



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS

“AISLAMIENTO, DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL Y EVALUACIÓN
DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE METABOLITOS SECUNDARIOS
DE ESPECIES DEL GÉNERO *Ageratina*”

T E S I S

PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A
M. en C. CELIA BUSTOS BRITO

TUTOR: DR. LEOVIGILDO QUIJANO
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

COMITÉ TUTOR:
DRA. MARTHA LYDIA MACÍAS RUBALCAVA
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM
DR. ADOLFO ANDRADE CETTO
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM
DR. JOSÉ FAUSTO RIVERO CRUZ
FACULTAD DE QUIMICA, UNAM

MÉXICO, D. F, MARZO DE 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE	Dr. Alfredo Ortega Hernández
VOCAL	Dra. Rachel Mata Essayag
VOCAL	Dra. Laura Patricia Álvarez Berber
VOCAL	Dr. Ricardo Reyes Chilpa
SECRETARIO	Dr. José Fausto Rivero Cruz

La presente tesis se realizó en el laboratorio 2-6 del
Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México
bajo la dirección del Dr. Leovigildo Quijano
con una beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

CONGRESOS

Aislamiento, determinación estructural y evaluación de la actividad biológica de los metabolitos secundarios de especies del género *Ageratina*. Poster. Celia Bustos Brito, Baldomero Esquivel Rodríguez, Adolfo Andrade Cetto, Fernando Calzada Bermejo y Leovigildo Quijano. 9ª Reunión de Investigación en Productos Naturales (23-29 de mayo de 2013), Pachuca, Hidalgo. México.

Evaluación del efecto hipoglucemiante agudo del extracto acuoso y metanólico de *Ageratina petiolaris* en ratas tratadas con NA-STZ. Poster. Celia Bustos Brito, Adolfo Andrade Cetto y Leovigildo Quijano. Simposio interno en homenaje al Dr. Alfonso Romo de Vivar, Instituto de Química, UNAM (29 de enero de 2014), México, D. F. México.

Aislamiento, elucidación estructural y actividad antidiarreica de derivados del timol de *Ageratina cylindrica*. Poster. Celia Bustos-Brito, Mariano Sánchez-Castellanos, Baldomero Esquivel, Fernando Calzada, Pedro Joseph-Nathan y Leovigildo Quijano. Poster. 10ª Reunión de Investigación en Productos Naturales (21-24 de mayo de 2014), Mérida, Yucatán. México.

Isolation, structural elucidation and biological activity of secondary metabolites from *Ageratina cylindrica*. Poster. Celia Bustos Brito y Leovigildo Quijano. QUIMIUNAM 2015 (22-24 de abril de 2015), México, D. F. México.

Isolation, structural elucidation and biological activity of secondary metabolites from *Ageratina cylindrica*. Poster. Celia Bustos Brito y Leovigildo Quijano. Simposio interno del Instituto de Química, UNAM (8-10 de junio de 2015), México, D. F. México.

PUBLICACIONES

Bustos-Brito, C., Sánchez-Castellanos, M., Esquivel, B., n, J. S., Calzada, F., Yopez-Mulia, F., - n, A., Joseph-Nathan, P., Cuevas, G., Quijano, L. 2014. Structure, Absolute Configuration, and Antidiarrheal Activity of a Thymol Derivative from *Ageratina cylindrica*. *Journal of Natural Products*, 77, 358-363. DOI: 10.1021/np400964w.

Bustos-Brito, C., Sánchez-Castellanos, M., Esquivel, B., n, J. S., Calzada, F., Yopez-Mulia, F., Joseph-Nathan, P., Cuevas, G., Quijano, L. 2015. *ent*-Kaurene Glycosides from *Ageratina cylindrica*. *Journal of Natural Products*. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.5b00488.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de continuar con mi formación académica a través del programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas.

Al Dr. Leovigildo Quijano por su esfuerzo y dedicación al transmitirme un poco de todos sus conocimientos durante mis estudios de doctorado, por la confianza brindada y por su apoyo incondicional tanto en el aspecto académico como personal.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de este proyecto (No. de becario 240055).

Al Dr. Mariano Sánchez Castellanos y Dr. Pedro Joseph Nathan por la determinación de la configuración absoluta mediante Dicroísmo Circular Vibracional.

Al Dr. Adolfo Andrade Cetto por la asesoría para la determinación de la actividad hipoglucemiante.

Al Dr. Fernando Calzada Bermejo y la Dra. Lilian Yépez Mulia por la realización de las pruebas de actividad antiprozoaria y antipropulsiva.

Al M. en C. Baldomero Esquivel Rodríguez por su contribución para la realización de este proyecto.

A mi comité tutor, Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava, Dr. José Fausto Rivero Cruz y Dr. Adolfo Andrade Cetto por sus valiosas aportaciones, opiniones y sugerencias para el desarrollo de este proyecto.

A los miembros del jurado: Dr. Alfredo Ortega Hernández, Dra. Rachel Mata Essayag, Dr. Ricardo Reyes Chilpa, Dra. Laura Patricia Álvarez Berber y Dr. José Fausto Rivero Cruz por las correcciones y comentarios que enriquecieron el documento.

Al personal Técnico del Instituto de Química: Dra. Beatriz Quiroz García, M. en C. Héctor Ríos Olivares, Dr. Rubén Gaviño Ramírez, Dra. _____, M. en C. Elizabeth Huerta Salazar y la Q. Ma. De los Ángeles Peña por la determinación y en su caso, asesoría técnica para la obtención de los espectros de RMN. A la Q. Rocío Patiño por la realización

de la espectroscopia UV-VIS, IR, DC y RO. Al IQ. Luis Velasco y Dr. [redacted] por la determinación de los espectros de masas mediante las técnicas DART, FAB e IE y la M. en C. Carmen Márquez y M. en C. Eréndira García por la determinación de los espectros de masas mediante la técnica de ionización por electrospray (ESI-MS). Al Dr. Simón Hernández por la determinación de la difracción de rayos X.

ÍNDICE

Lista de abreviaturas	I
Índice de Figuras	IV
Índice de Cuadros	VI
1. Antecedentes	1
1.1. El género <i>Ageratina</i> (<i>Eupatorieae</i>)	2
1.2. <i>Ageratina petiolaris</i> (Moc. & Sessé ex DC.) R.M. King & H. Rob	3
1.3. <i>Ageratina cylindrica</i> (McVaugh) R.M.King & H.Rob	4
1.4. Diabetes y medicina tradicional	6
1.5. Diarrea y plantas medicinales	9
2. Justificación	12
3. Objetivos	13
3.1. Objetivo general	13
3.2. Objetivos específicos	13
4. Resultados y discusión	14
4.1. Determinación de la potencial actividad antiprotozoaria de los extractos de <i>Ageratina cylindrica</i> y <i>Ageratina petiolaris</i>	14
4.2. Estudio fitoquímico del extracto hexánico de <i>Ageratina cylindrica</i>	14
4.2.1. Isobutirato de (8 <i>S</i>)-10-benzoiloxi-8,9-epoxi-6-hidroxi-7-oxotimol (9)	16
4.2.2. Isobutirato de 10-benzoiloxi-8,9-epoxi-7-oxotimol (10)	22
4.2.3. Isobutirato de 10-benzoiloxi-8,9-epoxi-7-hidroxitimol (5)	23
4.2.4. Isobutirato de 10-benzoiloxi-8,9-epoxi-7-acetiloxitimol (11)	24
4.2.5. Isobutirato de 10-benzoiloxi-8,9-epoxi-7-isobutiriloxitimol (12)	28

4.2.6. Isobutirato de 10-benzoiloxi-8,9-epoxi-6-hidroxi-isobutiriloxi- timol (13)	28
4.3. Estudio fitoquímico del extracto de diclorometano	29
4.3.1. Isobutirato de 10-benzoiloxi-8,9-dehidro-7-hidroxitimol (14)	29
4.3.2. 10-Benzoiloxi-7,8-dihidroxi-9-isobutiriloxitimol (15)	30
4.4. Estudio fitoquímico del extracto de acetona de <i>Ageratina cylindrica</i>	32
4.5. Estudio fitoquímico del extracto de metanol de <i>Ageratina cylindrica</i>	43
4.6. Estudio fitoquímico del extracto acuoso de <i>Ageratina cylindrica</i>	44
4.7. Actividad antiprotozoaria y antidiarreica de compuestos aislados de <i>Ageratina cylindrica</i>	47
4.8. Evaluación del potencial hipoglucemiante de <i>Ageratina petiolaris</i>	49
4.9. Estudio fitoquímico del extracto acuoso y metanólico de <i>Ageratina petiolaris</i>	51
4.10. Actividad antiprotozoaria de los compuestos aislados de <i>Ageratina petiolaris</i>	53
5. Conclusiones	54
6. Desarrollo experimental	56
6.1. Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y Espectrométricas	56
6.2. Métodos cromatográficos	56
6.3. Evaluación de la actividad antiprotozoaria	57
6.4. Determinación de la actividad inhibitoria de la propulsión intestinal	57
6.5. Evaluación de la actividad hipoglucemiante	58
6.6. Material vegetal	59

6.7. Preparación de los extractos de <i>Ageratina cylindrica</i>	59
6.8. Aislamiento de los metabolitos secundarios de <i>Ageratina cylindrica</i>	59
6.8.1. Estudio fitoquímico del extracto de hexano	59
6.8.2. Estudio fitoquímico del extracto de diclorometano	60
6.8.3. Estudio fitoquímico del extracto de acetona	62
6.8.4. Estudio fitoquímico del extracto de metanol	65
6.8.5. Estudio fitoquímico del extracto acuoso	66
6.9. Preparación de los extractos de <i>Ageratina petiolaris</i>	68
6.9.1. Estudio fitoquímico del extracto de metanol	68
6.9.2. Estudio fitoquímico del extracto acuoso	68
7. Referencias	70
8. Anexos	80
9. Publicaciones	135

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
$[\alpha]^{25}$	Rotación específica a 25 °C
AcOEt	Acetato de etilo
AcOH	Ácido acético
ANOVA	Análisis de varianza
c	Concentración en g/mL
CC	Cromatografía en columna abierta
CCFa	Cromatografía en capa fina analítica
CCFp	Cromatografía en capa fina preparativa
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CHCl ₃	Cloroformo
CI ₅₀	Concentración Inhibitoria media
COSY	“ CO rrelation S pectroscop Y ”: Espectroscopia de Correlación ¹ H- ¹ H en dos dimensiones (2D)
DART-MS	“Direct Analysis in Real Time-Mass Spectrometry”: Espectrometría de Masas mediante Análisis Directo en Tiempo Real
DCV	Dicroísmo Circular Vibracional
DEPT	“Distortionless enhancement by Polarization Transfer”: Incremento de señal sin distorsión por transferencia de polarización
DFT	“Density Functional Theory”: Teoría del funcional de la densidad
EEM	Error Estándar de la Media
ESI-MS	“ E lectro S pray I onization- M ass S pectrometry”: Espectrometría de Masas mediante ionización por Electrospray
FAB-MS	“ F ast A tom B ombardment- M ass S pectrometry”: Espectrometría de masas mediante ionización por Bombardeo con Átomos Acelerados
g	Gramos
Gb	Gigabytes
GHz	Gigahertz

h	Horas
H ₂ O	Agua
HCl	Ácido clorhídrico
HMBC	“Heteronuclear Multiple Bond Correlation”: Correlación Heteronuclear ¹³ C- ¹ H a larga distancia
HRESI-MS	“High Resolution ESI-MS”: Espectrometría de masas de alta resolución mediante ionización por Electrospray
HRFAB-MS	“High Resolution FAB-MS”: Espectrometría de masas de alta resolución mediante ionización por Bombardeo con Átomos Acelerados
HSQC	“Heteronuclear Single Quantum Correlación”: Correlación Heteronuclear ¹³ C- ¹ H a un enlace.
IC	Intervalo de confianza
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
IR	Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
KBr	Bromuro de potasio
Kcal/mol	Kilocalorías por mol
KOH	Hidróxido de potasio
L	Litro
M	Concentración molar
<i>m/z</i>	Relación masa-carga
MeOH	Metanol
mg	Miligramos
mg/dL	Miligramos/decilitro
mg/Kg	Miligramos/kilogramo
MHz	Megahertz
min	Minutos
mL	Mililitros
N	Concentración normal
n	Número de unidades experimentales
Na	Sodio

NA	Nicotinamida
Na ₂ SO ₄	Sulfato de sodio
NaIO ₄	Peryodato de sodio
<i>n</i> -BuOH	<i>n</i> -butanol
nm	Nanómetro
NOM	Norma Oficial Mexicana
OMS	Organización Mundial de la Salud
°C	Grados Celsius
pf	Punto de fusión
Piridina- <i>d</i> ₅	Piridina deuterada
RAM	“Random Access Memory”: Memoria de acceso aleatorio
RMN	Resonancia magnética nuclear
RO	Rotación óptica
SD	“Standard Deviation”: Desviación estándar
STZ	Estreptozotocina
SEMARNAT	SE cretaría de M edio Ambiente y R ecursos NAT urales
T0	Tiempo cero
TMS	Tetrametilsilano
1D-TOCSY	“1D- T otal C orrelation S pectroscop Y ”: Espectroscopia de correlación total en una dimensión
<i>u</i> L	Unidades por litro
UV	Ultravioleta
ε	Coficiente de extinción molar
λ _{máx}	Longitud de onda máxima
δ	Desplazamiento químico (ppm)
μL	Microlitros
μM	Micromolar
ppm	Partes por millón

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Constituyentes químicos de <i>Ageratina petiolaris</i>	4
Figura 2. <i>Ageratina cylindrica</i> , tomado de McVaugh, R. 1972	5
Figura 3. Compuestos con actividad hipoglucemiante aislados de especies pertenecientes a la familia Asteraceae	8
Figura 4. Metabolitos aislados del extracto hexánico de <i>Ageratina cylindrica</i>	15
Figura 5. Estructura del isobutirato de (8 <i>S</i>)-10-benzoiloxi-8,9-epoxi-6-hidroxi-7-oxotimol (9)	18
Figura 6. Gráfico de los espectros IR y DCV experimentales y calculados para el compuesto 9 a un nivel de teoría PBEPBE/DGDZVP	21
Figura 7. Estructura cristalina del isobutirato de (8 <i>S</i>)-10-benzoiloxi-8,9-epoxi-6-hidroxi-7-oxotimol (9) obtenida por difracción de rayos X	22
Figura 8. Estructuras de los isobutiratos de 10-benzoiloxi-8,9-epoxi-7-oxotimol (10) y 10-benzoiloxi-8,9-epoxi-7-hidroxitimol (5)	24
Figura 9. Estructuras de los isobutiratos de 10-benzoiloxi-8,9-epoxi-7-hidroxitimol (11), 10-benzoiloxi-8,9-epoxi-7-isobutiriloxitimol (12) y 10-benzoiloxi-8,9-epoxi-6-hidroxi-7-isobutiriloxitimol (13)	25
Figura 10. Estructuras del isobutirato de 10-benzoiloxi-8,9-dehidro-7-hidroxitimol (14) y 10-benzoiloxi-7,8-dihidroxi-9-isobutiriloxitimol (15).	30
Figura 11. Estructuras propuestas para el derivado del timol aislado de <i>Ageratina glabrata</i>	31
Figura 12. Derivados del ácido <i>ent</i> -kaurenoico aislados del extracto de acetona de <i>Ageratina cylindrica</i>	32
Figura 13. Compuestos 32-36	37
Figura 14. Estructura cristalina del ácido 15-oxo-(16 <i>R</i>)- <i>ent</i> -kauran-19-oico (33) obtenida por difracción de rayos X	37

Figura 15. Isómeros conformacionales más estables de los compuestos 32 y 36 obtenidos a el nivel de teoría B3PW91/DGDZVP	38
Figura 16. Comparación de los espectros IR y DCV experimentales y calculados a un nivel de teoría B3PW91/DGDZVP para 32	39
Figura 17. Comparación de los espectros IR y DCV experimentales y calculados a nivel de teoría B3PW91/DGDZVP para 36	40
Figura 18. Diterpenos aislados de <i>Ageratina vacciniaefolia</i> y de <i>Eupatorium betonicaeforme</i>	43
Figura 19. Estructuras de los compuestos 21-23	44
Figura 20. Compuestos 24-27 , aislados del extracto acuoso <i>Ageratina cylindrica</i>	45
Figura 21. Efecto hipoglucemiante agudo del extracto acuoso y metanólico de <i>Ageratina petiolaris</i> en ratas hiperglucémicas	51
Figura 22. Benzoatos de bencilo aislados del extracto acuoso y metanólico de <i>Ageratina petiolaris</i>	52
Figura 23. Estructura cristalina del compuesto 28 obtenida por difracción de rayos X	53

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Fármacos hipoglucemiantes y principales efectos adversos	7
Cuadro 2. Fármacos antidiarreicos y principales efectos adversos	11
Cuadro 3. Actividad antiprotozoaria de los extractos acuosos y orgánicos de <i>Ageratina cylindrica</i> y <i>Ageratina petiolaris</i>	16
Cuadro 4. Valores de comparación de los espectros de IR y DCV del compuesto 9 a diferentes niveles de teoría	20
Cuadro 5. Datos de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) y ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de los compuestos 5 y 9-11	26
Cuadro 6. Datos de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) y ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de los compuestos 12-15	27
Cuadro 7. Energías relativas y poblaciones conformacionales de los compuestos 32 y 36	39
Cuadro 8. Valores de la comparación de los espectros de IR y DCV para los compuestos 32 y 36 así como de las comparaciones cruzadas	40
Cuadro 9. Datos de RMN ^1H (400 MHz, piridina- d_5) y ^{13}C (100 MHz, piridina- d_5) de los compuestos 17-19	41
Cuadro 10. Datos de RMN ^1H (400 MHz, piridina- d_5) y ^{13}C (100 MHz, piridina- d_5) de los compuestos 25-27	46
Cuadro 11. Actividad antiprotozoaria y antipropulsiva de los compuestos aislados de <i>Ageratina cylindrica</i>	48
Cuadro 12. Actividad antiprotozoaria de los compuestos aislados de <i>Ageratina petiolaris</i>	53

RESUMEN

En la presente disertación se describe el estudio de la composición química de dos especies endémicas de México, *Ageratina cylindrica* (McVaugh) R. M. King & H. Rob, (Asteraceae) y *Ageratina petiolaris* (Moc. & Sessé ex DC.) R. M. King & H. Rob (Asteraceae). El estudio fitoquímico de la especie *A. cylindrica* condujo al aislamiento de 27 compuestos, 14 de los cuales no han sido descritos previamente en la literatura, ocho de estos corresponden a derivados del timol y los seis restantes a derivados del ácido *ent*-kaurenoico. Se determinó por primera vez la configuración absoluta del compuesto **9**, un derivado del timol con un grupo epóxido, mediante espectroscopia de dicroísmo circular vibracional (VCD) en combinación con cálculos teóricos utilizando la teoría del funcional de la densidad (DFT) y mediante la determinación de los parámetros de Flack y Hooft obtenidos mediante difracción de rayos X, utilizando radiación de cobre. La *Ageratina petiolaris* es conocida en el Estado de México como “hierba del Angel” y se utiliza para el tratamiento de la diabetes, mientras que, en el estado de Michoacán se utiliza para el tratamiento de desórdenes estomacales. En este trabajo se evaluó el efecto hipoglucemiante del extracto acuoso y metanólico de las partes aéreas de *A. petiolaris* en ratas con hiperglucemia inducida utilizando el modelo de la Streptozotocina-nicotinamida (STZ-NA) empleando dosis de 40 y 60 mg/Kg en el caso del extracto acuoso y de 67 y 670 mg/Kg para el extracto metanólico. Los extractos mostraron un efecto hipoglucemiante significativo a las tres horas posteriores a la administración. El estudio de los componentes químicos de ambos extractos condujo a la identificación de *L-chiro*-inositol y ácido clorogénico como constituyentes del extracto acuoso y como probables responsables de la actividad. Los compuestos aislados de ambas especies fueron evaluados como antiprotozoarios contra *Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica* y los resultados indican que estos tienen un efecto débil sobre los parásitos. Los derivados del timol **9-13** se evaluaron como inhibidores del hiperperistaltismo intestinal y se observó que los compuestos **9** y **13** representan entidades químicas con importante potencial como antidiarreicos y que el sustituyente hidroxilo en la posición C-6 del anillo del timol parece ser importante para mantener la actividad de los compuestos.

ABSTRACT

In the present dissertation the isolation, structural characterization of secondary metabolites from *Ageratina cylindrica* (McVaugh) R. M. King & H. Rob, (Asteraceae) and *Ageratina petiolaris* (Moc. & Sessé ex DC.) R. M. King & H. Rob (Asteraceae), two endemic species of Mexico, is described. From the leaves of *Ageratina cylindrica*, through successive chromatographic process 27 compounds were isolated, 14 of them were new chemical structures, eight thymol derivatives, and six *ent*-kaurenoic acid glycosides. The absolute configuration of a thymol derivative (compound **9**) was established for the first time by vibrational circular dichroism spectroscopy in combination with density functional theory calculations, and by evaluation of the Flack and Hooft X-ray parameters. *Ageratina petiolaris* is used traditionally in some communities in the State of Mexico for the treatment of diabetes, and it is commonly known as “hierba del ángel”. In the state of Michoacán, it is used to treat stomach disorders. The hypoglycemic effect of the aqueous and methanolic extracts from the aerial parts of *Ageratina petiolaris* were tested by the streptozotocin-nicotinamide (STZ-NA) assay in rats. A single oral administration of the water extract at doses of 40 and 160 mg/kg and doses of 67 and 670 mg/kg of the methanol extract were evaluated. The tested extracts were able to reduce the increase of glucose blood level after three hours of extract administration. *L-chiro*-inositol and chlorogenic acid were isolated as important constituents of the plant and were identified in both extracts along with other constituents. The antiprotozoal evaluation of the isolated compounds against *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* trophozoites is described; all tested compounds showed weak activity. Thymol derivatives **9-13** were also tested for antipropulsive effect activity using the charcoal-gum acacia induced hyperperistalsis model in rats. Compounds **9** and **13** showed high inhibitory effect in this model. The presence of a hydroxyl group at the C(6) position in thymol derivatives **9** and **13** seems to be important for the inhibition of hyperperistalsis.

1. ANTECEDENTES

Las plantas han sido utilizadas para el tratamiento de diversos padecimientos a través de los siglos en todo el mundo. En las áreas rurales de los países en desarrollo son utilizadas como la principal fuente de tratamiento para diversos padecimientos y los compuestos derivados de ellas han mostrado ser una herramienta muy valiosa en la búsqueda de nuevos compuestos biológicamente activos. Se han descrito trabajos donde se demuestra que aproximadamente el 60 % de los fármacos aceptados por la FDA están relacionados con los productos naturales, ya sea por semisíntesis, modificaciones químicas o inspirados en algún metabolito secundario extraído de una fuente natural.¹

Datos descritos por la SEMARNAT indican que México se encuentra en quinto lugar en el número de plantas vasculares que crecen en su territorio y en tercer lugar en plantas endémicas,² lo que lo convierte en un país con una enorme fuente potencial de productos naturales de origen vegetal con diferentes actividades biológicas que pueden ser exploradas.

A pesar de que se han registrado aproximadamente 400,000 especies de plantas en la naturaleza, se considera que solo se ha estudiado la composición química de alrededor del 1% de ellas, de manera que aún existe una alta probabilidad de encontrar nuevas estructuras químicas que resulten biológicamente activas.

La familia Asteraceae o Compositae es la familia más grande de plantas con flores, comprende aproximadamente 23,000 especies divididas en 12 subfamilias y 1,600 géneros.³ Es una de las familias más diversas y la más ampliamente distribuida en el mundo, excepto en el continente Antártico.⁴ En el continente Americano existen alrededor de 373 géneros descritos; alrededor de 371 de éstos crecen en México y 67 de ellos son endémicos de nuestro país.⁵

En la familia Asteraceae se incluyen especies de importancia económica; se han descrito especies usadas como flores de ornato, otras son valiosas fuentes de caucho y sustancias colorantes para textiles, en la industria alimentaria destacan sus usos como colorantes, saborizantes y edulcorantes, además representan una importante contribución a la industria cosmética y apícola. En otro sentido, muchas especies son consideradas como hierbas y malezas invasoras que causan importantes pérdidas económicas en la agricultura.

Especies de la familia Asteraceae se han usado desde tiempos ancestrales en la medicina tradicional de muchos países, entre ellos México, para el tratamiento de diversos padecimientos. Las evaluaciones biológicas de algunas de estas especies han mostrado su actividad como antihelmínticos, antihemorrágicos, anti-inflamatorios, antimicrobianos, diuréticos, analgésicos, hipoglucemiantes, antioxidantes y antiespasmódicos, entre otros.⁶ Ejemplo de lo anterior es el uso del “zoapatle” o “cihuapatli” (*Montanoa tomentosa*), utilizada en México desde tiempos prehispánicos por sus propiedades ocitoxicas para inducir las contracciones uterinas durante el parto y el “qinghao”, “ajenjo dulce o ajenjo chino” (*Artemisia annua*), utilizada en China desde el siglo IV para el tratamiento de la malaria y que fue objeto del premio Nobel de Medicina 2015, otorgado a la científica Youyou Tu por sus investigaciones sobre extractos de plantas utilizadas en la medicina tradicional china para el tratamiento de la malaria. Los trabajos de investigación de la investigadora Youyou Tu llevaron al aislamiento de la artemisinina y al desarrollo de nuevas terapias basadas en este compuesto (“Artemisinin-based Combination Therapy”), que constituyen hoy en día el principal tratamiento recomendado por la OMS para el tratamiento de la malaria.

1.1. El género *Ageratina* (*Eupatorieae*)

En el género *Ageratina* (*Eupatorium*) se incluyen aproximadamente 1,200 especies distribuidas principalmente en las regiones tropicales de América, Europa, Asia y África, aproximadamente 250 especies se concentran en México, América Central y en la Cordillera de los Andes, además de algunas endémicas de los Estados Unidos, Canadá, el Caribe y sur del Brasil.⁷

Algunas especies del género *Ageratina* son utilizadas en el tratamiento de infecciones bacterianas,⁸ infecciones fúngicas,⁹ así como agentes antiinflamatorios¹⁰ y analgésicos.¹¹ De allí que se han obtenido diferentes compuestos con actividades biológicas que podrían ser estructuras líderes en el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos. Entre los constituyentes principales de este género, se encuentran los terpenoides, flavonoides y alcaloides pirrolizidínicos.¹²

1.2. *Ageratina petiolaris* (Moc. & Sessé ex DC.) R.M. King & H. Rob

Ageratina petiolaris es una especie endémica de México.¹³ Se encuentra distribuida en la República Mexicana en los Estados de Veracruz, Tlaxcala, Tamaulipas, San Luis Potosí, Puebla, Oaxaca, Nuevo León, Michoacán, Estado de México, Hidalgo, Aguascalientes, Guanajuato, Durango, Coahuila y Chiapas.¹⁴

La especie se encuentra entre las más de 300 plantas con propiedades hipoglucemiantes reportadas en México¹⁵ y entre las especies descritas en el Atlas de la Medicina Tradicional Mexicana utilizadas para el tratamiento de la diabetes tipo 2.¹⁶

Algunas comunidades del Estado de México refieren a la “hierba del angel” o “yolochichotl” (*Ageratina petiolaris*) como tratamiento para la diabetes.¹⁷ En el estado de Michoacán se utiliza para el tratamiento de algunos desordenes estomacales, dolores musculares, dolor de cabeza, como anticoagulante, astringente, antihistamínico, antirreumático e inmunoestimulante.¹⁸ Además, también se le atribuyen propiedades antibacterianas contra *Helicobacter pylori*.¹⁹

Hasta el momento, se han realizado tres estudios enfocados en la fitoquímica de *Ageratina petiolaris* y se ha observado que los extractos menos polares se encuentran constituidos principalmente por derivados del timol, lactonas sesquiterpénicas, cromenos, triterpenoides y diterpenoides derivados del *ent*-labdano (Figura 1).²⁰

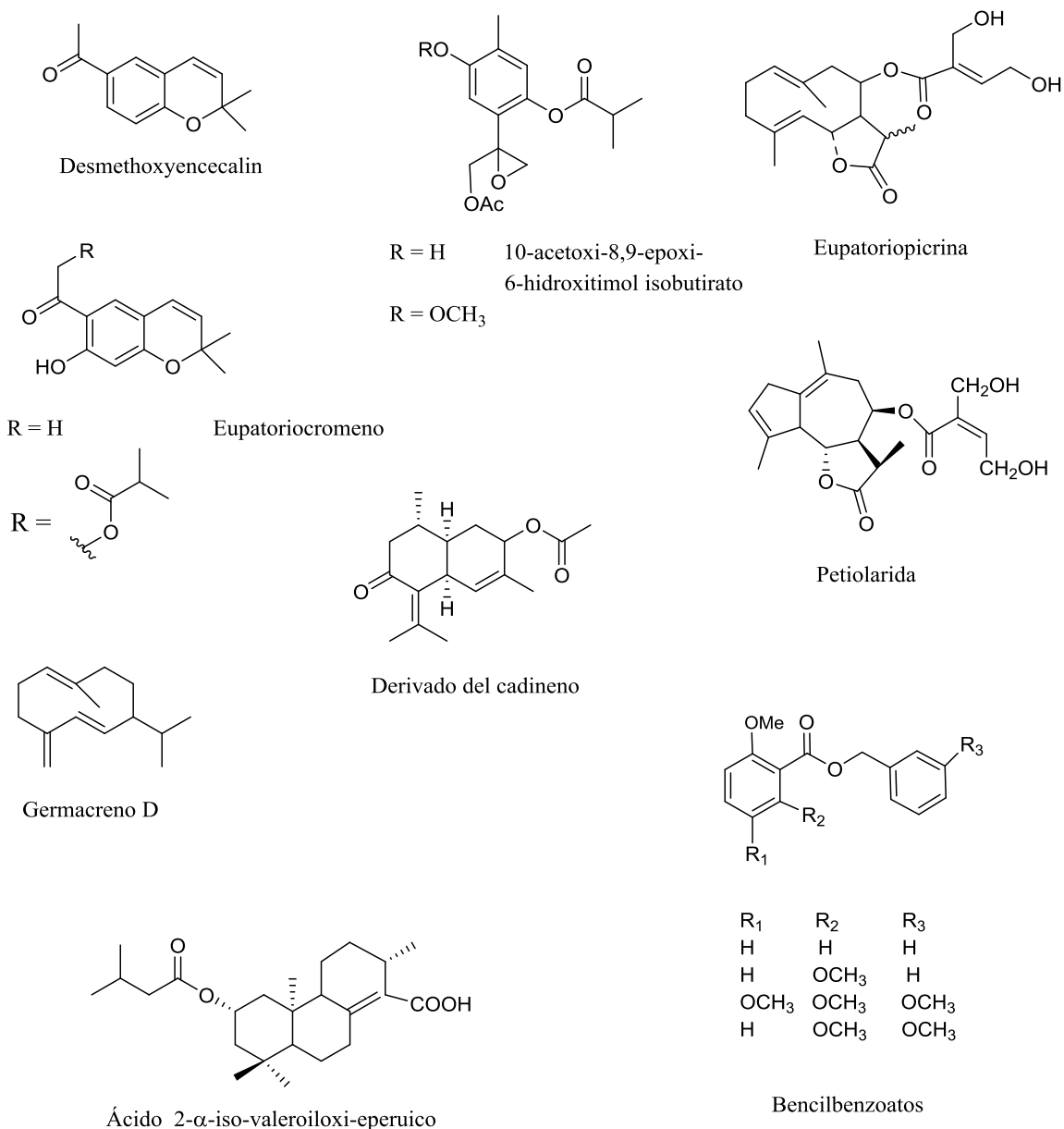


Figura 1. Constituyentes químicos de *Ageratina petiolaris*.

1.3. *Ageratina cylindrica* (McVaugh) R.M.King & H.Rob

Ageratina cylindrica es una especie endémica de México,²¹ se encuentra incluida en la flora de Jalisco, México, Michoacán y Morelos. Se caracteriza por sus flores rosas o moradas; inflorescencia elongada formando un tirso ovoide o subcilíndrico, inflorescencia y brácteas verdes tomentosas; aquenios glutinosos con puntos resinosos (Figura 2).

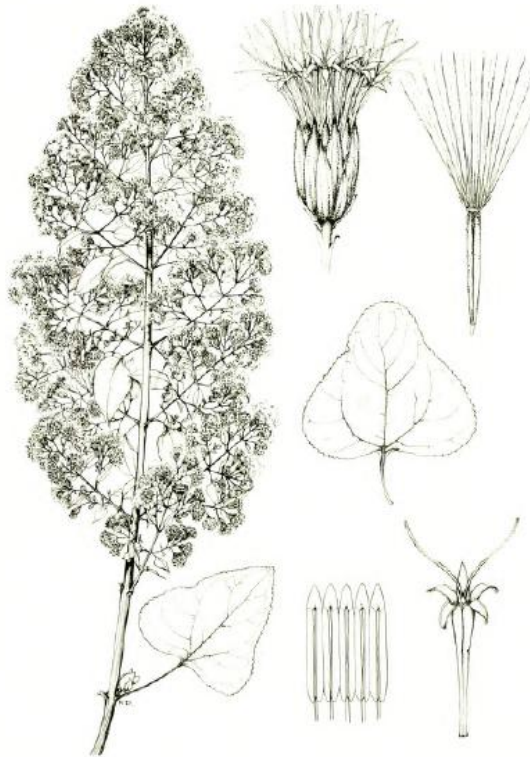


Figura 2. *Ageratina cylindrica*, tomado de McVaugh, R. 1972. Contributions from the University of Michigan Herbarium, 9(4): 393, f. 13.

McVaugh describió la especie originalmente como:

“ Frutex procerus, vel arborescens, caulibus 3-5-metralibus, ramulis foliisque juvenilibus paullo arachnoideo-tomentosis glutinosisque, pedunculis phyllariisque pauciglandulosi; folia mox glabrescentia pilis secum nervum medium et subtus in venarum majorum axillis persistentibus; foliorum laminae late ovatae vel deltoideae, triplinerves vel venis pinnatis, 6-11 cm longae, 5-9 cm latae, saepe tam latae quam longae, vel sesquilongiores quam latiores, apice subobtusae, basi late truncato-sub-cordatae vel rotundatae, marginibus quoque latere dentibus late triangularibus 30-40 dentatis, prope basin integris et in petiolum 3-5 cm longum cuneatim decurrentibus; folia inflorescentiae ramulorum integra vel subintegra, ovata, 1-3.5 longa; inflorescentia thyriformis, cylindrica vel anguste ovoidea, (10) 30-50 cm longa, paucifoliata, ramis ascendentibus 5-15 cm longis, 2-3-plo ramosis; capitula plurima, 21-27-flora, sub anthesi subrosea vel purpurascens, pedunculis 4-10 mm longis; involucrum 20-25 (-30), interiora subaequalia ca 15, elliptico-lanceolata, acuta, 0.8-1 mm lata, exteriora vix breviora, extima

angustiora; corolla alba vel pallide subrosea, 5-6 mm longa, anguste tubuloso-campanulata, lobis 0.8 mm longis pilosis; antherae 1.3-1.5 mm longae, basi obtusae, appendicibus, 0.2-0.3 mm longis; styli ramuli filiformes, exserti 4 mm; achaenia 3.8-4.5 mm longa, nigrescentia, 5-angulata, clavato-columnaria, substipitata, globulis resinosis instructa, et prope apicem etiam stipitato-glandulosa; pappus subroseus, biseriatus setis interioribus ca 30, barbellatis, crassiusculis, apice paullo dilatatis, corollam subaequantibus, exterioribus paucis (ca 10), 0.5-1.5 mm longis; receptaculum glabrum.”²²

1.4. Diabetes y medicina tradicional

Según la Asociación Americana de Diabetes, la diabetes mellitus se define como un grupo de enfermedades caracterizadas por un alto nivel de glucosa plasmática que es resultado de defectos en la capacidad del cuerpo para producir o usar la insulina.²³ La Organización Mundial de la Salud la ha dividido en 3 tipos principales: tipo 1, tipo 2 y gestacional. La primera de ellas es de etiología desconocida y se caracteriza por una producción ineficiente de insulina; la segunda, se debe a la utilización ineficaz de la insulina y la tercera se caracteriza por hiperglucemia que aparece durante el embarazo y alcanza niveles que, a pesar de que son superiores a los normales, son inferiores a los establecidos para diagnosticar una diabetes de tipo 1 ó 2.

La diabetes se ha convertido en un serio problema de salud pública; en 2015, la Federación Internacional de la Diabetes estimó que aproximadamente 415 millones de personas padecían diabetes a nivel mundial y prevé que para el 2040 esta cifra se incremente a 642 millones de individuos.²⁴ Por otro lado, datos reportados por la Organización Mundial de la Salud indican que en 2012 fallecieron 1.5 millones de personas como consecuencia de este padecimiento, y que el 80% de estos decesos se registraron en países de ingresos bajos y medios.²⁵

Las estadísticas indican que la diabetes tipo 2 es la de mayor prevalencia, afecta aproximadamente al 90 % de los individuos que presentan este padecimiento.

Cuando la diabetes se detecta en etapas tardías o no se trata adecuadamente ocasiona complicaciones graves de salud que afectan diversos órganos y sistemas. Los principales efectos de una diabetes no tratada apropiadamente son nefropatía, retinopatía, neuropatía, dislipidemia y enfermedades cardiovasculares. Además del desgaste físico que

este padecimiento representa para el paciente, también implica un alto impacto en la economía; se ha calculado que los gastos médicos de una persona con diabetes son de dos a cinco veces más altos que los de una persona sin este padecimiento.

En México, la situación es muy similar a la del resto del mundo, según datos reportados por la Federación Internacional de Diabetes 2015, México es uno de los países con mayor prevalencia de diabetes. Se calcula que aproximadamente 11.5 millones de personas entre 20 y 79 años padecen esta enfermedad.²⁶

La diabetes es uno de los principales retos que enfrenta el sistema de salud mexicano en términos de atención médica y salud pública. Las terapias actuales para la diabetes tipo 2 incluyen principalmente fármacos orales, tales como sulfonilureas, biguanidas inhibidores de α -glucosidasas, y tiazolidinedionas, los cuales son empleados como monoterapia o en combinación. Sin embargo, todos ellos presentan efectos adversos que deben ser anulados o minimizados (Cuadro 1). Por lo tanto, el desarrollo de nuevos fármacos hipoglucemiantes más seguros, accesibles y efectivos, sigue siendo una necesidad urgente.

Cuadro 1. Fármacos hipoglucemiantes y principales efectos adversos

Categoría	Ejemplo	Principales efectos adversos
Sulfonilureas	Glibenclamida	Hipoglucemia e incremento de peso
Biguanidas	Metformina	Síntomas gastrointestinales (diarrea, náusea y dolor abdominal), acidosis láctica y sabor metálico.
Inhibidores de α -glucosidasas	Acarbosa	Síntomas gastrointestinales (diarrea, calambres abdominales y flatulencias)
Tiazolidinedionas	Rosiglitazona	Hepatotoxicidad

Tomado y modificado de *Nat. Prod.Rep.* 2012, 29, 580-606.²⁷

En este sentido, los productos naturales surgen como una alternativa viable para la búsqueda de nuevas entidades químicas con potencial terapéutico como hipoglucemiantes debido a la inmensa variedad estructural que presentan y utilizando como fundamento el uso tradicional de las plantas para el tratamiento de múltiples enfermedades.

Entre los productos que se han aislado de plantas y que presentan actividad hipoglucemiante se encuentran principalmente los lignanos, flavonoides y terpenoides. La Figura 3 muestra algunos de los compuestos aislados de especies de la familia Asteraceae con potencial actividad como hipoglucemiantes.

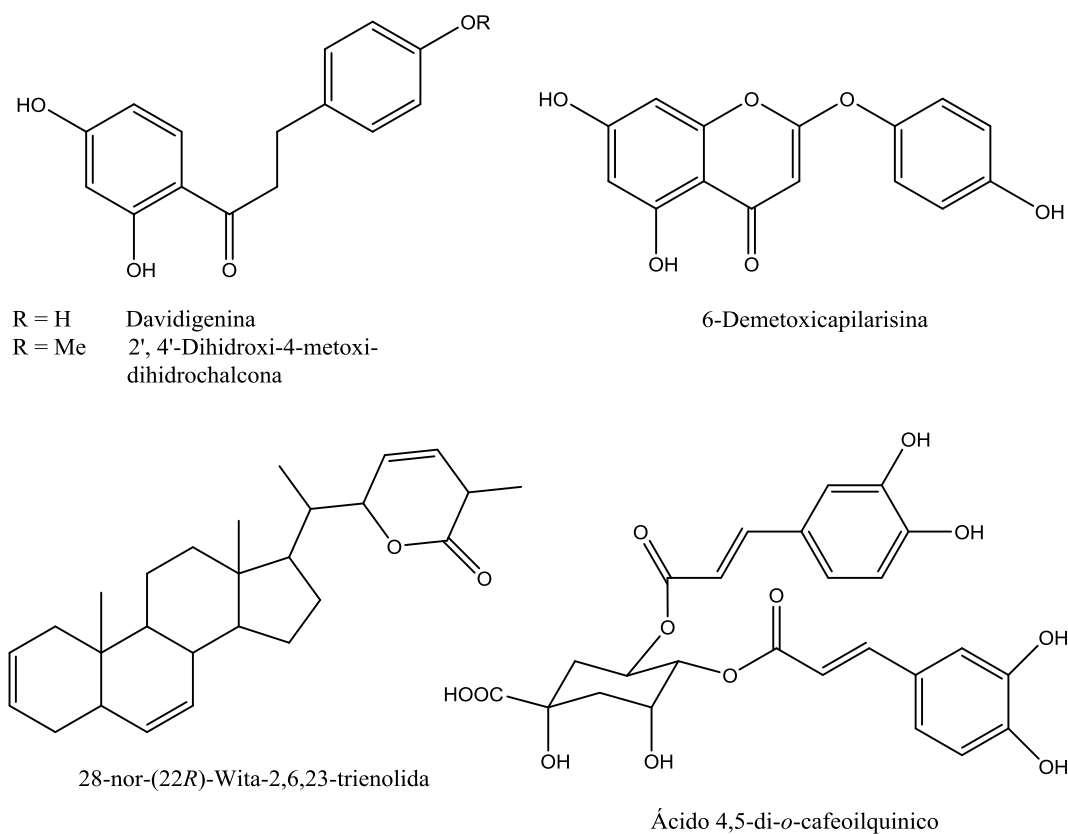


Figura 3. Compuestos con actividad hipoglucemiante aislados de especies pertenecientes a la familia Asteraceae.²⁸

Por otro lado, se sabe que la población recurre al uso de las plantas como una alternativa “segura” y accesible y hace uso de ellas, ya sea como único tratamiento o en combinación con fármacos alopáticos. Cuando un paciente no se siente mejor después de un corto periodo de tiempo utilizando el tratamiento convencional, busca otras alternativas. En un estudio de campo llevado a cabo recientemente se observó que del total de diabéticos entrevistados 97 % estaban bajo prescripción médica, 91 % usaban plantas medicinales como complemento al tratamiento y solo 3% usaban exclusivamente plantas medicinales.²⁹ En México, el uso de plantas para el tratamiento de la diabetes tipo 2 ha sido descrito

previamente,³⁰ sin embargo, en la mayoría de los casos no existen suficientes fundamentos científicos que avalen su uso.

Tomando como antecedente el uso tradicional de las plantas para el tratamiento de la diabetes, así como la amplia diversidad estructural en cuanto a entidades químicas que biosintetizan, es posible considerarlas como un punto de partida en la búsqueda de nuevas entidades químicas con actividad biológica así como una herramienta de estudio para validar su uso tradicional.

1.5. Diarrea y plantas medicinales

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, la diarrea se define como la deposición, tres o más veces al día (o con una frecuencia mayor que la normal para la persona) de heces sueltas o líquidas. Las enfermedades diarreicas son la principal causa de mortalidad y morbilidad en la niñez en el mundo, representan la segunda causa de muerte en niños menores de cinco años y ocasionan la muerte de alrededor de 760, 000 niños al año.

En México, entre 2000 y 2010 la incidencia de este padecimiento disminuyó un 24.8% y desde 1990 no está incluida entre las principales causas de mortalidad. Aunque estos datos son alentadores, también se ha observado que las mayores tasas de incidencia se reportan en niños menores a un año,³¹ lo que marca la pertinencia de la búsqueda y desarrollo de nuevos fármacos adecuados para el tratamiento de este padecimiento en la población infantil.

La diarrea es causada por diversos organismos bacterianos, virus y parásitos, la mayoría de los cuales, se transmiten por agua con contaminación fecal. *Entamoeba histolytica* es el principal parásito causante de la amibiasis y se ha convertido en un grave problema de salud pública a nivel mundial;³² la amibiasis es considerada como la tercera parasitosis de importancia médica después de la malaria y la esquistosomiasis. Este parásito es el de mayor incidencia en los países en vías de desarrollo en América Latina, donde las condiciones sanitarias, la explosión demográfica y los inadecuados tratamientos intensifican el desarrollo de la infección.³³ Al igual que *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* es un protozooario que frecuentemente es responsable de infecciones gastrointestinales, los tratamientos comunes para la erradicación de estos parásitos, como el

metronidazol, son efectivos pero muestran efectos indeseables tales como dolor epigástrico, náuseas, vómitos, diarrea, anorexia, cefaleas, convulsiones, vértigo, encefalopatía, meningitis aséptica, confusión, alucinaciones, trastornos transitorios de la visión, neuropatía óptica, neuritis, neutropenia, trombocitopenia, daño hepático, prurito, urticaria, entre otros. Se han desarrollado múltiples fármacos para el tratamiento farmacológico de las infecciones diarreicas, sin embargo, como en el caso del metronidazol, no son adecuados para el tratamiento de los niños debido a los efectos secundarios y adversos que presentan, por lo que la investigación y desarrollo de nuevos agentes eficaces y selectivos para mejorar la terapia contra la diarrea se ha incrementado notablemente y los productos naturales juegan un rol crucial en el desarrollo de una nueva generación de fármacos antidiarreicos.

La diarrea puede ser causada por otros factores no infecciosos tales como trastornos funcionales del intestino (síndrome del intestino irritable), enfermedades intestinales, intolerancias alimentarias y reacciones medicamentosas. Independientemente de la etiología de la diarrea, esta representa un problema grave no solo para la población infantil; en adultos, el síndrome de intestino irritable es la principal causa de ausentismo laboral y representa un impacto profesional negativo en el individuo, la sociedad y el Sistema de Salud.³⁴

Se ha hecho énfasis en el uso de la rehidratación oral como terapia de reemplazo para reconstituir los fluidos y electrolitos perdidos. Sin embargo, generalmente el tratamiento para la diarrea no es específico y la terapia debe enfocarse en la reducción de los movimientos intestinales y detención rápida y eficaz de las evacuaciones, para tal efecto, existen en el mercado fármacos sintéticos tales como los que se muestran en el Cuadro 2, que están disponibles para el tratamiento de la diarrea pero que presentan efectos adversos e incrementan la resistencia de los patógenos a los antibióticos comunes.

Por lo tanto, la investigación y desarrollo de agentes más efectivos y seguros para el tratamiento de la diarrea continúa siendo un área de alto impacto en la investigación.

En México se han descrito varias especies de plantas con potencial terapéutico para el tratamiento de los desórdenes gastrointestinales que actúan ya sea como antibacterianos, antiprotozoarios o por inhibición de la motilidad intestinal.³⁵

En conclusión, la importancia de las investigaciones enfocadas a la búsqueda de productos naturales como alternativas de fármacos antidiarreicos continúa siendo una de las opciones más viables para identificar y evaluar el potencial farmacológico de las plantas, así como de los metabolitos derivados de ellas.

Cuadro 2. Fármacos antidiarreicos y principales efectos adversos

	Fármaco	Efecto adverso
Antisecretores	Sulfasalazina	Erupciones, fiebre, dolor de articulaciones y hemolisis
	Subsalicilato de bismuto	Ninguno a dosis terapéuticas
	Atropina	Visión borrosa
	Mesalazina	Nauseas, dolor abdominal y dolor de cabeza
Antimotilidad	Codeína	Nausea, vómito y mareos
	Difenboxilato de atropina	Apnea, sedación, obnubilación mental
	Loperamida	Calambres abdominales y erupciones

2. JUSTIFICACIÓN

Considerando la elevada incidencia e importancia de la diabetes mellitus tipo 2 y las enfermedades diarreicas en México, se hace necesaria la búsqueda de alternativas, tratamientos y nuevas entidades químicas que resulten más accesibles, eficaces y que minimicen los efectos indeseables de los fármacos disponibles en el mercado.

Por otro lado, el endemismo de nuestro país permite explorar un alto número de especies de plantas vasculares que han sido usadas desde tiempos ancestrales por sus propiedades medicinales y que representan una fuente idónea para la búsqueda de novedosas entidades químicas con efecto hipoglucemiante, así como con propiedad antidiarreica, antiprotozoaria y/o para el tratamiento de desórdenes estomacales.

Las investigaciones en productos naturales pueden contribuir al descubrimiento de nuevos compuestos activos con novedosas estructuras, las cuales podrían ser utilizadas como líderes para el desarrollo de fármacos hipoglucemiantes y para el tratamiento de desórdenes estomacales. En el presente proyecto se plantea el análisis químico y la evaluación biológica de dos especies de plantas, como posibles fuentes de antiprotozoarios e hipoglucemiantes de origen natural. La primera de ellas, *Ageratina petiolaris* seleccionada tomando en cuenta el criterio etnobotánico y *Ageratina cylindrica* por su relación taxonómica con la primera. Además, lo anterior, representará un aporte al conocimiento químico y biológico de la flora endémica de México.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Contribuir al conocimiento químico y biológico de especies de la flora mexicana mediante el estudio de dos especies del género *Ageratina*: *Ageratina petiolaris* y *Ageratina cylindrica*.

3.2. Objetivos específicos

Aislar metabolitos secundarios presentes en las especies seleccionadas mediante técnicas cromatográficas.

Elucidar la estructura de los metabolitos secundarios mediante las técnicas espectroscópicas pertinentes y espectrometría de masas.

Evaluar la potencial actividad antiprotozoaria de los extractos orgánicos y acuosos así como de los compuestos puros aislados de las especies en estudio utilizando el método de subcultivos como modelo experimental y empleando a *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia* como organismos de prueba.

Evaluar el efecto hipoglucemiante del extracto acuoso y metanólico así como de los compuestos puros aislados de las partes aéreas de *Ageratina petiolaris* utilizando modelos biológicos convencionales.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Determinación de la potencial actividad antiprotozoaria de los extractos de *Ageratina cylindrica* y *Ageratina petiolaris*

Los resultados de la evaluación antiprotozoaria de los extractos contra *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia* (Cuadro 3) muestran que los valores de CI_{50} se encuentran entre 25.2 mg/mL y 55.0 mg/mL y que los extractos más activos corresponden a los acuosos en ambas especies, lo que es congruente con el uso tradicional de *A. petiolaris* en forma de infusión para el tratamiento de las afecciones estomacales.

La evaluación de la actividad de los extractos indicó que las especies propuestas son buenos candidatos para la búsqueda de nuevos agentes antiprotozoarios, lo que motivó la realización de su estudio fitoquímico.

4.2. Estudio fitoquímico del extracto hexánico de *Ageratina cylindrica*

El estudio del extracto hexánico de *Ageratina cylindrica* condujo al aislamiento e identificación de 13 metabolitos de la especie. Siete de ellos resultaron compuestos descritos con anterioridad en la literatura química como son el ácido 2- α -*iso*-valeroiloxi-eperuico (**4**) de naturaleza diterpénica, los acetatos de los triterpenos pentacíclicos: baurenol (**1**), traxasterol (**6**) y *pseudo*-taraxasterol (**7**), el espatulenol (**8**) de naturaleza sesquiterpénica, además de la mezcla de esteroides, β -sitosterol (**2**) y estigmasterol (**3**) (Figura 4). Los seis compuestos restantes **9**, **5**, **10**, **11**, **12** y **13** corresponden a derivados del timol cuyas estructuras no han sido descritas previamente y los cuales se nombraron cilindrinol A-F respectivamente.

