), 2.10 (1H, m, H-5'), 2.05 (1H, m, H-3'), 1.84 (1H, m, H-4), 1.77 (3H, dt, $J = 2.4, 1.3$ Hz, H-7), 1.57 (1H, sept, $J = 6.8$ Hz, H-8),

0.92 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-9), 0.91 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-10).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 201.0 (C, C-6), 145.3 (CH, C-2), 135.3 (C, C-1), 42.1 (CH_2 , C-5), 42.0 (CH, C-4), 32.0 (CH, C-8), 29.9 (CH_2 , C-3), 19.5 (CH_3 , C-9), 19.5 (CH_3 , C-10), 15.7 (CH_3 , C-7).

p-cymeno (40)



IR (CHCl_3) ν_{max} 3394, 3018, 2959, 2927, 2869 cm^{-1} .

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 7.11 (4H, m, H-2-3-5-6), 2.87 (1H, sept, $J = 6.9$ Hz, H-8), 2.31 (3H, sa, H-7), 1.23 (6H, d, $J = 6.9$ Hz, H-9-10).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 146.0 (C, C-4), 135.2 (C, C-1), 129.0 (CH, C-5, C-6), 126.0 (CH, C-2, C-3), 33.7 (CH, C-8), 24.1

(CH_3 , C-9, C-10), 21.0 (CH_3 , C-7).

7.6. Reacción general de aromatización con yodo

A una solución de **23** ó **25** (40 mg) en tolueno (10 mL), se le adicionó yodo (40 mg), la mezcla se dejó a reflujo durante 5 h. Transcurrido este tiempo se vertió sobre hielo, se extrajo con hexanos, la fase orgánica se lavó con solución saturada de: tiosulfato de sodio, bicarbonato de sodio y cloruro de sodio, se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró en rotavapor, obteniéndose 28 y 30 mg de carvacrol (**37**), respectivamente. Se tomó un nuevo lote de **23** (30 mg) y bajo las mismas condiciones de reacción descritas anteriormente se llevó a cabo la reacción

disminuyendo el tiempo a 3 h, donde se obtuvo al compuesto **37** y **39** en una proporción 2:1 con respecto al valor de la integral.

7.7. Método para calcular DCV

La búsqueda de los conformeros para **31** y **33**, se realizó mediante el programa Spartan'04, con mecánica molecular por el método MMFF donde se obtuvieron seis y nueve conformeros, respectivamente. Posteriormente fueron optimizadas las energías de los seis y nueve conformeros obtenidos por mecánica molecular, usando teoría de funcionales de la densidad (DFT), con el método B3LYP y un nivel de teoría 6-31G**. Esto con la finalidad de seleccionar solo aquellos conformeros donde su energía no sea mayor a 3 kcal/mol quedándonos así con solo tres conformeros, respectivamente. A estos conformeros se les realizó una nueva optimización de energía para así finalmente obtener las frecuencias de DCV e IR, esto llevado a cabo en el programa Gaussian'03W usando teoría de funcionales de la densidad (DFT) con el método B3LYP aplicando un nivel de teoría DGDZVP para cada uno de los tres conformeros, respectivamente.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Bladé-Font, A., Ordorica-Vargas, J. G., Ordorica-Vargas, M. A., Yañes-Avila, R. Apuntes sobre Mecanismos de Acción de Fármacos, Instituto Politécnico Nacional, México D.F. **1999**; pp 1-7.
2. Feher, M., Schmidt, J. M. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*. **2003**, *43*: 218-227.
3. Newman, D. J., Cragg, G. M. *Journal of Natural Products*, **2016**, *79*: 629-661.
4. Colegate, S. M., Molyneux, J. R. Bioactive Natural Products, CRC Press, New York, U.S.A. **2008**; pp 191-195.
5. Vanden, B. D. A., Vlietinck, A. J. "Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. In methods in plant biochemistry ed. Dey PM and Harborne JB." **1991**; pp 47-67.
6. Green, M. M., Nolte, R. J. M., Meijer E. W. Topics in stereochemistry: Materials-Chirality, Wiley. **2003**.
7. Juaristi, E. Introducción a la Estereoquímica y al Análisis Conformacional, El Colegio Nacional, México D. F. **2007**; pp 2-10.
8. Flack, H. D. *Acta Chimica Slovenica*. **2008**, *55*: 689-691.
9. Flack, H. D., Bernardinelli, G. *Chirality*. **2008**, *20*: 681-690.
10. Sands, D. E. Introducción a la Cristalografía, Reverté, S.A., Traducido en España. **1993**; pp 86-90.
11. Harada, N., Soutome, T., Nehira, T., Uda, H., Oi, S., Okamura, A., Miyano, S. *Journal of the American Chemical Society*. **1993**, *115*: 7547-7548.
12. Stephens, P. J., Devlin, F. J. *Properties and Spectroscopies*, Wiley/CSMP. **2007**; pp 180-181.
13. Nafie, L. A. New Approaches to the Determination of Absolute Configuration for Chiral Pharmaceuticals, *Business Briefing: Pharma Outsourcing*. **2004**; pp 38-43.
14. Cerda-García-Rojas, C. M., García-Gutiérrez, H. A., Hernández-Hernández, J. D., Román-Marín, L. U., Joseph-Nathan, P. *Journal of Natural Products*. **2007**, *70*: 1167-1172.
15. Areche, C., San-Martín, A., Roviroso, J., Muñoz, M. A. Hernández-