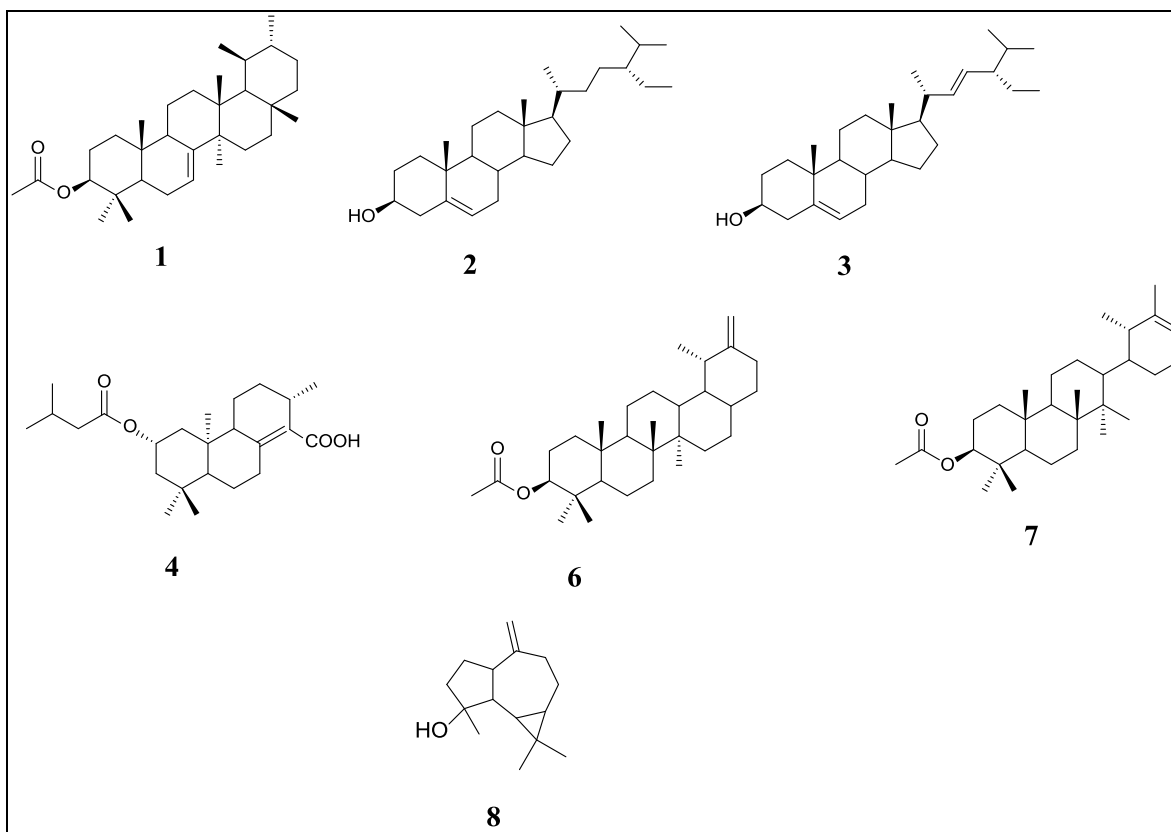


Figura 4. Metabolitos aislados del extracto hexánico de *Ageratina cylindrica*.

Los derivados del timol son compuestos que destacan entre los componentes aislados del género *Ageratina*. La diversidad en cuanto a estructura química y especies vegetales que los biosintetizan, así como la probabilidad de tener centros estereogénicos, incrementa la probabilidad de encontrar entre ellos nuevas entidades químicas con diferentes actividades biológicas. Esta clase de compuestos han sido descritos en 98 especies vegetales y en 42 géneros de la familia Asteraceae. Se encuentra documentado que solo el 10 % de los derivados del timol han sido evaluados biológicamente como antibacterianos, antiinflamatorios, antioxidantes, citotóxicos, piscicidas y agentes alelopáticos.³⁶

Cuadro 3. Resultados de la actividad antiprotozoaria de los extractos acuosos y orgánicos de *Ageratina cylindrica* y *Ageratina petiolaris*

Extracto	Especie /Control	<i>Entamoeba histolytica</i> CI ₅₀ (mg/mL) (IC)	<i>Giardia lamblia</i> CI ₅₀ (mg/mL) (IC)
Hexano	<i>A. cylindrica</i>	47.5 (46.5-48.5)	43.7 (43.2-44.3)
Diclorometano	<i>A. cylindrica</i>	52.6 (51.8-53.4)	45.5 (54.2-45.8)
Acetona	<i>A. cylindrica</i>	48.1 (47.5-48.7)	51.7 (50.2-62.6)
Metanol	<i>A. petiolaris</i>	56.2 (55.5-56.9)	59.0 (58.1-60.7)
	<i>A. cylindrica</i>	51.7 (51.2-52.2)	55.0 (54.0-57.1)
Agua	<i>A. petiolaris</i>	25.2 (25.7-24.8)	38.2 (38.6-37.9)
	<i>A. cylindrica</i>	30.6 (31.1-30.2)	33.7 (34.1-33.2)
	Emetina	1.05 (1.06-1.04)*	0.42 (0.43-0.41)*
	Metronidazol	0.04 (0.05-0.03)*	0.21 (0.28-0.14)*
Metronidazol ^{a,*}		0.23 (0.58-0.17)	1.22 (1.57-0.81)

Los resultados están expresados como la media (n = 6). IC = intervalo de confianza al 95%. Los valores marcados con * se consideraron con diferencia significativa respecto al control con $p \leq 0.05$. CI₅₀ calculada mediante un análisis probit. ^a Controles positivos.

A continuación se describe la elucidación estructural de los derivados del timol aislados de *Ageratina cylindrica*.

4.2.1. Cylindrinol A: Isobutirato de (8S)-10-benzoiloxi-8,9-epoxi-6-hidroxi-7-oxotimol (9)

Por razones de conveniencia, se discute detallada y primeramente la elucidación de la estructura del compuesto **9** (Figura 5).

El isobutirato de (8S)-10-benzoiloxi-8,9-epoxi-6-hidroxi-7-oxotimol (**9**) se aisló como un aceite amarillo y posteriormente fue cristalizado en una mezcla de

hexanos:CH₂Cl₂ (2:1). El compuesto se caracterizó completamente mediante métodos espectroscópicos, principalmente RMN de ¹H y ¹³C incluidos experimentos mono- y bidimensionales, así como homo- y heteronucleares (DEPT, COSY, TOCSY, HSQC y HMBC).

El espectro de RMN ¹H de **9** (Cuadro 5) exhibió dos señales en la región de protones aromáticos, una de ellas a δ 7.32 como una señal doble (d) con constante de acoplamiento, $J = 0.4$ Hz, que se asignó al protón H-2 con acoplamiento a larga distancia con el protón *para* H-5, y otra a δ 7.21 como una señal doble de dobles (dd), con constantes de acoplamiento, $J = 0.8$ y 0.4 Hz, que se asignó al protón H-5 con acoplamiento a larga distancia con H-7 y acoplamiento *para* con H-2, de esta manera estas señales fueron asignadas a H-2 y H-5 del anillo del timol, respectivamente. Dos señales a muy altas frecuencias, una señal simple aguda a δ 10.88 (intercambiable con D₂O) y una señal doble con un desplazamiento, δ 9.85, y una constante de acoplamiento, $J = 0.8$ Hz (no intercambiable con D₂O), fueron asignadas a los protones de un grupo OH fenólico en C-6 y un grupo aldehído en C-1, respectivamente con base en el desplazamiento químico del protón del fenol que se encuentra formando un puente de hidrógeno con el carbonilo del aldehído en C-1 del anillo del timol. Lo anterior fue confirmado por los acoplamientos a tres enlaces observados en el experimento HMBC entre el protón del metino aromático a δ 7.32 (H-2) y el carbonilo del aldehído (C-7, δ 195.6) y entre el protón del fenol (δ 10.88) y el carbón del metino aromático C-5 a δ 118.6 (δ _H 7.21).

Adicionalmente, el protón aromático H-2 (δ 7.32) también mostró acoplamientos a dos y tres enlaces con los cuatro carbonos cuaternarios del anillo aromático C-1 (δ 120.5), C-3 (δ 141.3), C-4 (δ 139.0) y C-6 (δ 159.3). Por su parte, el protón aromático H-5 (δ 7.21) mostró acoplamientos con C-1, C-3, C-6 y con el carbono cuaternario *sp*³ que soporta el grupo epoxi (C-8, δ 57.3).

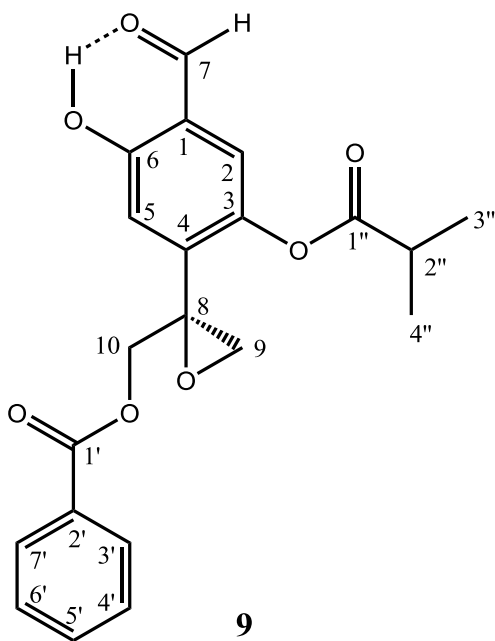


Figura 5. Estructura del isobutirato de (8*S*)-10-benzoiloxi-8,9-epoxi-6-hidroxi-7-oxotimol (**9**).

Las señales múltiples observadas a δ 7.96 (2H), 7.56 (1H) y 7.43 (2H) indicaron la presencia del grupo fenilo de un benzoato, mientras que la presencia de dos señales dobles, una de ellas en δ 1.33 (3H, $J = 6.8$) y otra a δ 1.34 (3H, $J = 6.8$) junto con una señal séptuple en δ 2.87 (1H, $J = 6.8$) revelaron la presencia de un grupo isobutirato en la molécula.

En el espectro de RMN ^1H , se observan además, dos sistemas AB como señales dobles a δ 3.15, 2.88 ($J = 5.2$ Hz) y 4.85, 4.45 ($J = 12.4$ Hz), las cuales fueron atribuidas a los metilenos de las posiciones C-9 y C-10, bases del grupo epoxi y el benzoato respectivamente.

El espectro de RMN ^{13}C mostró 19 señales representando 21 carbonos, los cuales, acorde con el experimento DEPT, corresponden a dos CH_3 , dos CH_2 , nueve CH (dos pares de ellos simétricamente equivalentes) y ocho carbonos cuaternarios.

La posición relativa de los ésteres, fue establecida con base en las correlaciones observadas en el experimento HMBC. El benzoato se ubicó en C-10 con base en los acoplamiento de los protones del metileno en δ 4.85 (H-10a) y 4.45 (H-10b) con el

carbonilo a δ 166.1 (C-1'), el cual a su vez, muestra acoplamiento con los protones aromáticos a δ 7.96 (H-3',7'). Consecuentemente, el isobutirato debe ubicarse en la posición C-3.

El espectro de masas determinado mediante el modo de ionización por electrospray (ESI-MS) muestra un *pseudo* ion molecular de $m/z = 407$ correspondiente al ión $[M+Na]^+$ congruente con la fórmula molecular $C_{21}H_{20}O_7+Na$, lo que apoya la estructura propuesta.

La configuración absoluta de **9** se estableció como (8*S*) por dicroísmo circular vibracional (DCV) en combinación con cálculos teóricos. Este método involucra la comparación del espectro de DCV experimental con el calculado mediante la teoría del funcional de la densidad (DFT). Para esto, se inició con un análisis conformacional de mecánica molecular utilizando el método de Monte Carlo y el campo de fuerzas MMFF94. Este protocolo proporcionó 223 conformeros en un intervalo de energía de 10 kcal/mol respecto al conformero más estable. Dado el alto número de conformeros obtenidos, se realizó un cálculo de punto simple para todas estas estructuras utilizando el nivel de teoría B3LYP/6-31G (d,p), se descartaron aquellas con una energía relativa por arriba de 5 kcal/mol respecto a la más estable obteniéndose únicamente 66 conformeros. Las 66 estructuras obtenidas se sometieron a una optimización de geometría con el funcional B3LYP y la base DGDZVP obteniéndose 31 conformeros con energías relativas dentro de una ventana de 3 kcal/mol. Finalmente, se calcularon las energías libres y la población conformacional asumiendo una distribución de Boltzmann de estas 31 estructuras conformacionales y se eliminaron aquellas con una abundancia menor o igual al 1%. Los 25 conformeros restantes representaron el 94% de la población conformacional total. Los espectros de IR y DCV se calcularon utilizando los momentos dipolares eléctricos y fuerzas rotacionales respectivamente usando funciones Lorentzianas con un ancho de banda de 6 cm^{-1} en cada caso. Finalmente, se obtuvieron los espectros ponderados considerando las 25 estructuras. El Cuadro 4 muestra los resultados de comparación obtenidos usando el software CompareVOA. Al nivel de teoría empleado, los índices de similitud entre los espectros de IR y DCV fueron 86.5 y 66.9 respectivamente con un nivel de confianza del 76 %. Debido al bajo nivel de confianza obtenido, se optó por utilizar el funcional B3PW91. Los cálculos involucrados redujeron el número a 13 conformeros que representaron el 91.8 % de la población conformacional total. Con este nivel de teoría, los

índices de similitud se incrementaron notablemente y el nivel de confianza fue del 100 %. Se ha probado que los métodos DFT son adecuados para predecir las frecuencias vibracionales en el IR, sin embargo, se sabe que los resultados obtenidos utilizando los funcionales B3LYP y B3PW91 sobreestiman las frecuencias con respecto a los resultados experimentales, las cuales son corregidas por el software *CompareVOA*, que calcula el factor de escalamiento (*anH*) requerido para ajustar las frecuencias calculadas con las experimentales. Esto permite que la comparación entre espectros de DCV calculados y experimentales sea lo más confiable posible. Con el objetivo de reducir este efecto en el sistema, se decidió emplear el funcional PBEPBE (optimizado para el cálculo de frecuencias) y la misma base (DGDZVP). El Cuadro 4 muestra que aunque el índice de similitud entre los espectros IR es menor, la comparación de los espectros de DCV es mejor que con los funcionales B3LYP, B3PW91. La comparación de los tres espectros calculados con el experimental muestra que la configuración del centro quiral en el compuesto **9** posee una configuración *S*. Los espectros calculados con el funcional PBEPBE así como los espectros experimentales se muestran en la Figura 6.

Cuadro 4. Valores de comparación de los espectros de IR y DCV del compuesto **9** a diferentes niveles de teoría

Método	^a <i>anH</i>	^b <i>S_{IR}</i>	^c <i>S_E</i>	^d <i>S_E</i>	^e <i>ESI</i>	^f <i>C</i> (%)	^g CPU (min)
B3LYP/DGDZVP	0.972	86.5	66.9	26.0	40.9	76	215
B3PW91/DGDZVP	0.962	92.8	71.6	21.4	50.2	100	266
PBEPBE/DGDZVP	1.002	70.3	72.5	13.4	59.1	100	154

^aFactor de anarmonización o escalamiento. ^bÍndice de similitud de espectro IR con el enantiómero *S*. ^cÍndice de similitud del espectro DCV con el enantiómero *S*. ^dÍndice de similitud del espectro DCV con el enantiómero *R*. ^e Índice de similitud enantiomérica. ^f Nivel de confianza de las asignaciones estereoquímicas. ^gTiempo promedio de cálculo invertido por conformero empleando un nodo con ocho procesadores de 2.93 GHz y 8 Gb de RAM.

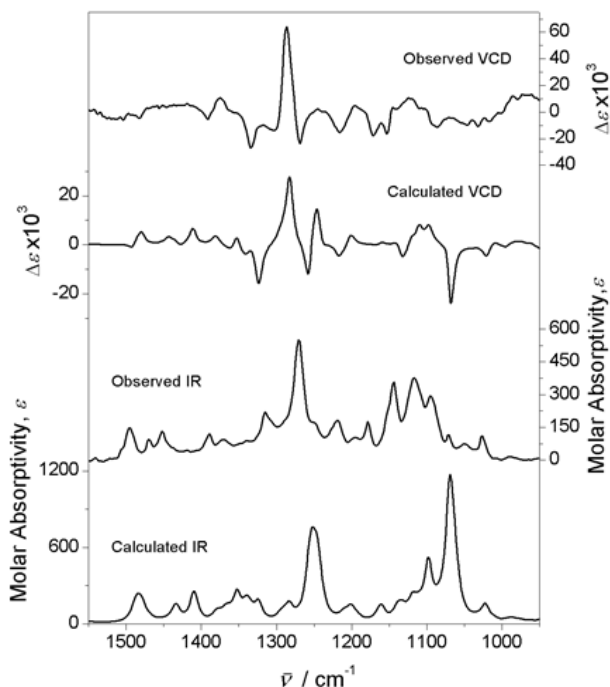


Figura 6. Gráfico de los espectros IR y DCV experimentales y calculados para el compuesto **9** a un nivel de teoría PBE/PBE/DGDZVP.

La configuración *S* para el compuesto **9** también se determinó mediante la evaluación de los parámetros de Flack y Hooft por difracción de rayos X utilizando radiación de cobre, confirmando de esta manera los datos obtenidos mediante DCV/DFT. Los parámetros de Flack (*x*) y Hooft (*y*) obtenidos para el enantiómero *S* correspondieron a -0.1 (2) y 0.02 (5) respectivamente; mientras que para la estructura invertida se determinó (*x*) = 1.1 (2) y (*y*) = 0.98 (5), por lo tanto, la configuración absoluta del centro quiral en el compuesto **9**, corresponde al enantiómero *S* en concordancia con la determinación por DCV/DFT. La Figura 7 muestra la estructura cristalina de **9** obtenida por difracción de rayos X.

De esta manera se determinó la estructura y configuración absoluta del cylindrinol A, como: isobutirato de (8*S*)-10-benzoiloxi-8,9-epoxi-6-hidroxi-7-oxotimol (**9**).

Es importante mencionar que esta es la primera vez que se lleva a cabo este tipo de estudios en un derivado del timol conteniendo un grupo epóxido en su estructura, ya que todos los compuestos de este tipo aislados previamente, se describen como aceites, por lo que no existen datos acerca de su estructura cristalina ni de su configuración absoluta.

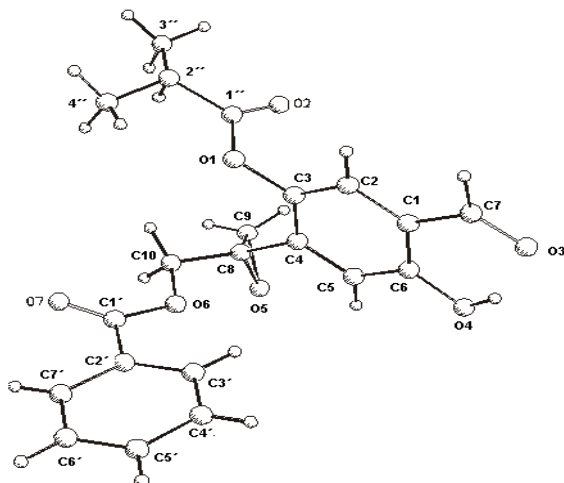


Figura 7. Estructura cristalina del isobutirato de (8S)-10-benzoiloxi-8,9-epoxi-6-hidroxi-7-oxotimol (**9**) obtenida por difracción de rayos X.

4.2.2. Cylindrinol C: Isobutirato de 10-benzoiloxi-8,9-epoxi-7-oxotimol (**10**)

El espectro IR del compuesto **10** mostró absorciones características de grupos carbonilos de éster y aldehídos a 1760, 1763 y 1704 cm^{-1} . Los datos de RMN (Cuadro 5) del compuesto **10**, resultaron muy similares a los del cylindrinol A. En el espectro de RMN ^1H , se observan los cambios inherentes a la ausencia del OH fenólico en C-6. Consecuentemente, en la región de los protones aromáticos, se observaron las señales típicas de un sistema ABX, correspondientes a la sustitución 1, 3, 4 del anillo aromático. Al igual que en el compuesto **9**, un análisis detallado de las constantes de acoplamiento observadas en el espectro del compuesto **10**, mostró a H-2 como una señal doble de dobles con acoplamientos *meta* y *para* en δ 7.62 ($^4J_{\text{H-2,H-6}} = 1.6$, $^5J_{\text{H-2,H-5}} = 0.4$ Hz), H-5 como una doble de triples en δ 7.75, con acoplamientos *orto*, *para* y a larga distancia con el protón del aldehído en C-7 ($^3J_{\text{H-5,H-6}} = 8.0$, $^5J_{\text{H-5,H-2}} = ^5J_{\text{H-5,H-7}} = 0.4$ Hz), y H-6 como una señal doble de dobles con acoplamientos *orto* y *meta* en δ 7.79 ($^3J = 8.0$, $^4J = 1.6$).

Como en el caso del cylindrinol A, se observaron las señales atribuidas a un grupo benzoato y una señal simple ancha a δ 10.00 correspondiente al protón del grupo aldehído y su correspondiente carbono a δ 190.8, el cual mostró correlaciones en el espectro HMBC con las señales asignadas a H-2 y H-6 indicando que el grupo aldehído (C-7) está localizado en la posición C-1 del anillo del timol. Los datos anteriores fueron concluyentes para establecer la estructura del compuesto **10** y su relación con **9**, diferenciada solamente

por la ausencia del grupo hidroxilo fenólico en C-6. Por lo tanto, la estructura del compuesto **10** (cylindrinol C) fue determinada como el isobutirato de 10-benzoiloxi-8,9-epoxi-7-oxotimol (Figura 8).

El espectro de masas de alta resolución determinado por el método FAB⁺ mostró un *pseudo* ion molecular [M+H]⁺ de *m/z* 369.1337 (calculada 369.1338), que es congruente con la fórmula molecular C₂₁H₂₀O₆+H.

4.2.3. Cylindrinol B: Isobutirato de 10-benzoiloxi-8,9-epoxi-7-hidroxitimol (5)

El compuesto **5** presentó un *pseudo* ión molecular [M+H]⁺ a *m/z* 371 en el espectro de masas obtenido por la técnica DART, el cual es consistente con la fórmula molecular C₂₁H₂₂O₆+H. En el espectro IR mostró absorciones características de grupos hidroxilo en 3401 cm⁻¹ y carbonilos de éster en 1754 y 1722 y cm⁻¹. Su espectro de RMN ¹H (Cuadro 5) muestra en la región de protones aromáticos las señales correspondientes a un benzoato como en los compuestos anteriores y de un anillo de tipo timol trisustituido como en el caso del cylindrinol C. El espectro difiere de los anteriores por la ausencia de las señales atribuibles al aldehído y la presencia de una señal simple en δ 4.70 (2H) asignable a un metileno bencílico que se ubicó en la posición C-1. En el espectro HMBC se observan correlaciones de los protones de este metileno (H-7) con C-1 (δ 143.2), C-2 (δ 121.0), C-5 (δ 129.5) and C-6 (δ 124.3), lo que confirma la propuesta.

En el caso de **5**, se observaron acoplamientos bencílicos de H-6 y H-2 con H-7 con una constante de acoplamiento de 0.4 Hz.

De acuerdo con lo anterior, el compuesto **5** (cylindrinol B) se identificó como isobutirato de 10-benzoiloxi-8,9-epoxi-7-hidroxitimol (Figura 8).

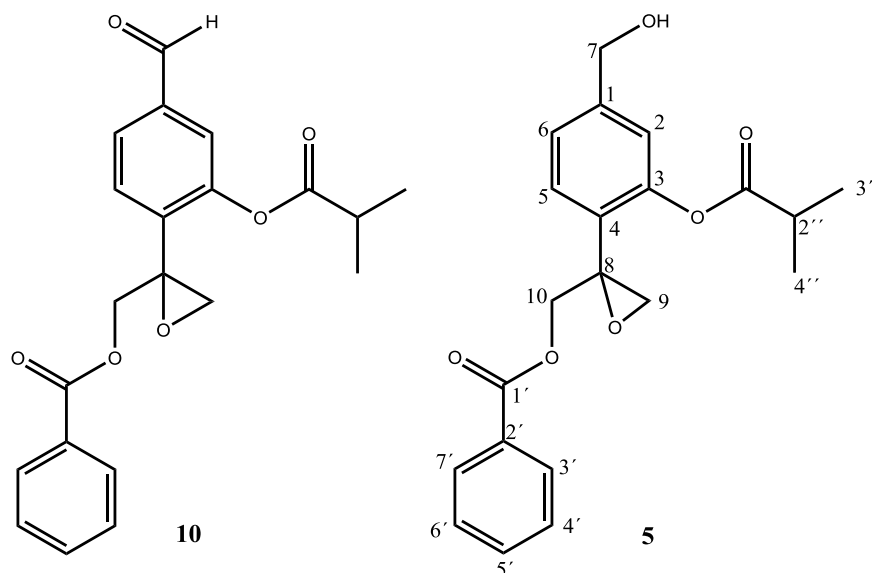


Figura 8. Estructuras de los isobutiratos de 10-benzoiloxi-8,9-epoxi-7-oxotimol (**10**) y 10-benzoiloxi-8,9-epoxi-7-hidroxitimol (**5**).

4.2.4. Cylindrinol D: Isobutirato de 10-benzoiloxi-8,9-epoxi-7-acetiloxitimol (**11**)

En espectro de RMN ^1H (Cuadro 5) del compuesto **11** se observan señales muy similares al compuesto **5**, excepto por el desplazamiento químico de los protones del metileno en C-1, los cuales, están desplazados a frecuencia más alta, δ 5.10 (2H), con respecto al desplazamiento de los mismos en el caso de **5** (δ 4.70 s, 2H), además de la presencia de una señal extra característica del metilo de un acetato en δ 2.11 (3H). El espectro de RMN ^{13}C confirma tal aseveración ya que en él se observan dos señales adicionales, una de ellas en δ 170.8 y la segunda δ 21.1.

Como en el caso del cylindrinol B (**5**), en el compuesto **11** también se observaron acoplamiento bencílicos entre los protones H-2 y H-6 con H-7

El espectro de masas de alta resolución de **11**, determinado por la técnica FAB^+ muestra un *pseudo* ión molecular $[\text{M}+\text{H}]^+$ de m/z 413 que concuerda con la fórmula molecular $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{O}_7$.

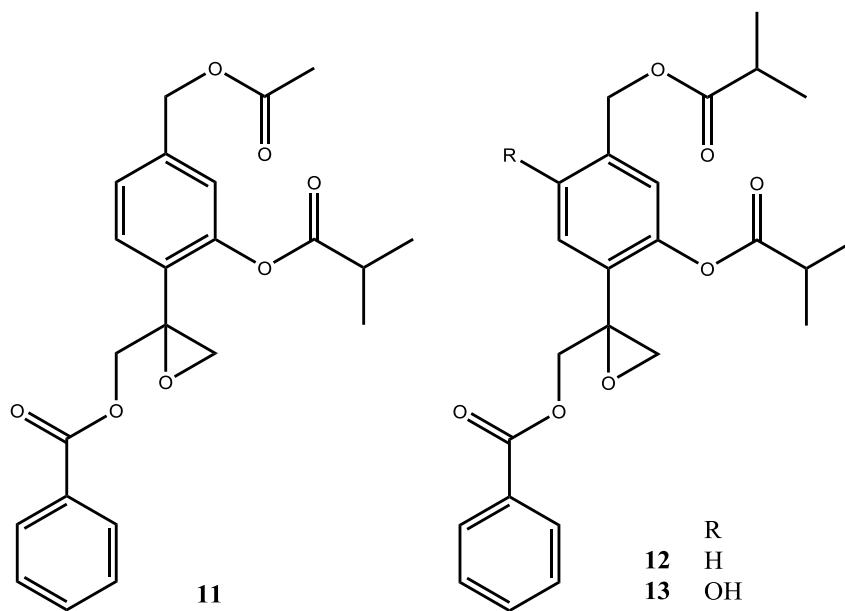


Figura 9. Estructuras de los isobutiratos de 10-benzoiloxi-8,9-epoxi-7-hidroxitimol (**11**), 10-benzoiloxi-8,9-epoxi-7-isobutiriloxitimol (**12**) y 10-benzoiloxi-8,9-epoxi-6-hidroxi-7-isobutiriloxitimol (**13**).

Cuadro 5. Datos de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) y ¹³C (100 MHz, CDCl₃) de los compuestos 5 y 9-11.

	5		9		10		11	
Posición	δ_H (J en Hz)	δ_C	δ_H (J en Hz)	δ_C	δ_H (J en Hz)	δ_C	δ_H (J en Hz)	δ_C
1		143.2, C		120.5, C		137.8, C		138.0, C
2	7.10 dt (1.6, 0.4)	121.0, CH	7.32 d (0.4)	126.8, CH	7.62 dd(1.6, 0.4)	123.6, CH	7.09 dq (1.6, 0.8)	122.4, CH
3		149.1, C		141.3, C		149.6, C		149.1, C
4		128.4, C		139.0, C		135.8, C		129.2, C
5	7.55 d (7.6)	129.5, CH	7.21 dd (0.8, 0.4)	118.6, CH	7.75 dt (8.0, 0.4)	130.2, CH	7.56 d (7.6)	129.6, CH
6	7.25 ddt (7.6, 1.6, 0.4)	124.3, CH		159.3, C	7.79 dd (8.0, 1.6)	127.4, CH	7.25 ddt (7.6, 2.0, 0.8)	125.8, CH
7	4.70 sa	64.6, CH ₂	9.85 d (0.8)	195.6, CH	10.00 sa	190.8, CH	5.10 sa	65.4, CH ₂
8		57.1, C		57.3, C		57.3, C		57.1, C
9a	3.13 d (5.2)	51.1, CH ₂	3.15 d (5.2)	51.2, CH ₂	3.18 d (5.2)	51.2, CH ₂	3.14 d (5.2)	51.1, CH ₂
9b	2.86 d (5.2)		2.88 d (5.2)		2.89 d (4.8)		2.86 d (5.2)	
10a	4.79 d (12.4)	66.1, CH ₂	4.85 d (12.4)	65.9, CH ₂	4.86 d (12.4)	66.0, CH ₂	4.78 d (12.0)	65.9, CH ₂
10b	4.48 d (12.4)		4.45 d (12.4)		4.47 d (12.4)		4.48 d (12.0)	
1'		166.1, C		166.1, C		166.0, C		166.1, C
2'		129.5, C		129.6, C		129.5, C		129.6, C
3', 7'	7.97 m	129.8, 2CH	7.96 m	129.9, 2CH	7.94 m	129.8, 2CH	7.97 m	129.8, 2CH
4', 6'	7.42 m	128.4, 2CH	7.43 m	128.7, 2CH	7.42 m	128.6, 2CH	7.43 m	128.6, 2CH
5'	7.56 tt (7.6, 1.6)	133.3, CH	7.56 m	133.6, CH	7.56 tt (7.6, 2.0)	133.5, CH	7.56 m	133.4, CH
1"		175.5, C		175.6, C		175.1, C		175.3, C
2"	2.86 hep (6.8)	34.4, CH ₂	2.87 hep (6.8)	34.4, CH	2.90 hep (6.8)	34.4, CH	2.87 hep (6.8)	34.4, CH
3" y 4"	1.32, 1.33, d (6.8)	19.1, 19.2, CH ₃	1.33, 1.34 d (6.8)	19.1, 19.2, CH ₃	1.347, 1.354 d (6.8)	19.0, 19.1, CH ₃	1.33, 1.34 d (6.8)	19.1, 19.2, CH ₃
1'''								
2'''								
3''', 4'''							2.11, s	
OCH ₃								170.8, C
OCOCH ₃								21.1, CH ₃
C6-OH			10.88 s					

Cuadro 6. Datos de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) y ¹³C (100 MHz, CDCl₃) de los compuestos 12-15

	12*		13		14		15	
Posición	δ_H (J en Hz)	δ_C	δ_H (J en Hz)	δ_C	δ_H (J en Hz)	δ_C	δ_H (J en Hz)	δ_C
1		138.4, C		122.9, C		142.3, C		143.2, C
2	7.07 d (1.5)	122.2, CH	7.12 s	118.3, CH	7.09 dt (1.6, 0.8)	121.1, CH	6.89 da (1.6)	116.5, CH
3		149.1, C		141.8, C		148.4, C		157.0, C
4		129.0, C		131.9, C		131.9, C		121.5, C
5	7.56 d (8.0)	129.5, CH	7.00 s	125.9, CH	7.34 d (8.0)	130.3, CH	7.10 d (8.0)	127.1, CH
6	7.24 dd (8.0, 1.5)	125.5, CH		153.5, C	7.23, ddt (7.6, 1.6, 0.8)	124.4, CH	6.85 ddt (8.0, 1.6, 0.8)	118.2, CH
7	5.10 sa,	65.1, CH ₂	5.06 s	62.7, CH ₂	4.71 s	64.7, CH ₂	4.62 sa	64.8, CH ₂
8		57.1, C		57.1, C		140.3, C		78.8, C
9a	3.14 d (5.5)	51.1, CH ₂	3.12 d (5.2)	51.1, CH ₂	5.53 dt (1.6, 1.2)	117.7, CH ₂	4.59 d (11.6)	67.6, CH ₂
9b	2.86 d (5.5)		2.86 d (5.2)		5.27 dt (1.6, 1.2)		4.56 d (11.6)	
10a	4.78 d (12.0)	65.9, CH ₂	4.76 d (12.0)	65.7, CH ₂	5.04 t (1.2)	66.7, CH ₂	4.69 s	68.1, CH ₂
10b	4.48 d (12.0)		4.48 d (12.0)		5.04 t (1.2)			
1'		166.1, C		166.1, C		166.2, C		167.0, C
2'		129.8, C		129.7, C		129.7, C		129.4, C
3', 7'	7.96 dd (8.0, 1.5)	129.8, 2CH	7.98 m	129.8, 2CH	8.02 m	129.8, 2CH	7.98 m	129.9, 2CH
4', 6'	7.42 brt (8.0)	128.5, 2CH	7.42 brt	128.6, 2CH	7.43 m	128.5, 2CH	7.43 m	128.7, 2CH
5'	7.56 tt (7.5, 1.5)	133.3, CH	7.55 tt (7.2, 1.6)	133.4, CH	7.56 tt (7.6, 1.2)	133.2, CH	7.57 tt (7.6, 1.6)	133.7, CH
1''		175.3, C		175.8, C		175.7, C		177.8, C
2''	2.86 hep (7.0)	34.4, CH	2.84 hep (7.2)	34.3, CH	2.79 hep (6.8)	34.3, CH	2.54 hep (6.8)	34.1, CH
3'' y 4''	1.328 1.334, d (7.0)	19.13, 19.08, CH ₃	1.31, 1.32 d (7.2)	19.1, 19.2, CH ₃	1.28 d (6.8)	19.0, 2CH ₃	1.11, 1.10, d (6.8)	19.0, 2CH ₃
1'''	2.60 hep (7.0)	175.3, C		179.8, C				
2'''	1.18 d (7.0)	34.4, CH	2.56 hep (7.2)	34.1, CH				
3''', 4'''		19.1, 19.2, CH ₃	1.16 d (6.8)	18.9, 19.0, CH ₃				
C6-OH			7.91 s					
C3-OH							8.94 s	

*Datos de RMN ¹H obtenidos a 500 MHz y ¹³C a 125 MHz.

4.2.5. **Cylindrinol E: Isobutirato de 10-benzoiloxi-8,9-epoxi-7-isobutiriloxitimol (12)**

El espectro de masas del compuesto **12** mostró un *pseudo* ion molecular $[M+H]^+$ en una relación masa/carga de 441 que es consistente con la fórmula molecular $C_{25}H_{28}O_7$. El espectro IR mostró bandas de esteres en 1755 y 1724 cm^{-1} . El espectro de RMN 1H (Cuadro 6) mostró, señales características de un segundo ester isobutírico en $\delta 2.60$ (hep, $J = 7.0$ Hz) y 1.18 (6H, d, $J = 7.0$). En el espectro de RMN ^{13}C (Cuadro 6) se observaron las señales inherentes a la presencia de un isobutirato extra en la molécula, $\delta 175.3$, 34.1 , 19.1 y 19.2 . El carbonilo ($\delta 175.3$) correspondiente al segundo isobutirato mostró acoplamiento con la señal del metileno en $\delta 5.10$ (2H) en el espectro HMBC indicando así que este sustituyente está en la posición 7 del anillo del timol. El resto del espectro fue muy similar a los compuestos ya descritos. Por lo tanto, el compuesto **12** (cylindrinol E) fue identificado como isobutirato de 10-benzoiloxi-8,9-epoxi-7-isobutiriloxitimol (Figura 9).

4.2.6. **Cylindrinol F: Isobutirato de 10-benzoiloxi-8,9-epoxi-6-hidroxi-7-isobutiriloxitimol (13)**

Los espectros de RMN 1H y ^{13}C , del cylindrinol F (**13**), fueron muy similares a los de los compuestos **12** y **9** (Cuadro 6) y llevaron a su identificación como el isobutirato del 10-benzoiloxi-8,9-epoxi-6-hidroxi-7-isobutiriloxitimol (F). En la región de los protones aromáticos del espectro de RMN 1H , además de las señales del grupo benzoato, solo se observaron como en el caso del compuesto **9**, dos señales simples correspondientes a dos protones con disposición *para* ($\delta 7.12$, H-2 y 7.00 , H-5). Los desplazamientos químicos de estos protones son congruentes con la presencia de un grupo hidroxilo adicional en C-6 en comparación con el compuesto **12**. Los datos de RMN ^{13}C (Cuadro 6) también resultaron muy similares a los de los compuestos **12** y **9**, y apoyan la estructura propuesta. En el espectro de ^{13}C , se observan también los cambios inherentes a la presencia de un hidroxilo extra en C-6 en comparación con el compuesto **12**, como son la ausencia de la señal del protón aromático en $\delta 7.24$ y la presencia de la señal de un carbono cuaternario aromático a $\delta 153.5$.

El espectro de masas determinado mediante el modo de ionización FAB muestra un *pseudo* ion molecular de $m/z = 457$ correspondiente al ion $[M + H]$ congruente con la fórmula molecular $C_{25}H_{29}O_8$ que apoya la estructura propuesta.

4.3. Estudio fitoquímico del extracto de diclorometano

El estudio del extracto de diclorometano de *A. cylindrica*, condujo al aislamiento de los compuestos **9**, **10** y **13** aislados previamente del extracto hexánico, así como de dos nuevos derivados del timol (**14** (cylindrinol G) y **15** (cylindrinol H)) no descritos en la literatura. Adicionalmente, se aisló el compuesto **16** que fue identificado como el flavonoide kaempferol. Las estructuras de los compuestos **14** y **15** se ilustran en la Figura 10 y la elucidación estructural de cada uno de ellos se describe a continuación.

4.3.1. Cylindrinol G: Isobutirato de 10-benzoiloxi-8,9-dehidro-7-hidroxitimol (**14**)

El compuesto **14** (Figura 10) se aisló como un aceite incoloro, de peso molecular 354 uma, establecido con base en su espectro de masas determinado por la técnica DART⁺, el cual es congruente con la fórmula molecular $C_{21}H_{22}O_5$. Los espectros de RMN 1H y ^{13}C (Cuadro 6) indicaron que la estructura de **14** está muy relacionada con el compuesto **5**. Tanto el espectro de RMN 1H como ^{13}C , muestran la diferencia debida a la presencia de un grupo metileno terminal en el compuesto **14**, en vez del grupo epoxi. Consecuentemente, en el espectro de RMN 1H de **14**, no se observan las señales del sistema AB atribuido a los protones del grupo epoxi como en los compuestos previamente descritos. Sin embargo, en el espectro se observaron dos señales dobles de triples en δ 5.27 y 5.53 ($J = 1.6$ y 1.2 Hz), las cuales se atribuyeron a un metileno terminal. En el espectro de RMN ^{13}C , las señales correspondientes a los carbonos olefinicos se observaron en δ 117.7 (CH_2) y 140.3 (CH) y se atribuyeron a C-9 y C-8, respectivamente, apoyando la presencia de un doble enlace olefinico terminal en vez del grupo metileno que soportaba al grupo epoxi en el compuesto **5**. De acuerdo con los datos anteriores, la estructura del cylindrinol G (**14**) se estableció como el isobutirato de 10-benzoiloxi-8,9-dehidro-7-hidroxitimol, el cual podría ser considerado como el precursor del compuesto **5** (cylindrol B).

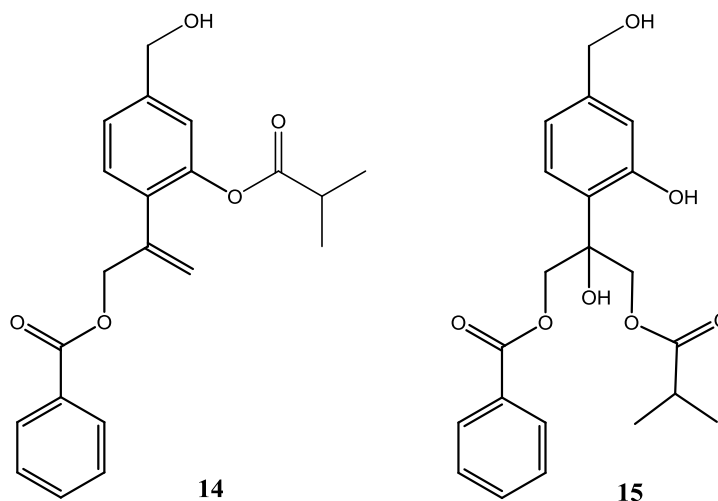


Figura 10. Estructura del isobutirato de 10-benzoiloxi-8,9-dehidro-7-hidroxitimol (**14**) y 10-benzoiloxi-7,8-dihidroxi-9-isobutiriloxi-timol (**15**).

4.3.2. Cylindrinol H: (10-Benzoiloxi-7,8-dihidroxi-9-isobutiriloxi-timol (**15**))

El peso molecular del compuesto **15** (cylindrinol H) fue consistente con la fórmula molecular $C_{21}H_{24}O_7$, con base en el espectro de masas determinado por la técnica ESI^+ de alta resolución y en los datos obtenidos por RMN (Cuadro 6). En el espectro de RMN ^{13}C se observaron tres señales a δ 68.1, 67.6 y 64.8, que por sus desplazamientos químicos y de acuerdo con los experimentos DEPT, deben corresponder a carbonos unidos a oxígeno. El experimento HSQC mostró que estos carbonos correlacionan con las señales de los protones a δ (H) 4.69 (s), δ 4.56/4.59 (AB, $J = 11.6$ Hz) y 4.62 (sa), respectivamente. El sistema AB centrado en 4.58 se asignó al metileno en C-9 con constante de acoplamiento ($J = 11.6$ Hz) de mayor magnitud que las observadas en los compuestos anteriores, mientras que una señal simple a δ 4.69 (2H) se asignó a los protones del metileno C-10 base del benzoato y la señal a δ 4.62 (2H) se atribuyó a los protones del metileno C-7, base de un alcohol primario. En el espectro HMBC se observan las correlaciones entre el metileno C-9 y un carbonilo en δ 177.8 y este, a su vez, con las señales adscritas a los protones de un grupo isopropilo en δ 2.54 (hept, 1H, $J = 7.2$), 1.11 (d, 3H, $J = 7.2$ Hz) y 1.10 (d, 3H, $J = 7.2$ Hz), lo que indica la presencia de un isobutirato en C-9. En el espectro de RMN 1H , además de las señales correspondientes al benzoato, se observan las señales características de un anillo aromático trisustituido a δ 6.89 (da, 1H, $J = 1.6$ Hz), 7.1 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz) y 6.85 (ddt, 1H, $J = 8.0, 1.6, 0.8$ Hz) correspondientes al anillo del timol. Las diferencias

observadas en los desplazamientos químicos de los protones de los metilenos 7, 9 y 10, con respecto a los del compuesto **5**, indican que en el compuesto **15** el isobutirato se ubica en la posición 9. Por otro lado, en el espectro de RMN ^{13}C se observa la señal de un carbono completamente sustituido en δ 78.8 que se asignó al carbono base del hidroxilo terciario. Todo lo anterior permitió la identificación del cylindrinol H (**15**) como el 10-benzoiloxi-7,8-dihidroxi-9-isobutiriloxi-timol (Figura 10).

Es importante mencionar que compuestos de este tipo pueden ser artefactos obtenidos por transposición del grupo éster de C-3 a C-9 durante el proceso de aislamiento y purificación. Así, el compuesto **15** podría ser un artefacto proveniente de la apertura hidrolítica del anillo oxirano del compuesto **5** seguido por la transposición del isobutirato de la posición C-3 a C-9. Se ha descrito previamente el aislamiento de artefactos de este tipo, formados durante el proceso de aislamiento³⁷ o posterior a la purificación.³⁸ Recientemente, fue reportado el aislamiento de un derivado del timol de *Ageratina grabrata*, cuya estructura fue establecida como el isobutirato del 10-benzoiloxi-6,8,9-trihidroxi-timol (**37**) (Figura 11), el cual, mostró efecto analgésico en la prueba de placa caliente.³⁹ Sin embargo, un análisis de los datos espectroscópicos publicados indica que la estructura del compuesto reportado debe corresponder al isómero **38** (Figura 11), en el que el isobutirato se encuentra la posición C-9 en vez de C-3, y debe ser corregida.

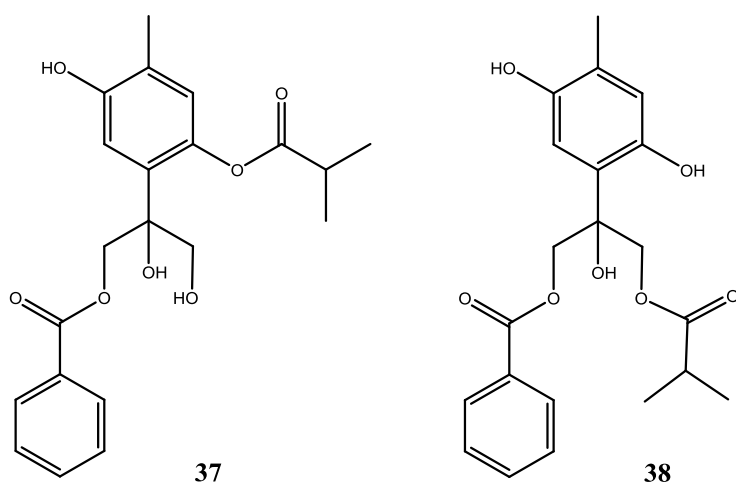


Figura 11. Estructuras propuestas del derivado del timol aislado de *Ageratina grabrata*.

Se han descrito derivados del timol que no presentan actividad óptica, los cuales se han identificado como racematos mediante la separación de los enantiómeros por HPLC

utilizando columnas quirales o mediante su análisis con el uso de reactivos de desplazamiento quiral. Los compuestos **10** y **11** no presentan actividad óptica por lo que es posible sugerir que se encuentran como mezclas racémicas. Mientras que **5**, **12**, **13** y **15** en los que el valor de rotación óptica es muy cercano a cero deben encontrarse como mezclas enantioméricas en las cuales predomina el enantiómero *S*, como es el compuesto **9**.

4.4. Estudio fitoquímico del extracto de acetona de *Ageratina cylindrica*

El estudio fitoquímico del extracto acetónico de *Ageratina cylindrica* llevó al aislamiento e identificación de 5 compuestos, dos flavonoides de estructura conocida: kaempferol (**16**) y astragalina (**20**) y tres diterpenos derivados del ácido *ent*-kaurenico de estructuras no descritas en la literatura (**17-19**). Las estructuras de los diterpenos se ilustran en la Figura 12 y las características espectroscópicas que condujeron al establecimiento de sus estructuras se detallan en los siguientes párrafos.

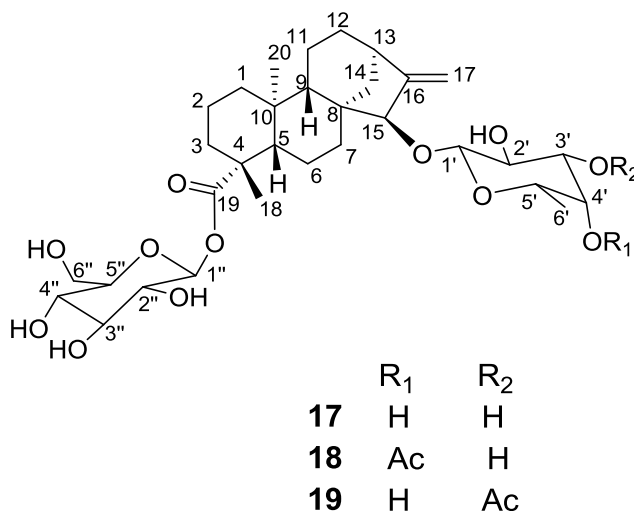


Figura 12. Derivados del ácido *ent*-kaurenico aislados del extracto de acetona con *Ageratina cylindrica*.

El compuesto **17** mostró una fórmula molecular de C₃₂H₅₀O₁₂ determinada por espectrometría de masas empleando el método ESI⁺ de alta resolución. El espectro IR presentó bandas de absorción para grupos OH y COOR en 3370 y 1732 cm⁻¹ respectivamente. Los espectros de ¹H y ¹³C del compuesto **17** fueron muy similares a los del paniculosido V (**24**), el cual, fue aislado por primera vez en 1977 de *Stevia paniculata*⁴⁰ y posteriormente de *Francoeuria crispa*.⁴¹ Como en el caso del paniculosido V (**24**), el espectro de RMN ¹H del compuesto **17** (Cuadro 9) muestra dos señales simples atribuibles a dos grupos metilo en δ 1.28 y 1.30 y otras dos señales en δ 5.08 y 5.88 que corresponden

a un metileno exocíclico, las cuales mostraron en el experimento HSQC correlación con un carbono metilénico en δ 106.5. Estas señales indicaron que se trata de una estructura relacionada con el ácido *ent*-kaurenoico. El espectro de ^1H , también mostró dos señales dobles en δ 4.80 ($J = 8.0$ Hz) y 6.29 ($J = 8.0$ Hz), asignables a protones anoméricos, las cuales mostraron en el experimento HSQC correlación con los carbonos en δ 107.3 y 96.2 respectivamente, lo que sugirió la presencia de dos unidades glicosídicas formando parte de la molécula. La magnitud de las constantes de acoplamiento de los protones anoméricos indicó que ambos carbohidratos deben encontrarse como β -piranosidos. La presencia de una señal doble en la región de alta frecuencia, δ 1.59 con constante de acoplamiento, $J = 6.4$ (3H) sugirió que uno de los residuos glicosídicos correspondía a una metil pentosa.

La posición relativa de las unidades glicosídicas, se determinó con base en los acoplamientos ^1H - ^{13}C a dos y tres enlaces observados en el espectro HMBC. En éste, se observó acoplamiento entre el grupo carbonilo en δ 177.4 (C-19) y el protón anomérico en δ 6.29, indicando que una de las uniones glicosídicas debe encontrarse en C-19 como un éster, mientras que la otra debe ubicarse en C-15 ya que el otro protón anomérico mostró acoplamiento con el carbono en δ 91.1 (δ_{H} 4.11) asignado a C-15. La identificación de los sistemas de spin de cada uno de los monosacáridos y la asignación completa de sus señales de protón y carbono, se llevó a cabo mediante el análisis de los espectros COSY, HSQC, TOCSY y 1D-TOCSY, lo que permitió la identificación de los dos sistemas de spin. Uno de estos, constituido por el monosacárido unido al carbonilo C-19, cuyo protón anomérico, δ_{H} 6.29 (H-1''), δ_{C} 96.2), mostró correlación en el experimento COSY con la señal de H-2'' (δ 4.23) y en el experimento 1D-TOCSY con las señales a δ 4.28 (H-3''), 4.36 (H-4''), 4.04 (H-5'') y 4.42/4.48 (δ_{C} 62.6) (2H-6''). Los desplazamientos químicos de H-3''- H6'' se determinaron de acuerdo con los experimentos COSY y 1D-TOCSY. El otro sistema de spins está conformado por el protón anomérico H-1', δ_{H} 4.80 (δ_{C} 107.3), de la metil pentosa unida en C-15 de la aglicona, el cual mostró acoplamiento en el experimento COSY con H-2' (δ 4.41) y con las señales de los metinos a δ 4.12 (H-3'), 4.06 (H-4'), 3.79 (H-5') y la señal doble del metilo a δ 1.59 (H₃-6', δ_{C} 17.8) en los experimentos TOCSY y 1D-TOCSY. Los desplazamientos químicos de los carbonos así como las constantes de acoplamiento ^1H -

^1H permitieron la identificación de los azúcares como residuos β -glucopiranosil y β -fucopiranosil respectivamente.

En el espectro de RMN ^{13}C (Cuadro 9) se observan 32 señales; correspondientes a tres grupos metilo, diez metilenos, 14 metinos y cinco carbonos cuaternarios de acuerdo con los experimentos DEPT. Un carbonilo (δ 177.4), un metileno olefínico (δ 106.5), un carbono olefínico totalmente sustituido así como 17 señales a bajas frecuencias se asignaron al esqueleto de kaurano (aglicona); mientras que las señales de diez metinos entre δ 62.6 y 107.3 junto con la señal de un metileno, δ 4.48, 4.42 y la señal del grupo metilo en δ 17.8 se asignaron a las unidades glicosídicas, las cuales, después de la hidrólisis ácida del compuesto **17**, se identificaron como *D*-glucosa y *L*-fucosa con base en la actividad óptica determinada a partir de sus correspondientes acetatos; *D*-glucosa ($[\alpha]_{\text{D}}^{25} +35.4$ (c 0.0048, CHCl_3) y *L*-fucosa ($[\alpha]_{\text{D}}^{25} -33.2$, c 0.0028, CHCl_3), así como la comparación por cromatografía de gases de sus derivados sililados con los de estándares comerciales.

La estereoquímica del centro quiral C-15, base del grupo fucosilo de los compuestos aislados no pudo establecerse inequívocamente mediante el análisis de los espectros de RMN ^1H (desplazamiento químico, multiplicidad y constantes de acoplamiento de H-15).

En este sentido, algunos autores coinciden en que la señal correspondiente a H-15 en la serie en la que el glicósido tiene orientación beta, H-15 alfa, se observa como una señal triple con $J \approx 3$ Hz (como es el caso del compuesto **17**), y en la serie de glicósidos con orientación alfa, la señal de H-15 se presenta como una señal simple ancha.⁴² Sin embargo, en la literatura se describen casos como el del ácido rutendoico donde la multiplicidad de la señal depende del disolvente empleado; de tal manera que en el espectro determinado en CDCl_3 la señal correspondiente a H-15 alfa se reporta como una señal triple con $J = 2.9$ Hz, en cambio, cuando se emplea piridina d_5 (disolvente empleado para la determinación de la RMN de **17**) la señal se observa como una señal simple ancha.⁴³

Otros investigadores argumentan que la señal correspondiente a H-15 es característica entre ambas series (α y β); en la serie alfa, se observa como un doble de doble ($J = 3, 2$ Hz) mientras que en la serie beta como una señal simple ancha.⁴⁴

Más aún, Puebla et. al.⁴⁵ sostienen que en el espectro de RMN ^{13}C , la señal de C-17 es distintiva en ambas series, ya que cuando la orientación del sustituyente en C-15 es alfa,

la señal para C-17 se observa en aproximadamente 104 ppm y cuando el sustituyente en C-15 es beta, la señal para C-17 se encuentra entre 108-111 ppm. En el caso de los compuestos aislados de *Ageratina cylindrica*, la señal de C-17 se encuentra en ≈ 106.5 ppm.

Ante la dificultad para asignar de manera confiable la configuración de C-15, en los compuestos aislados, se recurrió a la determinación de la configuración absoluta de la aglicona **35**, utilizando el método de DCV/DFT, mediante la comparación de los espectros experimentales con los calculados, utilizando la teoría del funcional de la densidad (DFT).

La comparación del espectro de DCV experimental y el calculado es un método que permite determinar la configuración absoluta de un solo centro quiral en presencia de otros centros quirales y es una valiosa herramienta en la determinación de la configuración absoluta de un significativo número de productos naturales.⁴⁶

El análisis por DCV es preferible utilizarlo con los derivados acetilados o metilados de un producto natural ya que los alcoholes o ácidos libres presentan interacciones intermoleculares soluto-disolvente y soluto-soluto que se refleja en menores índices de similitud cuando se compara el espectro experimental con el espectro calculado utilizando DFT, motivo por el cual, en nuestro caso se preparó el derivado acetilado y metilado de la aglicona (**32**) (Figura 13) para la determinación de la configuración absoluta mediante el método DCV/DFT.

Para obtener el compuesto **32** se realizó primeramente una hidrólisis ácida, la cual condujo al ácido 15-oxo-(16*R*)-*ent*-kauran-19-oico (**33**) en lugar del compuesto deseado (**32**). Se ha descrito previamente que cuando el compuesto **32** se encuentra en medio ácido diluido, sufre una transposición de tipo Wagner-Meerwein que conduce al compuesto **33**, también se ha documentado que esto solo se lleva a cabo cuando el sustituyente ubicado en C-15 tiene una orientación β , mientras que su epímero es estable bajo las mismas condiciones.⁴⁷ Este resultado sugiere que la orientación del grupo fucopiranosilo presente en los compuestos aislados de *A. cylindrica* poseen una orientación β .

Aunque el compuesto **33** ya ha sido descrito, no existen datos de su estructura cristalina, la cual, se describe por primera vez en este trabajo (Figura 14).

Con el propósito de obtener la aglicona **32** y evitar la formación del producto de transposición **33**, se llevó a cabo una degradación química utilizando el método descrito por Takamoto.⁴⁸ En este caso, la hidrólisis alcalina de **17** condujo al compuesto **34** (Figura 13), el cual, al ser tratado con peryodato de sodio (NaIO₄) seguido de la adición de KOH condujo al compuesto **35** (Figura 13), el cual, a su vez, sin previa purificación, fue sometido a acetilación seguida de esterificación para obtener el compuesto conocido como metil xilopato (**32**), aislado previamente de *Phebalium rude*.⁴⁹

Con la finalidad de comparar los datos y comprobar en este caso la utilidad del método de determinación de la configuración absoluta, adicionalmente, se obtuvo el compuesto **36**, epímero en C-15 de **32** (Figura 13), utilizando una muestra autentica de ácido grandiflórico.

La configuración absoluta de los epímeros **32** y **36**, se obtuvo mediante la comparación de los espectros IR y DCV teóricos y experimentales. Para ello, se realizó una búsqueda conformacional utilizando mecánica molecular y el campo de fuerzas MMFF94, lo cuál condujo a 12 conformeros de energías en un intervalo de 10 kcal/mol. Para cada uno de los epímeros, únicamente dos conformeros (**32a**, **32b**, **36a** y **36b**) en un intervalo de energía de 0.2 kcal/mol representaron el 99.99% de la población conformacional total. Estos cuatro conformeros fueron sometidos a un cálculo de punto simple usando el funcional híbrido B3PW91 y la base DGDZVP. Debido a que tanto **32a** y **32b**, así como **36a** y **36b** (Figura 15) se siguieron manteniendo con energía similar, las dos parejas de conformeros se optimizaron utilizando el mismo nivel de teoría (Cuadro 7). Las fuerzas rotacionales permitieron obtener las absorvidades molares para cada conformero usando funciones Lorentzianas de 6 cm⁻¹ de ancho. Finalmente se calcularon los espectros IR y DCV utilizando la energía libre de Gibbs para calcular el factor para ponderar cada espectro individual. Los espectros IR y DCV para ambos epímeros se muestran en las Figuras 16 y 17. El Cuadro 8 muestra los resultados de comparación obtenidos utilizando el software Compare/VOA. En el caso del compuesto **32** los índices de similitud de los espectros de IR y de DCV, S_{IR} y S_E , fueron 95.1 y 86.1 respectivamente, con un nivel de confianza de 100%, mientras que en el caso de **36** los valores fueron de 97.3 y 83.9 con el mismo nivel de confianza. En el mismo cuadro se puede observar que las comparaciones cruzadas entre ambos epímeros muestran altos valores de los índices de similitud pero menores que las

comparaciones previas además de que los niveles de confianza son menores que en el caso de la configuración correcta, con lo que se confirma que la configuración de compuesto **32** es $15R$ mientras que para **36** es $15S$.

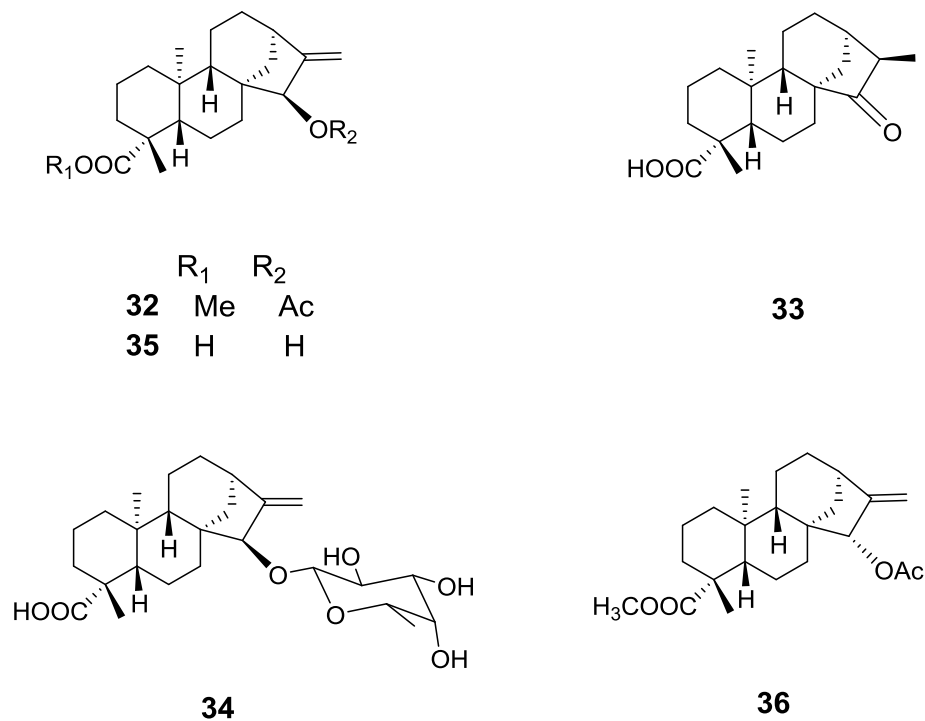


Figura 13. Compuestos **32-36**.

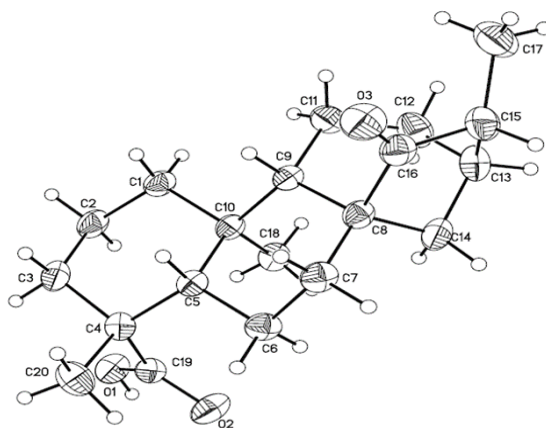
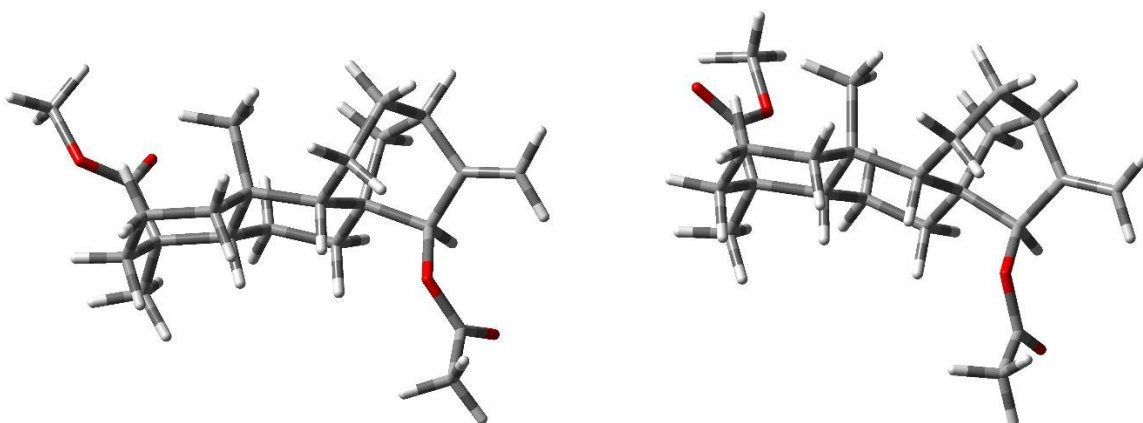
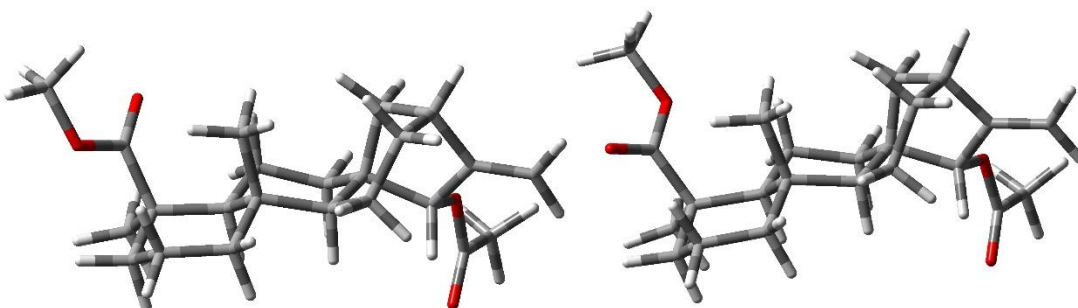


Figura 14. Estructura cristalina del ácido 15-oxo-(16*R*)-*ent*-kauran-19-oico (**33**) obtenida por difracción de rayos X.



32a

32b



36a

36b

Figura 15. Isómeros conformacionales más estables de los compuestos **32** y **36** obtenidos con el nivel de teoría B3PW91/DGDZVP.

Cuadro 7. Energías relativas y poblaciones conformacionales de los compuestos **32 y **36****

Confórmeros	$\Delta E_{\text{MMFF94}}^{\text{a}}$	$\%_{\text{MMFF94}}^{\text{b}}$	$\Delta E_{\text{SP}}^{\text{c}}$	$\%_{\text{SP}}^{\text{d}}$	$\Delta E_{\text{OPT}}^{\text{e}}$	$\%_{\text{OPT}}^{\text{d}}$	$\Delta G_{\text{B3PW91}}^{\text{f}}$	$\%_{\text{B3PW91}}^{\text{d}}$
32a	0.00	51.8	0.42	33.0	0.34	36.0	0.70	23.5
32b	0.04	48.2	0.00	67.0	0.00	64.0	0.00	76.5
36a	0.00	56.0	0.24	39.8	0.30	37.4	0.00	52.5
36b	0.14	44.0	0.00	60.2	0.00	62.6	0.06	47.5

^aEnergía relativa de mecánica molecular referidas a 73.03 y 72.74 kcal/mol para **32** y **36**, respectivamente.

^bPoblación conformacional (%) de mecánica molecular. ^cEnergía relativa de punto simple; los valores de energía de los conformeros más estables para **32** y **36** fueron -751396.8 y -751396.5 kcal/mol, respectivamente. ^dPoblación conformacional. ^eEnergía relativa de las estructuras optimizadas; datos relativos a -751439.7 kcal/mol para **32** y -751439.1 kcal/mol para **36**. ^fEnergía libre relativa a -751135.1 kcal/mol para **32** y -751133.9 kcal/mol para **36**.

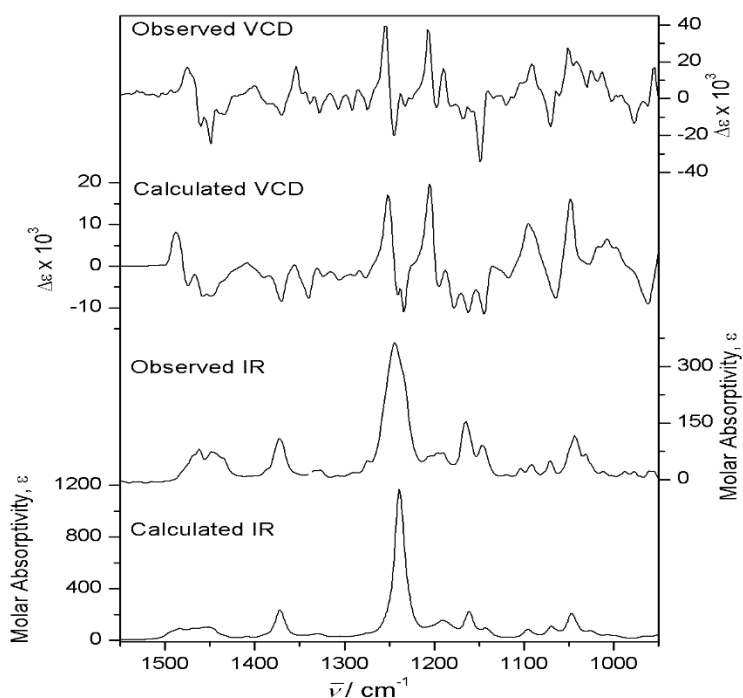


Figura 16. Comparación de los espectros IR y DCV experimentales y calculados a un nivel de teoría B3PW91/DGDZVP para **32**.

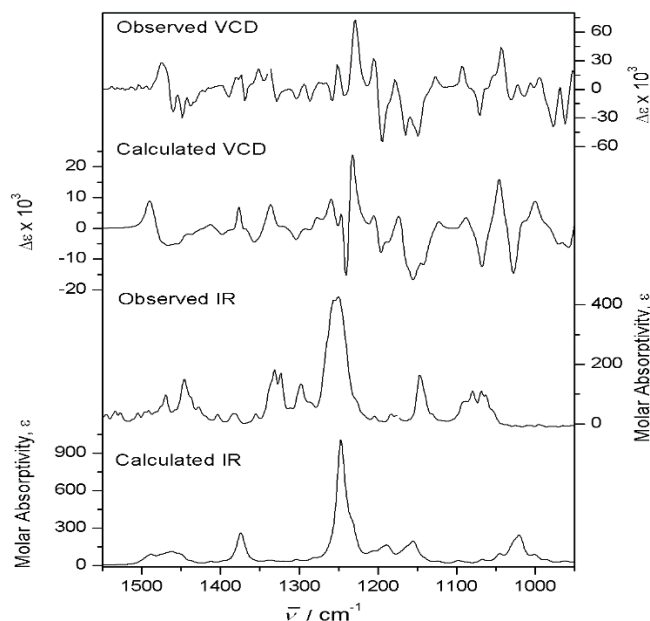


Figura 17. Comparación de los espectros IR y DCV experimentales y calculados con nivel de teoría B3PW91/DGDZVP para **36**.

Cuadro 8. Valores de la comparación de los espectros de IR y DCV para los compuestos **32** y **36** así como de las comparaciones cruzadas

Compuesto	anH ^a	S _{IR} ^b	S _E ^c	C ^d (%)
32	0.972	95.1	86.1	100
36	0.974	97.3	83.9	100
32E vs 36C ^e	0.969	94.2	67.0	82
36E vs 32C ^f	0.976	93.1	67.7	85

^aFactor de anarmonización o escalamiento. ^bÍndice de similitud del espectro IR. ^cÍndice de similitud entre los espectros de DCV. ^dNivel de confianza de las asignaciones estereoquímicas. ^eComparación del espectro experimental de **32** y el espectro calculado de **36**. ^fComparación del espectro experimental de **36** y espectro calculado de **32**.

La estereoquímica en C-15 del compuesto **32** también fue fundamentada por el efecto NOE observado entre H-15 a δ 5.15 (t, $J = 2.5$ Hz) y H-14 a δ 4.04 (d, $J = 12.0$ Hz), tal como se encuentra documentado para el caso de derivados del ácido *ent*-kaurenoico sustituidos en C-15 con una orientación β .⁴³

Con base en todo lo anterior, la estructura de **17** se estableció inequívocamente como 19- β -D-glucopiranosil-15- β -L-fucosiloxi-*ent*-kaur-16-en-19-ato. Adicionalmente se

demonstró la utilidad del método DCV para la determinación de la configuración de un centro quiral en presencia de otros centros quirales.

Cuadro 9. Datos de RMN ¹H (400 MHz, piridina-*d*₅) y ¹³C (100 MHz, piridina-*d*₅) de los compuestos 17-19

17		18		19		
Posición	δ_H (J en Hz)	δ_C , tipo	δ_H (J en Hz)	δ_C , tipo	δ_H (J en Hz)	δ_C , tipo
1a	1.82, d (13.2)	41.2, CH ₂	1.75, m	41.0, CH ₂	1.80, s	41.2, CH ₂
1b	0.83, td (13.2, 3.6)		0.75, td (13.2, 3.6)		0.83, td (12.0, 4.0)	
2a	2.23, m	20.0, CH ₂	2.18, m	20.0, CH ₂	2.21, s	20.0, CH ₂
2b	1.40, m		1.38, m		1.39, m	
3a	2.39, m	38.8, CH ₂	2.35, dd (13.6, 2.8)	38.9, CH ₂	2.31, m	39.0, CH ₂
3b	1.00, m		0.85, td (13.6, 4.4)		1.45, m	
4		44.6, C		44.5, C		44.5, C
5	1.25, dd (12.0, 1.6)	57.1, CH	1.12, dd (12.0, 1.2)	56.8, CH	1.87, m	46.8, CH
6a	2.48, d (13.6)	22.5, CH ₂	2.48, m	22.4, CH ₂	2.45, m	22.4, CH ₂
6b	2.13, dd (13.6, 1.6)		2.10, m		2.11, m	
7a	2.35, m	39.0, CH ₂	2.33, m	37.0, CH ₂	2.22, m	37.0, CH ₂
7b	1.46, m		1.47, m		1.01, m	
8		46.8, C		46.7, C		46.8, C
9	1.90, m	46.7, CH	1.83, m	46.7, CH	1.22, m	57.2, CH
10		40.1, C		40.1, C		40.1, C
11a	1.60, m	18.9, CH ₂	1.91, m	18.8, CH ₂	1.88, m	18.8, CH ₂
11b	1.42, m		1.83, m		1.43, m	
12a	1.61, m	34.4, CH ₂	1.60, m	34.3, CH ₂	1.56, m	34.3, CH ₂
12b	1.46, m		1.44, m		1.43, m	
13	2.58, sa	41.1, CH	2.58, sa	41.1, CH	2.57, sa	41.1, CH
14a	2.25, m	37.2, CH ₂	2.21, m	38.6, CH ₂	2.37, m	38.8, CH ₂
14b	1.02, m		1.03, dd (12.0, 4.4)		1.01, m	
15	4.11, t (2.0)	91.1, CH	4.10, t (2.4)	90.1, CH	4.10, t (2.4)	91.3, CH
16		157.3, C		157.2, C		157.0, C
17a	5.88, br s	106.5, CH ₂	5.91, br s	106.4, CH ₂	5.84, s	106.6, CH ₂
17b	5.08, br s		5.09, dd (1.2)		5.07, dd (1.2, 1.2)	
18	1.28, s	29.1, CH ₃	1.23, s	28.9, CH ₃	1.27, s	29.0, CH ₃
19		177.4, C		177.4, C		177.4, C
20	1.30, s	16.6, CH ₃	1.28, s	16.5, CH ₃	1.30, s	16.5, CH ₃
1'	4.80, d (8.0)	107.3, CH	4.87, d (8.0)	107.0, CH	4.87, d (8.0)	107.1, CH
2'	4.41, t (8.8)	72.9, CH	4.36, dd (9.2)	73.0, CH	4.62, dd (10.0, 8.0)	69.7, CH
3'	4.12, dd (9.2, 3.6)	76.0, CH	4.28, dd (9.6, 4.0)	73.6, CH	5.42, dd (10.0, 3.2)	78.5, CH
4'	4.06, dd (3.6, 0.8)	73.1, CH	5.64, dd (3.6, 1.2)	74.6, CH	4.25, dd (4.0, 0.8)	70.5, CH
5'	3.79, qd (6.4, 0.8)	71.8, CH	3.90, qd (6.4, 0.8)	70.1, CH	3.82, td (8.0, 0.8)	71.5, CH
6'	1.59, d (6.4)	17.8, CH ₃	1.37, d (6.4)	17.4, CH ₃	1.54, d (8.0)	17.6, CH ₃
1''	6.29, d (8.0)	96.2, CH	6.28, d (8.0)	96.2, CH	6.28, d (8.0)	96.2, CH
2''	4.23, t (8.8)	79.6, CH	4.25, t (8.8)	79.6, CH	4.23, t (8.0)	79.6, CH
3''	4.28, t (8.8)	74.5, CH	4.28, t (8.8)	74.5, CH	4.28, t (8.8)	74.5, CH
4''	4.36, t (9.2)	71.5, CH	4.37, dd (9.6, 9.2)	71.5, CH	4.35, t (8.8)	71.5, CH
5''	4.04, ddd (9.2, 4.4, 2.4)	79.8, CH	4.04, ddd (9.6, 4.4, 2.4)	79.8, CH	4.04, ddd (9.2, 4.4, 2.4)	79.8, CH
6''a	4.48, dd (12.0, 2.4)	62.6, CH ₂	4.47, dd (12.0, 2.4)	62.5, CH ₂	4.47, dd (12.0, 2.8)	62.5, CH ₂
6''b	4.42, dd (12.0, 4.0)		4.40, dd (12.0, 4.4)		4.39, dd (12.0, 4.4)	
OCOCH ₃			1.80, s	21.1, CH ₃	1.95, s	21.4, CH ₃
OCOCH ₃				171.4, C		171.2, C

Los compuestos **18** y **19** presentaron perfiles espectroscópicos similares al compuesto **17**, con los cambios inherentes a la presencia de un grupo acetato, que permiten proponer las estructuras mostradas en la Figura 12. El compuesto **18**, mostró un *pseudo* ión molecular $[M + Na]^+$ de m/z 691.3316, determinado por HRESI-MS, lo cual define la fórmula molecular $C_{34}H_{52}O_{13}$ (calculada para $C_{34}H_{52}O_{13} + Na$, 691.3306). Los espectros de RMN 1H y ^{13}C (Cuadro 9) muestran perfiles similares a los de **17**, excepto por el desplazamiento de H-4' el cual se observa como una señal doble de dobles, δ 5.64 ($J = 3.6$, 1.2 Hz) y la presencia de una señal simple a δ 1.81 (3H) en el espectro de RMN 1H , mientras que en el espectro de ^{13}C , la diferencia se restringe a la presencia de dos señales extras, δ 171.4 y 21.1, asignadas al grupo acetato. El desplazamiento de H-4' a frecuencias mayores, δ 5.64, comparado con el desplazamiento de H-4' (δ 4.06, dd, $J = 3.6$, 0.8 Hz) en **17**, es indicativo de la esterificación en esta posición. Lo anterior, se confirmó por la correlación observada en el espectro HMBC entre la señal de H-4', δ 5.64 y el metilo en δ 1.81 (H-6'), con la señal correspondiente al carbonilo del acetato en δ 171.4. Por lo tanto, la estructura del compuesto **18** quedó establecida como el 19- β -D-glucopiranosil-15- β -(4-acetoxi- β -L-fucosiloxi)-*ent*-kaur-16-en-19-ato.

El compuesto **19**, al igual que **18**, mostró un *pseudo* ion molecular $[M + Na]^+$ de m/z 691.3316, que junto con el espectro de RMN ^{13}C indicó una fórmula molecular $C_{34}H_{52}O_{13}$. Los espectros de RMN 1H y ^{13}C mostraron señales muy similares a **17**, excepto por la presencia de las señales extras del metilo y el carbonilo del acetato en el espectro de ^{13}C y el desplazamiento químico de H-3', que en el espectro de 1H se encuentra desplazado a frecuencias menores, δ 5.42 (dd, $J = 10.0$, 3.2 Hz), comparado con el compuesto **17**, en el que H-3' se encuentra en δ 4.12 (dd, $J = 9.2$, 3.6 Hz), indicando que el grupo acetato se encuentra en C-3'. De esta manera, se concluyó que **19** es un isómero de **18** y su estructura se estableció como 19- β -D-glucopiranosil-15- β -(3-acetoxi- β -L-fucosiloxi)-*ent*-kaur-16-en-19-ato.

Los derivados del ácido *ent*-kaurenoico tienen una amplia distribución en la familia Asteraceae. Sin embargo, la biosíntesis de este tipo de compuestos en especies del género *Ageratina* es limitada, entre los pocos que se han aislado, se pueden citar los diterpenos aislados de *Ageratina vacciniaefolia* y *Eupatorium betonicaeforme* (Figura 18).⁵⁰

Los derivados glicosilados del *ent*- kaurano y compuestos relacionados han atraído la atención debido a su potencial terapéutico y su valor económico como edulcorantes.⁵¹ En este sentido, los glucósidos del esteviol aislados de *Stevia rebaudiana* son usados por su bajo contenido calórico como sustitutos de la sacarosa, además de que presentan actividades biológicas tales como hipoglucemiantes, antitumorales, anticancerosos, antihipertensivos y antidiarreicos.⁵²

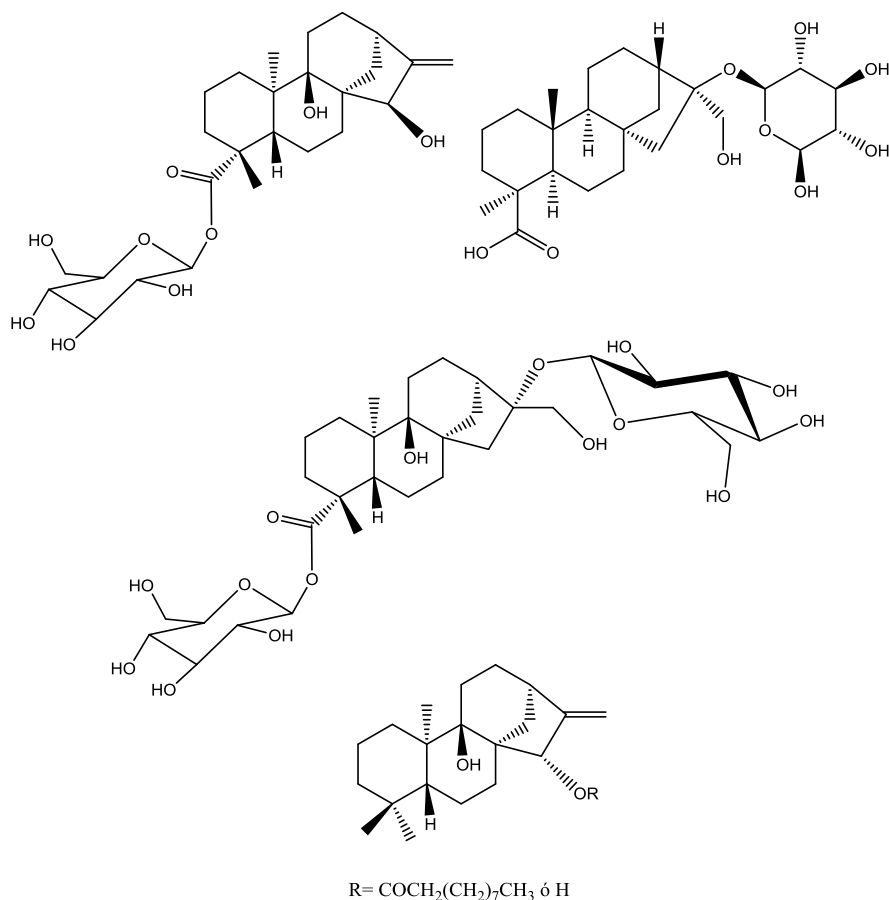


Figura 18. Diterpenos aislados de *Ageratina vacciniaefolia* y de *Eupatorium betonicaeforme*.

4.5. Estudio fitoquímico del extracto de metanol de *Ageratina cylindrica*

El perfil químico del extracto de metanol de *A. cylindrica*, mostró componentes muy similares al extracto de acetona. Su estudio, condujo al aislamiento e identificación de los compuestos **17-19** descritos previamente, así como de la astragalina (**20**), sacarosa (**21**) *L-chiro*-inositol (**22**) y ácido clorogénico (**23**) (Figura 19). El *L-chiro*-inositol (**22**) tiene una distribución limitada en la naturaleza y ha sido aislado solo de algunas especies vegetales como *Cremanthodium ellisii*,⁵³ *Euphorbia resinifera*,⁵⁴ y *Euphorbia pilulifera*.⁵⁵

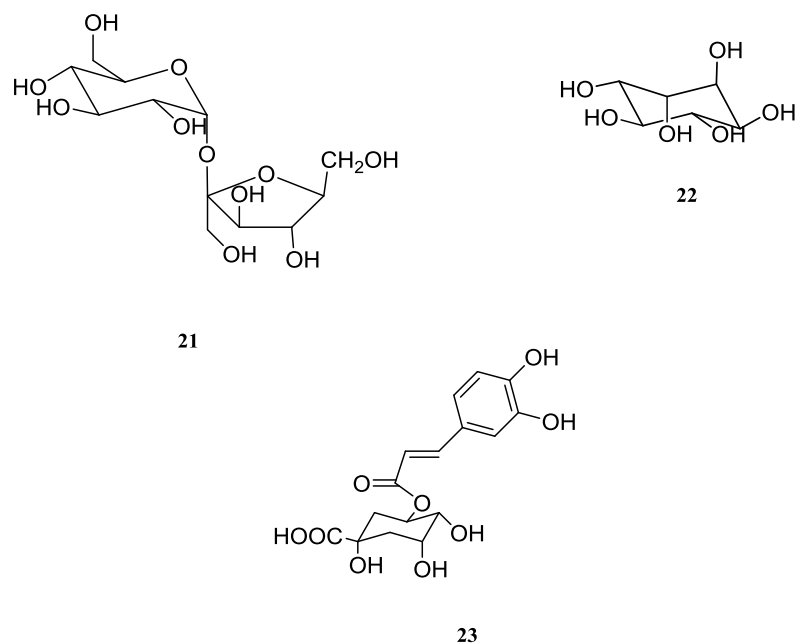


Figura 19. Estructuras de los compuestos **21-23**.

4.6. Estudio fitoquímico del extracto acuoso de *Ageratina cylindrica*

Como resultado del estudio fitoquímico del extracto acuoso de *A. cylindrica*, se aislaron e identificaron once compuestos (**17-27**); ocho corresponden a derivados del ácido *ent*-kaurenoico; tres de ellos, **17-19** aislados antes del extracto de acetona, los compuestos **20-23** aislados del extracto de metanol, además del paniculosido V (**24**), mientras que los compuestos **25-27** (Figura 20) de estructuras muy relacionadas con **17-19**, son compuestos no descritos previamente en la literatura,

El compuesto **25** mostró un *pseudo* ión molecular $[M + Na]^+$ a m/z 487.2667 (calculado para $C_{26}H_{40}O_7 + Na$, 487.2672) en su espectro de masas de alta resolución determinado por la técnica ESI^+ , que corresponde a la fórmula molecular $C_{26}H_{40}O_7$. En su espectro de RMN ^{13}C (Cuadro 10) se observaron 26 señales, 20 de ellas debidas a la aglicona y seis a una unidad glicosídica. Los datos de RMN 1H y ^{13}C (Cuadro 10) fueron muy similares a **17** excepto por la ausencia de las señales atribuidas a la glucosa en la posición C-19. El análisis de sus datos de RMN permitió su identificación como el ácido 15- β -(β -L-fucosiloxi-*ent*-kaur-16-en-19-oico (**25**). El compuesto **25** también fue identificado como el producto de hidrólisis básica del compuesto **17**.

Los compuestos **26** y **27** fueron aislados como mezcla (4.5 mg) y no se separaron debido a la pequeña cantidad de muestra aislada. Sus espectros de RMN ^1H y ^{13}C (Cuadro 10) fueron similares a **18** y **19** respectivamente excepto por la ausencia de las señales atribuidas a la glucosa en C-19 y se identificaron como el ácido 15- β -(4-acetoxi- β -L-fucosiloxi)-*ent*-kaur-16-en-19-oico (**26**) y el ácido 15- β -(3-acetoxi- β -L-fucosiloxi)-*ent*-kaur-16-en-19-oico (**27**). De los compuestos aislados como productos naturales, no se pudieron determinar completamente los datos de RMN, sin embargo, la hidrólisis enzimática de la mezcla de los compuestos **17-19** usando β -glucosidasa de almendras, produjo suficiente cantidad de **26** para su caracterización total (Cuadro 10).

El paniculosido V (**24**) ha sido descrito previamente en la literatura, de él solo se encontraron datos parciales de RMN, por lo que, en el presente trabajo se describen los datos completos de RMN ^1H y ^{13}C , asignados con base en experimentos mono y bidimensionales, así como homo y heteronucleares.

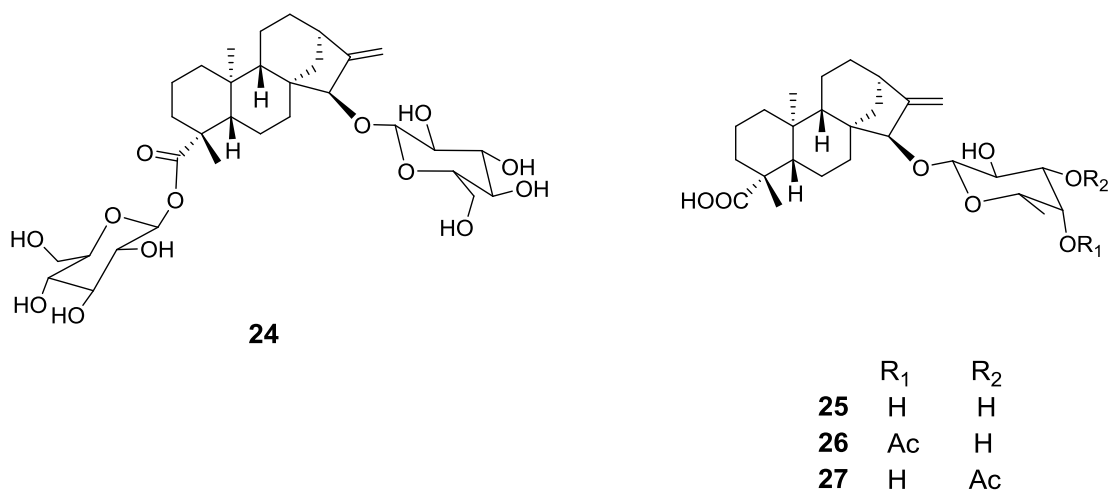


Figura 20. Compuestos **24-27** aislados del extracto acuoso *Ageratina cylindrica*.

Cuadro 10. Datos de RMN ¹H (400 MHz, piridina-d₅) y ¹³C (100 MHz, piridina-d₅) de los compuestos 25-27

	25		26*		27**	
Posición	δ _H (J en Hz)	δ _C , tipo	δ _H (J en Hz)	δ _C , tipo		
1a	1.81, s	41.4, CH ₂	1.84, m	41.2, CH ₂		
1b	0.87, td (13.6, 4.0)		0.81, td (13.5, 4.0)			
2a	2.25, m	20.3, CH ₂	2.24, m	20.3, CH ₂		
2b	1.48, m		1.45, m			
3a	2.38, td (13.2, 4.0)	39.0, CH ₂	2.42, m	38.9, CH ₂		
3b	1.01, m		0.89, td (13.0, 4.0)			
4		44.3, C		44.2, C		
5	1.23, m	56.6, CH	1.11, dd (12.0, 2.0)	56.4, CH		
6a	2.21, m	22.8, CH ₂	2.42, d (12.0)	22.8, CH ₂		
6b	2.14, m		2.14, m			
7a	2.05, d (12.0)	37.3, CH ₂	1.05, dd (11.5, 4.5)	37.2, CH ₂		
7b	1.05, m		2.04, d (11.5)			
8		46.8, C		46.7, C		
9	1.21, m	46.7, CH	1.85, d (7.5)	46.7, CH		
10		40.1, C		40.1, C		
11a	1.92, m	18.8, CH ₂	1.91, m	18.8, CH ₂		
11b	1.44, m		1.42, m			
12a	1.58, m	34.4, CH ₂	1.58, m	34.4, CH ₂		
12b	1.48, m		1.46, m			
13	2.61, s	41.1, CH	2.62, s	41.1, CH	2.61, s	41.1, s
14a	2.46, d (12.8)	38.9, CH ₂	2.05, d (11.5)	37.2, CH ₂		
14b	1.00, dd (13.2, 4.0)		1.06, dd (11.5, 4.5)			
15	4.13, m	91.0, CH	4.11, t (2.5)	90.9, CH		
16		157.2, C		157.1, C		
17a	5.92, s	106.4, CH ₂	5.94, s	106.4, CH ₂	5.09, s	106.6, CH ₂
17b	5.11, t (1.2)		5.12, s		5.88, s	
18	1.33, s	29.7, CH ₃	1.28, s	29.7, CH ₃	1.32, s	29.7, CH ₃
19		180.7, C		180.8, C		180.7, C
20	1.21, s	16.7, CH ₃	1.19, s	16.6, CH ₃	1.21, s	16.6, CH ₃
1'	4.85, d (8.0)	107.3, CH	4.91, d (8.0)	107.1, CH	4.92, d (7.6)	107.1, CH
2'	4.44, dd (9.2, 8.0)	72.9, CH	4.39, dd (9.5, 8.0)	73.0, CH	4.65, dd (10.0, 7.6)	72.8, CH
3'	4.14, dd (9.2, 3.2)	76.0, CH	4.30, dd (9.5, 3.5)	73.6, CH	5.46, dd (10.0, 3.2)	78.6, CH
4'	4.09, dd (3.2, 0.8)	73.1, CH	5.66, d (3.5)	74.6, CH	4.28, d (4.0)	70.5, CH
5'	3.85, td (8.0, 0.8)	71.8, CH	3.96, q (6.5)	70.1, CH	3.88, qd (6.4, 0.8)	71.6, CH
6'	1.64, d (8.0)	17.8, CH ₃	1.42, d (6.5)	17.4, CH ₃	1.58, d (6.4)	17.6, CH ₃
OCOCH ₃			1.82, s	21.1, CH ₃	1.96, s	21.4, CH ₃
O ₂ CCH ₃				171.0, C		171.2, C

*Datos de RMN ¹H obtenidos a 500 MHz y ¹³C a 125 MHz.

**Datos parciales del compuesto 27.

4.7. Actividad antiprotozoaria y antidiarreica de compuestos aislados de *Ageratina cylindrica*

Los resultados descritos en el Cuadro 11 indican que tanto los derivados del timol (**5**, y **9-13**) como los derivados del ácido *ent*-kaurenoico (**17-19** y **25**) presentan una actividad débil sobre los parásitos de prueba en comparación con el efecto del metronidazol (fármaco de referencia). Con fundamento en el hecho de que *Ageratina petiolaris* es una especie usada en la medicina tradicional para el tratamiento de la diarrea y considerando los derivados del timol que se han aislado de esa planta, se decidió evaluar la actividad de los derivados del timol aislados de *Ageratina cylindrica* como inhibidores del hiperperistaltismo intestinal en ratas utilizando el modelo experimental de hiperperistaltismo inducido con goma acacia.⁵⁶

Los resultados obtenidos (Cuadro 11) indican que el compuesto **9** posee una actividad comparable a la loperamida que es el fármaco de elección para el tratamiento de los casos de diarrea aguda y crónica. El ensayo del compuesto **13** presentó una actividad superior a la loperamida en varios órdenes de magnitud (25 veces), esto permite sugerir que **9** y **13** poseen un importante potencial como fármacos antidiarreicos.

Algo interesante que debe notarse es que el compuesto **12** muestra un débil efecto en la prueba siendo la ausencia del grupo hidroxilo en C-6 la única diferencia con **13**. Entre **9** y **10** se tiene la misma diferencia estructural y **10** presenta una actividad más débil que **9**, lo que indica que el grupo hidroxilo en C-6 es importante para la inhibición del hiperperistaltismo intestinal en ratas.

En el Cuadro 11 se observa que el kaempherol es el compuesto con mayor actividad antiprotozoaria y probablemente aporta una importante contribución a la actividad de los extractos de diclorometano y acetona.

Cuadro 11. Actividad antiprotozoaria y antipropulsiva de los compuestos aislados de *Ageratina cylindrica*

Compuesto/Control	<i>Entamoeba histolytica</i> CI ₅₀ μM (CI) ^a	<i>Giardia lamblia</i> CI ₅₀ μM (CI) ^a	Inhibición del hiperperistaltismo intestinal ID ₅₀ μmol/kg ± SD ^b
5	237.0 (237.8-236.7)	251.9 (252.2-250.5)	-
9	184.9 (186.9-180.7)	167.4 (168.7-165.8)	0.85 ± 0.005
10	287.5 (289.2-286.2)	226.2 (226.8-224.9)	29.34 ± 3.8
11	86.9 (87.1-85.7)	134.0 (135.2-133.5)	63.34 ± 0.70
12	210.2 (210.9-209.8)	164.5 (165.2-163.9)	SE
13	213.2 (214.3-212.5)	151.1 (152.4-149.6)	0.008 ± 0.001
17	41.8 (42.06-41.6)	40.4 (40.7-40.1)	-
18	49.6 (50.1-49.4)	79.8(69.9-69.2)	-
19	52.6 (53.0-52.4)	49.0 (49.3-48.7)	-
33	73.5 (85.8-73.9)	98.5 (98.7-97.8)	-
Acetato de baurenilo (1)	127.3 (129.3-124.8)	170.3 (172.0-168.2)	-
2α-iso-valeroiloxi-eperuico (4)	184.2 (185.5-181.0)	210.3 (212.3-209.6)	-
Kaempferol (16)	27.6 (28.0-27.3)	30.4(30.8-30.1)	-
Astragalina (20)	136.6 (136.8-136.4)	106.0 (106.3-105.8)	-
Emetina ^c	2.18 (2.2-2.14)	0.83 (0.87-0.82)	-
Metronidazol ^c	0.23 (0.58-0.17)	1.22 (1.57-0.81)	-
Loperamida ^c	-	-	0.2 ± 0.001

^a Los resultados están expresados como el promedio de n = 6. IC = intervalo del confianza al 95%. CI₅₀ calculada mediante un análisis probit. ^b Los resultados están expresados como el promedio de n = 6 ± EEM. SD= desviación estándar. ^c Controles positivos. SE = Sin efecto.

4.8. Evaluación del potencial hipoglucemiante de *Ageratina petiolaris*

Como es ampliamente conocido, la diabetes mellitus se ha convertido en un problema de salud pública a nivel mundial y las plantas representan una alternativa como coadyuvantes para el tratamiento de este padecimiento. Las plantas han sido empleadas desde la antigüedad para el tratamiento, no solo de la diabetes sino de muchas otras enfermedades, sin embargo, la mayoría de ellas no han sido evaluadas farmacológicamente ni se han determinado las entidades químicas responsables de su efecto. Por lo que los estudios enfocados al sustento científico del uso tradicional de las plantas así como la determinación de los compuestos responsables de la actividad, representan no solo un avance en el conocimiento químico de las plantas, sino una vía factible para el descubrimiento de nuevas moléculas que podrían resultar más accesibles y eficaces para el tratamiento de diversos padecimientos.

En 2005 se reportó una lista de 306 plantas mexicanas con efecto hipoglucemiante, entre las cuales se encuentra *Ageratina petiolaris* para el tratamiento de la diabetes,¹⁵ la cual se encuentra a la venta en el mercado más grande de plantas medicinales de América Latina en la ciudad de México, el “Mercado de Sonora”. Para este propósito, los vendedores recomiendan hervir 20 g de las partes aéreas de la planta en 0.5 L de agua; considerando este hecho, se investigó el efecto hipoglucemiante del extracto acuoso y metanólico de la especie en ratas con diabetes inducida por el método NA-STZ y se identificaron los principales constituyentes de los extractos probados.

La STZ, 2-deoxi-2-(3-metil-3-nitrosoureido)-D-glucopiranososa, es un producto natural con propiedades antibióticas extraído de *Streptomyces achromogenes* que resultó particularmente tóxico para las células β pancreáticas de los islotes de Langerhans,⁵⁷ produciendo hiperglucemia, lo que motivó su uso en un modelo animal de diabetes. Su mecanismo de acción no está completamente establecido, pero se sabe que la entidad glucosídica, facilita el transporte de la molécula a través de la membrana de las células beta pancreáticas utilizando el transportador GLUT 2 y que la fracción nitrosourea es la responsable de la toxicidad. Se ha demostrado que la administración de STZ provoca daño al ADN por un proceso de alquilación. Como resultado del daño al ADN, se desencadenan procesos de reparación tales como la activación de la enzima poli-(ADP-ribosa) polimerasa

1 (PARP-1), lo que culmina en la disminución de NAD^+ (Nicotinamida-Adenina Dinucleótido) y ATP. La desfosforilación del ATP induce la actividad de la xantina oxidasa provocando la formación de radicales superóxido, que aunado a la generación de radicales NO procedentes de la STZ, contribuyen al daño oxidativo celular.

Estudios previos *in vitro* e *in vivo* han mostrado que la NA (nicotinamida) es capaz de proteger efectivamente a las células β del daño causado por STZ. Se ha propuesto que el mecanismo por el cual ejerce su acción protectora consiste en su capacidad para inhibir a la enzima PARP-1 y por su carácter antioxidante protege a las células del daño ocasionado por los radicales libres.⁵⁸

También se sabe que la acción protectora de la NA en las células β disminuye con el tiempo transcurrido después de la administración de STZ a las ratas. Esta disminución, es el resultado de la degradación de ATP ya que la absorción de NA por las células β es ATP-dependiente. En la mayoría de los experimentos, la NA se administra a las ratas 15 min antes de STZ.

El fármaco STZ es el agente de elección para la inducción de la diabetes experimental tipo 2 debido a que presenta varias ventajas frente a otros inductores; mayor tiempo de vida media, hiperglucemia sostenida, menor incidencia de mortalidad y por lo tanto desarrollo de las complicaciones asociadas a la enfermedad.

Los resultados del efecto hipoglucemiante agudo de los extractos acuoso y metanólico de *Ageratina petiolaris* se muestran en la Figura 21.

Se observa que a la dosis de 40 mg/Kg el extracto acuoso disminuye significativamente los niveles de glucosa en ratas hiperglucémicas cuando se compara contra el grupo control hiperglucémico a los 180 minutos después de haber sido tratadas, y que cuando la dosis se incrementa a 160 mg/Kg este efecto se observa desde los 60 minutos y permanece constante hasta los 180. En cambio, la comparación de los niveles de glucosa que presenta el grupo tratado a los diferentes tiempos (60, 120 y 180 min) contra los niveles que presentaron antes del tratamiento (T0), muestra que la dosis menor disminuye significativamente la glucosa desde los 120 minutos y la dosis mayor desde los 60.

En el caso del extracto metanólico a dosis de 67 mg/Kg no muestra efecto hipoglucemiante en este modelo experimental. Sin embargo, al incrementar la dosis a 670 mg/Kg, se observa un efecto hipoglucemiante significativo desde los 120 min cuando se compara el grupo hiperglucémico tratado con el grupo hiperglucémico sin tratamiento y un efecto significativo desde los 60 minutos posteriores al tratamiento cuando se compara con los niveles de glucosa que presentó antes de la administración del extracto.

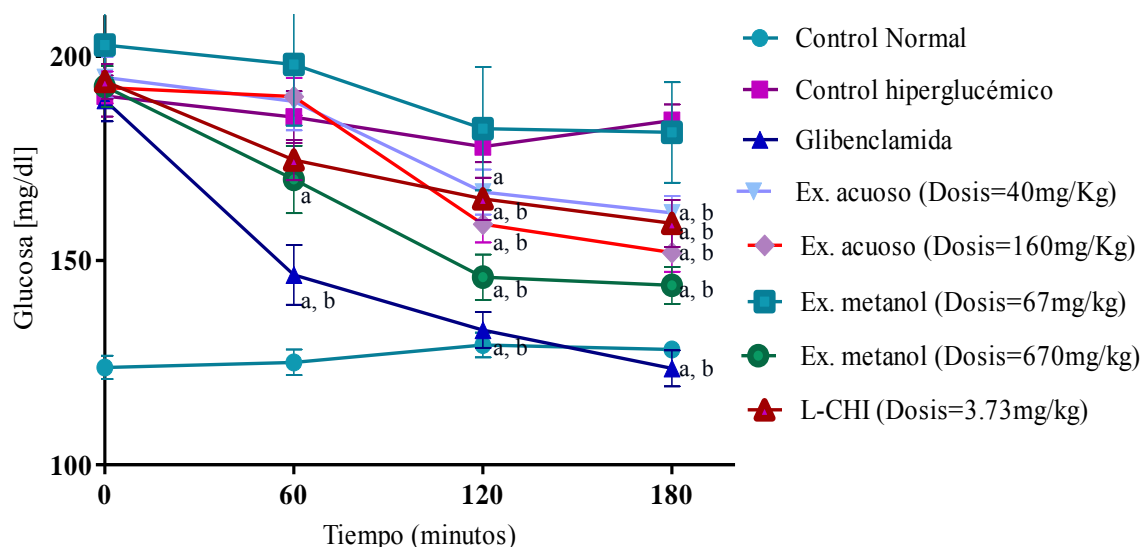


Figura 21. Efecto hipoglucemiante agudo del extracto acuoso y de metanol de *Ageratina petiolaris* en ratas hiperglucémicas. Cada grupo representa el promedio ($n = 11$) \pm EEM para los animales de cada grupo. Los datos se analizaron mediante una ANOVA de dos vías seguida de un análisis estadístico Bonferroni. a = diferencia significativa respecto al tiempo cero dentro del mismo grupo con $p \leq 0.05$. b = diferencia significativa con respecto al control hiperglucémico al mismo tiempo con $p \leq 0.01$.

Teniendo como base estos resultados anteriores y con el objetivo de encontrar los metabolitos que le confieren la actividad a la planta, se realizó el estudio fitoquímico de ambos extractos.

4.9. Estudio fitoquímico del extracto acuoso y metanólico de *Ageratina petiolaris*

El estudio químico de los extractos de *A. petiolaris*, condujo al aislamiento, purificación e identificación del *L-chiro*-inositol (**22**) y ácido clorogénico (**23**) como los principales constituyentes del extracto acuoso. El ácido clorogénico es un compuesto con

probada actividad hipoglucemiante que ha demostrado su capacidad para bloquear la producción hepática de glucosa y se ha identificado como el principal constituyente del extracto acuoso de *Cecropia obtusifolia* y *C. peltata*, plantas utilizadas tradicionalmente para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2.⁵⁹ El D-*chiro*-inositol, ha sido identificado como uno de los constituyentes activos de *Momordica charantia* y *Cucurbita ficifolia*, especies utilizadas tradicionalmente para el tratamiento de la diabetes tipo 2,⁶⁰ mientras que el efecto del L-*chiro*-inositol aún no ha sido descrito, esto quizá debido a que su distribución en la naturaleza es limitada y ha sido aislado solo de algunas especies vegetales como *Cremanthodium ellisii*,⁶¹ *Euphorbia resinifera*,⁵⁴ *Euphorbia pilulifera*.⁵⁵ En el presente trabajo se evaluó el efecto hipoglucemiante del L-*chiro*-inositol en ratas diabéticas a una dosis de 3.73 mg/Kg (Figura 21). Los resultados mostraron una diferencia significativa con respecto al tiempo cero desde los 60 min posteriores a la administración y una diferencia significativa respecto al control hipoglucémico a los 180 min. Es importante hacer notar que ambos compuestos (**22** y **23**) están presentes en el extracto metanólico y acuoso, la concentración en el extracto metanólico es menor que en el acuoso, lo que explica su menor efecto. Los resultados obtenidos permiten proponer a estos dos compuestos como dos de los componentes responsables de la actividad mostrada, y respaldan el uso tradicional de la especie para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2.

Además de los compuestos mencionados, la separación del extracto acuoso llevó al aislamiento e identificación del diterpeno **4** y los benzoatos de bencilo **28-31** (Figura 22) como componentes minoritarios, mientras que del extracto metanólico se aisló el benzoato de bencilo **31** (Figura 23) en adición a los ya mencionados en el extracto acuoso.