- Barragán, A.; Bucio, M. A; Joseph-Nathan, P. *Journal of Natural Products*. **2010**, 73: 79-82.
16. García-Sánchez, E., Ramírez-López, C., Talavera-Alemán, A., León-Hernández, A., Martínez-Muñoz, R., Martínez-Pacheco, M., Gómez-Hurtado, M., Cerda-García-Rojas, C., Joseph-Nathan P., del Río, R. *Journal of Natural Products*. **2014**, 77: 1005-1012.
 17. Gómez-Hurtado, M. A., Torres-Valencia, J. M., Manríquez-Torres, J., del Río, R. E., Motilva, V., García-Mauriño S., Ávila, J., Talero E., Cerda-García-Rojas, C., Joseph-Nathan, P. *Phytochemistry*. **2011**, 72: 409-414.
 18. Villaseñor, J. L. *Interciencia*. **2003**, 28: 160-167.
 19. Villaseñor, J. L. *Revista Sociedad Mexicana de Historia Natural*. **1993**, 117-124.
 20. Turner, B. L. *Phytologia*. **2008**, 90: 358-372.
 21. Rzedowski, C. G., Rzedowski, J. E. Flora Fanerógamica del Valle de México. Instituto de Ecología A. C. Conocimiento y el uso de la biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán. **2005**, 1406.
 22. Li, Z., Wua, M. Z. Jian, G. Y., Irwinc., When, S. Q. *Chemistry y Biodiversity*. **2008**, 5: 40-55.
 23. Ishikawa, T., Takayanagi, T., Kitajima, J. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. **2002**, 50: 1471-1478.
 24. De Marino, S., Festa, C., Zollo, F., Rusolo, F., Capone, F., Guerriero, E., Costantini, S., De Felice, V., Iorizzi M. *Phytochemistry Letters*. **2014**, 10: 152-159.
 25. Galeotti, N., Mannelli, L., Mazzantib, G., Bartolini, A., Ghelardini, C. *Neuroscience Letters*. **2002**, 322: 145-148.
 26. Yamamoto, T. US5773410 (Takasago International Corp.). **1998**, patente otorgada.
 27. Kenmochi, H., Akiyama, T., Yuasa, Y., Kobayashi, T., Tachikawa, A. US5959161 (Takasago International Corp.). **1999**, patente otorgada.
 28. Shiroyama, K., Sawano, K., Ohta, H. US6328982 (Takasago International Corp.). **2001**, patente otorgada.
 29. Calixto, J.B., Kassuya, C., Andre, E., Ferreira, J. *Pharmacology Therapeutics*. **2005**, 106: 179-208.