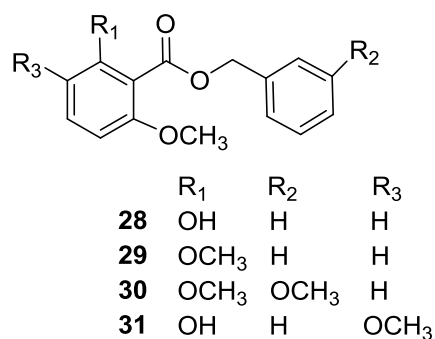


Figura 22. Benzoatos de bencilo aislados del extracto acuoso y de metanol de *Ageratina petiolaris*.

El compuesto **4** ha sido aislado previamente de *Fleischmannia viscidipes*⁶² y de *Eupatorium (Ageratina) petiolaris*.^{20b} Los compuestos **29** y **30** han sido aislados previamente de la misma especie y los compuestos **22**, **23**, **28** y **31** se describen por vez primera en la especie. Aunque el compuesto **28** se ha aislado antes de *Ageratina petiolaris* y de otras especies, no se encontraron datos de su estructura cristalina por lo que en este trabajo se describe por primera vez (Figura 23).

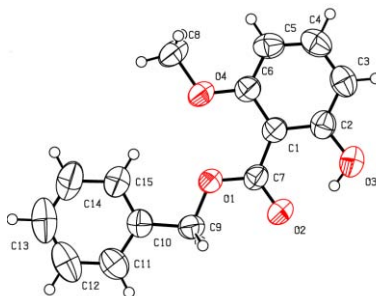


Figura 23. Estructura cristalina del compuesto **28** obtenida por difracción de rayos X.

4.10. Actividad antiprotozoaria de los compuestos aislados de *Ageratina petiolaris*

Como se observa en el Cuadro 12, los compuestos aislados de *Ageratina petiolaris* muestran baja actividad contra los organismos de prueba, lo que sugiere que la actividad que presenta el extracto acuoso (Cuadro 3), este dada, por un sinergismo entre sus constituyentes y no por un compuesto en particular.

Cuadro 12. Actividad antiprotozoaria de los compuestos aislados de *Ageratina petiolaris*

Compuesto/Control	<i>Entamoeba histolytica</i> CI ₅₀ μM (IC) ^a	<i>Giardia lamblia</i> CI ₅₀ μM (IC) ^a
L- <i>chiro</i> -inositol (21)	475.98 (474.86 - 478.21)	522.34 (520.11 - 523.46)
Ácido clorogénico (23)	96.9 (96.32 - 97.46)	118.36 (117.23 - 118.92)
28	184.2 (185.5 - 181.0)	210.3 (212.3 - 209.6)
29	106.9 (108.2 - 106.6)	130.6 (131.4 - 129.8)
30	90.4 (91.2 - 88.6)	122.8 (123.5 - 123.7)
Emetina ^{b,*}	2.18 (2.2 - 2.14)	0.83 (0.87 - 0.82)
Metronidazol ^{b,*}	0.23 (0.58 - 0.17)	1.22 (1.57 - 0.81)

^a Los resultados están expresados como el promedio de n = 6. IC = intervalo del confianza al 95%. Los valores marcados con * se consideraron con diferencia significativa respecto al control con p ≤ 0.05. CI₅₀ calculada mediante un análisis probit. ^bControles positivos.

5. CONCLUSIONES

Los resultados presentados en este trabajo, representan una contribución al conocimiento químico y biológico de especies de la flora mexicana y reafirman el valor de las plantas como fuente de nuevas entidades químicas con potencial farmacológico.

El estudio fitoquímico de la especie *Ageratina cylindrica* condujo al aislamiento de 27 compuestos, 14 de los cuales no han sido descritos previamente en la literatura, ocho de ellos corresponden a derivados del timol y los seis restantes a estructuras relacionadas con ácido *ent*-kaurenoico.

Se determinó por primera vez la configuración absoluta y la estructura cristalina de un derivado del timol con un grupo epóxido en su estructura (compuesto **9**).

Se determinó la configuración absoluta de los nuevos derivados del ácido *ent*-kaurenoico mediante espectroscopia de dicroísmo circular vibracional en combinación con cálculos teóricos utilizando la teoría del funcional de la densidad poniendo en evidencia la utilidad de esta herramienta para la determinación de la configuración absoluta de un centro quirral en presencia de otros centros quirales.

Se describe por primera vez la estructura cristalina del ácido 15-oxo-(16*R*)-*ent*-kauran-19-oico (compuesto **33**), producto de la hidrólisis ácida de los derivados del ácido *ent*-kaurenoico, sustituidos en C-15 con una orientación β .

La evaluación de los derivados del timol como inhibidores del hiperperistaltismo intestinal indica que los compuestos **9** y **13** representan entidades químicas con importante potencial como antidiarreicos y que un sustituyente hidroxilo en la posición C-6 del anillo del timol es importante para mantener la actividad de los compuestos.

La investigación de *Ageratina petiolaris* como una especie hipoglucemiante condujo a la identificación de *L-chiro*-inositol y ácido clorogénico como los principales constituyentes del extracto acuoso y como probables responsables de la actividad que mostró dicho extracto en las pruebas de actividad hipoglucemiante *in vivo*, lo que proporciona soporte científico al uso tradicional de la especie.

La evaluación de los compuestos aislados contra *Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica* indica que los metabolitos presentan una baja actividad contra estos parásitos y

que la actividad mostrada en el extracto acuoso debe estar dada por el efecto de sus constituyentes en conjunto y no por un compuesto en particular.

6. DESARROLLO EXPERIMENTAL

6.1. Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas

Los puntos de fusión fueron determinados en un aparato Fisher-Johns y no están corregidos. Los espectros IR fueron obtenidos en un espectrómetro IR Bruker Tensor 27. Las RO fueron medidas en un polarímetro Perkin-Elmer 323. Los espectros UV fueron realizados en un espectrómetro Shimadzu UV 160U. Los espectros de DCV fueron adquiridos en un espectrómetro BioTools dualPEM Chiral/IR FT-VCD (Jupiter, FL). Los experimentos de RMN 1D y 2D fueron realizados en un espectrómetro Bruker Advance III a 400 MHz para ^1H and 100 MHz para ^{13}C y en un Varian, Unity Inova 500 MHz para ^1H y 125 MHz para ^{13}C . Los desplazamientos químicos (δ) están referenciados con el TMS y las constantes de acoplamiento (J) están dadas en Hz. Los espectros de HRESI-MS se determinaron en un espectrómetro de masas Waters Synap G2S HDMS Q-TOF y/o en un Bruker micrOTOF-Q II, Los espectros DART-MS en un The AccuTOF JMS-T100LC y FAB-MS en un JEOL JMS-SX102A. Los datos de rayos X fueron colectados en un difractorómetro Agilent Xcalibur Atlas Gemini.

6.2. Métodos cromatográficos

Las separaciones por cromatografía en columna abierta (CCA) se realizaron sobre gel de sílice de malla 230-400 (Macherey-Nagel) o Sephadex LH-20 (Pharmacia Biotech) de acuerdo a las técnicas convencionales empleando diferentes sistemas de elución. La cromatografía en columna “flash” se realizó usando la metodología descrita por W. Clark Still et. al.⁶³ utilizando como fase estacionaria gel de sílice de malla 230-400 (Macherey-Nagel) u octadecilsilicio (C_{18}) (Sigma Aldrich). La CCF fue realizada en placas Macherey Nagel Sil G/UV₂₅₄ de 20 x 20 cm y 0.25 a 2.00 mm de espesor, según el caso. El seguimiento del progreso tanto de cromatografías como de reacciones se realizó mediante cromatografía en capa fina analítica (CCFa) utilizando cromatofolios de gel de sílice de 0.20 mm con indicador de fluorescencia adquiridas de Macherey Nagel. La visualización de las placas se llevó a cabo con una lámpara de luz UV Espectroline modelo CX-20 a dos longitudes de onda (254 y 365 nm) y/o utilizando reveladores de sulfato cérico amoniacal y/o óleum.

6.3. Evaluación de la actividad antiprotozoaria

Giardia lamblia IMSS: 1090-1 se cultivó en medio TYI-S-33 modificado, suplementado con 10% de suero de ternera y bilis bovina. *Entamoeba histolytica* HM1 IMSS se cultivó a 37 °C en medio TYI-S-33 suplementado con 10 % de suero de bovino (inactivado por calentamiento). Los trofozoitos se mantuvieron en condiciones axénicas. Los estudios se realizaron utilizando trofozoitos en fase logarítmica de crecimiento. Los ensayos de susceptibilidad *in vitro* se llevaron a cabo incubando trofozoitos de *E. histolytica* (6×10^3) o *G. lamblia* (5×10^4) a 37 °C durante 48 h en presencia de los compuestos a evaluar disueltos en DMSO a diferentes concentraciones (2.5-200 µg/mL). Después de la incubación, se tomó un inóculo de 50 µL de cada tubo y se transfirió en medio fresco para ser incubado durante 48 horas adicionales en ausencia del compuesto a evaluar. Cada evaluación incluyó metronidazol y emetina como controles positivos, un control (medio de cultivo, trofozoitos y DMSO) y un blanco (medio de cultivo). El número final de parásitos se determinó utilizando un hemocitómetro y se determinó el porcentaje de inhibición de crecimiento por comparación con el control. Cada prueba se realizó por duplicado y se repitió al menos tres veces. Los datos obtenidos se sometieron a un análisis probit y el porcentaje de trofozoitos viables se determinó por comparación con el control. Los valores de concentración inhibitoria media (CI₅₀) se obtuvieron mediante un análisis de regresión graficando probit versus log de la concentración.

6.4. Determinación de la actividad inhibitoria de la propulsión intestinal

La evaluación de la actividad antipropulsiva se realizó siguiendo el método descrito por Calzada.⁶⁴ Se emplearon grupos de 6 ratas machos de la cepa Sprague-dawley cuyo peso osciló entre los 200 y 250 g, obtenidas del bioterio del IMSS (Instituto Mexicano del Seguro Social). Los protocolos experimentales fueron aprobados por el “Animal Care and Use Committee” del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI. El manejo de los animales se realizó de acuerdo a la NOM 0062-ZOO-1999 titulada “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio”. Las ratas se mantuvieron en ayunas durante toda la noche y agua *ad libitum*.

El experimento incluyó un grupo blanco (DMSO 2 % en agua + carbón activado al 2% en agua), un control negativo (DMSO 2% en agua + solución de goma de acacia al 5%-

carbón activado al 10% en agua) control positivo (10 mg /Kg de loperamida en DMSO al 2% en agua + solución de goma acacia al 5%-carbón-activado al 10% en agua) y un grupo de prueba (compuesto a diferentes concentraciones en DMSO al 2% en agua + solución de goma acacia al 5%-carbón activado al 10% en agua). La administración se realizó vía intragástrica. Los compuestos puros, así como la loperamida fueron administrados 20 min antes de la administración de la suspensión de carbón activado-goma acacia. Se dejaron transcurrir 30 min y los animales fueron sacrificados por dislocación cervical, se disectó el intestino delgado desde el píloro hasta el ileón y se midió el avance del carbón activado-goma acacia en el tubo digestivo.

Los datos se analizaron mediante una prueba *t* de Student.

6.5. Evaluación de la actividad hipoglucemiante

La evaluación del efecto hipoglucemiante del extracto acuoso de *Ageratina petiolaris* se realizó siguiendo el método propuesto por Massiello.⁶⁵ Se emplearon cinco grupos de 12 ratas de la cepa Wistar incluyendo machos y hembras de 2 meses de edad y entre 250 y 300 g de peso, adquiridas del bioterio de la Facultad de Ciencias, UNAM. Las unidades experimentales se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura (25 °C), humedad (55 %), periodos de luz oscuridad de 12 x 12 h, acceso libre al alimento (Purina, Rodent Laboratory Chow 5001) y agua *ad libitum*. Se les administró una dosis de 150 mg/Kg de nicotinamida (NA) en solución isotónica al 0.9 % por vía intraperitoneal. Después de 15 minutos se administró una dosis de 65 mg/Kg de estreptozotocina (STZ) disuelta en buffer de citratos a un pH de 4.5 por vía intravenosa. Después de 24 h y durante siete días consecutivos, se monitorearon los niveles de glucosa plasmática. Las muestras de sangre se obtuvieron de acuerdo al procedimiento descrito en la guía del “Institutional Animal Care and Use Committe” (10/09/99) (IACUC, 1999). El criterio de inclusión de una rata en el experimento fue un nivel de glucosa entre 180 y 220 mg/dL. El experimento incluyó un grupo blanco (ratas normales a las que se les administró solución fisiológica), un control negativo (ratas diabéticas a las que se les administró solución fisiológica), un control positivo (ratas diabéticas a las que se les administro glibenclamida) y grupo de prueba (ratas diabéticas a las que se les administró el extracto o compuesto de prueba). Las determinaciones de glucosa se realizaron por duplicado, la primera de ellas 5 min antes de

la administración oral de los extractos, vehículo o fármaco (T0) y después a los 60, 120 y 180 min. La concentración de glucosa se determinó mediante el empleo de equipos Accutrend GC (Roche).

Los datos se analizaron mediante una prueba de ANOVA de dos vías seguida de un análisis estadístico Bonferroni.

6.6. Material vegetal

Ageratina cylindrica y *Ageratina petiolaris* fueron colectadas en Tenancingo, Estado de México, México en febrero del 2012. El material botánico fue identificado por el Dr. José Luis Villaseñor y una muestra de cada espécimen fue depositado en el Herbario Nacional MEXU, del Instituto de Biología de la UNAM, registrados como *Ageratina cylindrica*: MEXU-1 333 472 y *Ageratina petiolaris*: MEXU-1 333 471.

6.7. Preparación de los extractos de *Ageratina cylindrica*

El material vegetal se separó manualmente en hojas, tallos y flores, se secó a temperatura ambiente y a la sombra, y se molió en un molino de cuchillas.

Se pesaron 400 g de material y posteriormente se realizó la extracción por percolación, utilizando disolventes de polaridad ascendente, obteniéndose los extractos de hexano (170 g), diclorometano (19 g), acetona (21 g) y metanol (63 g).

El extracto acuoso se preparó mediante el método de infusión. Se tomaron 100 g del material molido, se trataron con 1 L de agua destilada hirviendo; se dejó enfriar y se filtró a través de papel filtro, por gravedad. El proceso se repitió 3 veces. El filtrado se liofilizó obteniéndose 33 g de residuo del extracto acuoso.

6.8. Aislamiento de los metabolitos secundarios de *Ageratina cylindrica*

6.8.1. Estudio fitoquímico del extracto de hexano

El extracto de hexano se sometió a CC en gel de sílice usando un gradiente de elución con AcOEt/hexanos (0:100-100:0) hasta obtener 144 eluatos, los cuales se combinaron en 12 fracciones primarias (A-L) mediante su evaluación en CCFa. En la fracción E (64 mg) (eluida con AcOEt/hexanos 90:10) cristalizó el compuesto **1** (30 mg). En la fracción F (1.4 g) se obtuvo un precipitado blanco que fue identificado como una mezcla de **2** y **3**. La fracción G (32 mg) se separó por CCFp en gel de sílice utilizando una

mezcla de hexanos:acetona (3:1) como sistema de elución obteniéndose los compuestos **4** (5 mg) y **5** (7 mg) como aceites amarillentos. En la fracción H, se obtuvo una mezcla de **6** y **7** como un sólido blanco (58 mg). La fracción I (80 mg) se sometió a CCFp obteniéndose el compuesto **8** (20 mg). La fracción J (907 mg) se sometió a CC en Sephadex LH-20 utilizando metanol como eluyente, obteniéndose los compuestos **9** (20 mg), **10** (5 mg), **11** (15 mg), **12** (15 mg) y **13** (15 mg) como aceites incoloros. El resto de las fracciones no fueron analizadas debido a la escasa cantidad de muestra y a su complejidad en cuanto a composición.

6.8.2. Estudio fitoquímico del extracto de diclorometano

El extracto de diclorometano se sometió a CC usando un gradiente de elución con AcOEt/hexanos (0:100-100:0) hasta obtener 56 aluatos, los cuales se combinaron en 5 fracciones primarias (A-E) mediante su evaluación en CCFa. La fracción A (350 mg) se sometió a CC en Sephadex LH-20 usando como sistema de elución una mezcla de hexanos/AcOEt (2:1) para obtener los compuestos **9** (250 mg) y **10** (20 mg); el compuesto **9** fue cristalizado en una mezcla de CH₂Cl₂/Hexanos. La fracción B (80 mg) se sometió a CCFp con la misma mezcla de elución para obtener el compuesto **13** (40 mg), la fracción C se sometió a CCFp utilizando una mezcla de hexanos/AcOEt (2:1) como disolvente de elución para obtener los compuestos **14** (8 mg) y **15** (12 mg) como aceites incoloros. En la fracción E cristalizó el compuesto **16**. El resto de las fracciones no fueron tratadas debido a la poca cantidad de muestra y a la complejidad en cuanto a composición.

Cylindrinol B (Isobutirato de 10-benzoiloxi-8,9-epoxi-7-hidroxitimol, 5): Aceite incoloro; $[\alpha]_{589} +2.4$ (*c* 0.01, acetona); UV (MeOH) $\lambda_{\text{máx}}$ (log ϵ) 204 (2.89), 223 (2.80), 272 (1.88) nm; IR (CHCl₃) $\nu_{\text{máx}}$ 3401, 2934, 2878, 1754, 1722, 1270 cm⁻¹; RMN ¹H y ¹³C (CDCl₃) ver Cuadro 5; DART-MS *m/z* 371 [M + H]⁺.

Cylindrinol A (Isobutirato de (8S)-10-benzoiloxi-8,9,epoxi-6-hidroxi-7-oxotimol, 9): Cristales incoloros; (CH₂Cl₂-hexanos); pf 74-75 °C; $[\alpha]_{589} +25.5$, $[\alpha]_{578} +27.1$, $[\alpha]_{546} +30.9$, $[\alpha]_{436} +52.6$ (*c* 1.03, CHCl₃); UV (MeOH) $\lambda_{\text{máx}}$ (log ϵ) 224 (3.27), 255 (2.91), 332 (2.41) nm; IR (CHCl₃) $\nu_{\text{máx}}$ 3692, 2940, 2854, 1758, 1723, 1666, 1270 cm⁻¹; RMN ¹H y ¹³C (CDCl₃) ver Cuadro 5; FABMS *m/z* 385 [M]⁺ (96), 136 (60), 192 (20), 105 (100), 71 (35), 43 (30); HRESI-MS *m/z* 407.1101[M + H]⁺ (calculada para C₂₁H₂₀O₇ + Na, 407.1109).

Cylindrinol C (Isobutirato de 10-benzoiloxi-8,9-epoxi-7-oxotimol, 10): Aceite incoloro; $[\alpha]_{589} = 0$ (*c* 0.01, acetona); UV (MeOH) $\lambda_{\text{m\acute{a}x}}$ (log ϵ) 206 (3.14), 228 (3.00), 281 (2.23) nm; IR (CHCl₃) $\nu_{\text{m\acute{a}x}}$ 2982, 2832, 1760, 1723, 1704, 1270 cm⁻¹; RMN ¹H y ¹³C (CDCl₃) ver Cuadro 5; FAB-MS *m/z* 369 [M+H]⁺ (100), 307 (58), 289 (35), 154(84), 136 (37), 105 (14); HRFAB-MS *m/z* 369.1337 [M + H]⁺ (calculada para C₂₁H₂₀O₆ + H, 369.1338).

Cylindrinol D (Isobutirato de 10-benzoiloxi-8,9-epoxi-7-acetiloxitimol, 11): Aceite incoloro; $[\alpha]_{589} 0$, (*c* 0.01, acetona); UV (MeOH) $\lambda_{\text{m\acute{a}x}}$ (log ϵ) 205 (3.25), 251 (3.22) nm; IR (CHCl₃) $\nu_{\text{m\acute{a}x}}$ 2938, 2878, 1725, 1452, 2385, 1270 cm⁻¹; RMN ¹H y ¹³C (CDCl₃) ver Cuadro 5; FAB-MS *m/z* 413 [M+1]⁺ (67), 353 (15), 231 (46), 203 (25), 161 (22), 105 (100), 71(21), 43 (19); HRFAB-MS *m/z* 413.1592 [M+H]⁺ (calculada para C₂₃H₂₄O₇ + H, 413.1600).

Cylindrinol E (Isobutirato de 10-benzoiloxi-8,9-epoxi-7-isobutiriloxitimol, 12): Aceite incoloro; $[\alpha]_{589} +2.4$ (*c* 0.01, acetona); UV (MeOH) $\lambda_{\text{m\acute{a}x}}$ (log ϵ) 205 (3.19), 222 (3.14) nm; IR (CHCl₃) $\nu_{\text{m\acute{a}x}}$ 2932, 2856, 1755, 1724, 1270 cm⁻¹; RMN ¹H y ¹³C (CDCl₃) ver Cuadro 6; FAB-MS *m/z* 441 [M+1]⁺ (34), 407 (28), 231 (39), 91 (23), 154 (100), 136 (80), 105 (80), 95 (58), 71 (35), 55 (83), 43 (74).

Cylindrinol F (Isobutirato de 10-benzoiloxi-8,9-epoxi-6-hidroxi-7-isobutiriloxitimol, 13): Aceite incoloro; $[\alpha]_{589} +7.9$ (*c* 0.01, acetona); UV (MeOH) $\lambda_{\text{m\acute{a}x}}$ (log ϵ) 204 (2.99), 2227 (2.79), 282 (2.18) nm; IR (CHCl₃) $\nu_{\text{m\acute{a}x}}$ 3281, 2980, 2878, 1752, 1722, 1272 cm⁻¹; RMN ¹H y ¹³C (CDCl₃) ver Cuadro 6; FAB-MS *m/z* 457 [M+H]⁺ (100), 280 (31), 369 (44), 247(64), 177 (33), 105 (73), 71 (14), 43 (8); HRFAB-MS *m/z* 457.1851 [M+H]⁺ (calculada para C₂₅H₂₉O₈ +H, 457.1862).

Cylindrinol G (Isobutirato de benzoiloxi-8,9-dehidro-7-hidroxitimol, 14): Aceite incoloro; UV (MeOH) $\lambda_{\text{m\acute{a}x}}$ (log ϵ) 205 (3.09), 227 (2.97) nm; IR (CHCl₃) $\nu_{\text{m\acute{a}x}}$ 2933, 2877, 1751, 1720, 1273, 116 cm⁻¹; RMN ¹H y ¹³C (CDCl₃) ver Cuadro 6; DART-MS *m/z* 355 [M+H]⁺.

Cylindrinol H (Isobutirato de 10-benzoiloxi-8-hidroxi-9-isobutiriloxi-7-hidroxitimol, 15): Aceite incoloro; $[\alpha]_{589} +0.42$ (*c* 0.01, acetona); UV (MeOH) $\lambda_{\text{m\acute{a}x}}$ (log ϵ) 204 (2.92), 224 (2.73), 276 (2.07) nm; IR (CHCl₃) $\nu_{\text{m\acute{a}x}}$ 3353, 2931, 2856, 1724, 1272 cm⁻¹; RMN ¹H y ¹³C (CDCl₃) ver Cuadro 6; HR-ESI-MS: 411.1414 [M + Na]⁺. (calculada para C₂₁H₂₄O₇ + Na, 411.1420)

Análisis por DCV del compuesto 9: Una muestra de 7.9 mg del compuesto **9**, se disolvió en 150 μL de CDCl_3 100% deuterado y se colocó en una celda de BaF_2 con un paso de luz de 0.1 mm. Los datos fueron adquiridos usando una resolución de 4 cm^{-1} y un tiempo de colección de 40 h, dividido en bloques de 1 h. Se promediaron 35 bloques de 1 h y se obtuvo la línea base sustrayendo el espectro del disolvente adquirido bajo las mismas condiciones de la muestra. La estabilidad de la muestra se monitoreó por espectroscopia de RMN ^1H antes y después de la medición del espectro de DCV.

Métodos computacionales para la determinación de la configuración absoluta del compuesto 9: La búsqueda conformacional se llevó a cabo con un nivel de teoría de mecánica molecular empleando el campo de fuerzas MMFF94 incorporado en el software Spartan '04 (Wavefunction, Irvine, CA, USA). Se obtuvieron 223 conformeros con una energía relativa de 10 kcal/mol por arriba del conformero de más estable. El número de conformeros se redujo considerando aquellos dentro del rango de 5 kcal/mol, y se sometieron a un cálculo de punto simple con el nivel de teoría BLYP/6-31G(d,p). Las geometrías de los 66 conformeros dentro de las primeras 5 kcal/mol fueron optimizadas a con el funcional B3LYP y la base DGDZVP empleando el programa Gaussian 09W.⁶⁶ Se obtuvieron 31 conformeros con frecuencias no imaginarias en el análisis vibracional y con una energía libre (G) en el rango de 3 kcal/mol por arriba del conformero más estable. Los espectros de IR y DCV se obtuvieron utilizando los 23 conformeros de abundancia mayor a 1%. Para los funcionales B3PW91 y PBEPBE se siguió la misma estrategia para obtener los conformeros más abundantes considerando una distribución de Boltzmann. Los espectros calculados y experimentales fueron comparados utilizando el software CompareVOA.⁶⁷ Todos los cálculos gaussianos se llevaron a cabo usando un nodo de supercómputo con ocho procesadores a 2.93 GHz y 8Gb de RAM.

6.8.3. Estudio fitoquímico del extracto de acetona

El residuo del extracto crudo se sometió a lavados sucesivos con CH_2Cl_2 , acetona y metanol. Se pesaron 7 g de la fracción soluble en acetona y se sometieron a CC en Sephadex usando metanol como disolvente de elución. Se obtuvieron 32 eluatos de 60 ml cada uno. Los eluatos se reunieron de acuerdo con su perfil cromatográfico en 5 fracciones primarias (A-E). La fracción B (120 mg) fue sometida a CCFp utilizando como disolvente

de elución una mezcla de AcOEt/MeOH/H₂O (200:16:7) eluida tres veces para obtener los compuestos **17** (20 mg), **18** (35 mg) y **19** (7 mg). En las fracciones C y D cristalizaron espontáneamente los compuestos **20** (70 mg) y **16** (53 mg), respectivamente. El resto de las fracciones no fueron analizadas debido a la pequeña cantidad de muestra y a la complejidad en cuanto a composición.

19-β-D-glucopiranosil-15-β-L-fucopiranosiloxi-ent-kaur-16-en-19-ato (17): Polvo blanco; pf 145-150 °C; $[\alpha]_D^{25}$ -31.6 (c 0.01, MeOH); IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ 3370, 2924, 2856, 1732, 1655, 1061 cm⁻¹; RMN ¹H y ¹³C (piridina *d*₅) ver Cuadro 9; HRESI-MS *m/z* [M + Na]⁺ 649.3222 (calculada para C₃₂H₅₀O₁₂ + Na, 649.3200).

19-β-D-glucopiranosil-15-β-(4-acetoxi-β-L-fucopiranosiloxi)-ent-kaur-16-en-19-ato (18): Polvo blanco; pf 150-152 °C; $[\alpha]_D^{25}$ -46.6 (c 0.01, MeOH); IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ 3373, 2925, 2857, 1724, 1655, 1602, 1240, 1070 cm⁻¹; RMN ¹H y ¹³C (piridina *d*₅) ver Cuadro 9; HRESI-MS *m/z* [M + Na]⁺ 691.3316 (calculada para C₃₄H₅₂O₁₃ + Na, 691.3306).

19-β-D-glucopiranosil-15-β-(3-acetoxi-β-L-fucopiranosiloxi)-ent-kaur-16-en-19-ato (19): Polvo blanco; pf 145-148 °C; $[\alpha]_D^{25}$ -33.0 (c 0.01, MeOH); IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ 3691, 3597, 2929, 1856, 1734, 1602, 1022 cm⁻¹; RMN ¹H y ¹³C (piridina *d*₅) ver Cuadro 9; HRESI-MS *m/z* [M + Na]⁺ 691.3316 (calculada para C₃₄H₅₂O₁₃ + Na, 691.3306).

Metil xylopató (19-β-metil-15-α-acetoxi-ent-kaur-16-en-19-ato, 32): A una solución de **17** (17 mg) en H₂O (2.0 mL), se adicionaron 23 mg of NaIO₄ y se agitaron a temperatura ambiente por 18 h. Posteriormente se adicionaron 20 mg de KOH a la mezcla de reacción y se pusieron en condiciones de reflujo por 1 h. A continuación se adicionaron 2.0 mL de agua y el pH se ajustó a 4-5 con AcOH. La mezcla resultante se extrajo con EtOAc (10 mL x 3). La fracción orgánica se lavó con agua (25 mL), se secó con Na₂SO₄ anhidro, y se evaporó el disolvente a presión reducida para obtener **35**, el cual, sin purificación se sometió a un proceso de esterificación con diazometano seguido de acetilación en anhídrido acético y piridina, para dar **32** (1 mg), el cual, fue identificado por sus datos de RMN comparados con la literatura.⁶⁸

19-β-metil-15-β-acetoxi-ent-kaur-16-en-19-ato (36): Se obtuvo mediante un proceso de esterificación y acetilación similar al descrito para **35** de una muestra auténtica de ácido

grandiflorico (15 mg) aislado de *Montanoa Gigas*,⁶⁹ sus datos de RMN fueron congruentes con los descritos en la literatura.

Hidrólisis alcalina de 17: Una muestra de **17** (30 mg), disueltos en una solución de KOH en etanol al 10% se calentó a 70 °C por 4 h. Posteriormente se aciduló con ácido acético y se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo obtenido de esta manera se disolvió en agua y se extrajo con *n*-butanol (10 mL x 3). La fracción butanólica se destiló a presión reducida, para dar un sólido blanco amorfo, el cual fue identificado de acuerdo con sus características espectroscópicas como **34** (18 mg).

Hidrólisis ácida de 17-19: A una mezcla de **17-19** (35 mg) disuelta en metanol (5 mL) se le agregaron 10 mL de HCl al 10% y se mantuvo en reflujo por 8 h, posteriormente se dejó enfriar y se extrajo con CH₂Cl₂ (20 mL × 3). De la fase orgánica, después de eliminar el disolvente, se obtuvo el compuesto **33**, el cual se caracterizó espectroscópicamente por sus datos de RMN ¹H y ¹³C comparados con los datos previamente descritos en la literatura.⁷⁰ La fase acuosa se neutralizó con KOH 1N y se extrajo con *n*-BuOH, se lavó con agua (10 mL x 3) y después de remover el disolvente, se prepararon los derivados sililados de los azúcares mediante tratamiento con *bis*(trimetilsilil) trifluoroacetamida (Merck) utilizando el método ya descrito⁷¹ y se analizaron por CG.

Determinación de la configuración de la fucosa: Se pesaron 60 mg de **34** y se sometieron a hidrólisis ácida por el método descrito en el párrafo anterior, la fase acuosa se neutralizó con Na₂CO₃ y se extrajo con *n*-BuOH (20 mL x 3). El residuo obtenido después de remover el disolvente a presión reducida y sin previa purificación, se acetiló y se purificó por CCFp usando una mezcla de hexanos:AcOEt (2:1) para obtener 3 mg del acetato de fucosa, el cual se identificó por sus características espectroscópicas en RMN y su rotación específica $[\alpha]_D^{25} -33.2$ (c 0.003, CHCl₃), como L-fucosa.

Determinación de la configuración absoluta de los derivados del ácido *ent*-kaurenoico mediante DCV: Muestras de 7.0 mg de **32** y 9.4 mg de **36** se disolvieron en 150 µL de CDCl₃ 100 % deuterado y se colocaron en una celda de BaF₂ con un paso de luz de 0.1 mm. Los datos se adquirieron durante 6 h con 4 cm⁻¹ de resolución para las muestras y disolvente. Los seis bloques de una hora se promediaron y se obtuvo el espectro final sustrayendo el espectro del disolvente medido en las mismas condiciones de la muestra. La

estabilidad se monitoreo a través de RMN ^1H antes de después de la determinación de los espectros de DCV.

Métodos computacionales para los derivados del ácido *ent*-kaurenoico: La búsqueda de los conformeros más estables de los epímeros **32** y **36** se llevó a cabo con mecánica molecular utilizando el campo de fuerzas MMFF94 incluido en el software ComputeVOA (Biotools, Jupiter, FL, USA). Se inició con 12 confórmeros en una ventana de 10 kcal/mol para cada molécula, después se realizó un recorte de confórmeros considerando aquellos contenidos en el intervalo de energía relativa de 0.2 kcal/mol que representaron el 99.99 % del total de la población conformacional. Estos confórmeros se sometieron a un cálculo de punto simple a con un nivel de teoría B3PW91/DGDZVP de donde se obtuvieron dos confórmeros para cada una de las estructuras. La geometría de los confórmeros **32a**, **32b**, **36a** y **36b** se optimizó al mismo nivel de teoría empleando el programa Gaussian 09W. Las estructuras optimizadas de ambos confórmeros no presentaron frecuencias imaginarias en el análisis vibracional y la energía libre relativa entre estos confórmeros fue de 0.7 kcal/mol para **32** y 0.06 kcal/mol para **36**. Los 4 confórmeros fueron considerados para el cálculo de los momentos dipolares eléctricos y las fuerzas rotacionales. Los espectros de IR y DCV se obtuvieron pesando la contribución de cada confórmero considerando una distribución de Boltzman y un ancho de banda de 6 cm^{-1} . Los espectros calculados y experimentales se compararon usando el programa CompareVOA (Biotools, Jupiter, FL, USA). Todos los cálculos Gaussianos se realizaron usando un nodo de supercomputo con 16 procesadores de 2.60 GHz y 16 Gb de RAM.

6.8.4. Estudio fitoquímico del extracto de metanol

La evaluación por CCFa del extracto metanólico mostró una composición muy similar al extracto de acetona por lo que se sometió a una CC en gel de sílice utilizando como sistema de elución una mezcla de AcOEt/MeOH/H₂O (200:16:7), se obtuvieron 50 fracciones de 100 mL cada una, las fracciones se reunieron de acuerdo con su perfil cromatográfico en CCFa en 6 fracciones (A-F). De la fracción A se obtuvo por cristalización espontanea el compuesto **20** (20 mg). En la fracción B cristalizó el compuesto **21**. El compuesto **22** (120 mg) cristalizó de manera espontánea en la fracción D. De la fracción DE (40 mg) se obtuvo el compuesto **23** (40 mg). De la fracción F (400 mg) se

obtuvo una mezcla de los compuestos **17-19**, los cuales se separaron de la manera descrita en el caso del extracto de acetona.

6.8.5. Estudio fitoquímico del extracto acuoso

El extracto acuoso se fraccionó en una columna de Sephadex LH-20 usando MeOH como eluyente, obteniéndose 9 fracciones (A-I). La fracción D (950 mg) se sometió a CC “flash” utilizando C18 como soporte, una mezcla de MeOH/H₂O (3:1) como fase móvil y un flujo de 5 mL/min. Se obtuvieron 50 eluatos (25 mL cada uno), los cuales se reunieron en quince fracciones mayoritarias (D1-D15) con base en su perfil cromatográfico evaluado en CCFa). La fracción D1 se sometió a CCFp con una mezcla de EtOAc/MeOH/H₂O (200:16:7) como sistema de elución para obtener el compuesto **24** (25 mg). El compuesto **17** (30 mg) se aisló de forma pura de la fracción D3. Los compuestos **18** (100 mg), **19** (25 mg) y **25** (15 mg), se aislaron de la misma manera de las fracciones D8, D11 y D13 respectivamente. La fracción ED15 resultó una mezcla de **26** y **27** (4.5 mg). El compuesto **22** cristalizó de manera directa en la fracción F. La fracción G (30 mg) se sometió a CCFp con n-butanol:2-propanol:ácido fórmico:H₂O (48:17:18:17) para obtener el compuesto **23** (15 mg), el compuesto **20** fue aislado de la misma manera de la fracción I.

15-β-L-fucosiloxi-ent-kaur-16-en-19-ato (25): Polvo blanco; pf 142-146 °C; $[\alpha]_D^{25}$ -36.7 (c 0.01, MeOH); IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ 3368, 1731, 1706, 1655, 1231 cm⁻¹; RMN ¹H y ¹³C (piridina *d*₅) ver Cuadro 10; HRESI-MS *m/z* [M + Na]⁺ 487.2667 (calculada para C₂₆H₄₀O₇ + Na, 487.2672).

15-β-(4-acetoxi-L-fucosiloxi)-ent-kaur-16-en-19-ato (26): Polvo blanco; pf 149-152 °C; $[\alpha]_D^{25}$ -28.0 (c 0.0051, MeOH); IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ 3596, 1735, 1693, 1449, 1370, 1242 cm⁻¹; RMN ¹H y ¹³C (piridina *d*₅) ver Cuadro 10; DART-MS *m/z* [M + H]⁺ 507.

15-β-(3-acetoxi-L-fucosiloxi)-ent-kaur-16-en-19-ato (27): RMN ¹H (pyridina-*d*₅, 500 MHz): Datos parciales extraídos de la mezcla de **26** y **27**; δ 2.61 (1H, s, H-13), 5.88 (1H, s, H-17a), 5.11 (1H, s, H-17b), 1.32 (3H, s, CH₃-18), 1.21 (3H, s, CH₃-20), 1.96 (3H, s, OCOCH₃), 4.92 (1H, d, *J* = 7.6 Hz, H-1'), 4.65 (1H, dd, *J* = 10.0, 7.6 Hz, H-2'), 5.46 (1H, dd, *J* = 10.0, 3.2 Hz, H-3'), 4.28 (1H, d, *J* = 4.0 Hz, H-4'), 3.88 (1H, qd, *J* = 6.4, 0.8 Hz, H-5'), 1.58 (3H, d, *J* = 6.4 Hz, CH₃-6'); ¹³C RMN (CDCl₃, 125 MHz) δ 41.1 (CH, C-13), 106.6 (CH₂, C-17), 29.7 (CH₃, C-18), 180.7 (C, C19), 16.6 (CH₃, C-20), 171.2 (C,

OCOCH₃), 21.4 (CH₃, OCOCH₃), 107.1 (CH, C-1'), 72.8 (CH, C-2'), 78.6 (C, C-3'), 70.5 (CH, C-4'), 71.6 (CH, C-5'), 17.6 (CH₃, C-6').

19-β-D-glucopiranosil-15-β-(D-glucopiranosiloxi)-ent-kaur-16-en-19-ato (Paniculosido V): polvo blanco; pf 168-172 °C (reportado^{41b} 173-175 °C), Los datos de RMN ¹³C fueron esencialmente los mismos que los reportados.⁴¹ RMN ¹H (piridina-*d*₅, 400 MHz): δ 1.82 (1H, d, *J* = 12.4, H-1a), 0.83 (1H, td, *J* = 12.4, 3.2, H-1b), 2.19 (1H, m, H-2a), 1.38 (1H, m, H-2b), 2.34 d (1H, d, *J* = 12.8, H-3a), 0.95 (1H, dd, *J* = 13.6, 4.4, H-3b), 1.30 (1H, m, H-5), 2.43 (1H, m, H-6a), 2.08 (1H, m, H-6b), 2.44 (1H, m, H-7a), 1.48 (1H, m, H-7b), 1.92 (1H, m, H-9), 1.90 (1H, m, H-11a), 1.43 (1H, m, H-11b), 1.62 (1H, m, H-12a), 1.46 (1H, m, H-12b), 2.57 (1H, br s, H-13), 2.22 (1H, m, H-14a), 1.00 (1H, m, H-14b), 4.11 (1H, t, *J* = 2.4, H-15), 5.89 (1H, br s, H-17a), 5.09 (1H, dd, *J* = 1.6, 0.8, H-17b), 1.24 (3H, s, CH₃-18), 1.29 (3H, s, CH₃-20), 5.04 (1H, d, *J* = 7.6, H-1'), 4.12 (1H, t, *J* = 8.8, H-2'), 4.27 (1H, m ov, *J* = 9.2, H-3'), 4.25 (1H, m ov, H-4'), 3.92 (1H, ddd, *J* = 8.8, 4.8, 2.8, H-5'), 4.54 (1H, dd, *J* = 11.2, 2.8, H-6'a), 4.42 (1H, dd, *J* = 12.0, 4.0, H-6'b), 6.27 (1H, d, *J* = 8.0, H-1''), 4.21 (1H, t, *J* = 8.8, H-2''), 4.28 (1H, t, *J* = 8.4, H-3''), 4.34 (1H, t, *J* = 9.2, H-4''), 4.03 (1H, ddd, *J* = 9.2, 4.4, 2.4, H-5''), 4.46 (1H, dd, *J* = 12.0, 2.4, H-6''a), 4.38 (1H, dd, *J* = 12.0, 4.8, H-6''b).

Hidrólisis enzimática de la mezcla de 17-19: Se tomaron 60 mg de una mezcla de **17-19** y se disolvieron en 20 mL de buffer de acetatos 0.1 M y pH 5.0. Se adicionaron 12 000 μ L de β-gucosidasa de almendras (Sigma-Aldrich 49290). La mezcla se mantuvo en agitación y a 50 °C por 96 h. Posteriormente se extrajo con AcOEt (3 x 20 mL) para obtener una fracción orgánica conteniendo una mezcla de (**25-27**), los productos fueron identificados por CCFA comparando con muestras auténticas como referencia.

Determinación de la configuración de la glucosa: La fase acuosa de la hidrólisis enzimática descrita en el párrafo anterior, se extrajo con *n*-BuOH (20 mL x 3), y se trató de la misma forma que para el caso de la fucosa para dar 5 mg del acetato de D-glucosa, el cual se identificó por sus características espectroscópicas en RMN y su rotación específica $[\alpha]_D^{25} +35.4$ (c 0.01, CHCl₃).

6.9. Preparación de los extractos de *Ageratina petiolaris*

Las partes aéreas se secaron a temperatura ambiente y a la sombra, y se molieron en un molino de cuchillas.

El extracto de metanol se preparó usando 100 g del material seco y molido se extrajo mediante el método de maceración; se utilizó un 1 L de metanol y se consideró un tiempo de 48 h como tiempo de extracción; el disolvente se eliminó a presión reducida y se obtuvieron 24 g de extracto.

El extracto acuoso se obtuvo a partir de 100 g del material seco y molido, por el método de infusión ya descrito para el caso de *Ageratina cylindrica*. Después de liofilizar, se obtuvo un extracto crudo de 27 g.

6.9.1. Estudio fitoquímico del extracto de metanol

El extracto metanólico de *A. petiolaris* (3 g) se sometió a CC sobre Sephadex LH-20, utilizando metanol como disolvente de elución, se obtuvieron 18 eluatos de 100 mL cada uno. Los eluatos se reunieron en 8 fracciones primarias (A-H) con base en su similitud cromatográfica en CCFa. La fracción E (950 mg) se sometió a CC “flash” en C₁₈ usando metanol como fase móvil y un flujo de 5 mL/min. Se obtuvieron 50 eluatos de 25 mL cada uno, los cuales se combinaron en 4 secundarias (EA-ED) después de su análisis por CCFa. El compuesto **22** (80 mg) cristalizó en la fracción EA. La fracción EB (50 mg) se sometió a CCFp sobre C₁₈ usando un sistema de elución consistente en una mezcla de MeOH/H₂O (1:2) para obtener el compuesto **23** (5 mg). La fracción EC (250 mg) se purificó mediante CCFa utilizando una mezcla de hexanos/AcOEt (3:1) como fase móvil para obtener el compuesto **4**. La fracción ED se sometió a CC sobre tonsil usando CH₂Cl₂ como disolvente de elución obteniéndose 19 eluatos de 5 mL cada uno, los cuales se reunieron en tres fracciones (EDA-EDC). La fracción EDC (300 mg) se sometió a CCFp usando una mezcla de hexanos/AcOEt (3:1) como fase móvil para obtener los compuestos **4** (20 mg), **28** (15 mg), **29** (30 mg), **30** (10 mg) y **31** (5 mg). El resto de las fracciones no se trabajó debido a la complejidad en cuanto a composición.

6.9.2. Estudio fitoquímico del extracto acuoso

El extracto crudo (17 g), se trató con metanol obteniéndose una fracción soluble en metanol (10 g), la cual se concentró a presión reducida. El residuo obtenido de esta manera se disolvió en agua y se sometió a un proceso de partición líquido/líquido utilizando CH_2Cl_2 . Ambas fases se concentraron a presión reducida para obtener 50 mg y 9.85 g de residuo de las fases orgánica y acuosa, respectivamente. El residuo de la fase acuosa se separó utilizando una columna de Sephadex LH-20 usando metanol como disolvente de elución, hasta obtener 52 eluatos de 50 mL cada uno, los cuales, se combinaron en 7 fracciones mayoritarias (A-G) de acuerdo a su perfil cromatográfico en CCFa. La fracción D (250 mg) fue sometida a CC en fase reversa sobre octadecilsilano (C18) usando agua como fase móvil hasta obtener 50 eluatos de 10 mL cada uno, los cuales, se combinaron en 8 subfracciones (DA-DH) de acuerdo con su perfil cromatográfico en CCFa. La fracción DF (180 mg) se sometió a CCFp en fase reversa (C18) y utilizando una mezcla de $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ (2:1) para obtener el compuesto **23** (35 mg). La fracción DG (500 mg) se fraccionó sobre Sephadex LH-20 usando metanol como disolvente de elución hasta obtener 30 eluatos de 5 mL cada uno, los cuales se combinaron en 5 fracciones (DGA-DGE), el compuesto **22** (250 mg) cristalizó en la fracción DGB.

El residuo de CH_2Cl_2 se separó por CCFp utilizando una mezcla de Hexano: AcOEt (v/v 3:1) para obtener los compuestos **4** (2 mg), **28** (2 mg), **29** (5 mg), **30** (2 mg).

7. REFERENCIAS

- ¹ Newman, D. J., Cragg, G. M. **2012**. Natural Products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products* 75, 311-335.
- ² Serie ¿Y el medio ambiente? Biodiversidad, conocer para conservar, secretaria del medio ambiente y recursos naturales. 2011. Página web; [http:// www.semarnat.gob.mx](http://www.semarnat.gob.mx) (consultada en agosto de 2015)
- ³ Lundberg, J. and Bremer, K. **2003**. A phylogenetic study of the order asterales using one morphological and three molecular data sets. *International Journal of Plant Sciences* 164 (4), 553–578.
- ⁴ Funk, V. A., Bayer, R. J., S. Keeley, R. Chan, L. Watson, B. Gemeinholzer, E. E. Schilling, J. L. Panero, B. G. Baldwin, N. T. García-Jacas, A. Susanna, and Jansen R. K. **2005**. Everywhere but Antarctica: using a supertree to understand the diversity and distribution of the Compositae. pp. 343-373 in *Plant diversity and complexity patterns- local, regional and global dimensions*, I. Friis and H. Balslev, eds.
- ⁵ a) Rzedowski, J. **1991**. Diversidad y orígenes de la flora fanerogámica de México. *Acta Botánica mexicana* 14, 3-21. b) Villaseñor, J. L., Ibarra, G., Ocaña, D. **1998**. Strategies for the conservation of Asteraceae in Mexico. *Conservation Biology* 12(5), 1066-1075.
- ⁶ a) Achika, J. I., Arthur, D. E. Gerald, I., Adedayo, A. **2014**. A Review on the Phytoconstituents and related medicinal properties of plants in the Asteraceae family. *Journal of Applied Chemistry*, 7(8), 1-8. b) Fabri, R. L.; Nogueira, M. S.; Dutra, L. B.; Bouzada, M. L. M.; Scio, E. **2011**. Potencial antioxidante e antimicrobiano de espécies da familia Asteraceae. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 13 (2), 183-189.
- ⁷ King, R. M. y H. Robinson. **1970**. New combinations in Ageratina. *Phytologia* 19, 208–229.
- ⁸ a) García-Sánchez, E., Ramírez-López, C. B., Talavera-Alemán, A., León-Gómez, A., Martínez-Muñoz, R. E., Martínez-Pacheco, M. M., Gómez-Hurtado, M. A., Cerda-García-Rojas, C. M., Joseph-Nathan, P., del Río, R. E. **2014**. Absolute configuration of (13*R*)- and (13*S*)- labdane diterpenes coexisting in *Ageratina jocotepecana*. *Journal of Natural Products* 77, 1005-1012. b) Meckes, M., Villarreal, M. L., Tortoriello, J. **1995**. A

- microbial evaluation of medicinal plants used by the Maya people of Southern Mexico. *Phytotherapia Research* 9, 244-250.
- ⁹ Aguilar, B., Navarro, V., León-Rivera, I., Ríos, M. Y. **2009**. Active compounds against *Tinea pedis* Dermatophytes from *Ageratina pichinchensis* var *bustamenta*. *Natural Products Research* 23, 1559-1565.
- ¹⁰ Chen, J-J., Tsai, Y-C., Hwang, T-L., Wang, T-C. **2011**. Thymol, benzofuranoid, and phenylpropanoid derivatives: antiinflammatory constituents from *Eupatorium cannabinum*. *Journal of Natural Products* 74, 1021-1027.
- ¹¹ García, P. G. García, S. E., Martínez, G. I., Scior, R. F. T., Salvador, J. L., Martínez, M. M., del Río, R. E. **2011**. Analgesic effect of leaf extract from *Ageratina glabrata* in the hot plate test. *Brazilian Journal Pharmacognosy* 21(5), 928-935.
- ¹² Zhang, M-L., Wu, M., Zhang, J-J., Irvin, D., Gu, Y-Ch., Shi, O-W. **2008**. Chemical constituents of plants from the genus *Eupatorium*. *Chemistry and biodiversity* 5, 40-55.
- ¹³ Villaseñor, J. L., Ortiz, E., Beutelspacher, C.R. Gómez-López, J.A. **2013**. La familia Asteraceae en el municipio de San Cristobal de las Casas, Chiapas, México. *Lacandonia* 7(1), 31-55.
- ¹⁴ Trópicos.org. Missouri Botanical Garden. Consultada el 26 de enero de 2015
- ¹⁵ Andrade-Cetto, A., Heinrich, M. **2005**. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology* 99, 325-348.
- ¹⁶ www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx, consultada en enero de 2015.
- ¹⁷ Wenseslao Cervantes Hernández, Plantas medicinales de una comunidad de ñahñu del Alto Lerma, 1ª ed. 2010, editado por el Centro de estudios antropológicos Ce-Acatl.A.C. México. pp. 71.
- ¹⁸ a) García-Sánchez, E., Ramírez-López, C. B., Del Río-Torres, REN, Martínez-Pacheco, M. M. **2011**. A revision of *Eupatorium* (Compositae:Eupatoriae) from Michoacán. *International Journal of Experimental Botany* 80, 139-146. b) Alonso-Castro, A.J. Maldonado-miranda, J.J., Martínez-Zarate, A., Jacobo-Salcedo, M. del R., Fernández-Galicia, C., Figueroa-Zúñiga, L.A., Ríos-reyes, N.A., de León-Rubio, M.A., Medellín-

- Castillo, N.A., Reyes-Munguía, A., Martínez-Méndez, R., Alvarez-Carranza, C. **2012**. Medicinal plants used in the Huasteca potosina, México. *Journal of Ethnopharmacology* 143, 292-298.
- ¹⁹ Cástillo-Juárez, I., González, V., Jaime-Aguilar, H., Martínez, G., Linares, E., Bye, R., Romero, L. **2009**. Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology* 122, 402-405.
- ²⁰ a) Guerrero, C., Cruz, V., Saucedo, R. **1982**. Estudio químico de *Eupatorium petiolare* Moc. *Revista Latinoamericana de Química* 13(1), 33-34. b) Calderón, S. J., Quijano, L., Garduño, M., Gómez, F., Ríos, T. **1983**. 2 α -iso-Valeroyloxyeperuic acid, a diterpene from *Eupatorium petiolare*. *Phytochemistry* 22(11), 2617-2619. c) Bohlmann, F., Jakupovic, J., Lonitz, M. **1977**. Natürlich vorkommende Terpen-Derivate, 76 Über Inhaltsstoffe der Eupatorium-Gruppe. *Chemische Berichte* 110, 301-314.
- ²¹ Trejo-Soto, F., Palomino, G., Villaseñor, J. L. **2011**. Números cromosómicos de Asteraceae de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel (REPSA), México, Distrito Federal. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 82, 383-393.
- ²² McVaugh, R. **1972**. Contributions from the University of Michigan Herbarium, 9(4), 393, f. 13. 1972.
- ²³ Diabetes; página web: <http://www.diabetes.org> (consultada en agosto de 2015).
- ²⁴ Atlas de la diabetes, International Diabetes Federation. sexta edición, 2013.
- ²⁵ World Health Organization, 2015, página web; <http://www.who.org> (consultada: agosto, 2015).
- ²⁶ Atlas diabetes, Federación Internacional de Diabetes, séptima edición, 2015.
- ²⁷ Hung, H-Y., Qian, K., Morris-Natschke, S. L., Hsu, C-S., Lee, K-H. **2012**. Recent discovery of plant-derived anti-diabetic natural products. *Natural Products Reports* 29, 580-606.
- ²⁸ a) Logendra, S., Ribnicky, D. M., Yang, H., Poulev, A., Ma, J., Kennelly, E. J., Raskin, I. **2006**. Bioassay-guided isolation of aldose reductase inhibitors from *Artemisia dracunculus*. *Phytochemistry* 67, 1539-1546. b) Daisy, P., Jasmine, R., Ignacimuthu, S.,

- Murugan, E. **2009**. A novel Steroid from *Elephantopus scaber* L. an Ethnomedicinal plant with antidiabetic activity. *Phytomedicine* 16, 252-257.
- ²⁹ Cruz, C., Andrade-Cetto, A. **2015**. Ethnopharmacological field study of the plants used to treat type2 diabetes among the Cakchiquels in Guatemala. *Journal of Ethnopharmacology* 159, 238-244.
- ³⁰ a) Andrade, C., Heinrich, M. **2005**. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology* 99: 325-348. b) Hernández-Galicia, E., Aguilar-Contreras, A., Aguilar-Santamaría, L., Román-Ramos, R., Chávez-Miranda, A. A., García-Vega, L. M., Flores-Sáenz, J. L., Alarcón-Aguilar, F. J. **2002**. Studies on hypoglycemic activity of Mexican medicinal plants. *Proceedings of the Western Pharmacology Society* 45, 118-124. c) Lozoya, X., Aguilar, A., Camacho, J. R. **1987**. Encuesta sobre el uso actual de plantas en la Medicina Tradicional Mexicana. *Revista Medica IMSS (Méx)* 25, 283-291.
- ³¹ a) Dirección General de Epidemiología. Perfil epidemiológico de la infancia en México 2010. Página web; <http://www.dgepi.salud.gob.mx> (consultada en agosto de 2015). b) Dirección General de Epidemiología. Perfil epidemiológico de las enfermedades infecciosas intestinales. México, 2012. Página web; www.salud.gob.mx (consultado en agosto de 2015)
- ³² Bansal, D., Sehgal, R., Chawla, Y., Malla, N., Mahajan, R.C. **2006**. Multidrug resistance in amoebiasis patients. *Indian Journal of Medical Research* 124, 189–194
- ³³ c) Calzada, F., Yépez-Mulia, F., Aguilar, A. **2006**. In vitro susceptibility of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* to plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology* 108 (3), 367-370.
- ³⁴ Diagnóstico y tratamiento del intestino irritable en adultos, Guía de referencia rápida, catálogo maestro de guías de práctica clínica: IMSS-042-08. Actualización 2015.
- ³⁵ a) Salaga, M., Kowalczyk, A., Zielinska, M., Blazewicz, A., Fichna, J. **2015**. *Calea zacatechichi* dichloromethane extract exhibits antidiarrheal and antinociceptive effects in mouse models mimicking irritable bowel syndrome. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 388, 1069-1077. b) Calzada, F., Arista, R., Pérez, H. **2010**. Effect of plants

- used in Mexico to treat gastrointestinal disorders on charcoal-gum acacia-induced hyperperistalsis in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 128, 49-51. c) Calzada, F., Yépez-Mulia, F., Aguilar, A. **2006**. In vitro susceptibility of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* to plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology* 108 (3), 367-370.
- ³⁶ Talavera-Alemán, A., Rodríguez-García, G., López, Y., García-Gutiérrez, H. A., Torres-Valencia, J. M., Del Río, R. E., Cerda-García-Rojas, C. M., Joseph-Nathan, P., Gómez-Hurtado, M. A. **2015**. Systematic evaluation of thymol derivatives possessing stereogenic or prostereogenic centers. *Phytochemistry Reviews* 1-27.
- ³⁷ Maldonado E., Márquez, C. L., Ortega, A. **1992**. A thymol derivative from *Calea nelsonii*. *Phytochemistry* 31, 2527-2528.
- ³⁸ Bohlmann, F., Nuedballa, U., Schulz. **1969**. Über einige Thymolderivate aus *Gaillardia*- und *Helenium*-Arten, *J. Chemische Berichte* 102(3), 864-871.
- ³⁹ García, P. G., García, S. E., Martínez, G. I., Scior, R. F. T., Salvador, J. L., Martínez, P. M. M., del Rio, R. E. **2011**. Analgesic effect of leaf extract from *Ageratina glabrata* in the hot plate test. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 21(5), 928-935.
- ⁴⁰ a) Yamasaki, K., Kohda, H., Kobayashi, T., Kaneda, N., Kasai, R., Tanaka, O., Nishi, K. **1977**. Application of ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy to chemistry of glycosides: Structures of paniculoses-I, -II, -III, -IV and -V, diterpene glucosides of *Stevia paniculata* LAG. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 25(11), 2895-2899. b) Kaneda, N., Kohda, H., Yamasaki, K., Tanaka, O., Nishi, K. **1978**. Paniculose-I-V, Diterpene-glucosides from *Stevia ovata* LAG. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 26(7), 2266-2267.
- ⁴¹ Abdel-Mogib, M., Jakupovic, J., Dawidar, M., Metwally, M.A., Abou-Elzahab, M. **1990**. Sesquiterpene lactones and kaurane glycosides from *Francoeuria crispa*. *Phytochemistry* 29(8), 2581-2584.
- ⁴² (a) Zdero, C., Bohlmann, F. **1989**. Platycarphol and other kaurene derivatives from *Platycarpha carlinoides*. *Phytochemistry* 28(10), 2745-2751. (b) Bohlmann, F., Jakupovic, J., Schuster, A., King, R. M. Robinson, H. **1982**. New melampolides, kaurene

- derivatives and other constituents from *Ichthyothere* species. *Phytochemistry* 21(9), 2317-2327. (c) Nagashima, F., Toyota, M., Asakawa, Y. **1990**, Bitter kaurane-type diterpene glucosides from the liverwort *Jungermannia infusca*. *Phytochemistry* 29(5), 1619-1623.
- ⁴³ Nagashiro, F., Tanaka, H., Asakawa, Y. **1997**. Ent-kaurane-type diterpenoids from the liverwort *Jungermannia rotundata*. *Phytochemistry* 44(4), 653-657.
- ⁴⁴ (a) Abdel-Mogib, M., Jakupovic, J., Dawidar, A. M., Metwally, M. A., Abou-Elzahab, M. **1990**. Sesquiterpene lactones and kaurane glycosides from *Francoeuria crispa*. *Phytochemistry* 29(8), 2581-2584.
- ⁴⁵ a) Puebla, P., Aranguren, N., Rincón, J., Rojas, M., Guerrero, M., San Feliciano, A. J. **2011**. Polar Compounds Isolated from the Leaves of *Calea prunifolia* H.B.K. and their Anti-Adrenergic Related Vasodilator Activity. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 12, 2281-2285.
- ⁴⁶ Joseph-Nathan, P., Gordillo-Román, B. Vibrational Circular Dichroism Absolute Configuration Determination of Natural Products. In *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*; Kinghorn, A. D., Falk, H., Kobayashi, J., Eds.; Springer International Publishing: Switzerland, **2015**; Vol. 100; pp 311-452.
- ⁴⁷ a) Barnes, M.F., MacMillan, J. **1967**. The garryfoline–cuauchichicine rearrangement: a study of the mechanism in the (–)-kaurenols. *Journal of the Chemical Society (C)* 361-366. b) Avent, A.G., Hanson, J. R., De Olvera, Bras. H. **1990**. Hydrolysis of the diterpenoid glycoside, stevioside. *Phytochemistry* 29 (8), 2712-2715. c) Cannon, J. R.; Chow, P.W.; Jefferies, P.R.; Meehan, G.V. **1996**.
- ⁴⁸ Takamoto, T., Hanessian, S. **1974**. Aminoglycoside antibiotics: Chemical transformation of paromomycin into a bioactive pseudotrisaccharide. *Tetrahedron Letters* 15(46), 4009-4012.
- ⁴⁹ Cannon, J. R., Chow, P. W., Jefferies, P. R., Meehan, G. V. **1966**. Isolation of (–)-Kaur-16-en-19-oic acid and 15β-Hydroxy-(–)-kaur-16-en-19-oic acid from *Phebalium rude* Bartl. *Australian Journal of Chemistry* 19, 861-867.

- ⁵⁰ a) Torrenegra, R., Robles, J., Pedrozo, J., Pescador, B. **1999**. (-)-b-D-18-glucopiranosyl-9-15-dihydroxy kaurenoate, a new diterpene glycoside from *Ageratina vacciniaefolia*. *Molecules* 4, M92. b) Huertas, A., Vega, D., Rodriguez, J. A., Rojas, C., Ruben, T., Rodriguez, O. **2007**. Glucosilate kaurenoic acid sesquihydrate. *Acta Crystallographica, section E: structure reports online* 63 (12) o4880, o4880/1-o4880/12. Torrenegra, R., Robles, J., Pedrozo, J., Pescador, Beatriz. **1999**. A new diglicoside of diterpene from *Ageratina vacciniaefolia*. *Molecules* 4, M94. Albureque, M. R. J. R., Pires, A. M. L. Pessoa, O. D. L., Silverira, E.R. **2006**. Terpenoids, flavonoids and others constituents of *Eupatorium betonicaeforme*. *Journal of the Brazilian chemical Society* 17(1), 68-72.
- ⁵¹ a) Prakash, I., Markosyan, A., Bunders, C. **2014**, Development of Next Generation Stevia Sweetener: Rebaudioside M. *Foods* 3, 162-175. (b) Madan, S., Ahmad, S., Singh, G. N., Kohli, K., Kumar, Y., Singh, R, Garg, M. **2010**. *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni-A review. *Indian Journal of Natural Products and Resources* 1, 267-286. c) Brahmachari, G., Mandal, L. C., Roy, R., Mondal, S., B, A. K. **2011**. Stevioside and related compounds- Molecules of pharmaceutical promise: A critical overview. *Archiv der Pharmazie* 1, 5-19.
- ⁵² (a) Cai, X. F., Shen, G., Dat, N. T., Kang, O. H., Lee, Y. M., Lee, J. J., Kim, Y. H. **2003**. Inhibitory effect of kaurane type diterpenoids from *Acanthopanax koreanum* on TNF- α secretion from trypsin-stimulated HMC-1 Cells. *Archives of pharmacal research* 26 (9), 731-734. (b) Pariwat, P., Homvisasevongsa, S., Muanprasat, C., Chatsudthipong, V. **2008**. A natural plant-derived dihydroisosteviol prevents cholera toxin-induced intestinal fluid secretion. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 324, 798-805. (c) Gregersen, S., Jeppesen, P. B., Holst, J. J., Hermansen, K. 2004. Antihyperglycemic effects of stevioside in type 2 diabetic subjects. *Metabolism* 53, 73-76.
- ⁵³ Wang, A. X., Zhang, Q., & Jia, Z. J. **2004**. Phenylpropanosids, lignans and other constituents from *Cremanthodium ellisii*. *Pharmazie* 59(11), 889-892.
- ⁵⁴ Bøe, J. E., Winsnes, R., Nordal, A., & Bernatek, E. **1969**. New constituents of *Euphorbia resinifera* Ber. *Acta Chemica Scandinavica* 23, 3609.
- ⁵⁵ El-Naggar, L., Beal, J. L., Parks, L. M., Salman, K. N., & Patil, P. **1978**. A note on the isolation and identification of two pharmaceutically active constituents of *Euphorbia pilulifera*. *Lloydia* 41,73-75.

- ⁵⁶ Williamson, E. M., Okpako, D. T., Evans, F. J. Pharmacological methods in phytotherapy research selection, preparation and pharmacological evaluation of plant material. John Wiley & Sons, Chichester, 1996; vol. 1, p. 28.
- ⁵⁷ Szkudelski, T. **2001**. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiological Research* 50, 536-546.
- ⁵⁸ Szkudelski, T. **2012**. Streptozotocin-nicotinamide-induced diabetes in the rat. Characteristics of the experimental model. *Experimental Biology and Medicine* 237, 481-490.
- ⁵⁹ a) Andrade-Cetto, A., Cárdenas, V.R. **2010**. Gluconeogenesis inhibition and phytochemical composition of two *Cecropia* species. *Journal of Ethnopharmacology* 130 (1), 93-97. b) Andrade-Cetto, A., Wiedenfeld, H. **2001**. Hypoglycemic effect of *Cecropia obtusifolia* on streptozotocin diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 78 (2-3), 145-149.
- ⁶⁰ a) Xia, T., Wang, Q. 2007. D-chiro-inositol found in *Momordica charantia* fruit extract plays a role in reducing blood glucose in streptozotocin-diabetic rats. *Journal of Food Chemistry* 31, 551-562. b) Xia, T., Wang, Q. 2006. D-Chiro-inositol found in *Cucurbita ficifolia* (Cucurbitaceae) fruit extracts plays the hypoglycemic role in streptozotocin-diabetic rats. *Journal of pharmacy and pharmacology* 58, 1527-1532.
- ⁶¹ Wang, A. X., Zhang, Q., & Jia, Z. J. **2004**. Phenylpropanosids, lignans and other constituents from *Cremanthodium ellisii*. *Pharmazie* 59 (11), 889-892.
- ⁶² Bohlmann, F., Grenz, M., Jakupovic, R., King, R., Robinson, H. **1984**. New labdane derivatives and other constituents from *Fleismania viscidipides*. *Revista latinoamericana de Química* 15(1), 1-3.
- ⁶³ Still, W. C., Kahn, M., Mitra, A. 1978. Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. *Journal of Organic Chemistry* 43(14), 2923-2925.
- ⁶⁴ Calzada F. Arista R., Pérez H. **2010**. Effect of plants used in Mexico to treat gastrointestinal disorders on charcoal-gum acacia-induced hyperistalsis in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 128, 49-51.

- ⁶⁵ Masiello, P., Broca, C., Gross, R., Roye, M., Manteghetti, D., Hillaire-Buys, D., Novelli, M Ribes, G. **1998**. Experimental NIDDM: development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide. *Diabetes* 47 (2), 224-229.
- ⁶⁶ Gaussian 09, Revision **D.01**, Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, J. A., Jr.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, J. M.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas, Ö.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J. Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.
- ⁶⁷ Debie, E., Gussem, E. D., Dukor, R. K., Herrebout, W., Nafie, L. A., Bultinck, P. **2011**. A confidence level algorithm for the determination of absolute configuration using vibrational circular dichroism or raman optical activity. *ChemPhysChem* 12(8), 542–1549.
- ⁶⁸ Hutchison, M., Gaskin, P., MacMillan, J., Phinney, B. O. **1988**. Gibberellins in seeds of *Helianthus annuus*. *Phytochemistry* 27(8), 2695-2701.
- ⁶⁹ Quijano, L., Calderón, J. D., Gómez-Garibay, F., Angulo-M., M., Rios, T. **1987**. Sesquiterpene lactones from *Montanoa gigas* and the crystal structure of gigantanolide a. *Phytochemistry* 26(9), 2589-2592.
- ⁷⁰ Cannon, J. R., Chow, P. W., Jefferies, P. R., Meehan, G. V. **1966**. Isolation of (–)-Kaur-16-en-19-oic acid and 15β-Hydroxy(–)-kaur-16-en-19-oic acid from *Phebalium rude* Bartl. *Australian Journal of Chemistry* 19, 861-867.

⁷¹ Pereda-Miranda, R., Mata, R., Anaya, A. L., Wickramaratne, D. B. M., Pezzuto, J. M., Kinghorn, A. D. **1993**. Tricolorin A, Major Phytogrowth Inhibitor from *Ipomoea tricolor*. *Journal of Natural products* 56 (4), 571-582.

8. ANEXOS

Figura 1. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) del compuesto 5	83
Figura 2. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) del compuesto 5	84
Figura 3. Espectro de RMN DEPT (CDCl_3 , 100 MHz) del compuesto 5	85
Figura 4. Espectro de RMN COSY (CDCl_3 , 400 MHz) del compuesto 5	86
Figura 5. Espectro de RMN HSQC (CDCl_3 , 400 MHz) del compuesto 5	87
Figura 6. Espectro de RMN HMBC (CDCl_3 , 400 MHz) del compuesto 5	88
Figura 7. Espectro de masas (DART) del compuesto 5	89
Figura 8. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) del compuesto 9	90
Figura 9. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) del compuesto 9	91
Figura 10. Espectro de RMN DEPT (CDCl_3 , 100 MHz) del compuesto 9	92
Figura 11. Espectro de RMN COSY (CDCl_3 , 400 MHz) del compuesto 9	93
Figura 12. Espectro de RMN HSQC (CDCl_3 , 400 MHz) del compuesto 9	94
Figura 13. Espectro de RMN HMBC (CDCl_3 , 400 MHz) del compuesto 9	95
Figura 14. Espectro de masas (ESI) del compuesto 9	96
Figura 15. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) del compuesto 10	97
Figura 16. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) del compuesto 10	98
Figura 17. Espectro de masas (FAB^+) del compuesto 10	99
Figura 18. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) del compuesto 11	100
Figura 19. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) del compuesto 11	101
Figura 20. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) del compuesto 12	102
Figura 21. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) del compuesto 12	103
Figura 22. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) del compuesto 13	104
Figura 23. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) del compuesto 13	105

Figura 24. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) del compuesto 14	106
Figura 25. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) del compuesto 14	107
Figura 26. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) del compuesto 15	108
Figura 27. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) del compuesto 15	109
Figura 28. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) del compuesto 17	110
Figura 29. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) del compuesto 17	111
Figura 30. Espectro de RMN DEPT (CDCl_3 , 100 MHz) del compuesto 17	112
Figura 31. Espectro de RMN COSY (piridina- d_5 , 400 MHz) del compuesto 17	113
Figura 32. Espectro de RMN HSQC (piridina- d_5 , 400 MHz) del compuesto 17	114
Figura 33. Espectro de RMN HMBC (piridina- d_5 , 400 MHz) del compuesto 17	115
Figura 34. Espectro de masas (ESI) del compuesto 17	116
Figura 35. Espectro de RMN ^1H (piridina- d_5 , 400 MHz) del compuesto 18	117
Figura 36. Espectro de RMN ^{13}C (piridina- d_5 , 100 MHz) del compuesto 18	118
Figura 37. Espectro de RMN ^1H (piridina- d_5 , 400 MHz) del compuesto 19	119
Figura 38. Espectro de RMN ^{13}C (piridina- d_5 , 100 MHz) del compuesto 19	120
Figura 39. Espectro de RMN ^1H (piridina- d_5 , 400 MHz) del compuesto 25	121
Figura 40. Espectro de RMN ^{13}C (piridina- d_5 , 100 MHz) del compuesto 25	122
Figura 41. Espectro DEPT (piridina- d_5 , 100 MHz) del compuesto 25	123
Figura 42. Espectro COSY (piridina- d_5 , 500 MHz) del compuesto 25	124
Figura 43. Espectro de RMN HSQC (piridina- d_5 , 500 MHz) del compuesto 25	125
Figura 44. Espectro de RMN HMBC (piridina- d_5 , 500 MHz) del compuesto 25	126
Figura 45. Espectro de masas (ESI) del compuesto 25	127
Figura 46. Espectro de RMN ^1H (piridina- d_5 , 500 MHz) del compuesto 26	128
Figura 47. Espectro de RMN ^{13}C (piridina- d_5 , 125 MHz) del compuesto 26	129

Figura 48. Espectro de RMN ^1H (piridina- d_5 , 500 MHz) de la mezcla de los compuestos 26 y 27	130
Figura 49. Espectro de RMN ^{13}C (piridina- d_5 , 125 MHz) de la mezcla de los compuestos 26 y 27	131
Tabla 1. Datos cristalográficos y de refinamiento para el compuesto 9	132
Tabla 2. Datos cristalográficos y de refinamiento para el compuesto 28	133
Tabla 3. Datos cristalográficos y de refinamiento para el compuesto 33	134

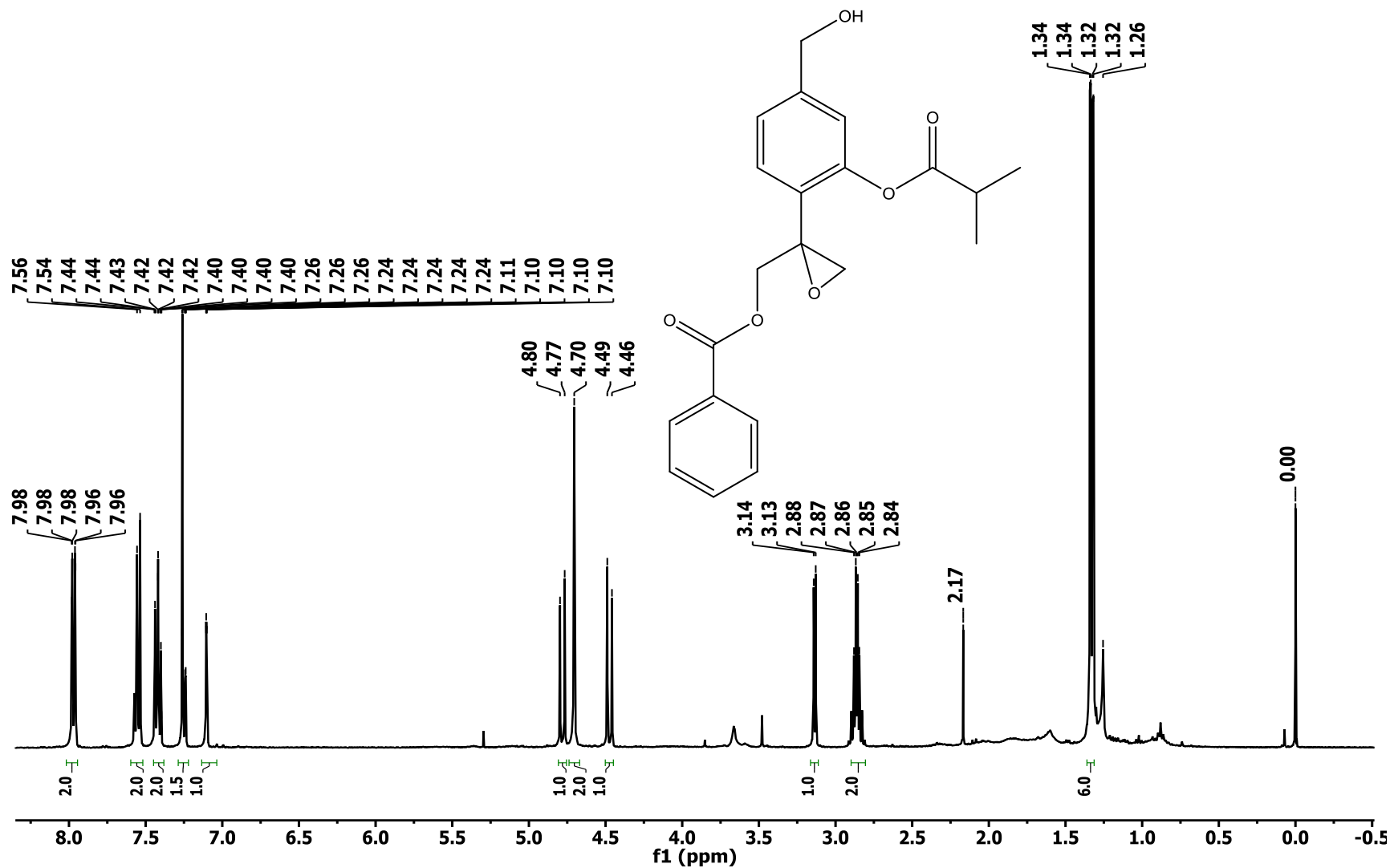


Figura 1. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) del compuesto 5.

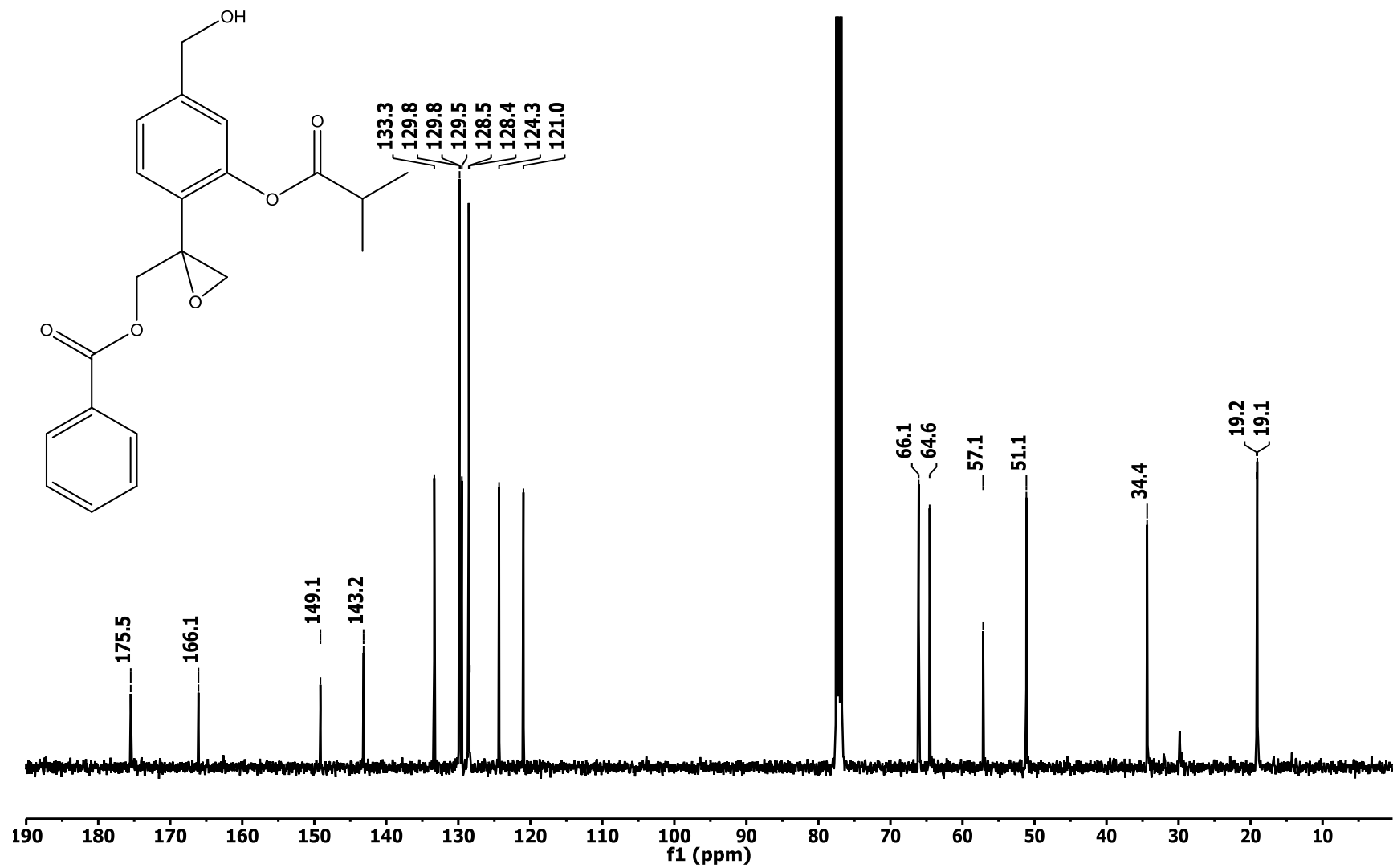


Figura 2. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) del compuesto 5.

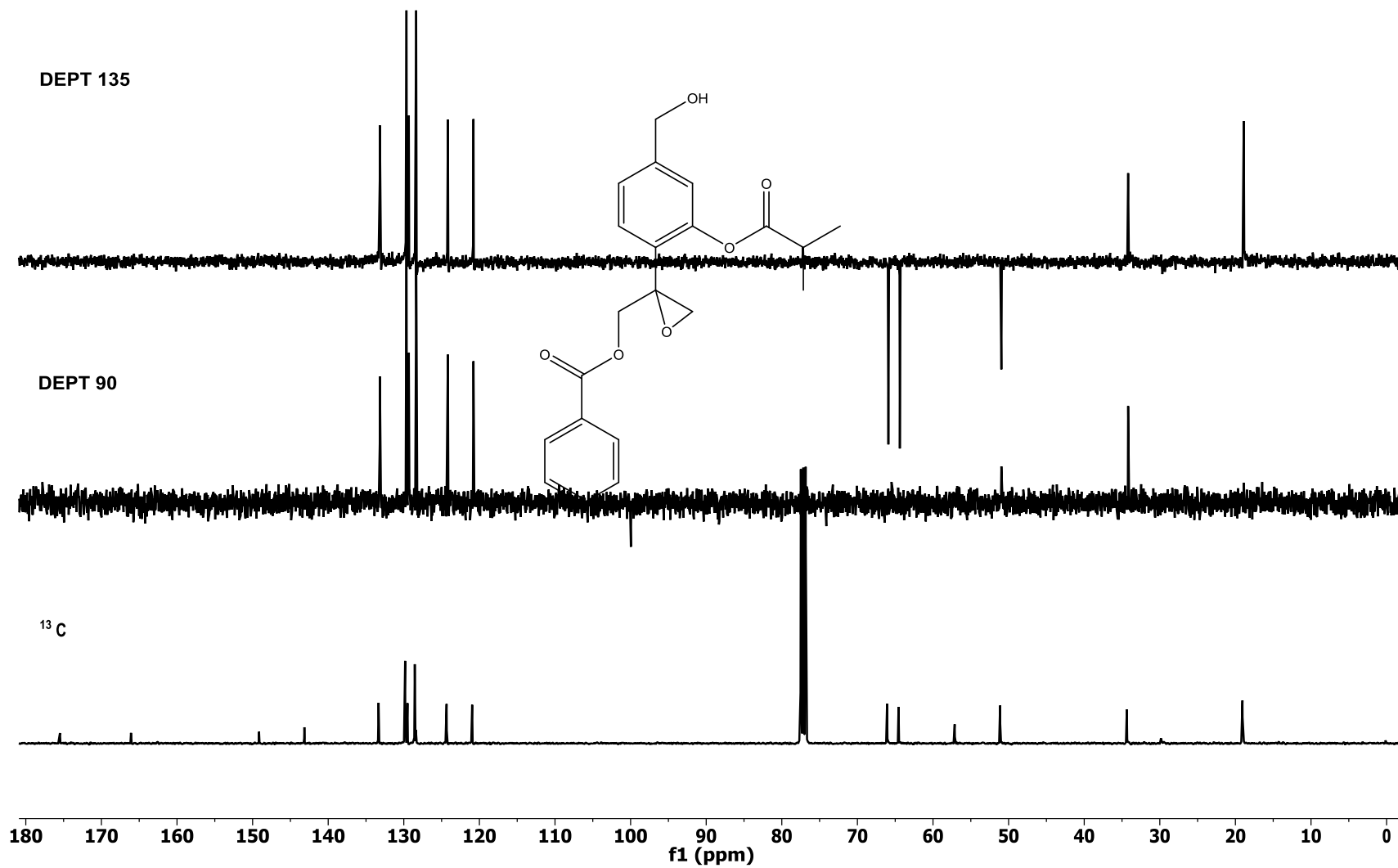


Figura 3. Espectro de RMN DEPT (CDCl₃, 100 MHz) del compuesto 5.

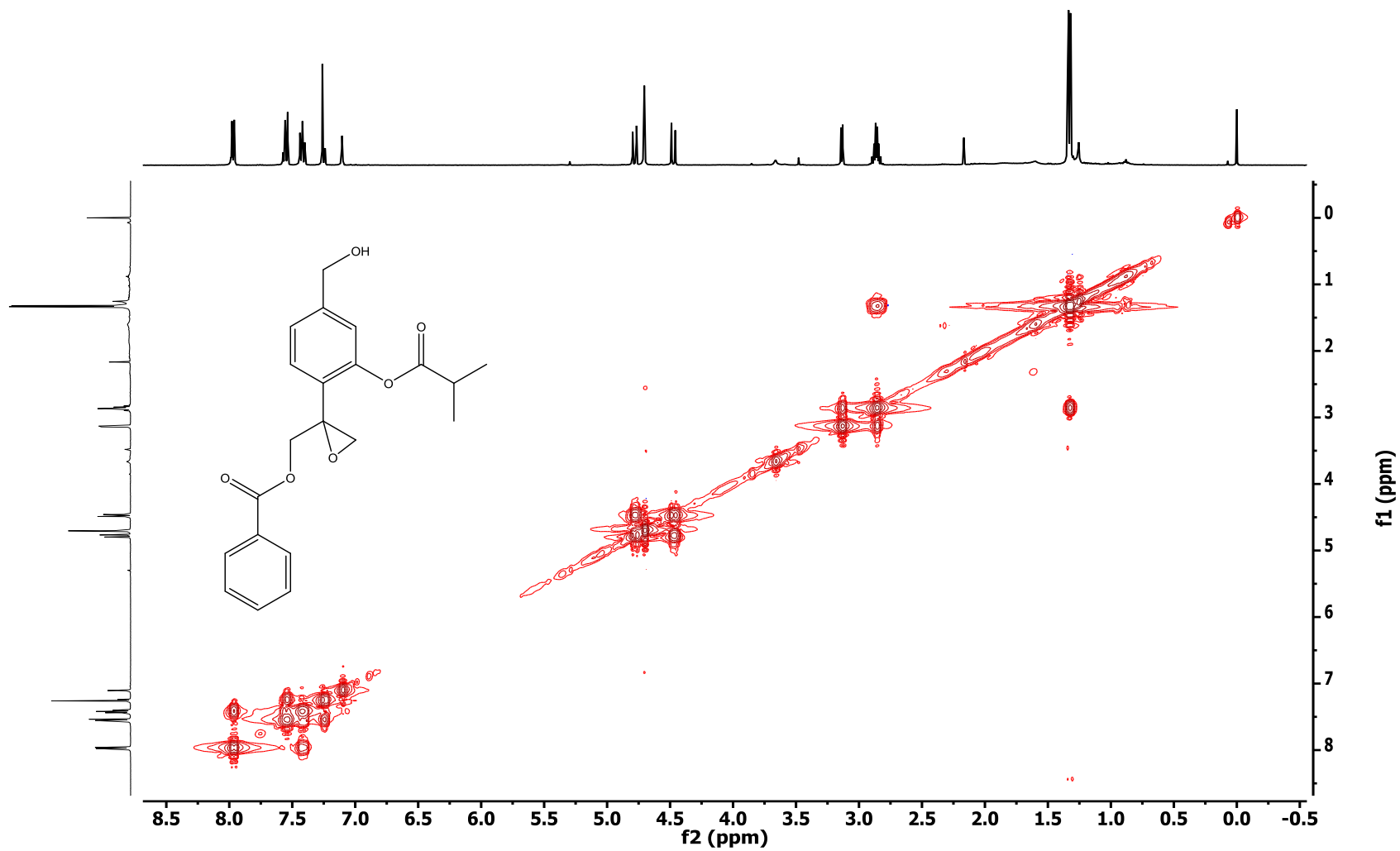


Figura 4. Espectro de RMN COSY (CDCl_3 , 400 MHz) del compuesto 5.

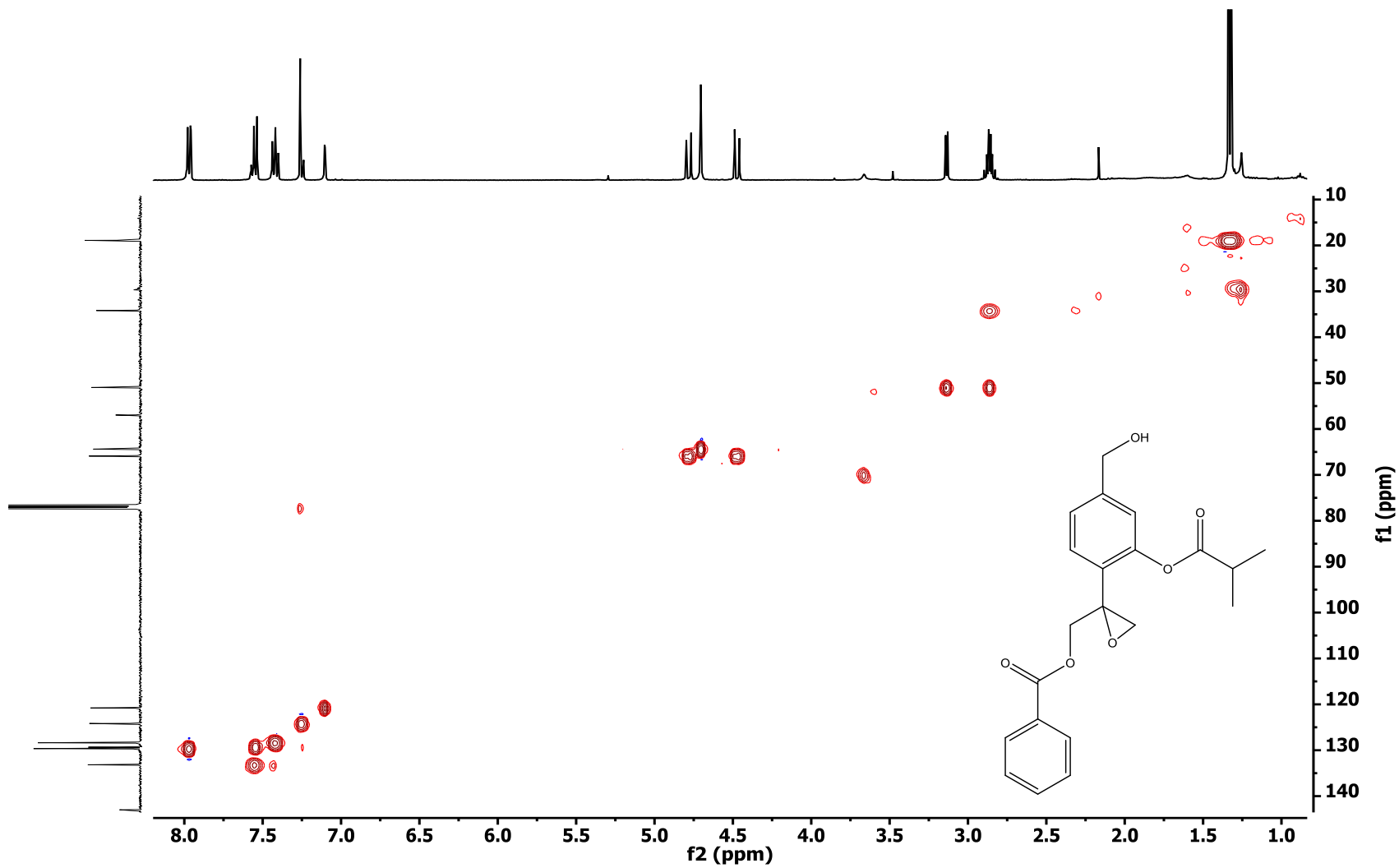


Figura 5. Espectro de RMN HSQC (CDCl_3 , 400 MHz) del compuesto 5.

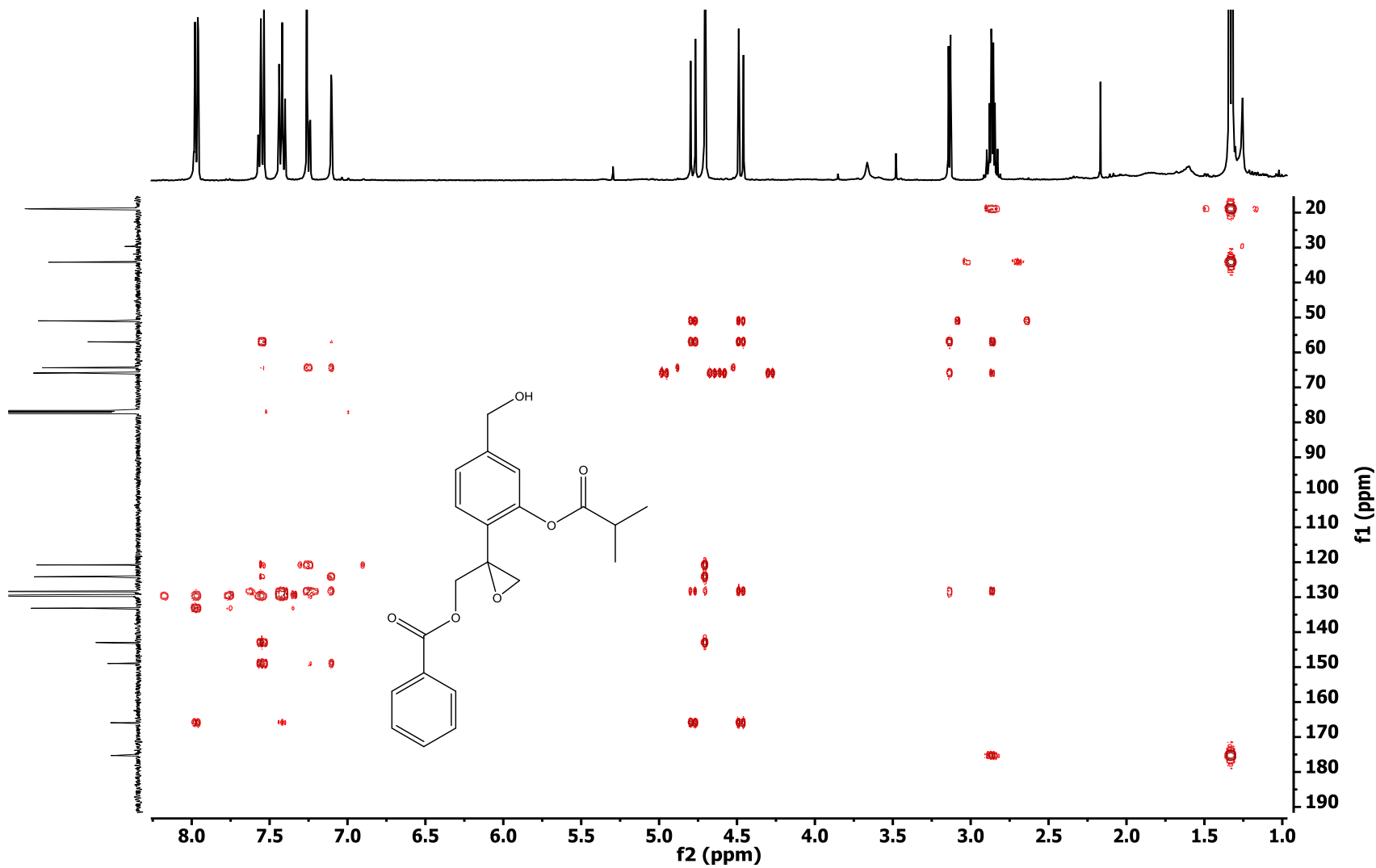


Figura 6. Espectro de RMN HMBC (CDCl₃, 400 MHz) del compuesto 5.

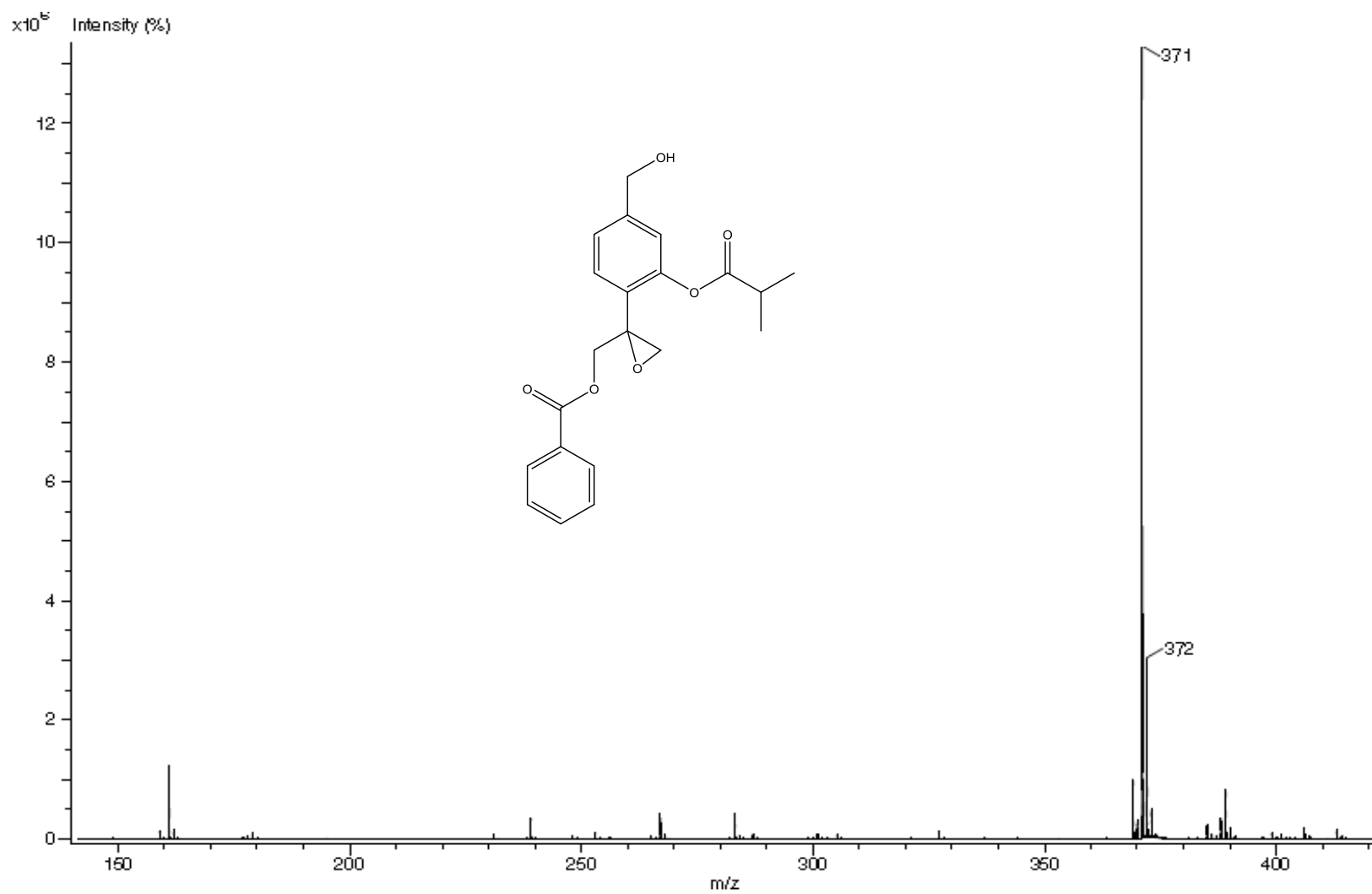


Figura 7. Espectro de masas (DART) del compuesto 5.

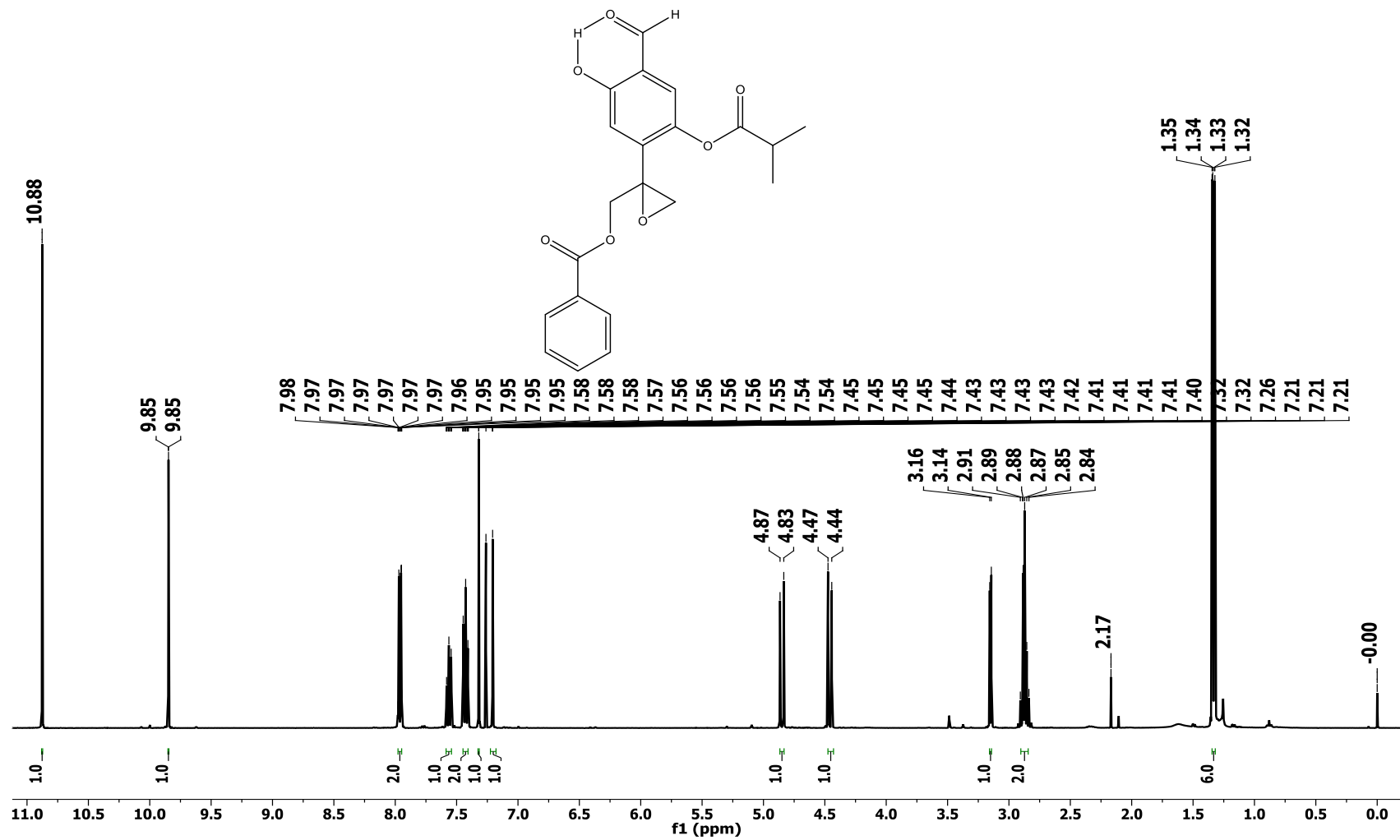


Figura 8. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) del compuesto 9.

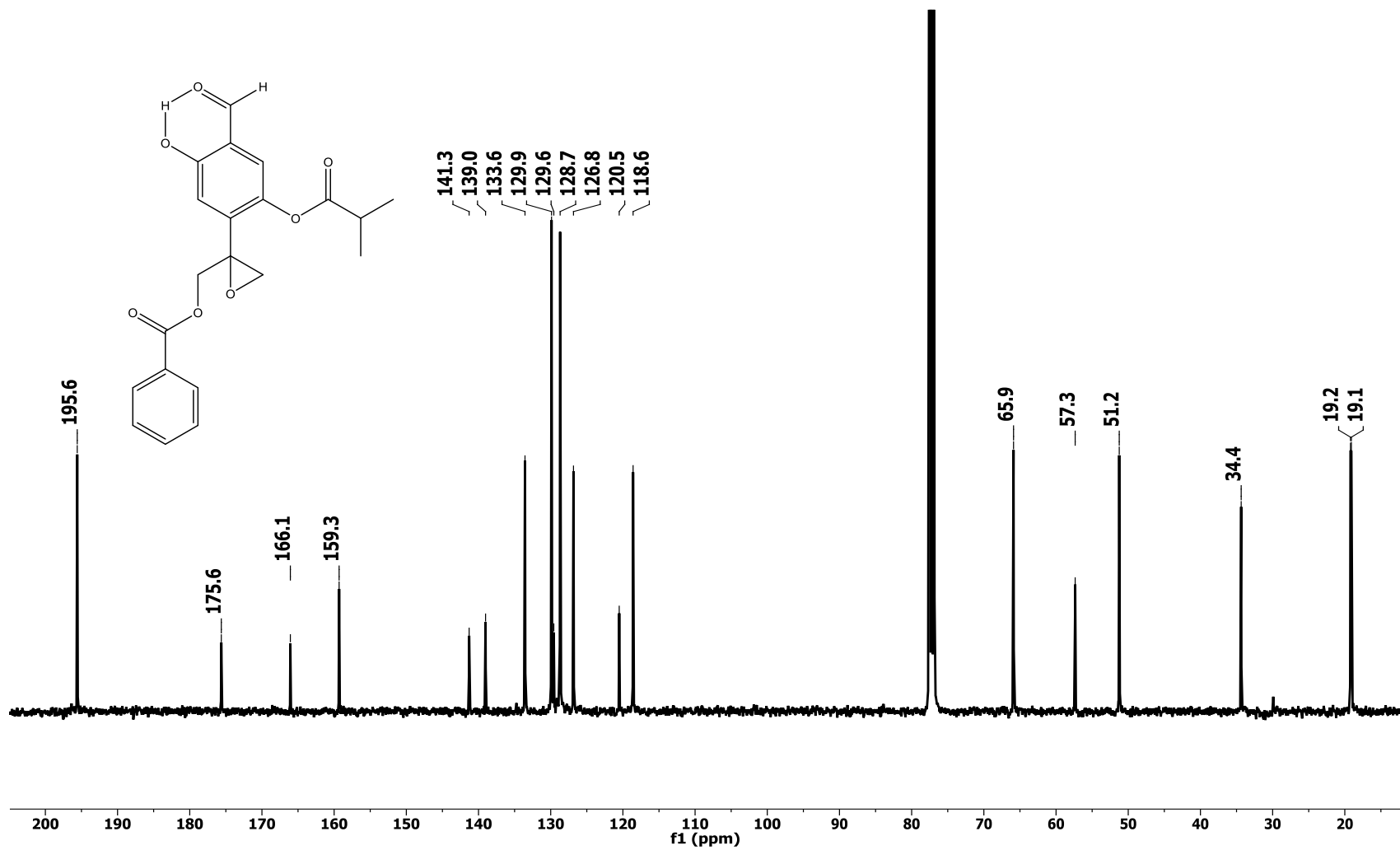


Figura 9. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) del compuesto 9.