30. Cao, Y., Wei X., Xu, H., Tang, W. *Fitoterapia*, **2010**, *81*: 1176–1179.
31. Cuenca, M. D. R., Catalan, C. A., Día, J. G., Herz, W. *Journal of Natural Products*. **1991**, *54*: 1162-1164.
32. Wolf-R. A., Burghard, S., Klaus, K. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **1986**, *24*: 24-30.
33. Muhammad, A., Sherkheli, A., Vogt, E., Daniel, B., Leopoldo, R., Beltrán, M., Günter, G., Hanns, H. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. **2010**, *13*: 242-253.
34. Pardo Novoa Julio Cesar. Tesis de Licenciatura Titulada; Escrutinio fitoquímico y antimicrobiano de *Eupatorium glabratum* H.B.K. **2010**.
35. D' Agostino, M., De Simone, F., Zollo F., Pizza, C. *Phytochemistry*. **1990** *29*: 3656-3657.
36. Pardo Novoa Julio Cesar. Tesis de Maestría Titulada; Estudio químico de extractos polares de *Ageratina glabrata* H.B.K. **2014**.
37. Blumann, A., Della, E. W., Henrick, C. A., Hodgkin, J., Jefferies, P. R. *Australian Journal Chemistry*. **1962**, *15*: 290.
38. De Pascual, T. J., Torres, C, González, MS, Grande, M, Bellido, IS. *Phytochemistry*. **1983**, *22*: 2749–51.
39. Dewick, P. M. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach, 3rd Edition. **2009**, 196.
40. Román, L. U., Hernández, J. D., Cerda-García-Rojas C. M., Domínguez-López R. M., Joseph-Nathan P. *Journal of Natural Products*. **1992**, *55*: 577-588.
41. Tamayo-Castillo, G., Jakupovic, J., Bohlmann, F., Rojas, A., Castro, V., King R. M. *Phytochemistry*. **1988**, *27*: 2893-2897.
42. Liu, X., Wu, Q. X., Shi, Y. P. *Journal of the Chinese Chemical Society*. **2005**, *52*: 369–374.
43. Sy, L. K., Brown, G. D. *Phytochemistry*. **1997**, *45*: 537-544.
44. Schenck, G. O. *Angewandte Chemie*. **1957**, *69*: 579-599.
45. Stolow, R. D., Sachdev, K. *Tetrahedron*. **1965**, *21*: 1889-1895.
46. Stolow, R. D., Sachdev, K. *Journal of Organic Chemistry*. **1971**, *36*: 960-966.

47. Turner, J. A., Herz, W. *Journal of Organic Chemistry*. **1977**, *42*: 1895-1900.
48. De Pascual, T. J., Bellido, I. S., Torres, C., Sastre, B. A., Grande, M. *Phytochemistry*. **1981**, *20*: 163-165.
49. Delgado, G., Ríos, M. Y. *Phytochemistry*. **1991**, *30*: 3129-3131.
50. Cuenca, M. D. R., Catalan, C. A., Díaz, J. G., Herz, W. *Journal of Natural Products*. **1991** *54*: 1162-1164.
51. Li, X. Q., Gao, K., Jia, Z. J. *Planta médica*. **2003**, *69*: 356-360.
52. Zhang, T., Chen, D. *Journal of Ethnopharmacology*. **2008**, *117*: 351-361.
53. Sumioka, H., Harinantenaina, L., Matsunami, K., Otsuka, H., Kawahata, M., Yamaguchi, K. *Phytochemistry*. **2011**, *72*: 2165-2171.
54. Liu, D., Qu, W., Liang, J. Y. *Biochemical Systematics and Ecology*. **2013**, *46*: 127-129.
55. Delord, T. J., Malcolm A. J., Fronczek F. R., Fischer N. H., Watkins S. F. *Acta Crystallographica Section C: Crystal Structure Communications*. **1988**, *44*: 765-767.
56. Friedman, M. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2014**, *62*: 7652-7670.
57. Yamada, K., Murata, T., Kobayashi, K., Miyase, T., Yoshizaki, F. *Phytochemistry*. **2010**, *71*: 1884-1891.
58. Domingo, V., Prieto, C., Silva, L., Rodilla, J. M., Quilez del Moral, J. F., Barrero, A. F. *Journal of Natural Products*. **2016**, *79*: 831-837.
59. Weyerstahl, P., Marschall, H., Splittgerber, U., Son, P. T., Giang, P. M., Kaul, V. K. *Flavour and Fragrance Journal*. **1999** *14*; 225-229.
60. Hareau, G. P., Koiwa, M., Hikichi, S., Sato, F. *Journal of the American Chemical Society*. **1999**, *121*; 3640-3650.
61. Krueger, T., Vorndran, K., Linker, T. *Chemistry-A European Journal*. **2009**, *15*; 12082-12091.
62. Sgorbini, B., Cagliero, C., Pagani, A., Sganzerla, M., Boggia, L., Bicchi, C., Rubiolo, P. *Phytochemistry*. **2015**, *117*: 296-305.