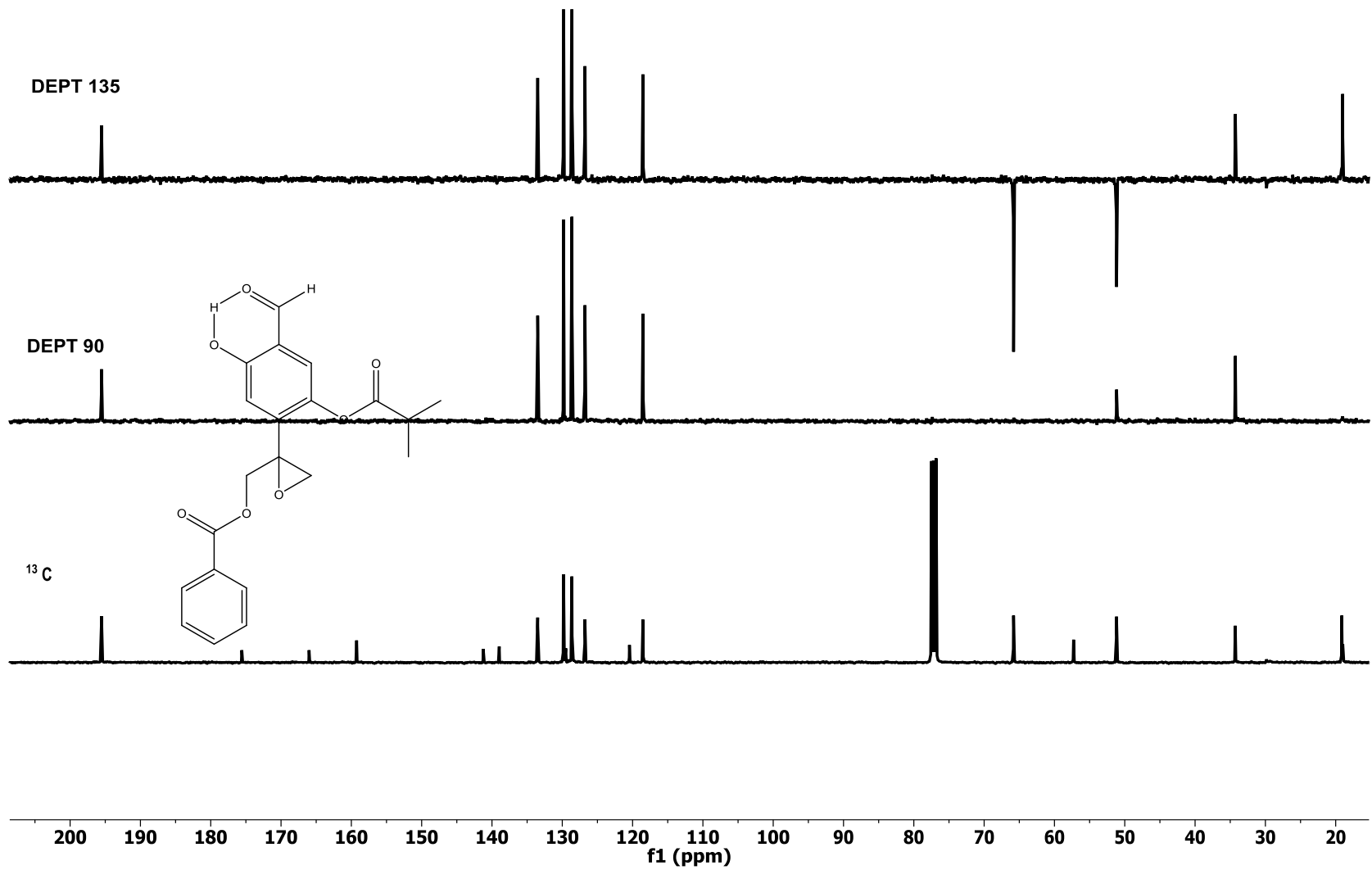


Figura 10. Espectro de RMN DEPT (CDCl_3 , 100 MHz) del compuesto **9**.

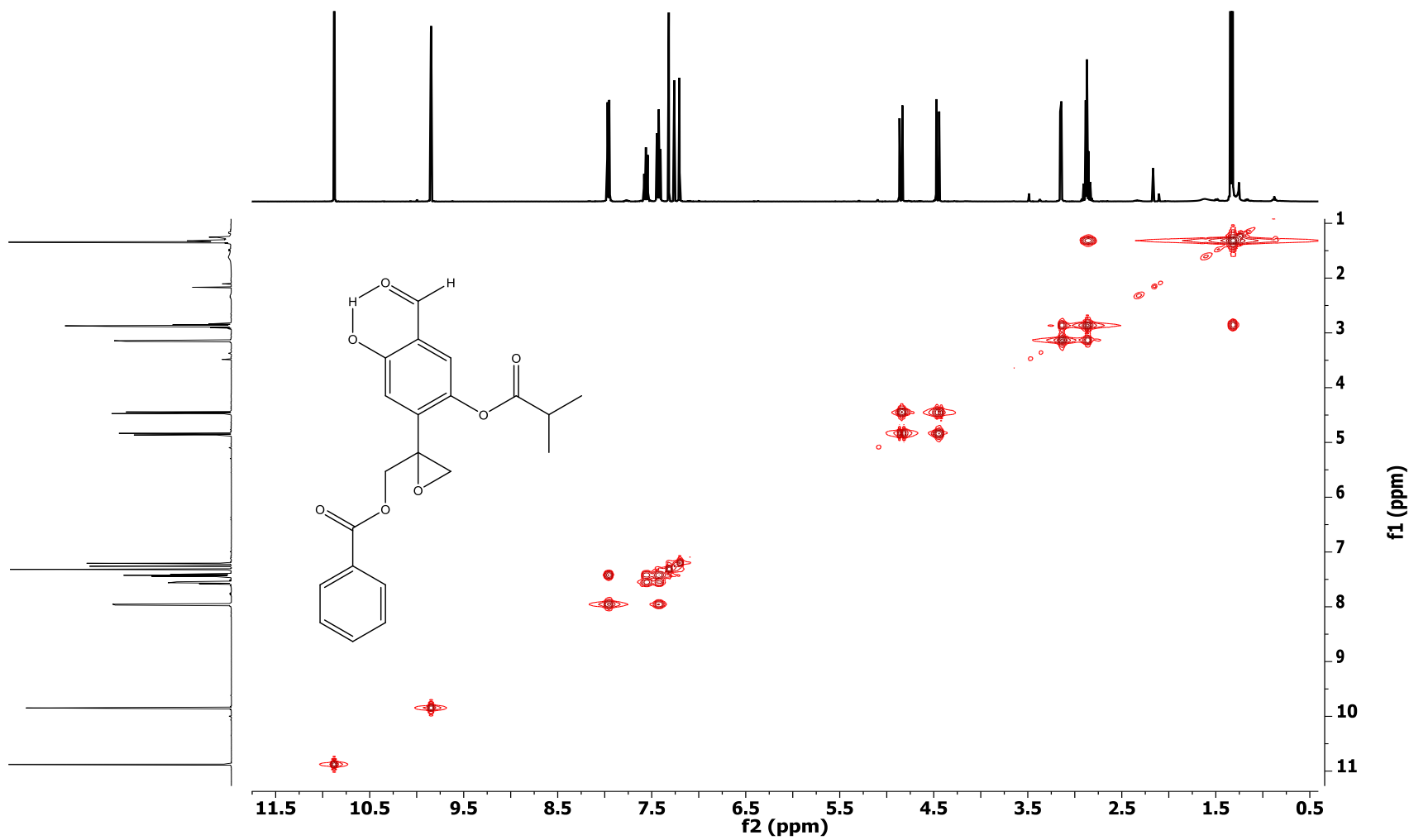


Figura 11. Espectro de RMN COSY (CDCl_3 , 400 MHz) del compuesto **9**.

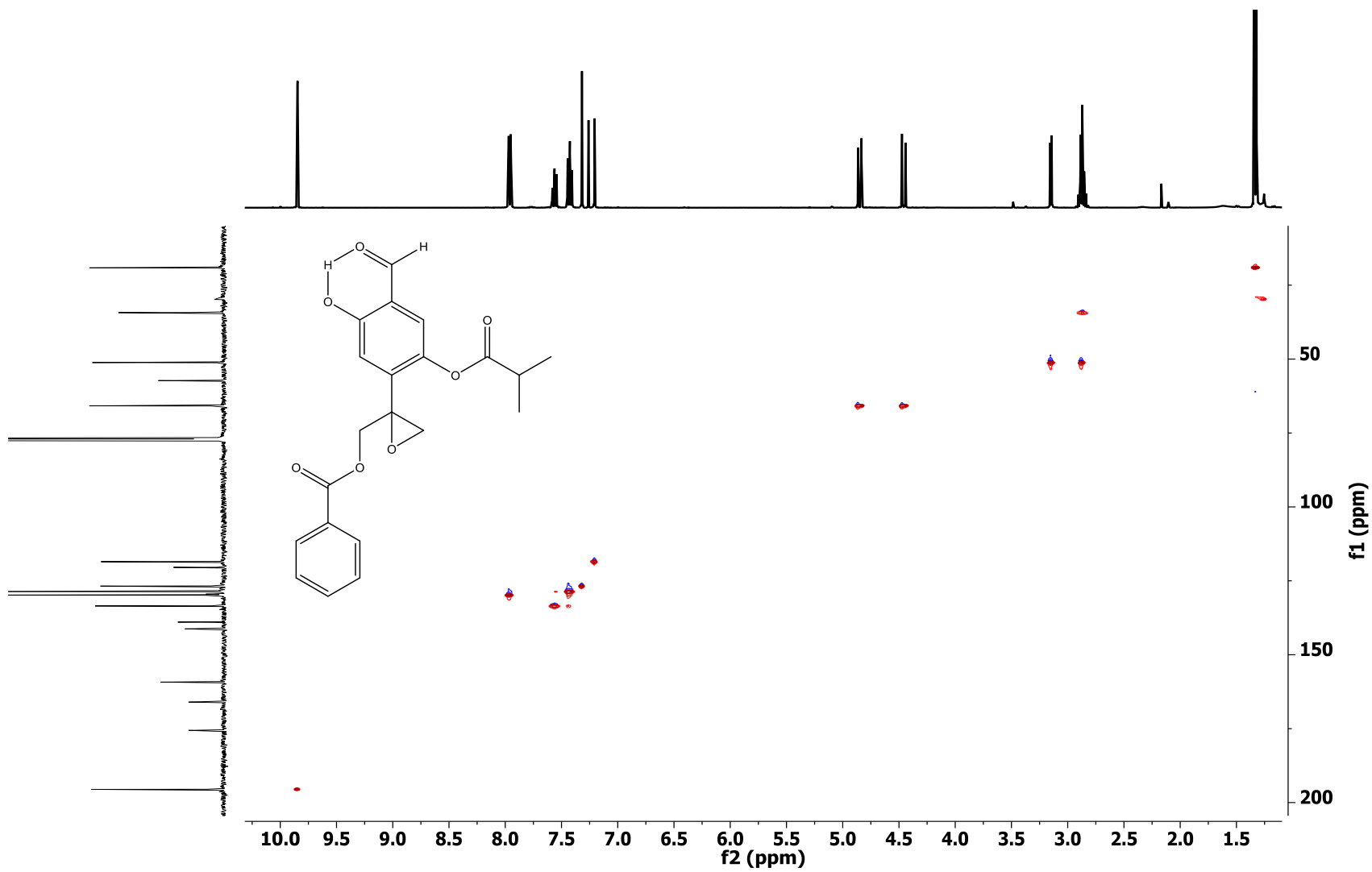


Figura 12. Espectro de RMN HSQC (CDCl₃, 400 MHz) del compuesto 9.

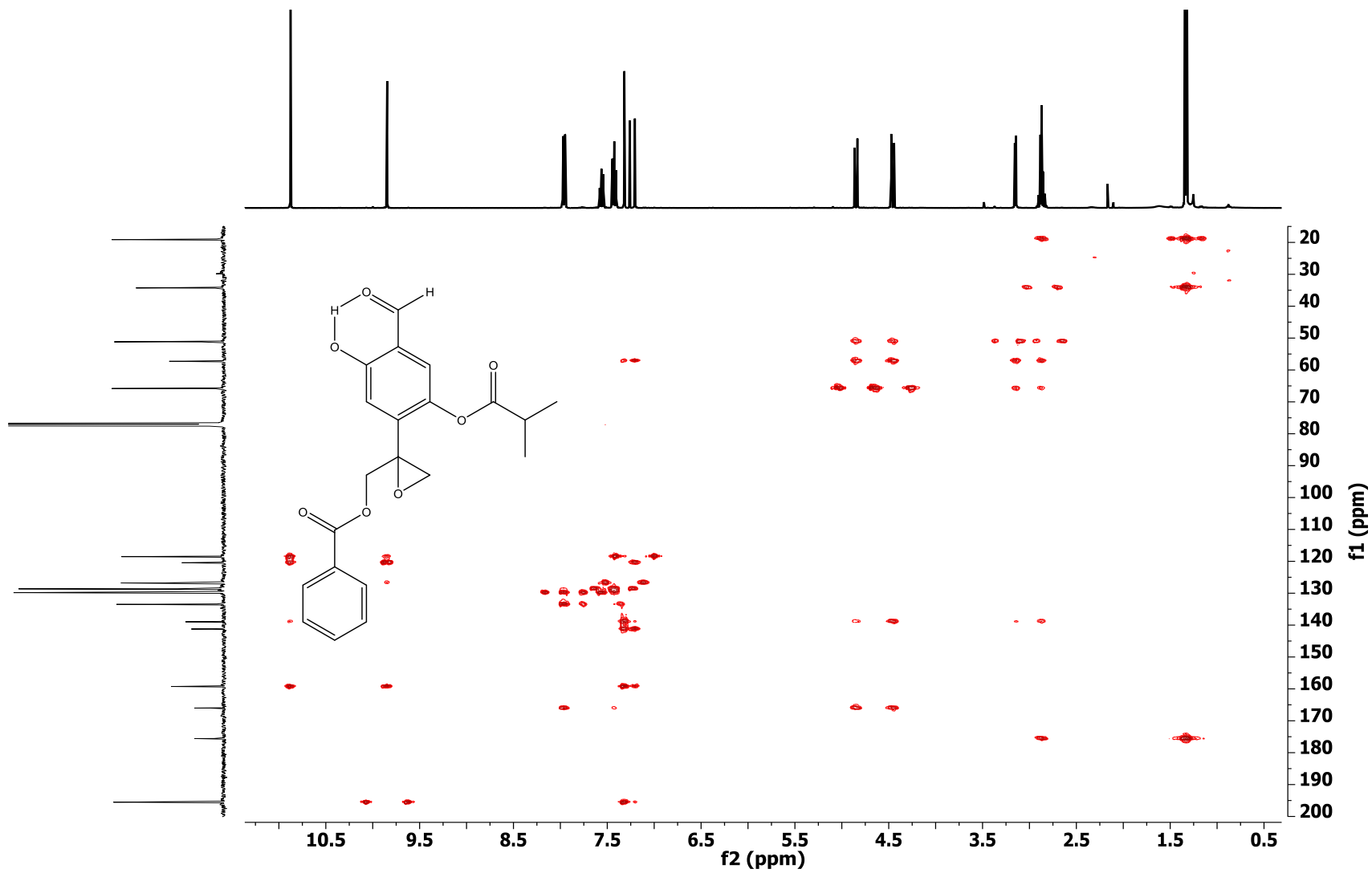


Figura 13. Espectro de RMN HMBC (CDCl₃, 400 MHz) del compuesto 9.

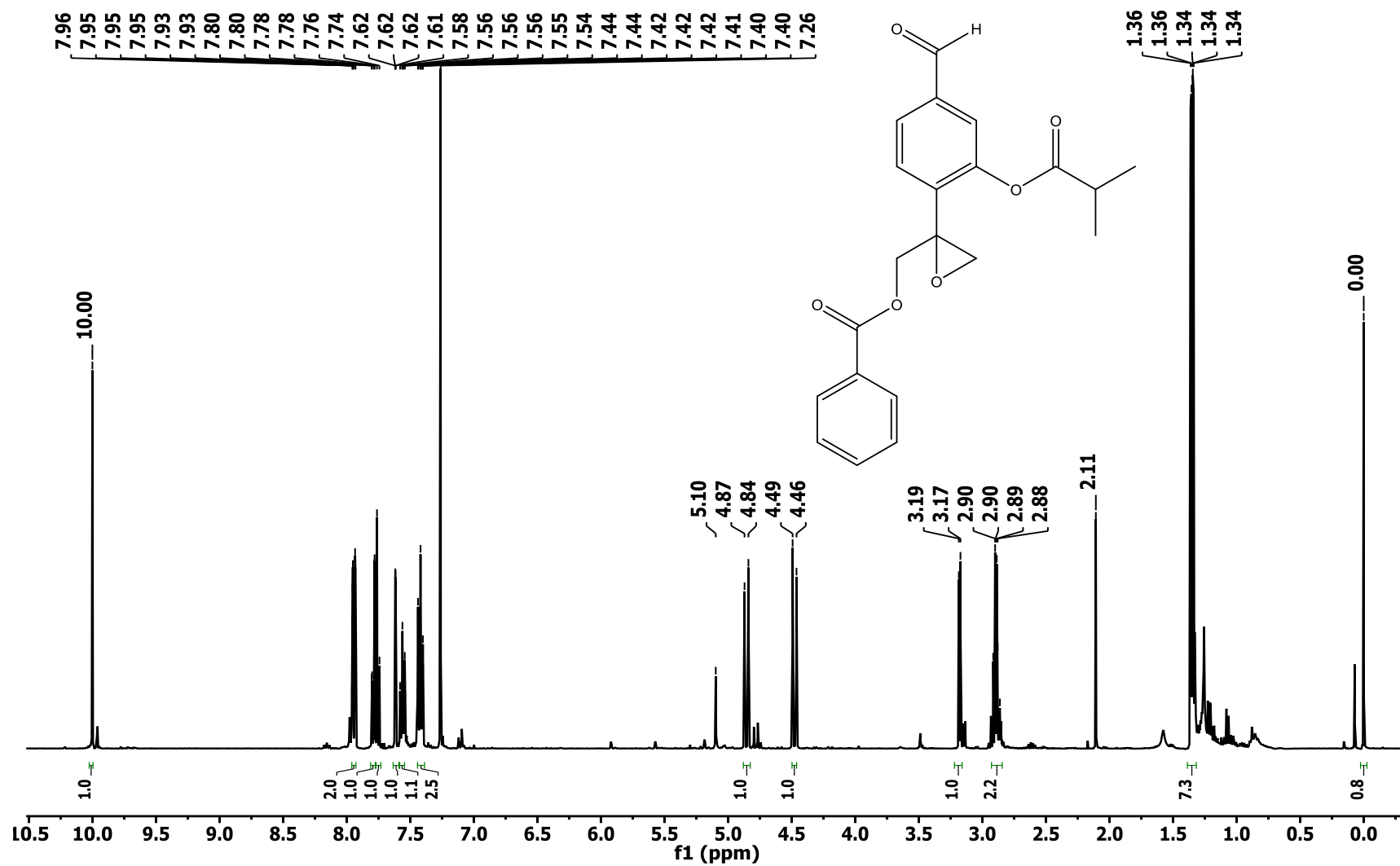


Figura 15. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) del compuesto 10.

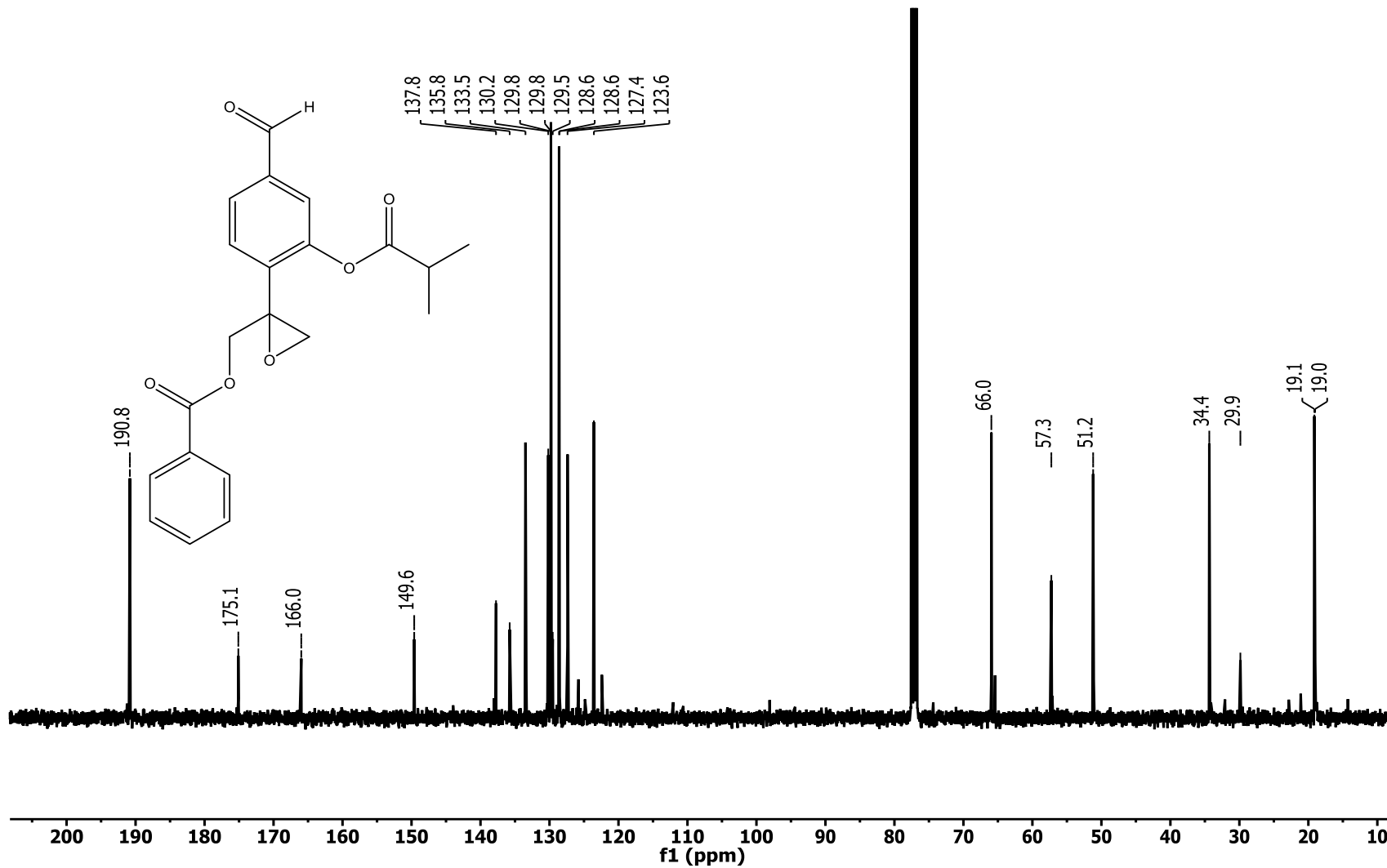


Figura 16. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) del compuesto 10.

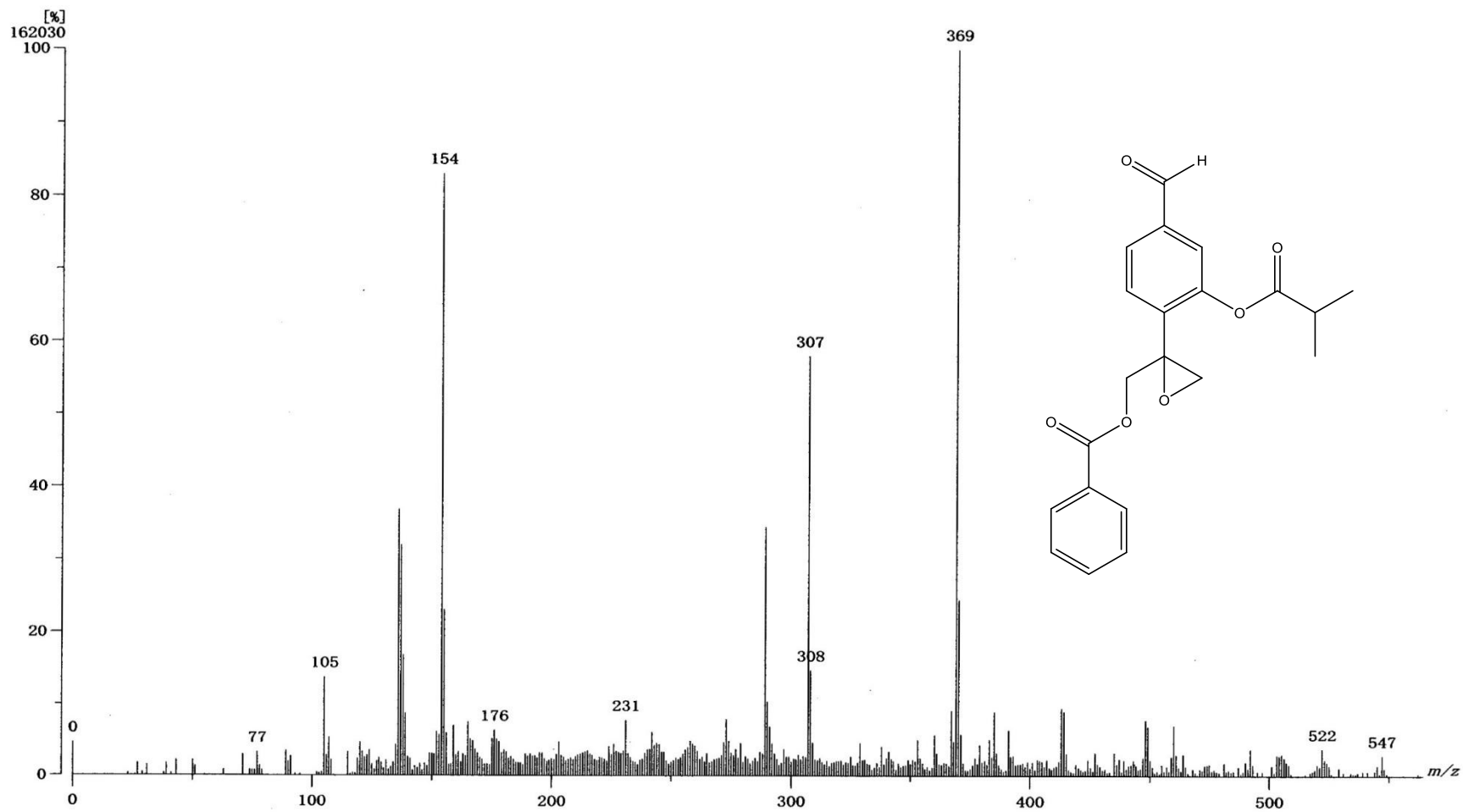


Figura 17. Espectro de masas (FAB⁺) del compuesto 10.

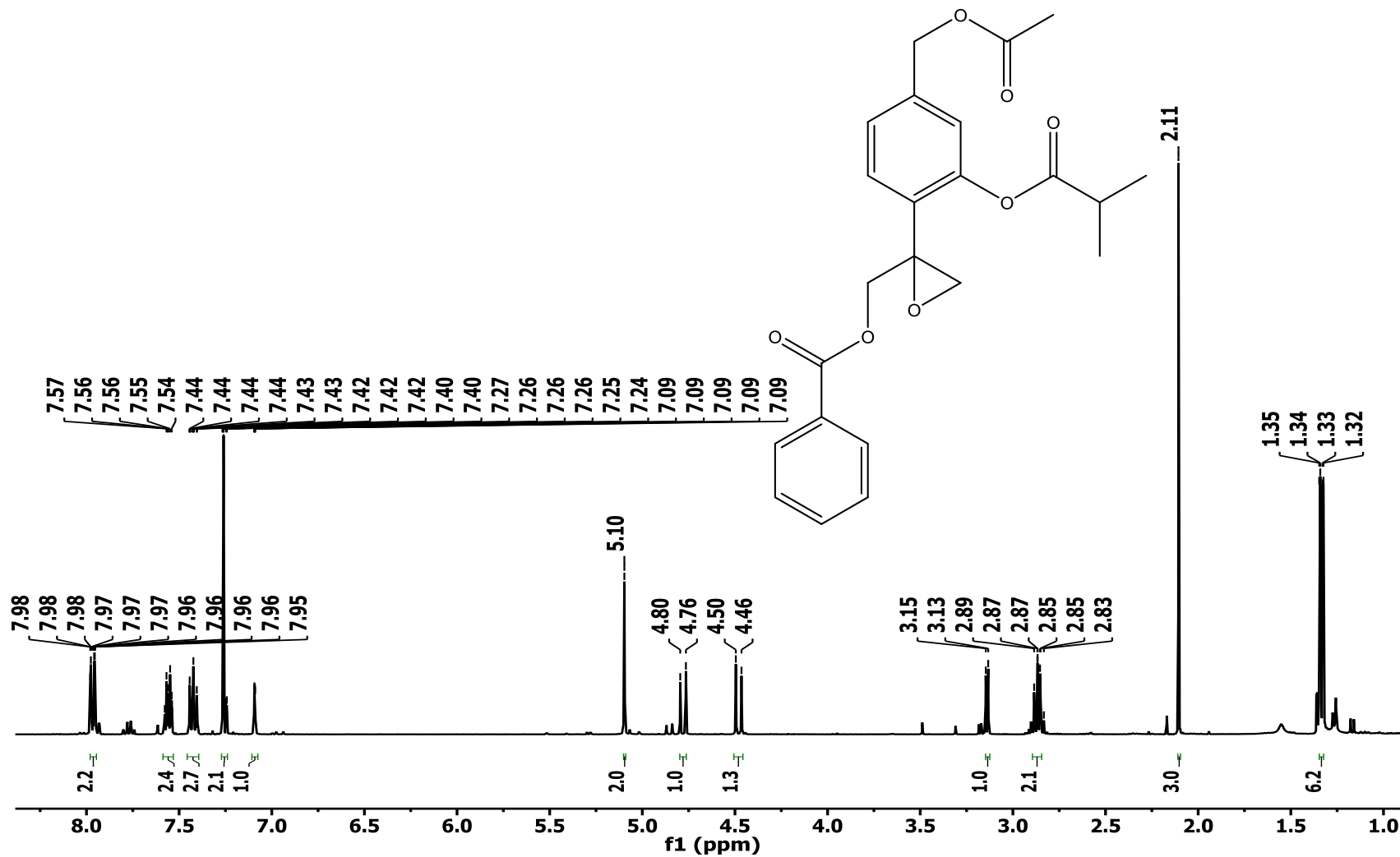


Figura 18. Espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) del compuesto 11.

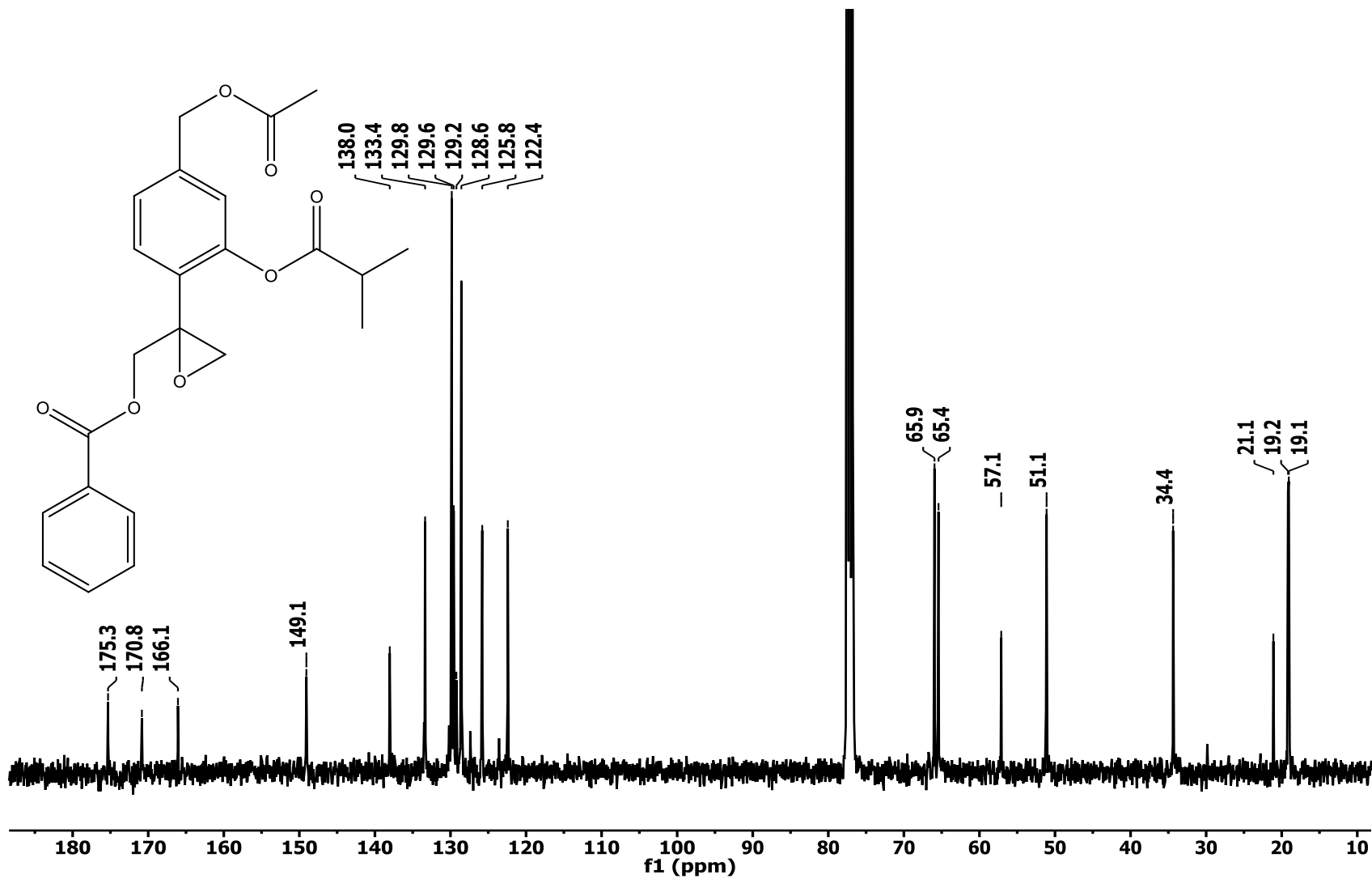


Figura 19. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) del compuesto 11.

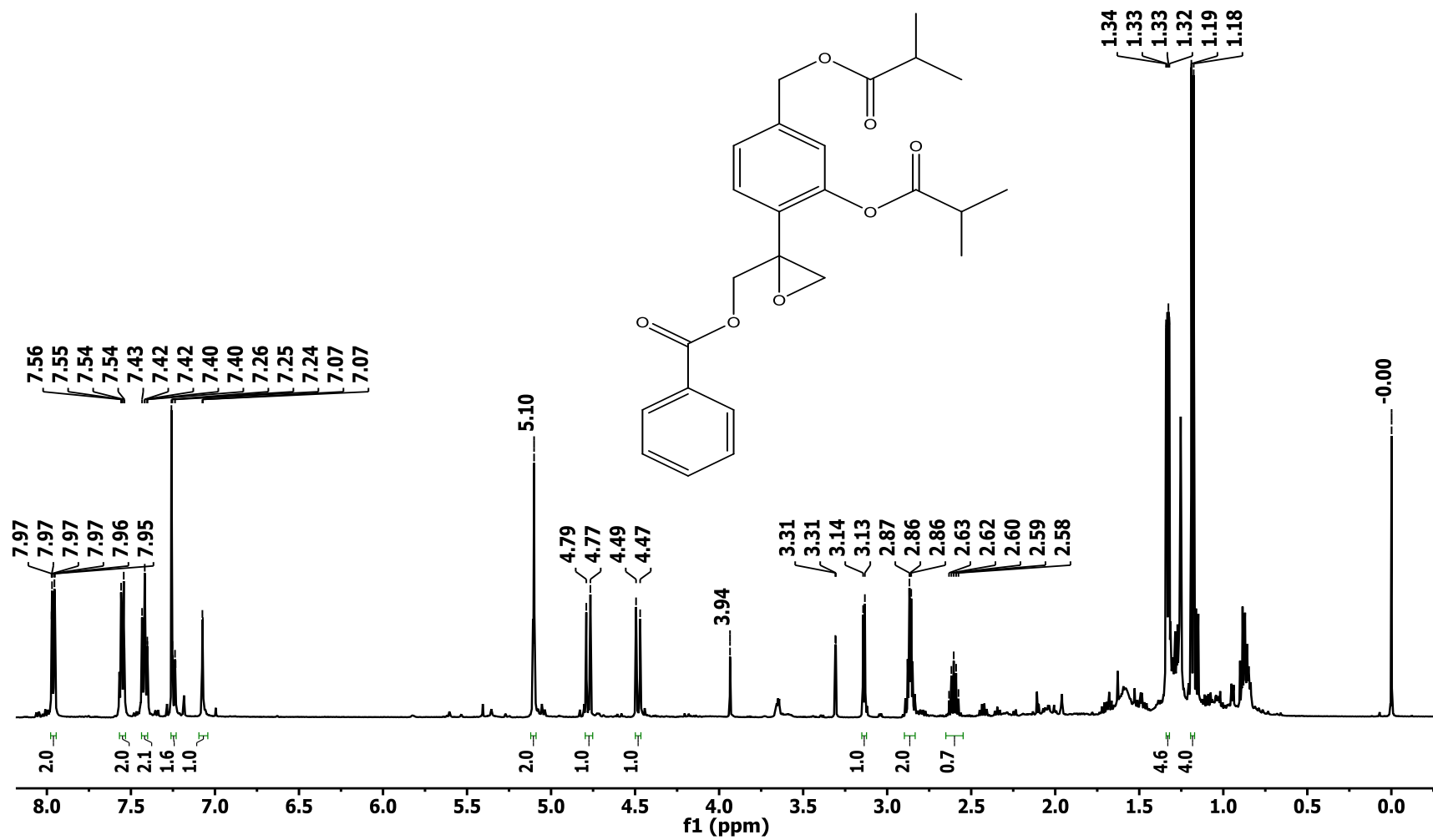


Figura 20. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) del compuesto 12.

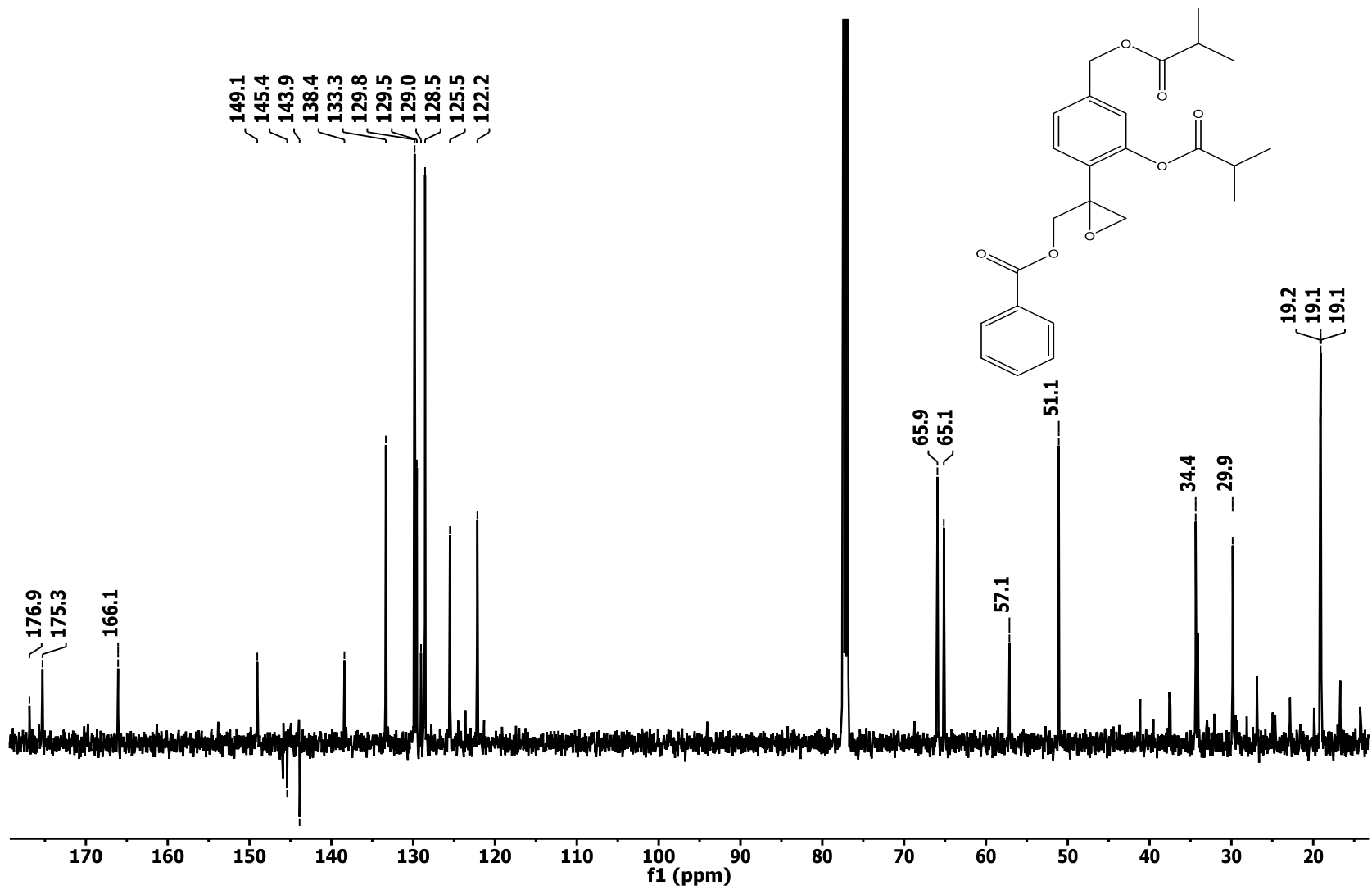


Figura 21. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) del compuesto 12.

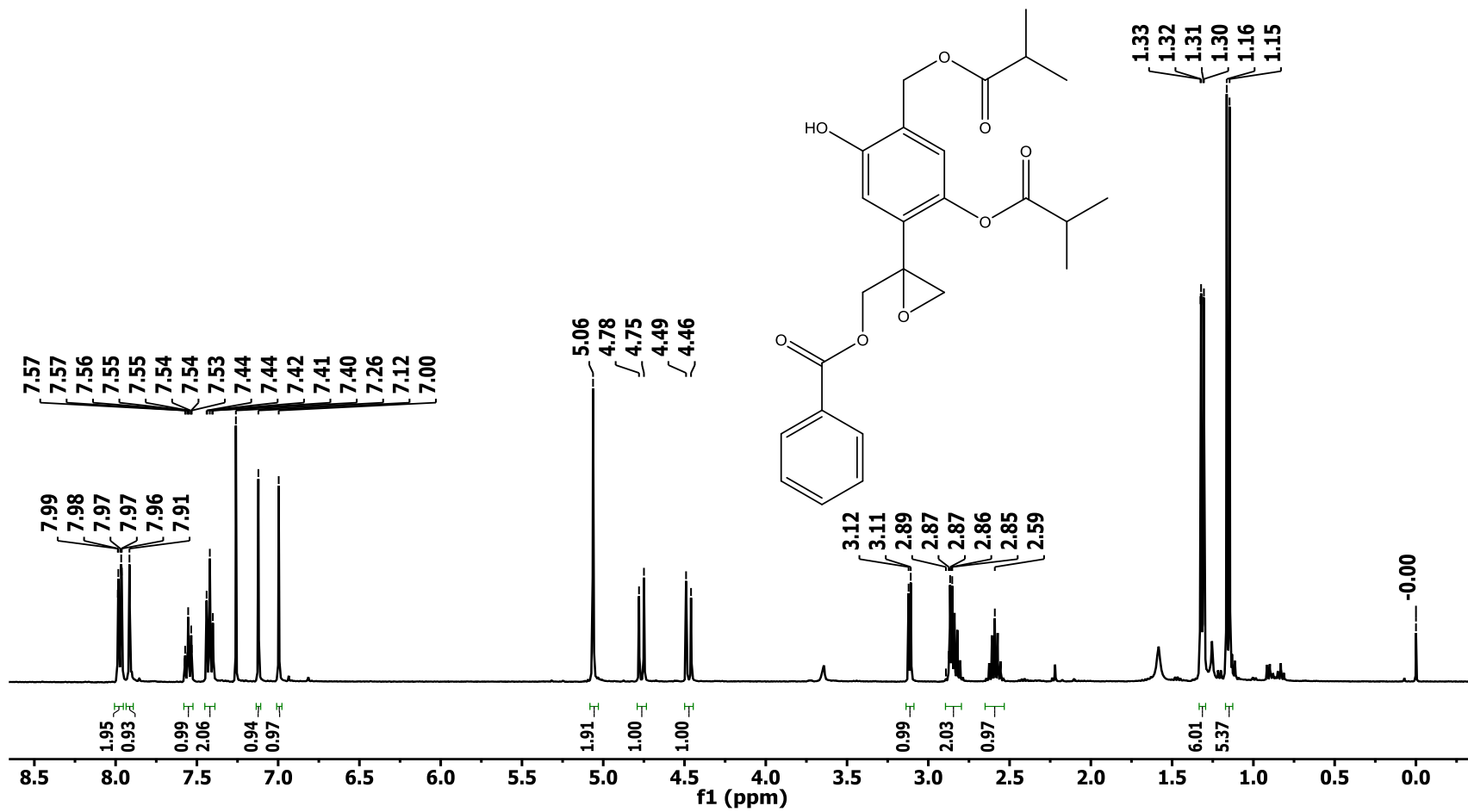


Figura 22. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) del compuesto 13.

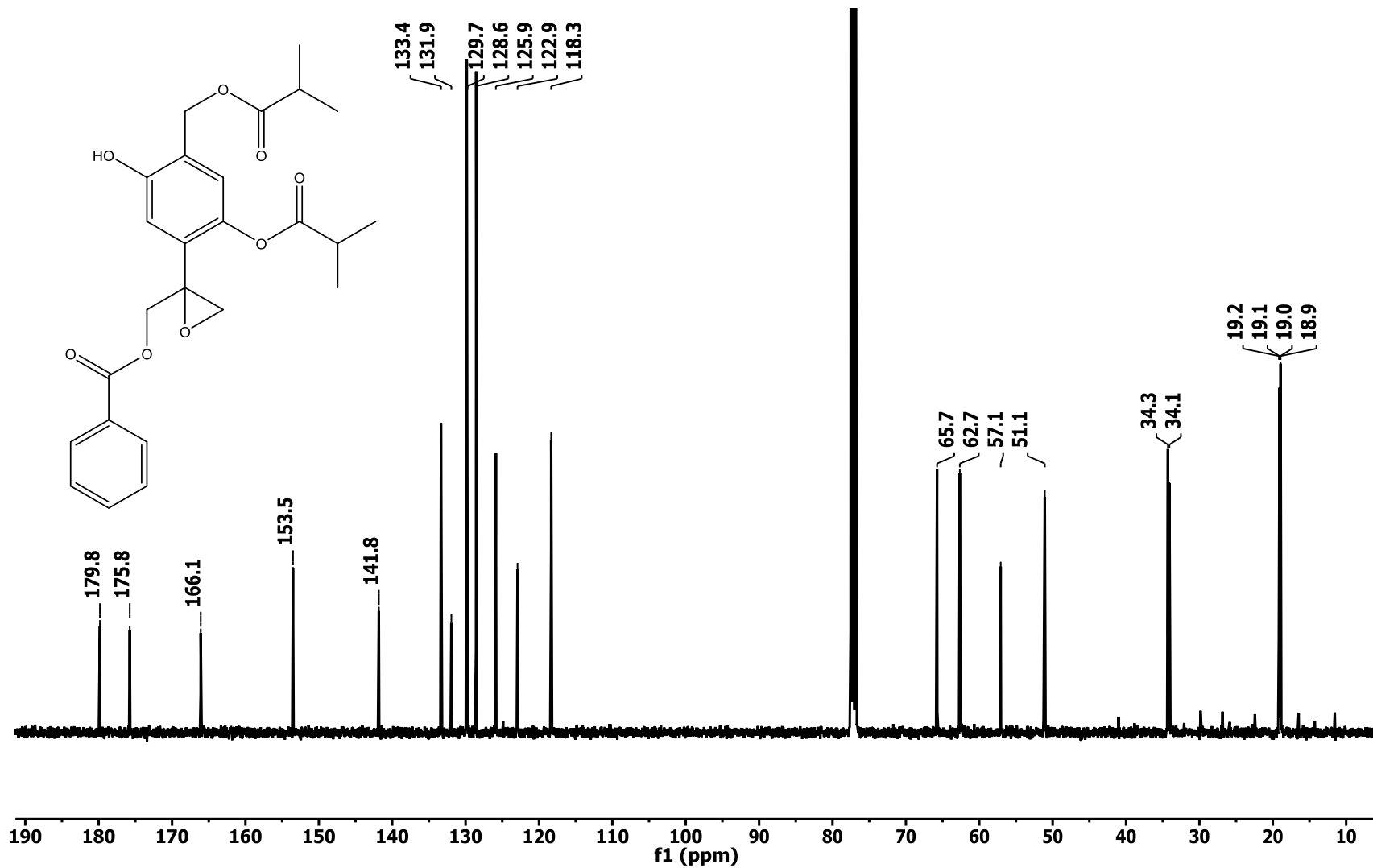


Figura 23. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) del compuesto **13**.

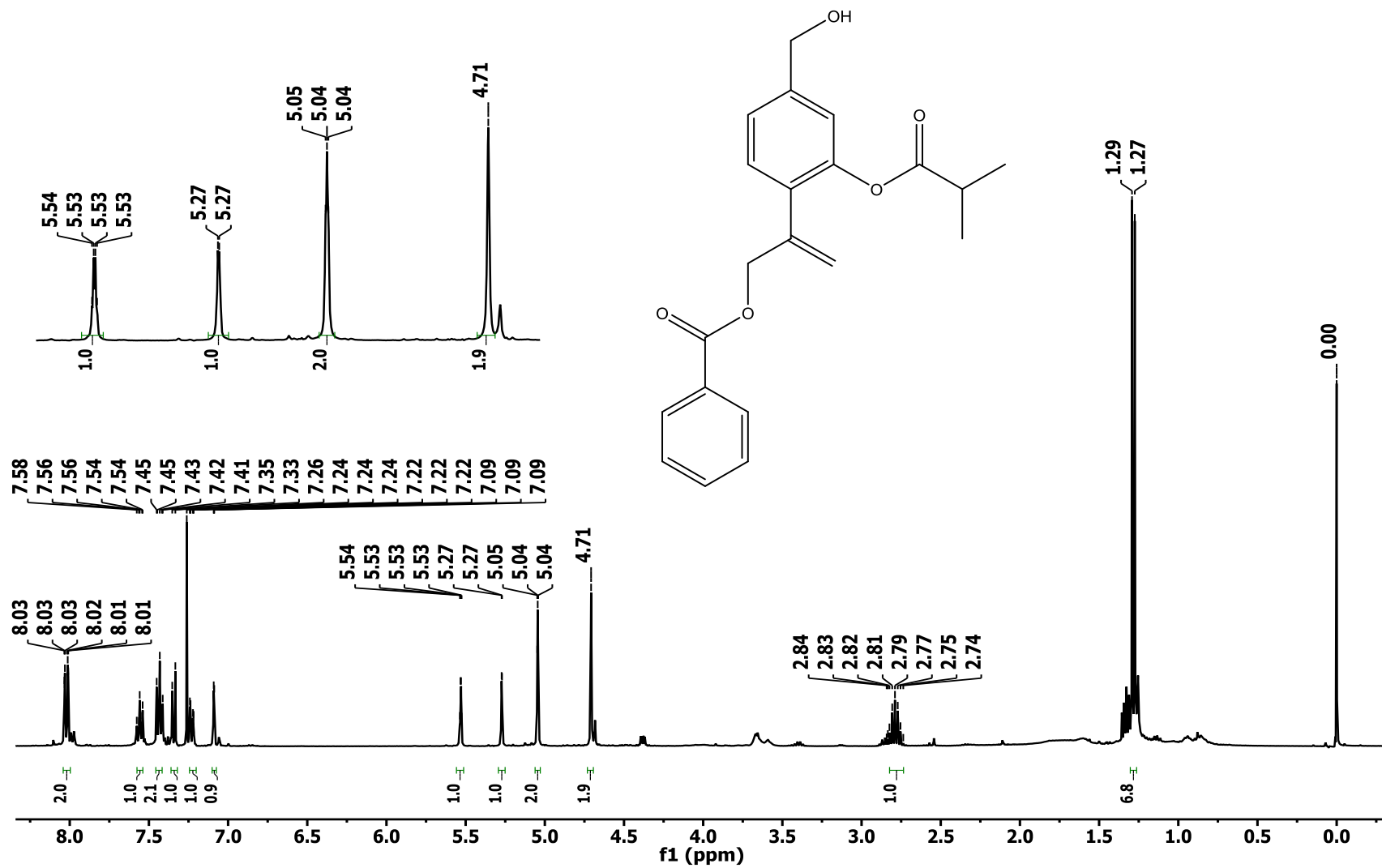


Figura 24. Espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) del compuesto 14.

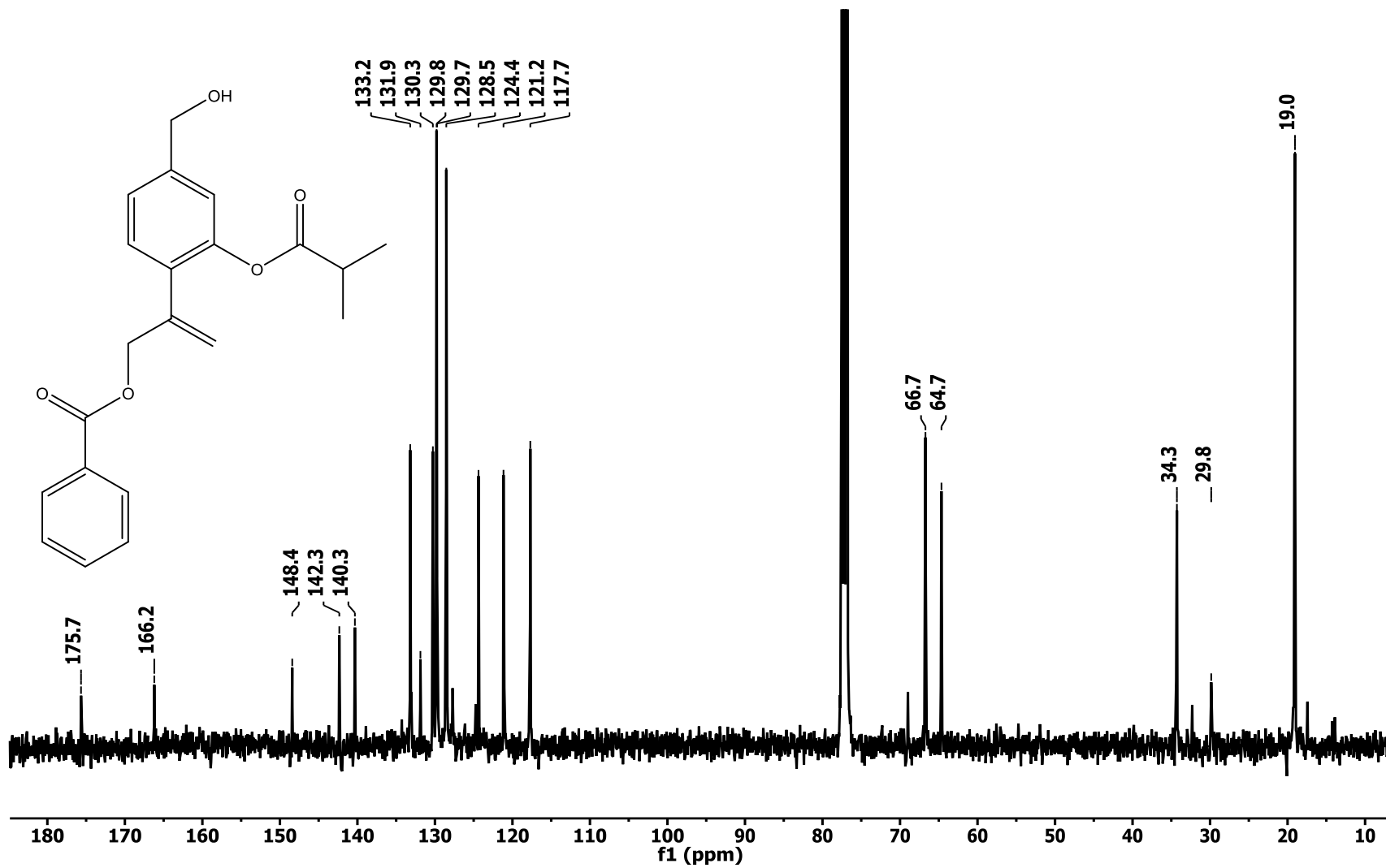


Figura 25. Espectro de RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) del compuesto 14.

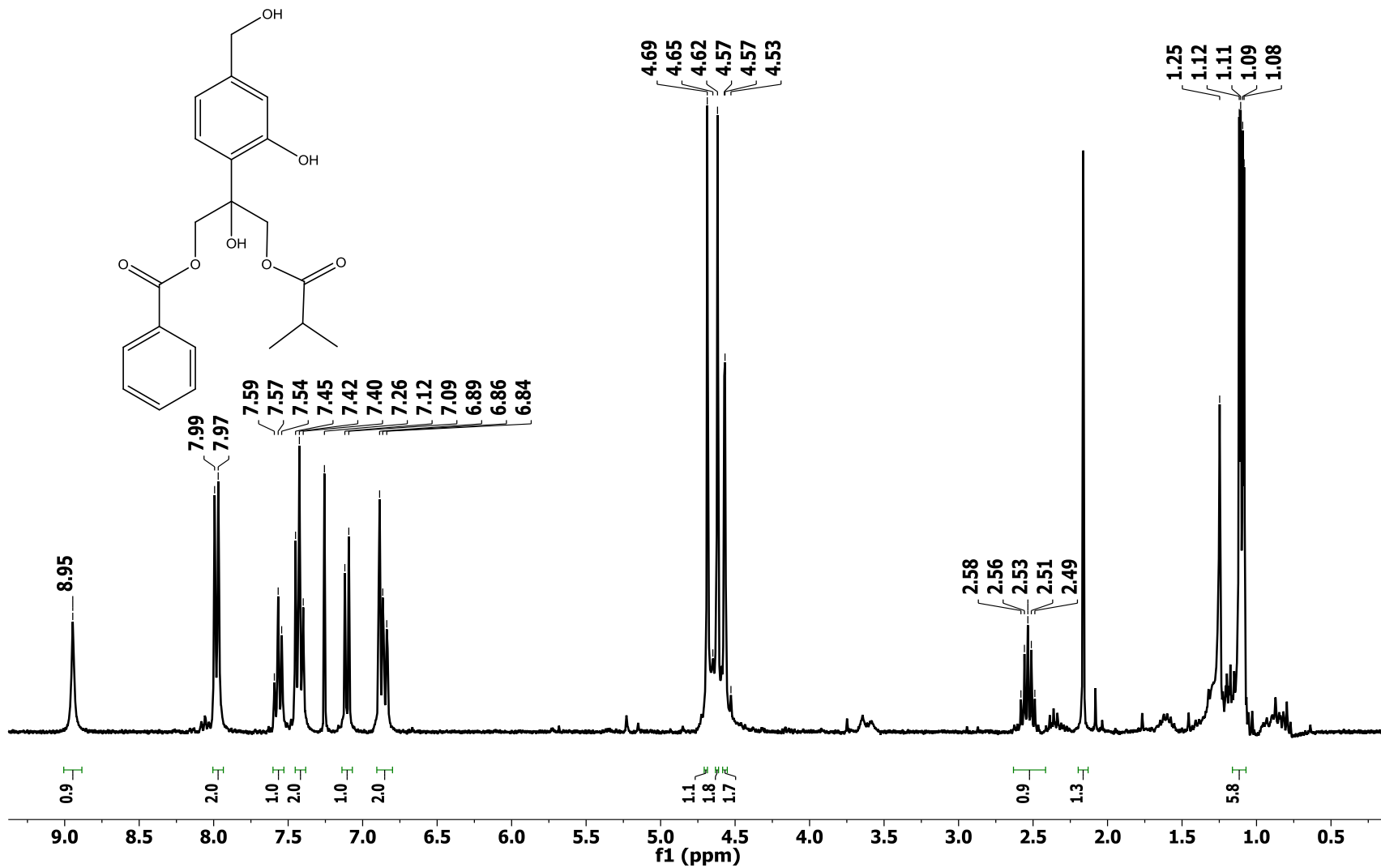


Figura 26. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) del compuesto 15.

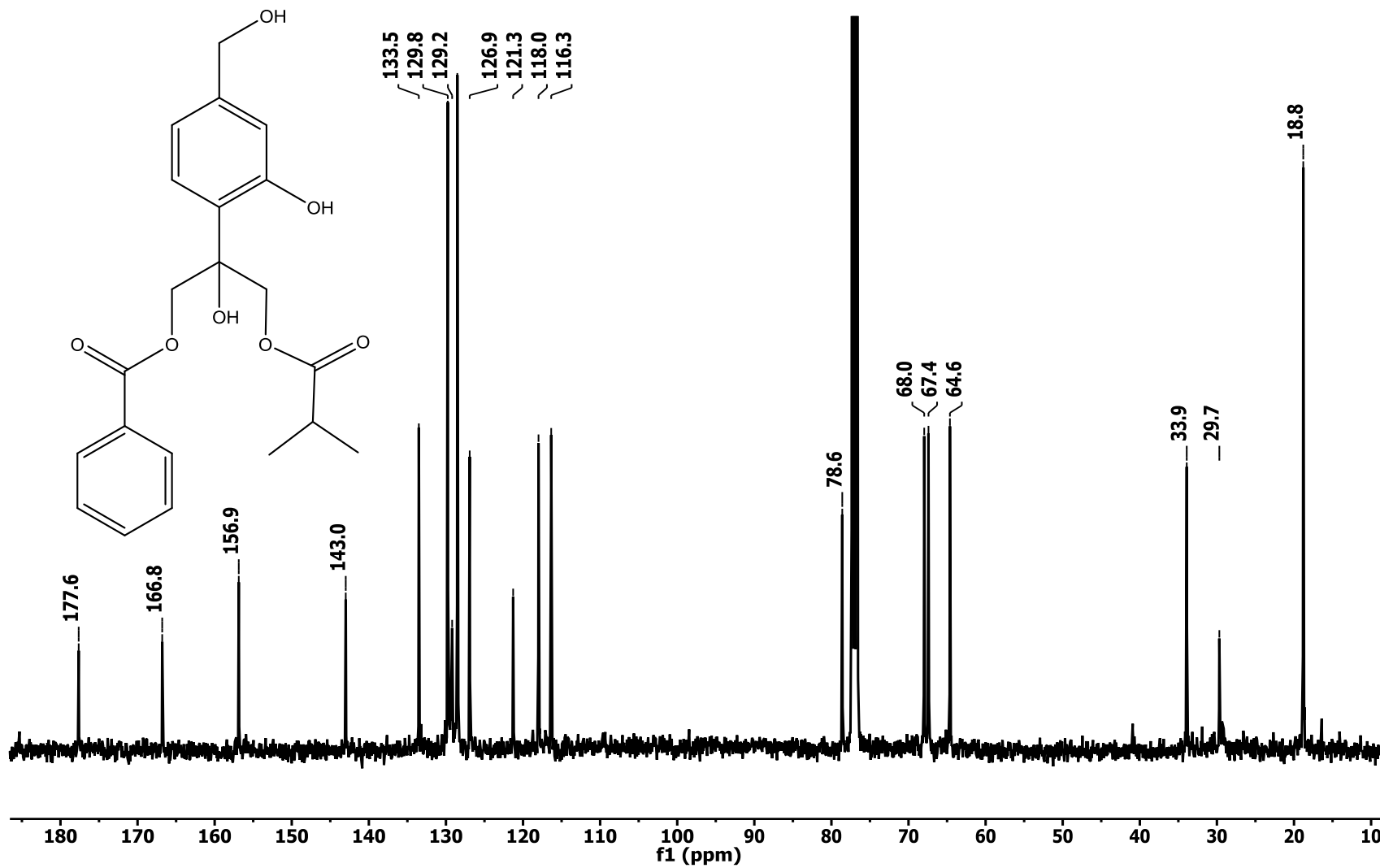


Figura 27. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl₃, 100 MHz) del compuesto 15.

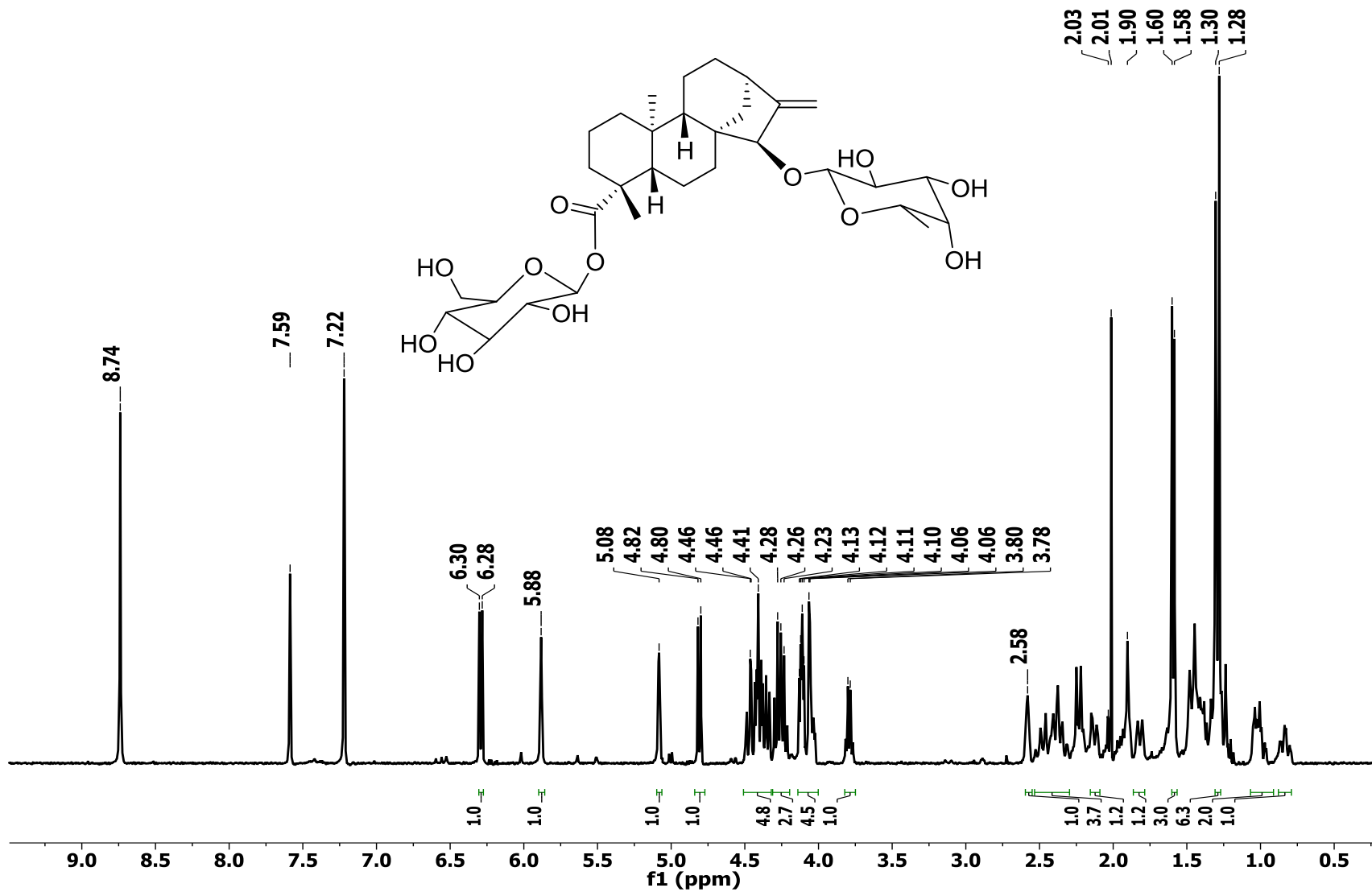


Figura 28. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) del compuesto 17.

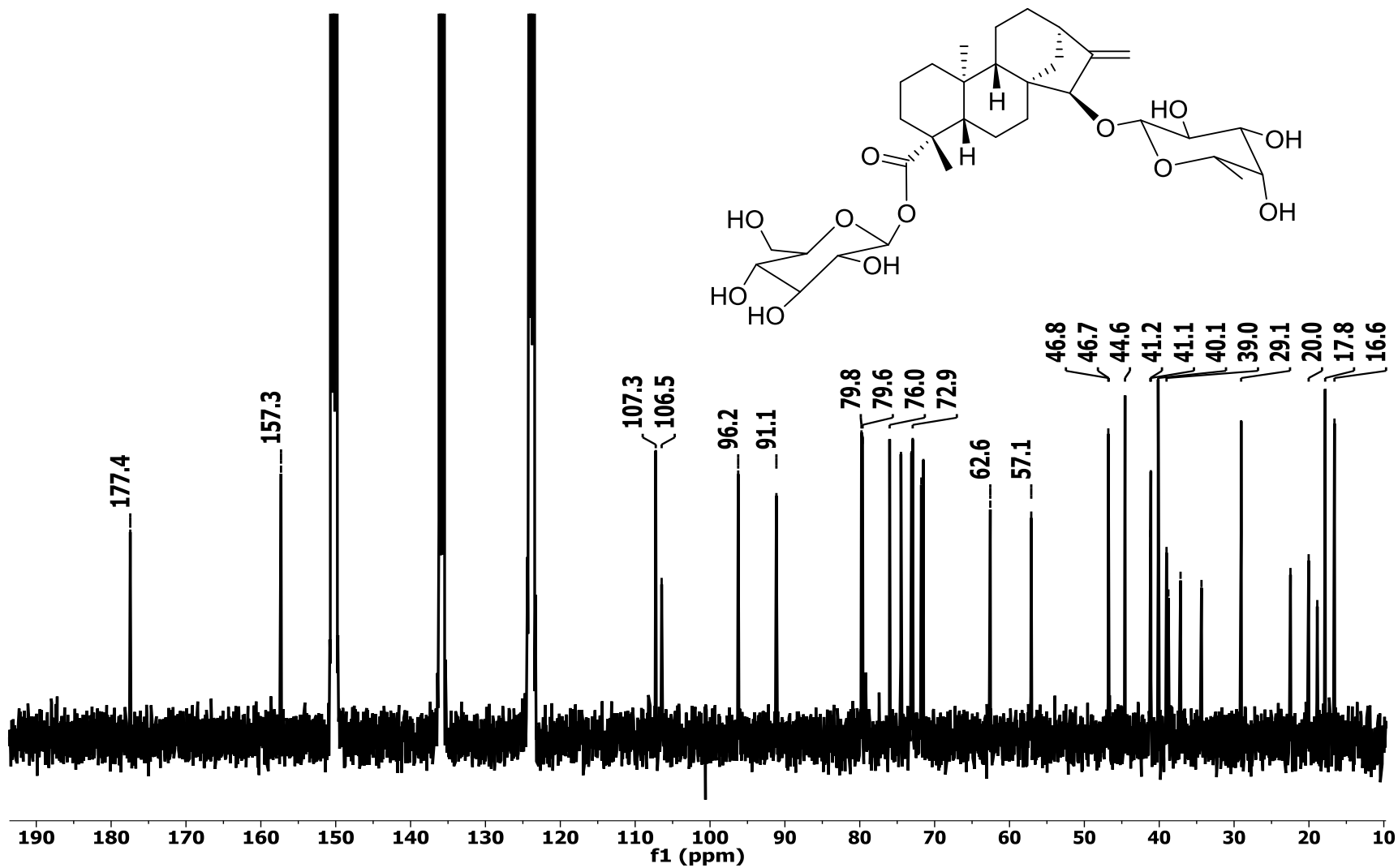


Figura 29. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) del compuesto 17.

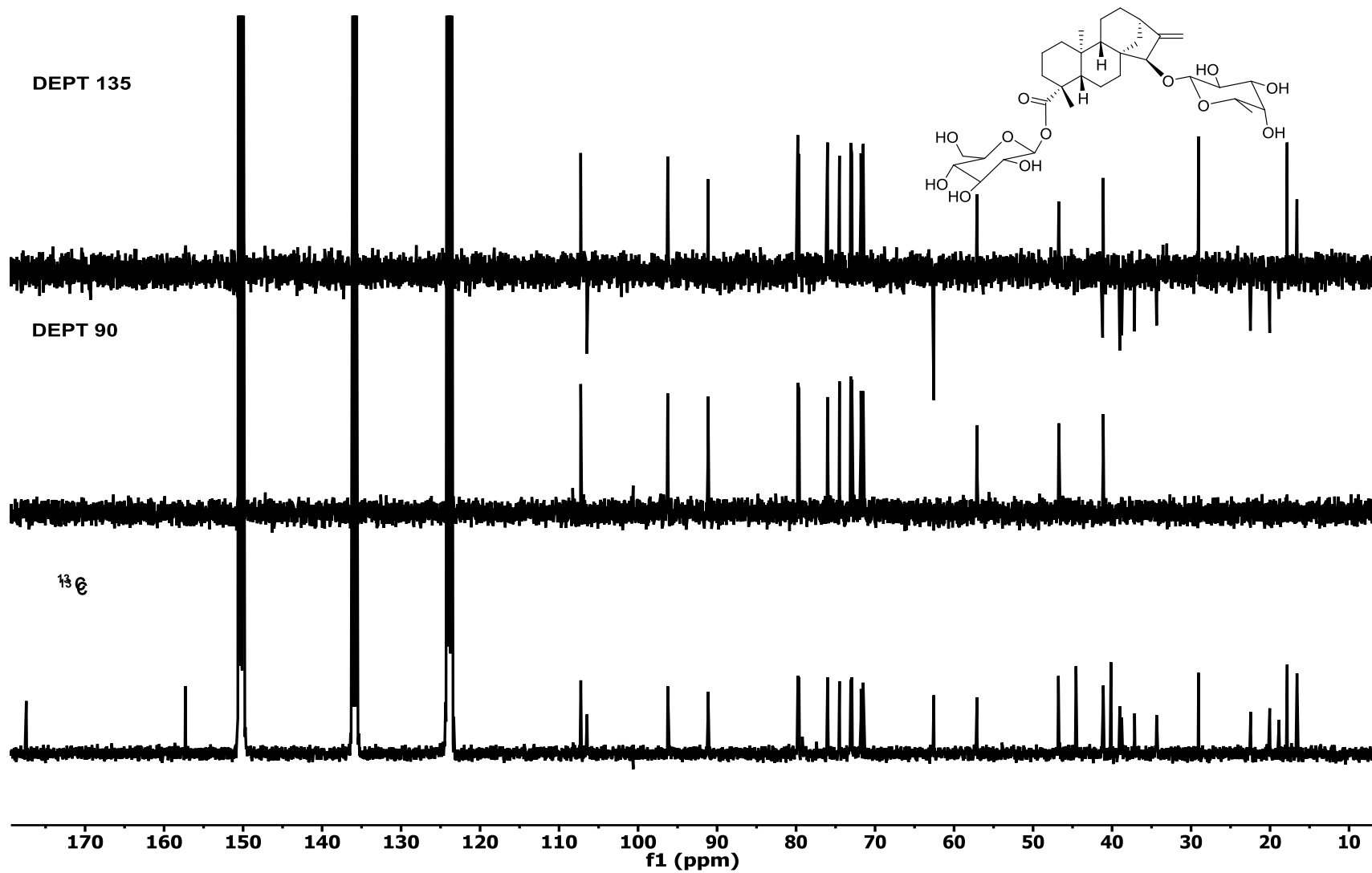


Figura 30. Espectro de RMN DEPT (CDCl_3 , 100 MHz) del compuesto 17.

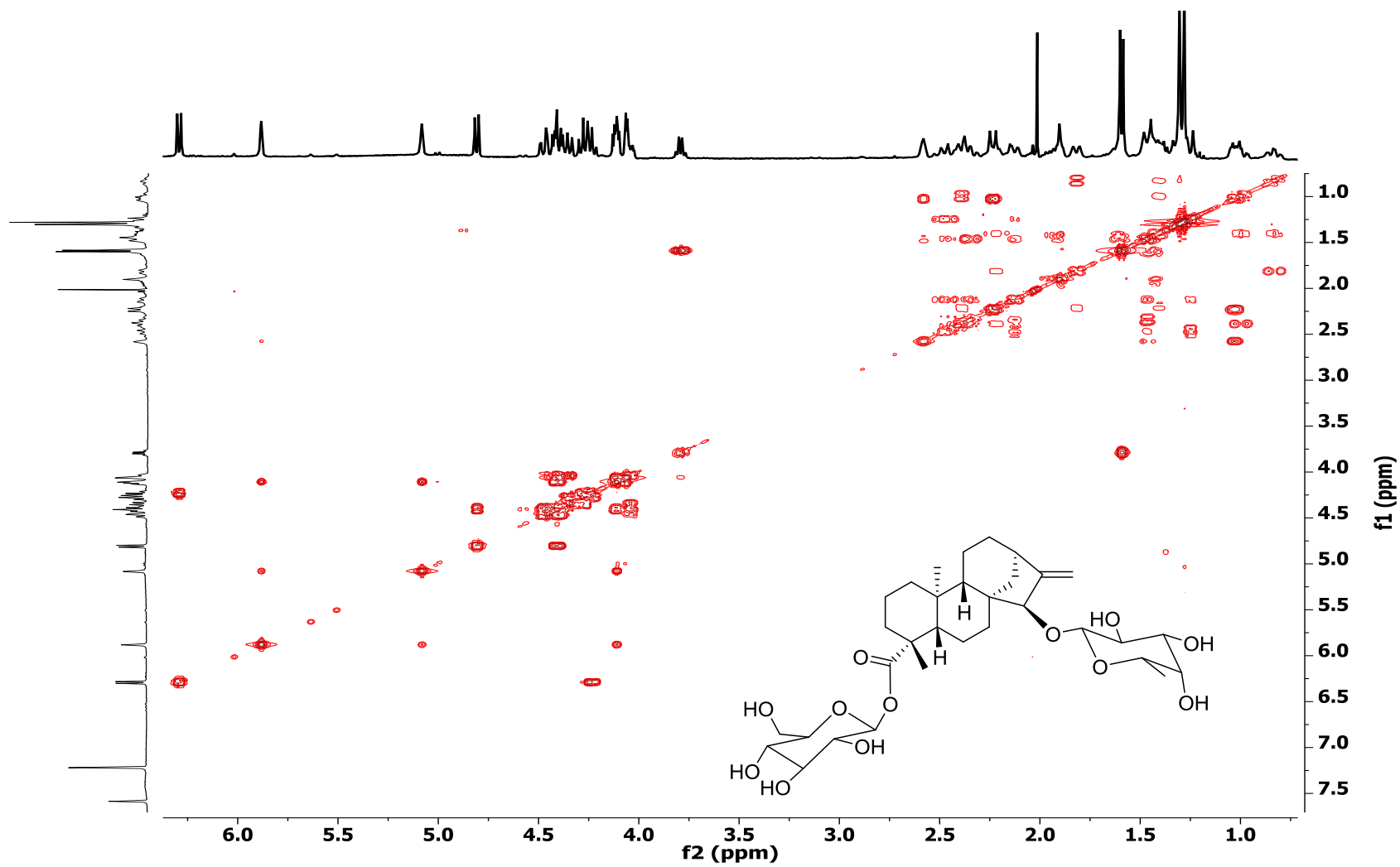


Figura 31. Espectro de RMN COSY (piridina- d_5 , 400 MHz) del compuesto 17.

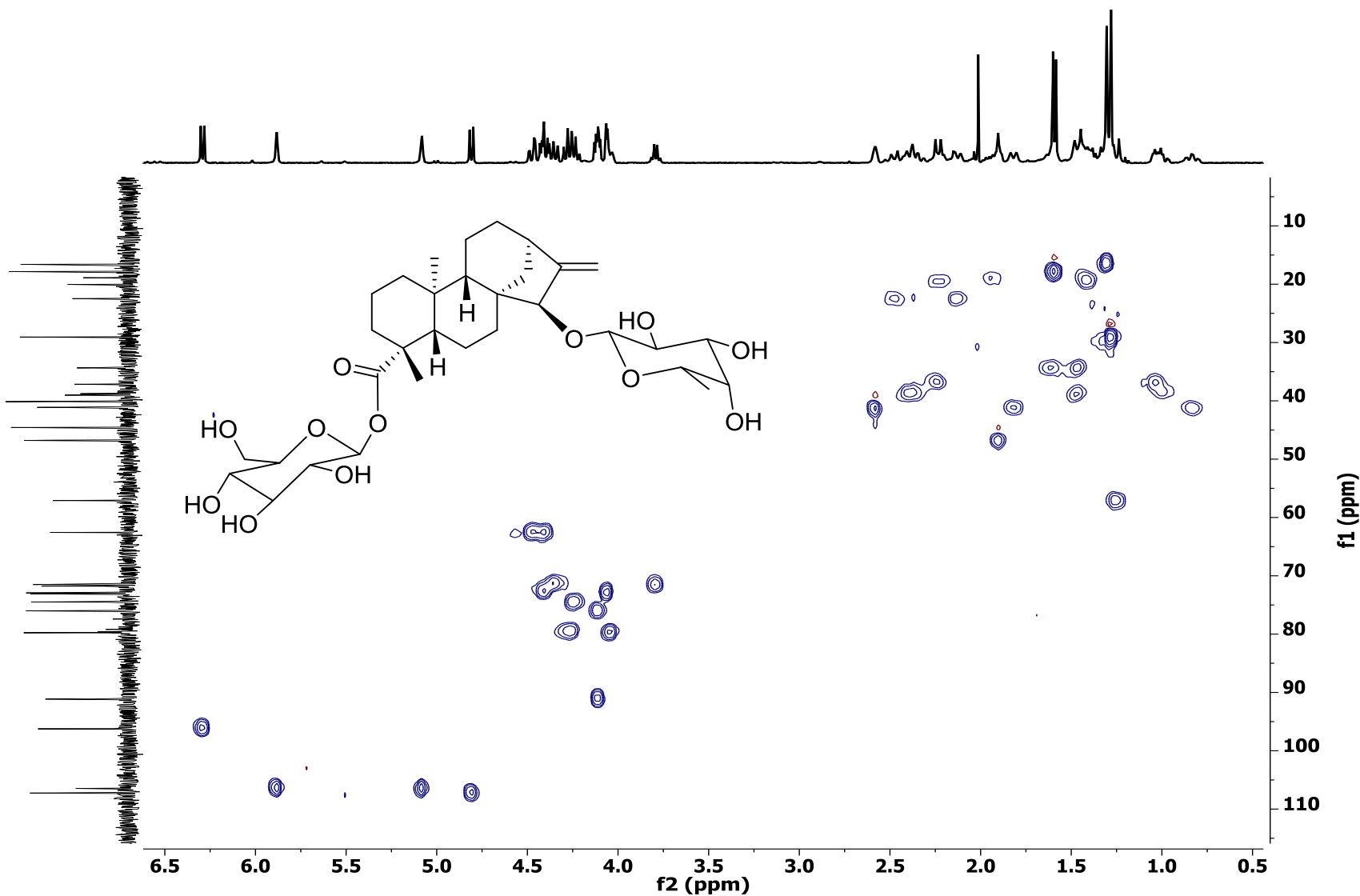


Figura 32. Espectro de RMN HSQC (piridina-*d*₅, 400 MHz) del compuesto 17.

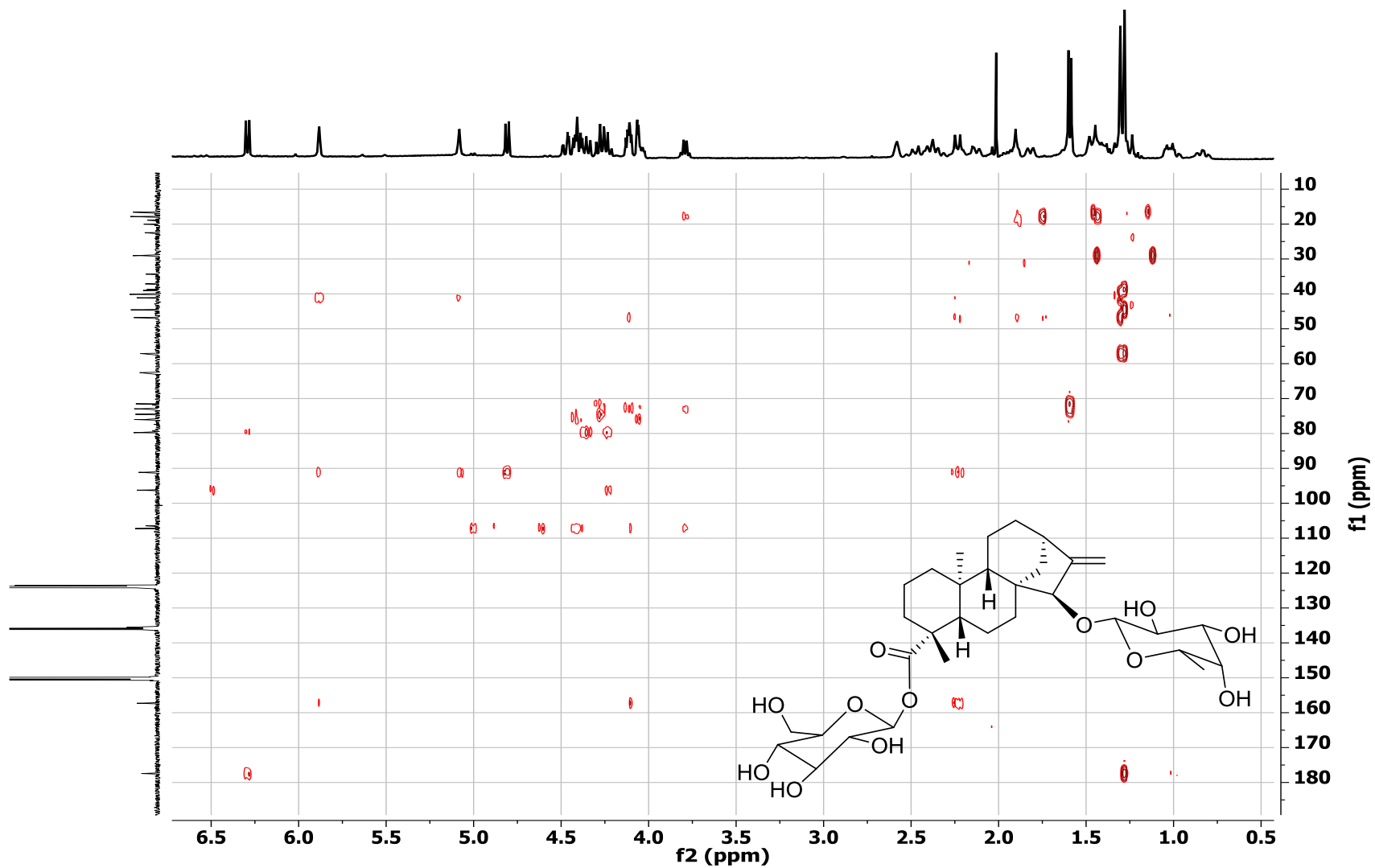


Figura 33. Espectro de RMN HMBC (piridina-*d*₅, 400 MHz) del compuesto 17.

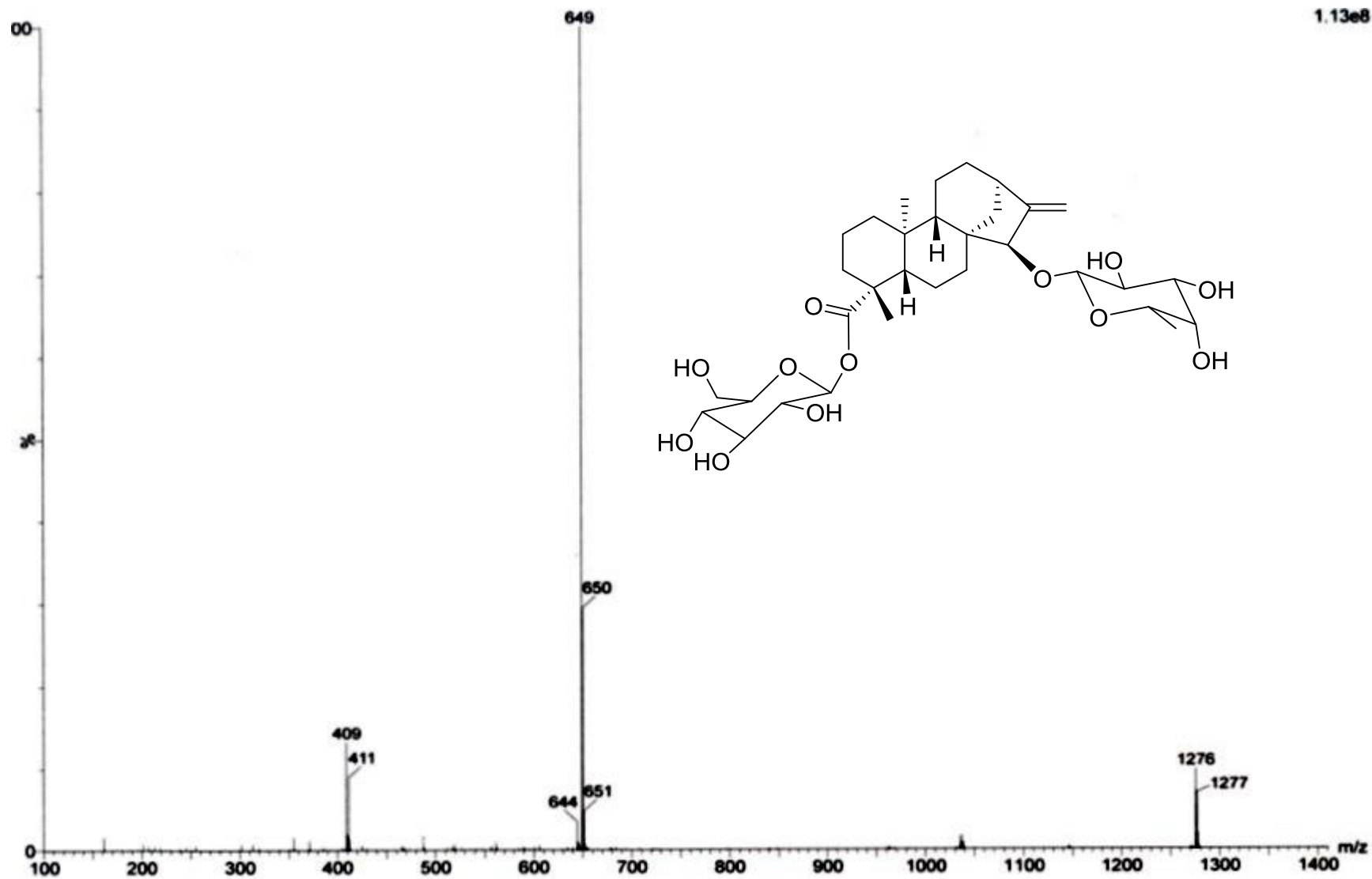


Figura 34. Espectro de masas (ESI⁺) del compuesto 17.

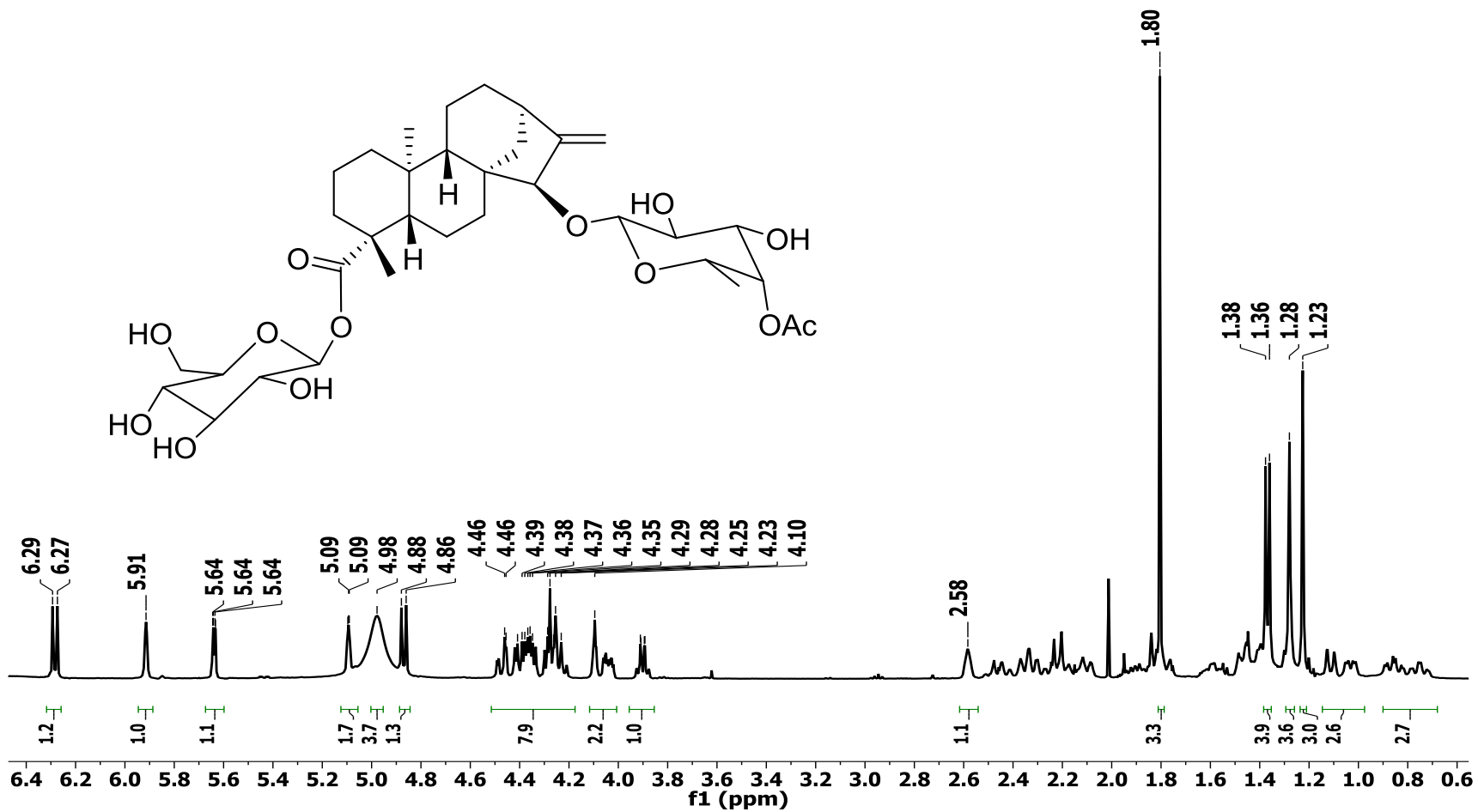


Figura 35. Espectro de RMN ¹H (piridina-*d*₅, 400 MHz) del compuesto 18.

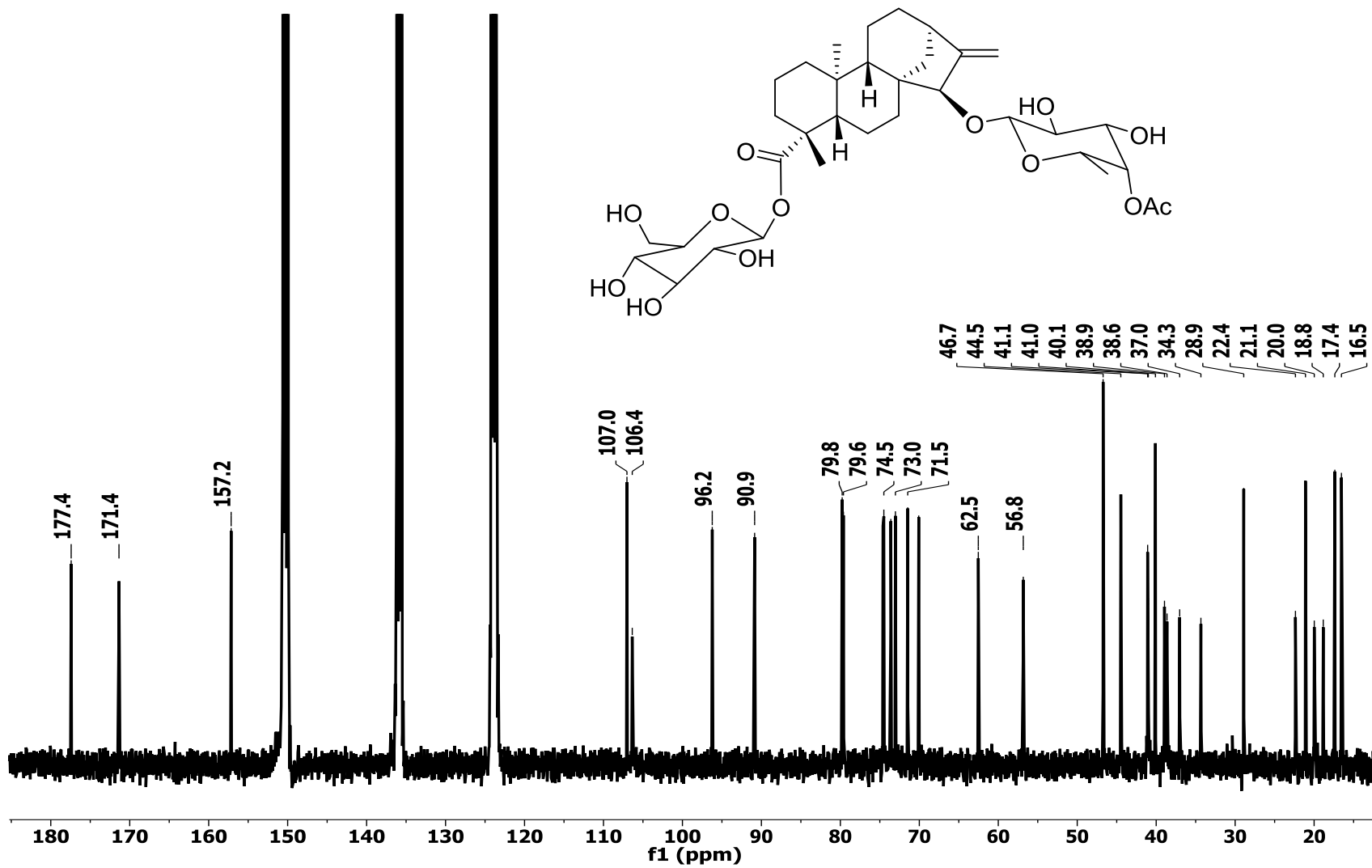


Figura 36. Espectro de RMN ^{13}C (piridina- d_5 , 100 MHz) del compuesto 18.

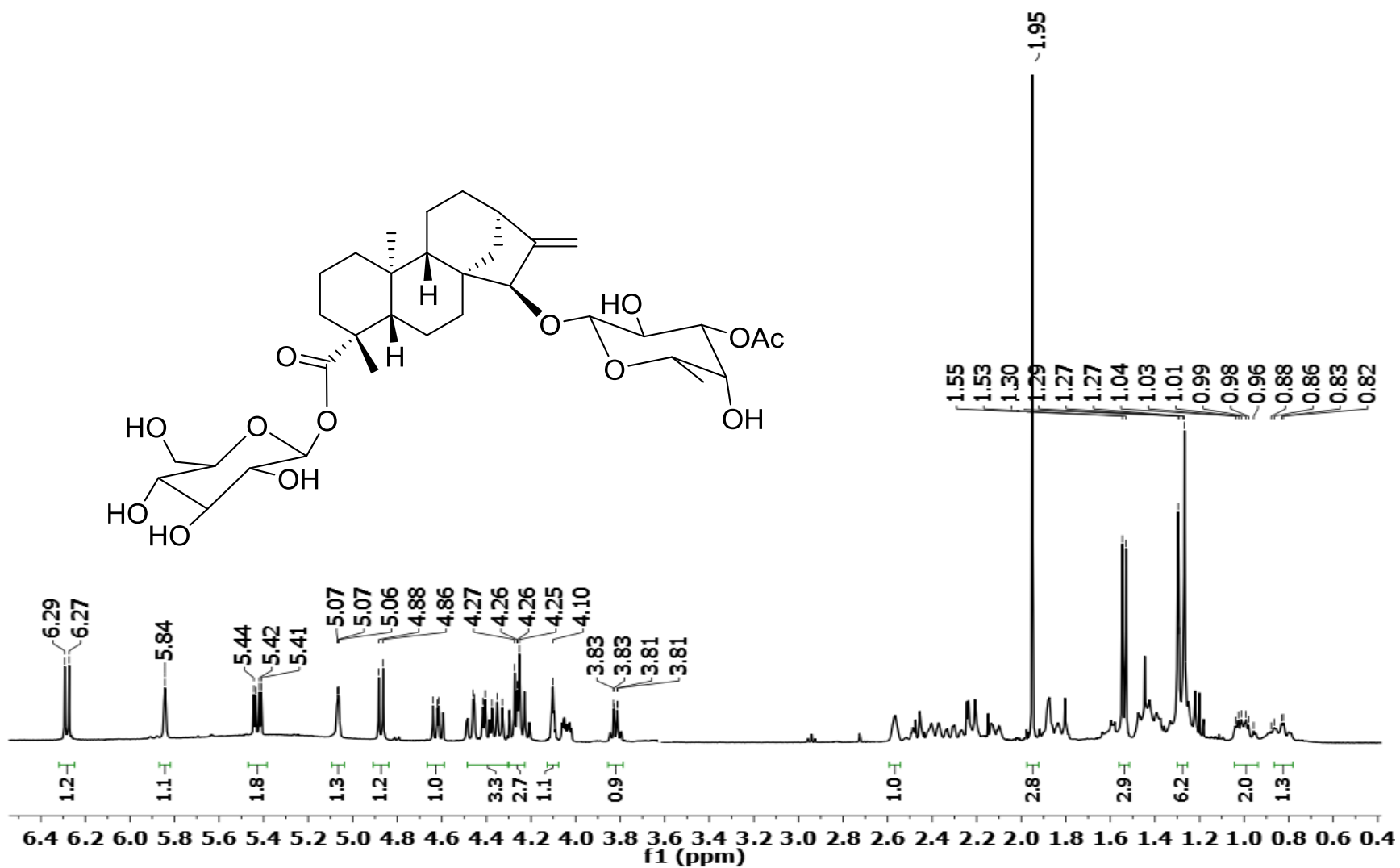


Figura 37. Espectro de RMN ^1H (piridina- d_5 , 400 MHz) del compuesto 19.

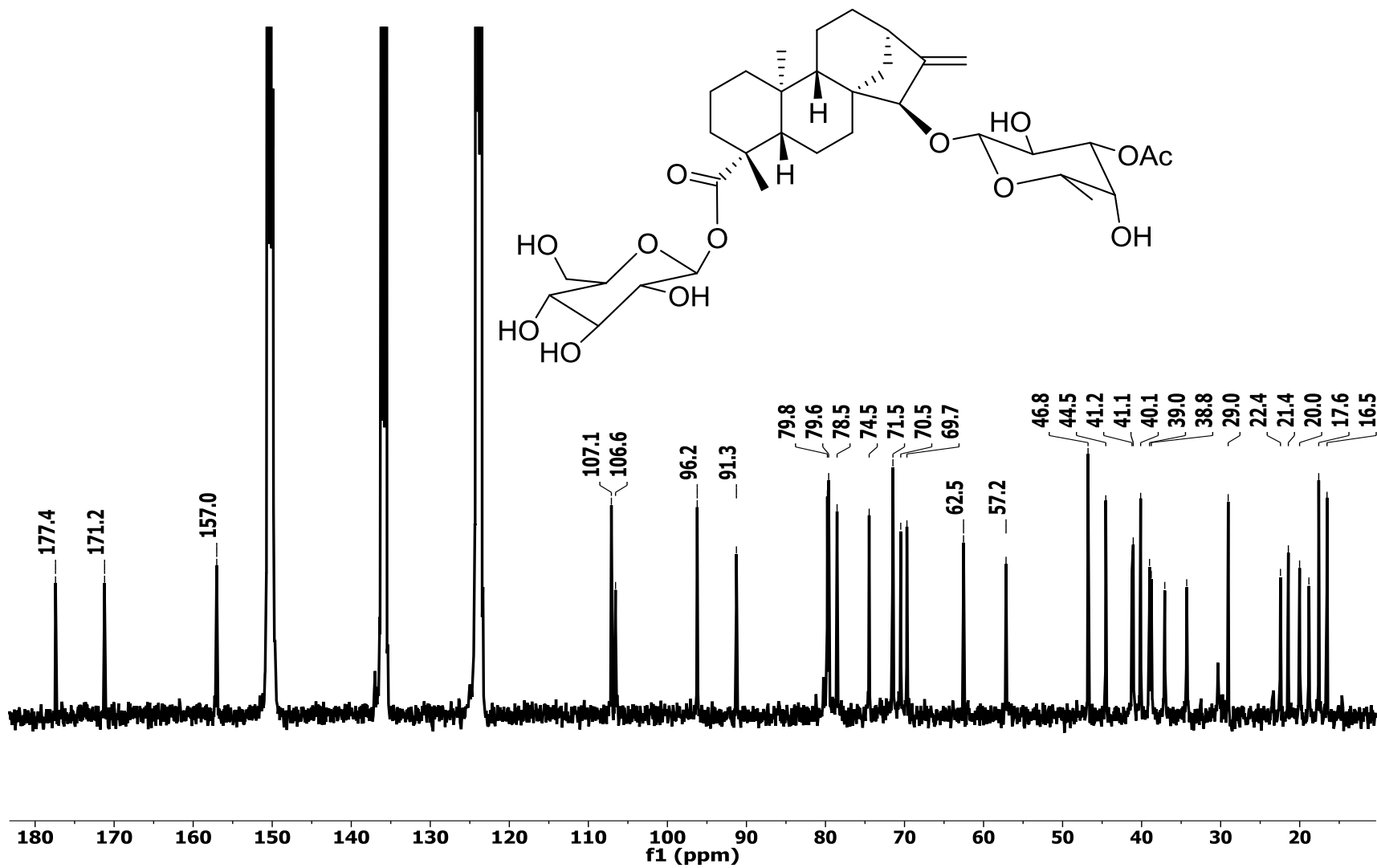


Figura 38. Espectro de RMN ^{13}C (piridina- d_5 , 100 MHz) del compuesto 19.

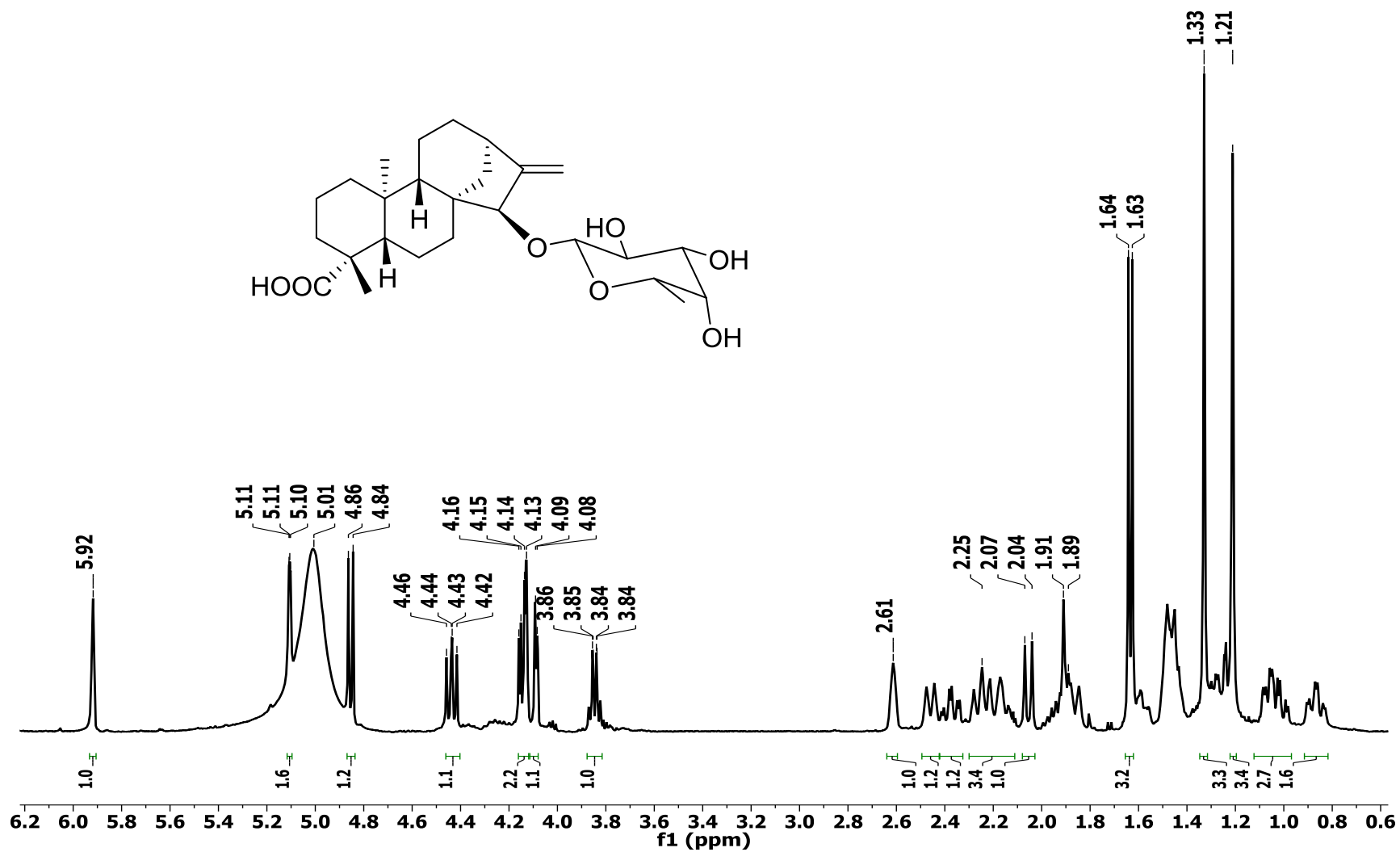


Figura 39. Espectro de RMN ¹H (piridina-d₅, 400 MHz) del compuesto 25.

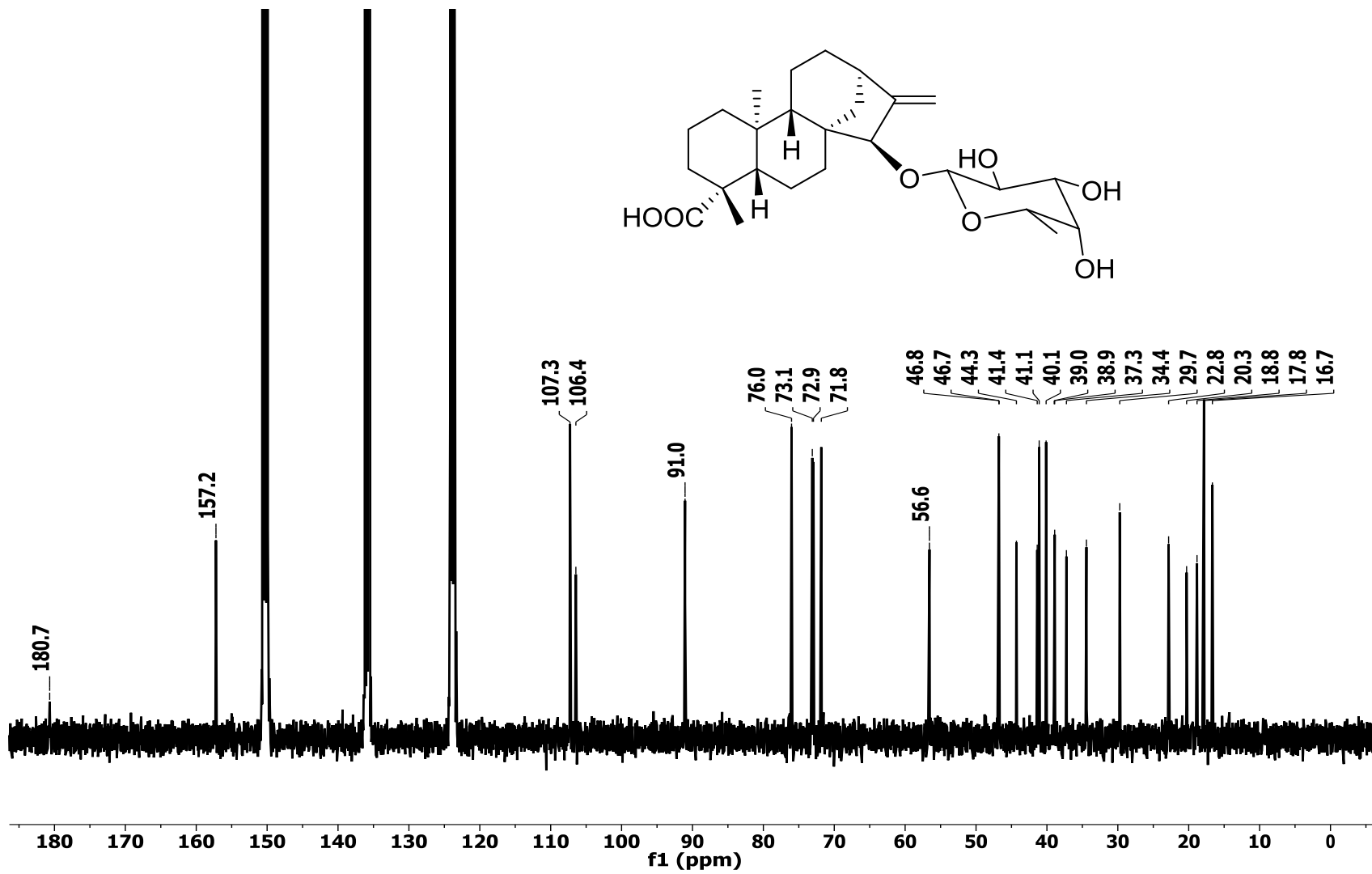


Figura 40. Espectro de RMN ¹³C (piridina-*d*₅, 100 MHz) del compuesto 25.

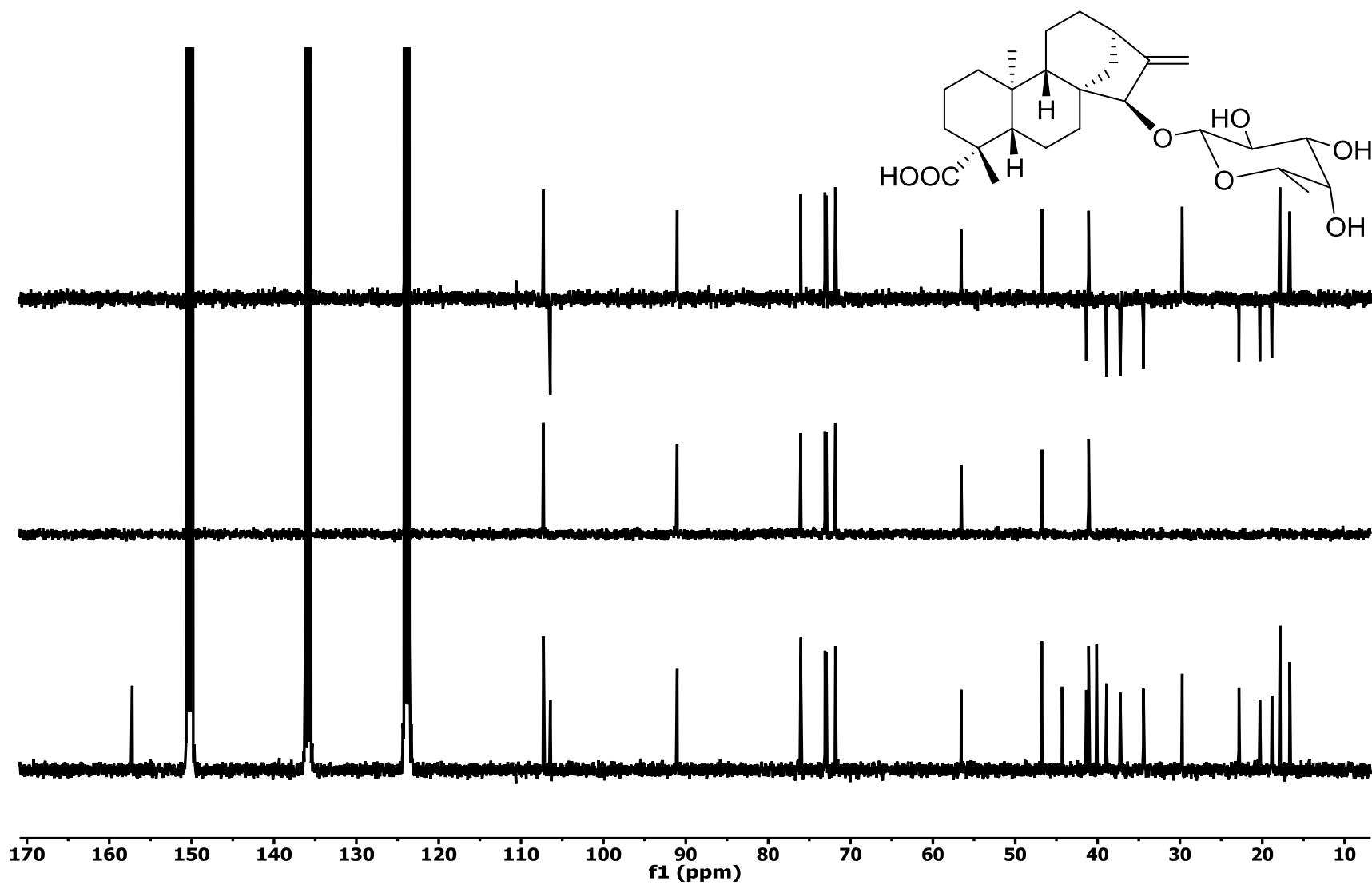


Figura 41. Espectro DEPT (piridina- d_5 , 100 MHz) del compuesto 25.

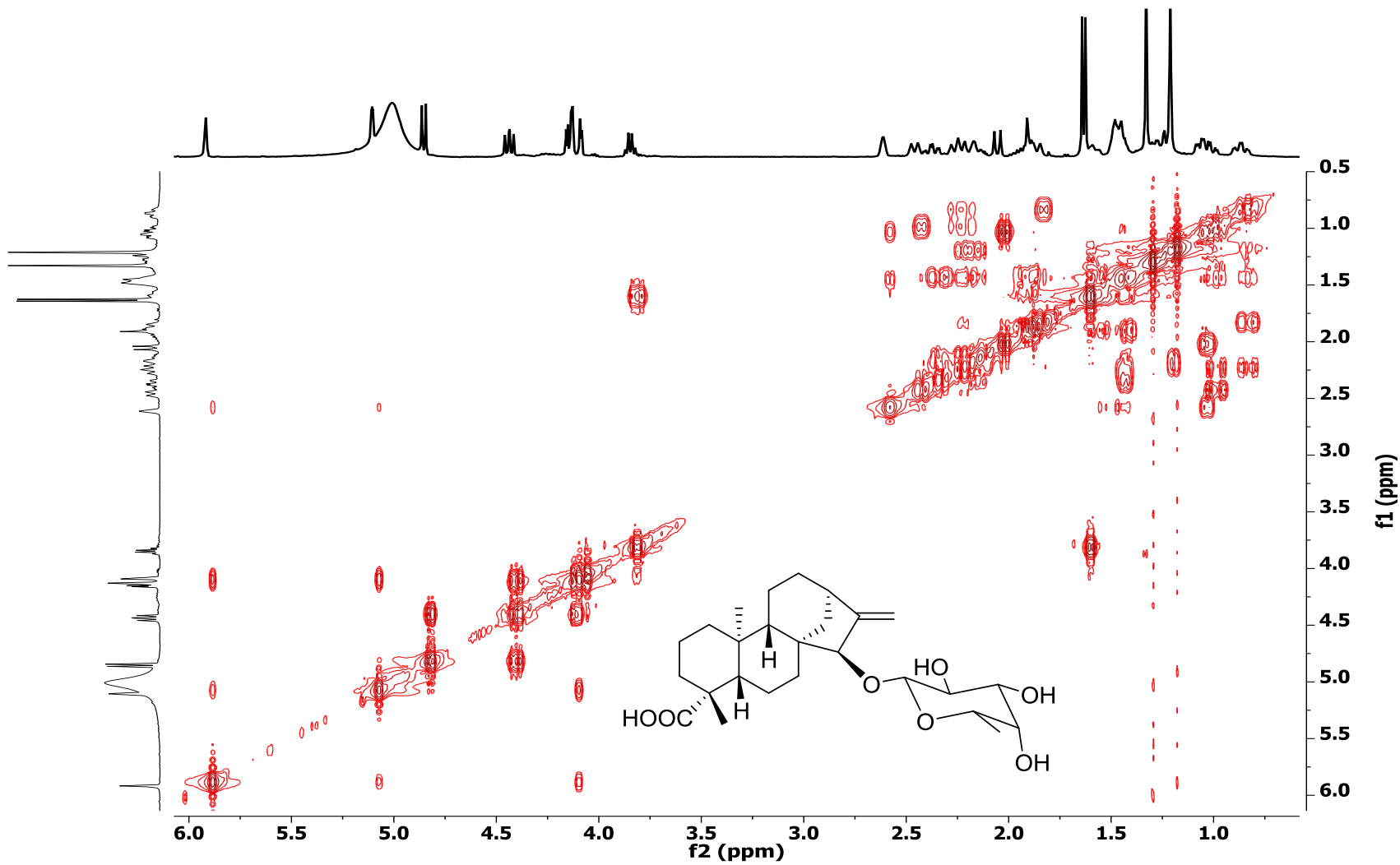


Figura 42. Espectro COSY (piridina-*d*₅, 500 MHz) del compuesto 25.

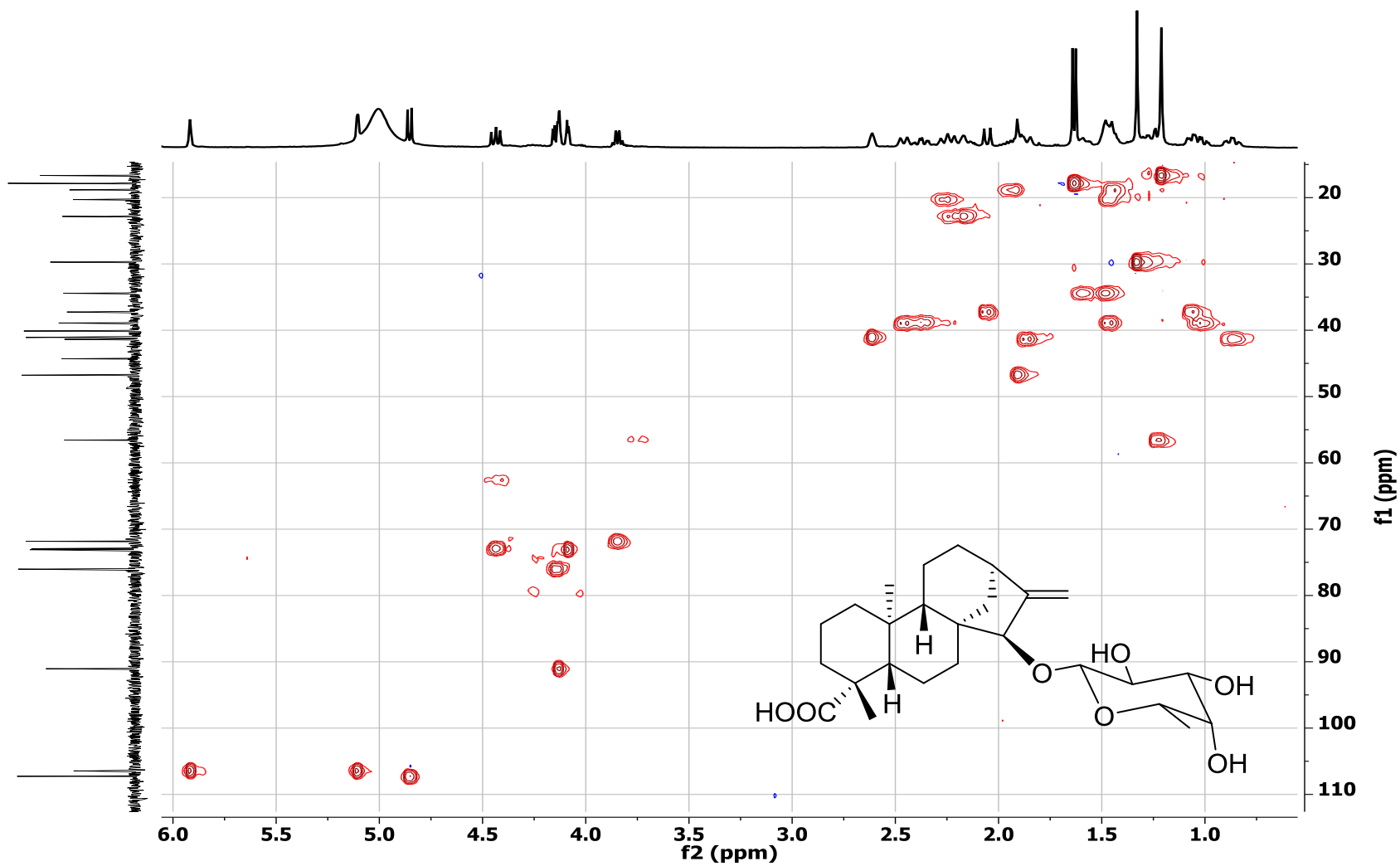


Figura 43. Espectro de RMN HSQC (piridina-*d*₅, 500 MHz) del compuesto 25.

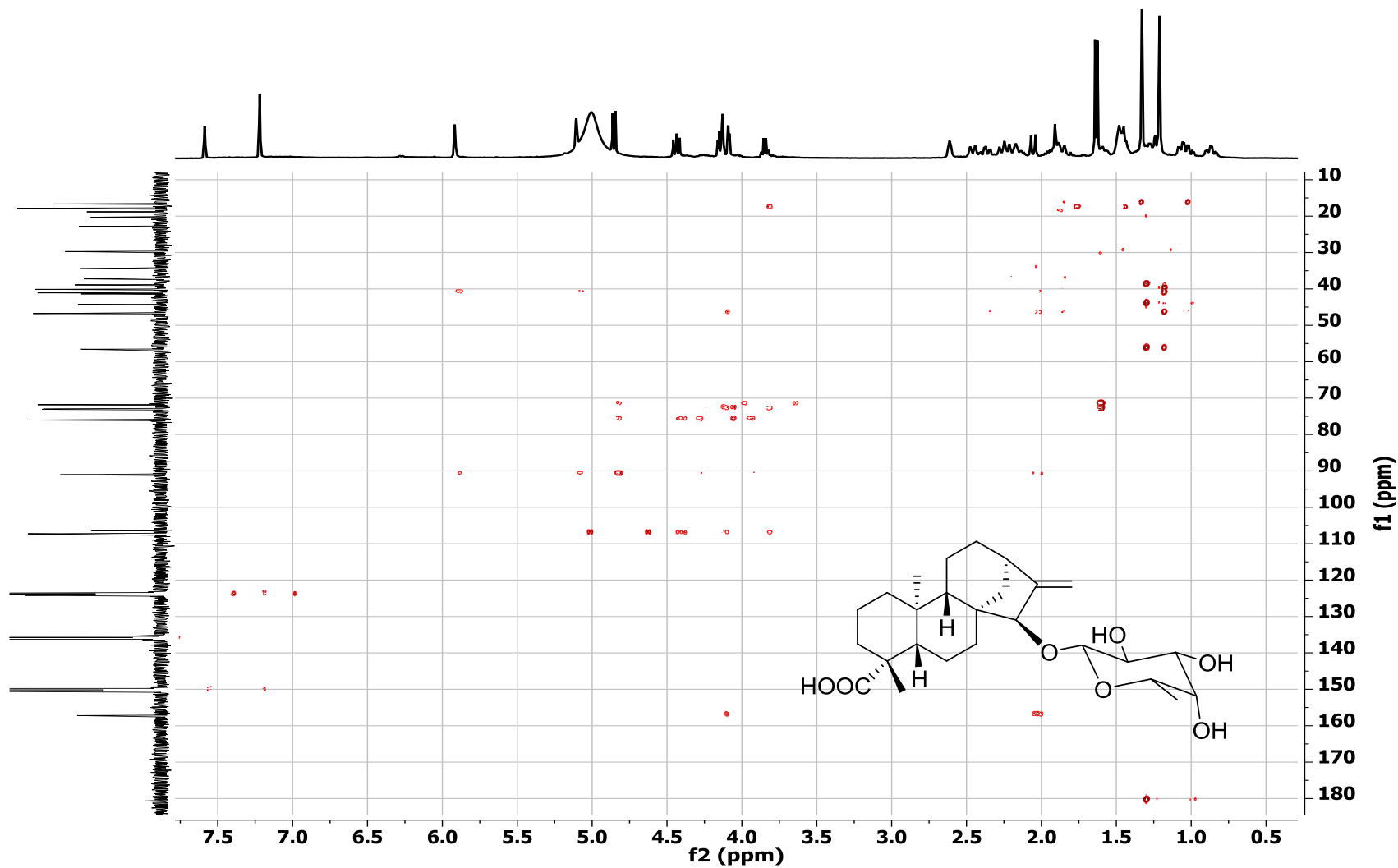


Figura 44. Espectro de RMN HMBC (piridina-*d*₅, 500 MHz) del compuesto 25.

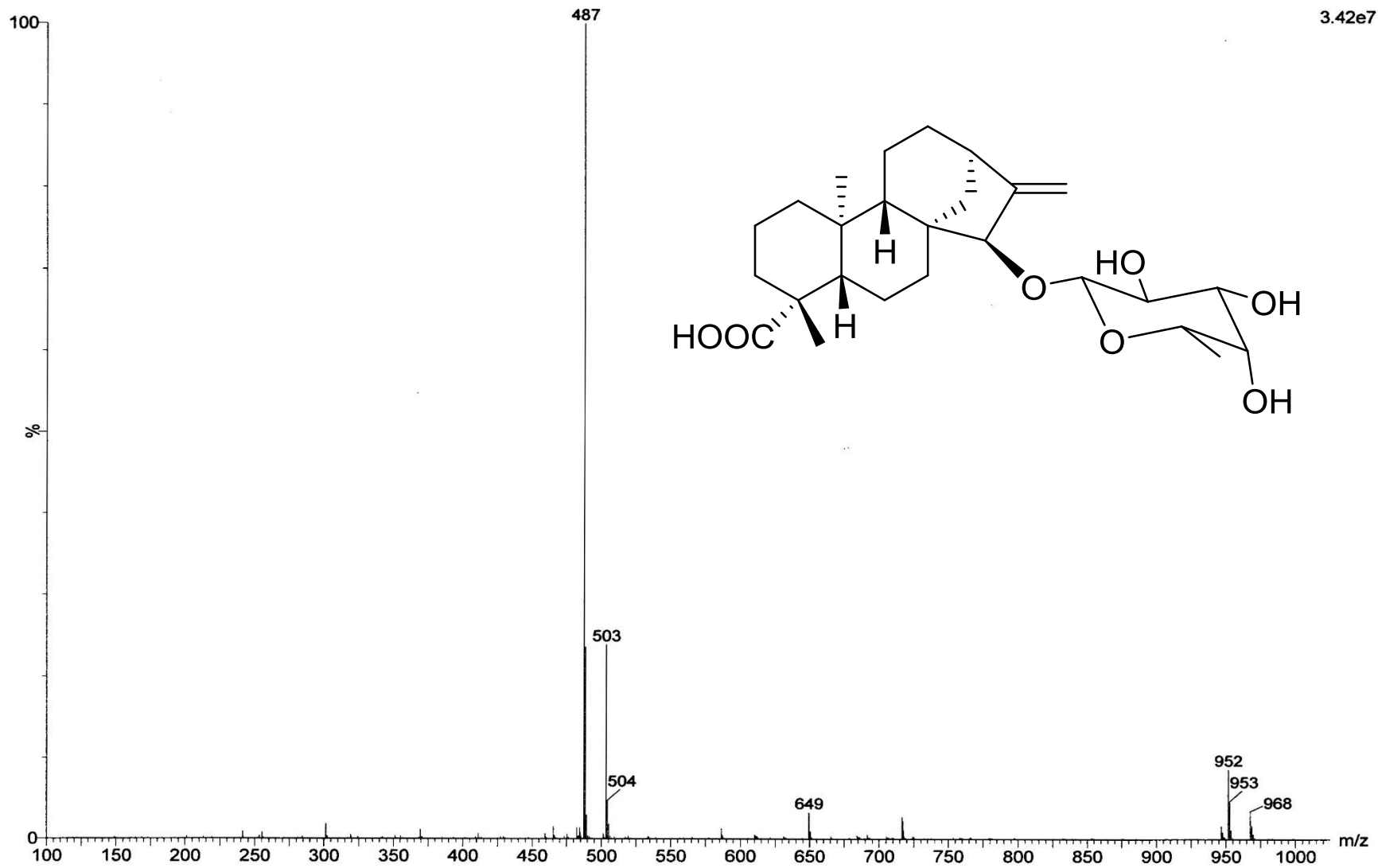


Figura 45. Espectro de masas (ESI⁺) del compuesto 25.

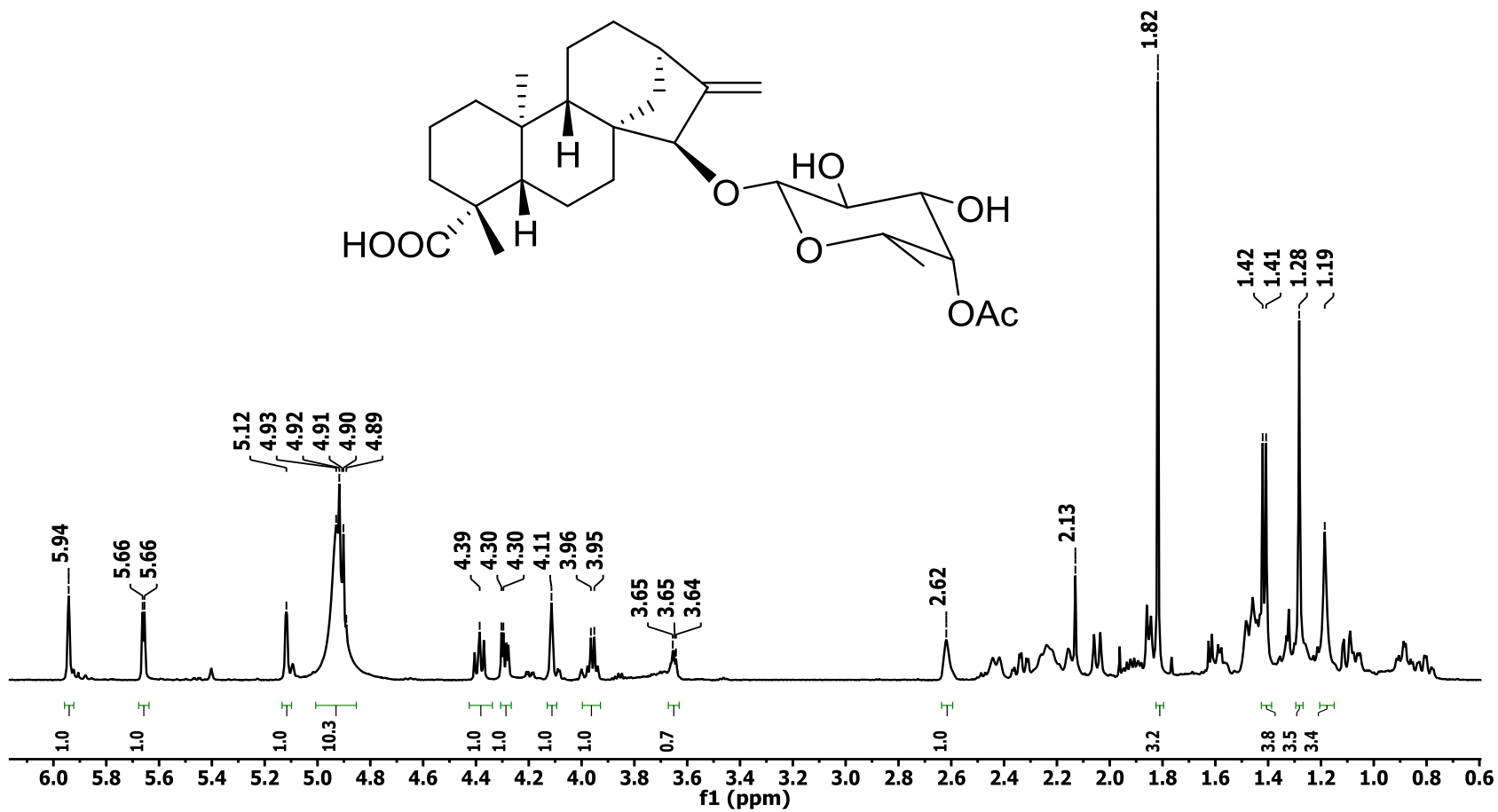


Figura 46. Espectro de RMN ¹H (piridina-d₅, 500 MHz) del compuesto 26.

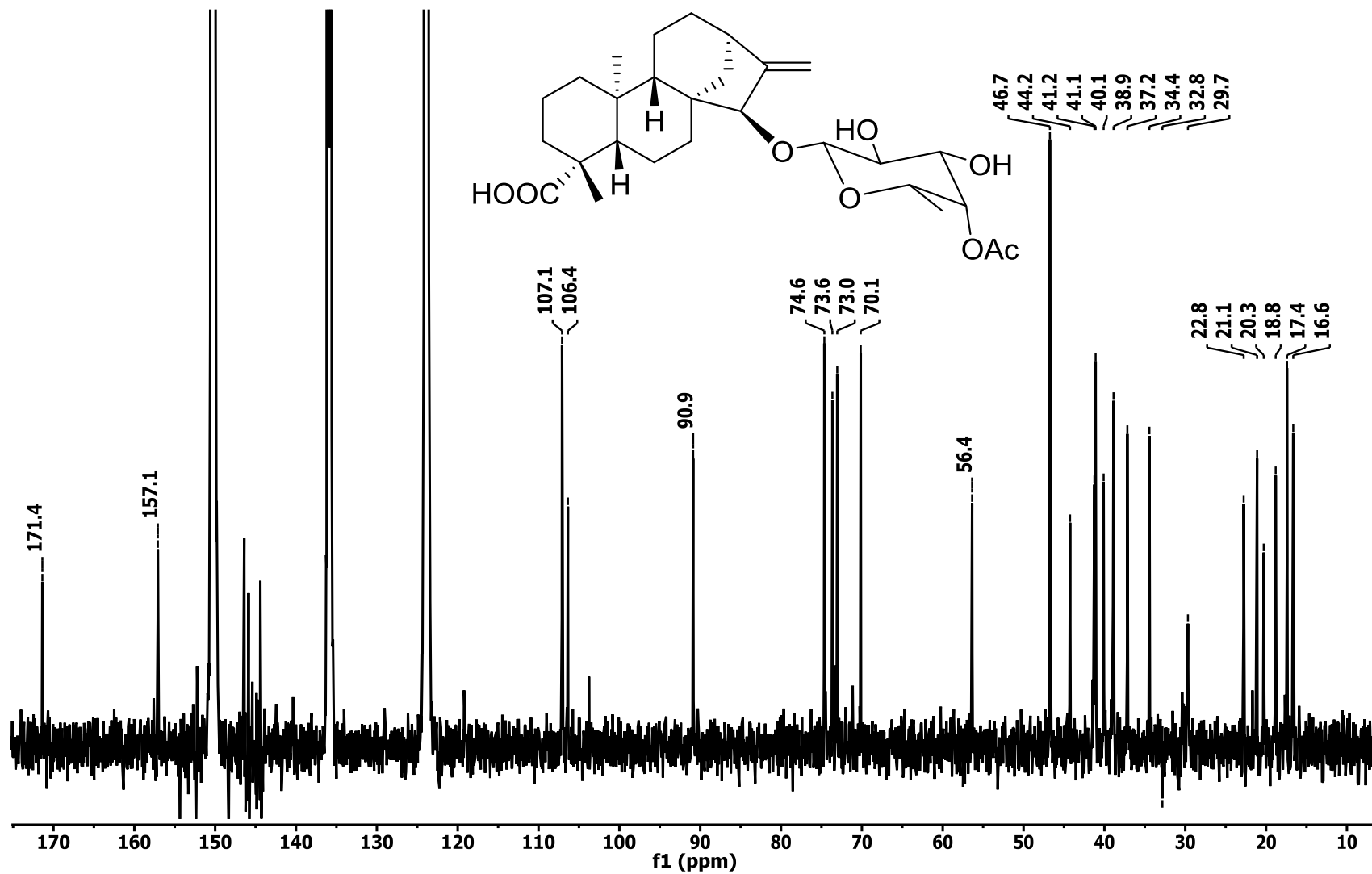


Figura 47. Espectro de RMN ^{13}C (piridina- d_5 , 125 MHz) del compuesto 26.

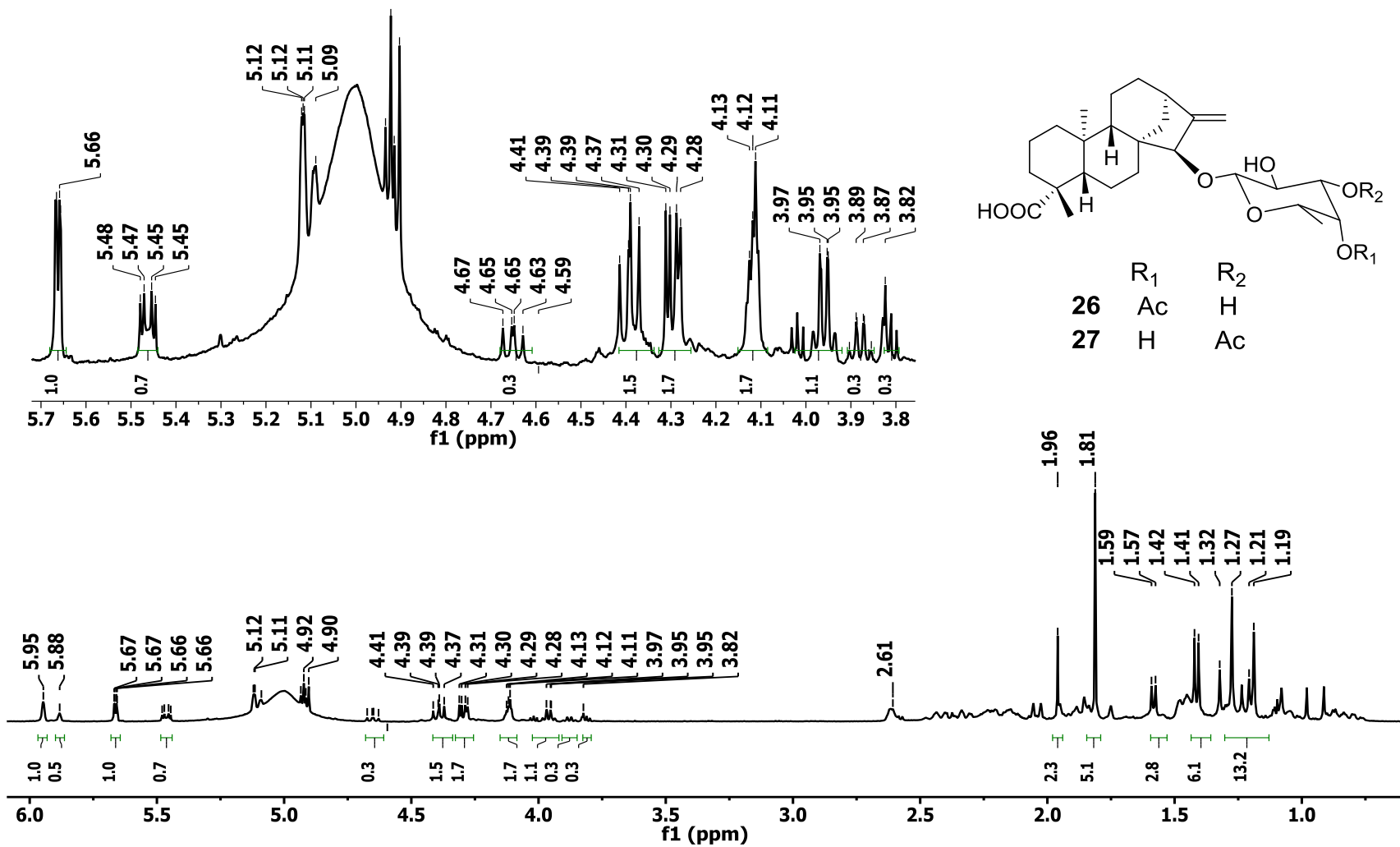


Figura 48. Espectro de RMN ¹H (piridina-d₅, 500 MHz) de la mezcla de los compuestos 26 y 27.

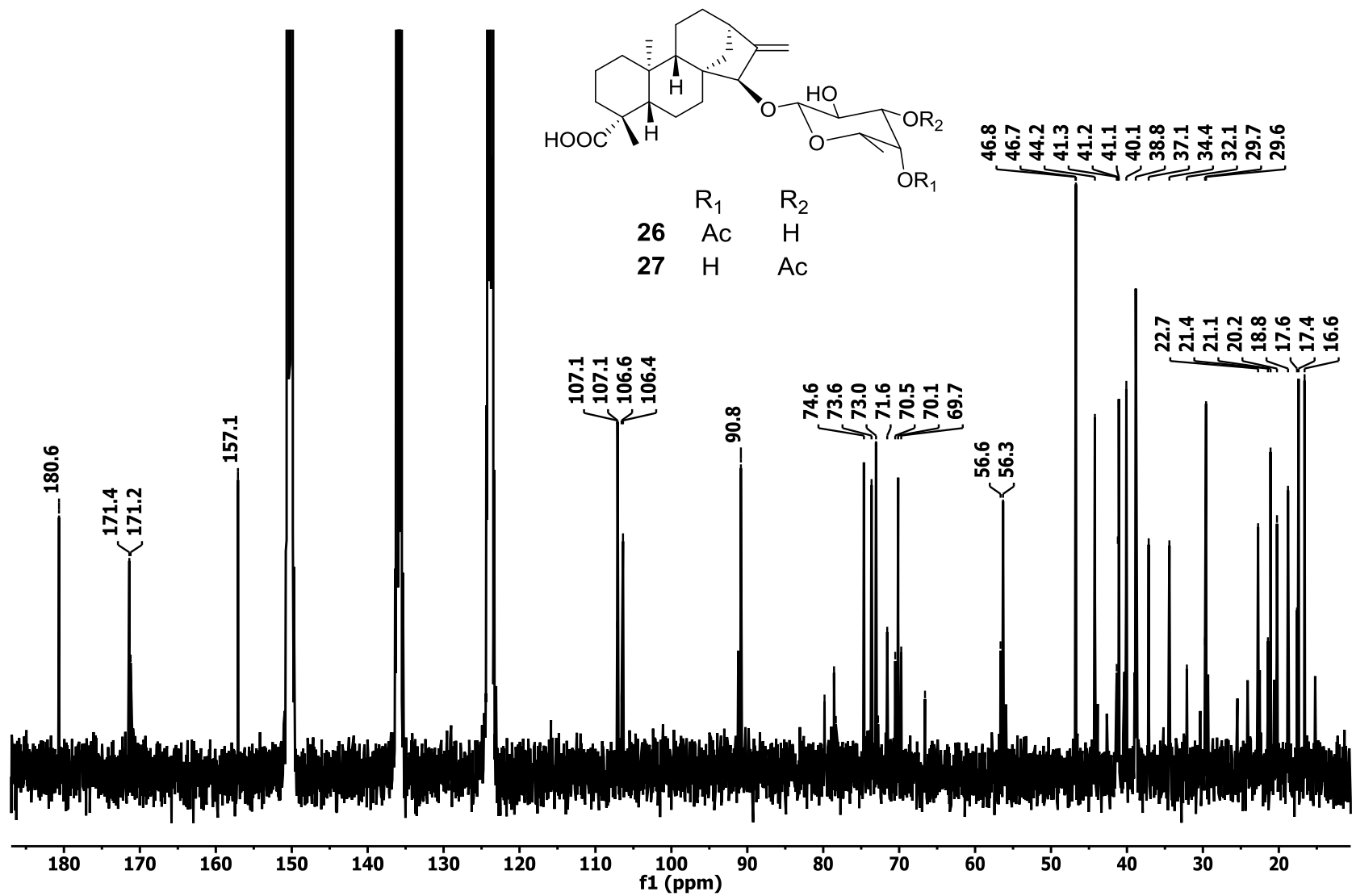


Figura 49. Espectro de RMN ¹³C (piridina-*d*₅, 125 MHz) de la mezcla de los compuestos **26** y **27**.

Tabla 1. Datos cristalográficos y de refinamiento para el compuesto 9.

Código de identificación	231QUL13	
Fórmula empírica	C ₂₁ H ₂₀ O ₇	
Peso molecular	384.37	
Temperatura	298 (2) K	
Longitud de onda	0.71073 Å	
Sistema cristalino	Monoclínico	
Grupo espacial	P 2 ₁	
Dimensiones de celda unitaria	a = 8.7340 (4) Å	α = 90°.
	b = 11.2293 (5) Å	β = 106.1860 (10)°.
	c = 10.4223 (4) Å	γ = 90°.
Volumen	981.67 (7) Å ³	
Z	2	
Densidad (calculada)	1.300 Mg/m ³	
Coefficiente de absorción	0.098 mm ⁻¹	
F (000)	404	
Tamaño del cristal	0.413 x 0.358 x 0.232 mm ³	
Rango Theta para la colección	2.035 a 25.264°.	
Índice de rangos	-10 ≤ h ≤ 10, -13 ≤ k ≤ 13, -12 ≤ l ≤ 12	
Reflexiones colectadas	9987	
Reflexiones independientes	3561 [R (int) = 0.0731]	
Integridad para Theta = 25.242°	99.9 %	
Corrección de la absorción	Ninguna	
Método de refinamiento	Matriz completa de mínimos cuadrados en F ²	
Datos / restricciones / parámetros	3561 / 122 / 293	
Bondad de ajuste sobre F ²	0.928	
Índice R final	R1 = 0.0354, wR2 = 0.0618	
Índices R (Todos los datos)	R1 = 0.0733, wR2 = 0.0736	
Parámetro de estructura absoluta	0.1 (6) la estructura absoluta no puede ser determinada confiablemente	

Tabla 2. Datos cristalográficos y de refinamiento para el compuesto 28.

Código de identificación	246QUL15	
Fórmula empírica	C ₁₅ H ₁₄ O ₄	
Peso molecular	258.26	
Temperatura	296 (2) K	
Longitud de onda	0.71073 Å	
Sistema cristalino	Monoclínico	
Grupo espacial	P 2 ₁ /c	
Dimensiones de celda unitaria	a = 7.5238 (9) Å	α = 90°.
	b = 24.168 (3) Å	β = 92.930 (5)°.
	c = 14.6577 (19) Å	γ = 90°.
Volumen	2661.8 (6) Å ³	
Z	8	
Densidad (calculada)	1.289 Mg/m ³	
Coefficiente de absorción	0.094 mm ⁻¹	
F (000)	1088	
Tamaño del cristal	0.423 x 0.260 x 0.240 mm ³	
Rango Theta para la colección	2.711 a 25.429°.	
Índice de rangos	-9 ≤ h ≤ 9, -29 ≤ k ≤ 28, -17 ≤ l ≤ 17	
Reflexiones colectadas	24532	
Reflexiones independientes	4856 [R (int) = 0.0906]	
Integridad para Theta = 25.242°	99.7 %	
Corrección de la absorción	Ninguno	
Método de refinamiento	Matriz completa de mínimos cuadrados en F ²	
Datos / restricciones / parámetros	4856 / 2 / 351	
Bondad de ajuste sobre F ²	1.050	
Índice R final	R1 = 0.0472, wR2 = 0.1241	
Índices R (Todos los datos)	R1 = 0.0623, wR2 = 0.1359	

Tabla 3. Datos cristalográficos y de refinamiento para el compuesto 33

Código de identificación	274QUL14
Fórmula empírica	C ₂₀ H ₃₀ O ₃
Peso molecular	318.44
Temperatura	299(2) K
Longitud de onda	1.54178 Å
Sistema cristalino	Ortorrómbico
Grupo espacial	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Dimensiones de celda unitaria	a = 9.8171 (2) Å α = 90°. b = 10.8252 (2) Å β = 90°. c = 33.6771 (5) Å γ = 90°.
Volumen	3578.94 (6) Å ³
Z	8
Densidad (calculada)	1.182 Mg/m ³
Coefficiente de absorción	0.610 mm ⁻¹
F (000)	1392
Tamaño del cristal	0.316 x 0.276 x 0.154 mm ³
Rango Theta para la colección	2.624 a 68.360°.
Índice de rangos	-11 ≤ h ≤ 11, -13 ≤ k ≤ 11, -40 ≤ l ≤ 40
Reflexiones colectadas	29025
Reflexiones independientes	6538 [R (int) = 0.0731]
Integridad para Theta = 25.242°	99.9 %
Corrección de la absorción	Analítica
Método de refinamiento	Matriz completa de mínimos cuadrados en F ²
Datos / restricciones / parámetros	6538 / 2 / 427
Bondad de ajuste sobre F ²	1.095
Índice R final	R1 = 0.0445, wR2 = 0.1067
Índices R (Todos los datos)	R1 = 0.0500, wR2 = 0.1113
Parámetro de estructura absoluta	-0.01 (11)

9. PUBLICACIONES

Bustos-Brito, C., Sánchez-Castellanos, M., Esquivel, B., n, J. S., Calzada, 136
F., Yepez-Mulia, F., - n, A., Joseph-Nathan, P., Cuevas, G.,
Quijano, L. 2014. Structure, Absolute Configuration, and Antidiarrheal Activity of a
Thymol Derivative from *Ageratina cylindrica*. *Journal of Natural Products*, 77, 358-
363. DOI: 10.1021/np400964w

Bustos-Brito, C., Sánchez-Castellanos, M., Esquivel, B., n, J. S., Calzada, 142
F., Yepez-Mulia, F., Joseph-Nathan, P., Cuevas, G., Quijano, L. 2015. *ent*-Kaurene
Glycosides from *Ageratina cylindrica*. *Journal of Natural Products*. DOI:
10.1021/acs.jnatprod.5b00488

Structure, Absolute Configuration, and Antidiarrheal Activity of a Thymol Derivative from *Ageratina cylindrica*

Celia Bustos-Brito,[†] Mariano Sánchez-Castellanos,[†] Baldomero Esquivel,[†] José S. Calderón,[†] Fernando Calzada,^{†,§} Lilian Yopez-Mulia,^{†,§} Angelina Hernández-Barragán,[‡] Pedro Joseph-Nathan,[‡] Gabriel Cuevas,[†] and Leovigildo Quijano*[†]

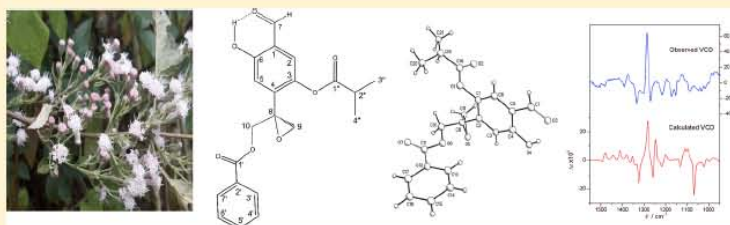
[†]Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, D.F., 04510 México

[‡]Unidad de Investigación Médica en Farmacología, 2o Piso CORCE, UMAE Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, Avenida Cuauhtémoc 330, México, D.F., 06725 México

[§]Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, UMAE Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, México City, D.F., 06725 México

[‡]Departamento de Química, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Apartado 14-740, México, D.F., 07000 México

5 Supporting Information



ABSTRACT: The leaves of *Ageratina cylindrica* afforded a thymol derivative that was characterized by physical and spectroscopical methods as (8*S*)-8,9-epoxy-6-hydroxy-10-benzoyloxy-7-oxothymol isobutyrate (1). The absolute configuration of 1 was established as 8*S* by vibrational circular dichroism spectroscopy in combination with density functional theory calculations and by evaluation of the Flack and Hooft X-ray parameters. Compound 1 showed weak antiprotozoal activity against *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* trophozoites and a high inhibitory effect on hyperpropulsive movement of the small intestine in rats.

Ageratina cylindrica (McVaugh) R. M. King & H. Rob (Asteraceae) is endemic to Mexico, with distribution in the states of Jalisco, Mexico, Michoacan, and Morelos. This nation is a main center of diversification of Asteraceae, with about 361 genera and 3021 species, of which more than 60% are endemic.¹ It is well known that several Asteraceae species are used as traditional herbal medicines throughout the world, and thymol derivatives are well represented in the family Asteraceae,² particularly within the tribes Senecioneae, Eupatorieae, Inuleae, and Helenieae. All known chiral 8,9-epoxythymol derivatives, isolated from the genera *Donoricum*,³ *Inula*,^{4,5} *Marshallia*,⁶ *Kaunia*,⁷ *Calea*,⁸ *Ageratina*,^{9,10} *Arnica*,¹¹ *Hofmeisteria*,¹² *Asteriscus*,¹³ *Vieraea*,¹⁴ *Callilepis*,¹⁵ *Bishovia*,¹⁶ *Porophyllum*,¹⁷ *Schizogyne*,¹⁸ and *Carpesium*,¹⁹ are reported as oils whose absolute configuration has not yet been determined. Recently, the biological activities of thymol derivatives have attracted considerable attention, since these compounds have shown significant antibacterial, cytotoxic, and phytotoxic properties.^{12,20}

Diarrheal disease is one of the most common causes of morbidity and mortality in many developing countries. It is the

leading cause of child death, and it has been estimated that the disease causes about three million deaths of children under 5 years of age per year.²¹ Patients suffering from diarrhea or dysentery usually show a wide range of symptoms such as stomachache, cramps, bloating, or tenderness. Two of the most common causes of such symptoms are *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*, protozoa that cause amoebic dysentery and giardiasis, respectively. Investigation of new powerful and selective agents to improve the therapy for diarrheal disease has been increased, and natural products play a crucial role in the development of a new generation of antidiarrheal drugs.

In this paper we describe the isolation, structural characterization, and antidiarrheal activity of the thymol derivative 1 from *A. cylindrica*. Its absolute configuration, the first one for a chiral 8,9-epoxythymol derivative, was established by vibrational circular dichroism (VCD) and X-ray crystallography.

Received: November 25, 2013

Published: February 6, 2014

RESULTS AND DISCUSSION

Chromatographic separation of a CH_2Cl_2 extract of the leaves of *A. glandulosus* by the technique of (R_f) - (R_f) -supercritical hydrocarbon-benzene-supercritical-methanol-miscutrate (1), where maximum resolution was established at $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}_2$ by HPLC-VS, the $[\text{M} - \text{N}]^+$ ion at m/z 407.130 (calculated 407.1199) and ^{10}H HMR spectroscopic data. Compound 1 was fully characterized by its physical and spectroscopic constants including ^1H and ^{13}C NMR data (Table 1). The resonances were assigned using

Table 1. NMR Data (^1H 400 MHz, ^{13}C 100 MHz, CDCl_3) of 1

atom	δ_c	δ_h	$J_{\text{C-H}}$ (Hz)	HMBC
1	136.1	C		
2	129.4	CH	157.4 (14)	1, 3, 4, 5, 6
3	141.1	C		
4	137	C		
5	10.7	CH	151.42 (55.16)	1, 3, 5, 6
6	59.2	C		
7	123.2	CH	142.4 (18)	1, 3, 5, 6
8	17.1	C		
9	51.7	CH ₂	175.0 (17)	1, 3, 5, 6
10	57.4	CH ₂	142.4 (18)	1, 3, 5, 6
10a	57.4	CH ₂	142.4 (18)	1, 3, 5, 6
10b	57.4	CH ₂	142.4 (18)	1, 3, 5, 6
11	168.7	C		
12	173.7	C		
13, 7	124.5	CH	75.0 (1)	1, 3
14, 8	174.7	CH	74.9 (1)	
15	124.4	CH	75.0 (1)	
16	124.4	C		
17	168.7	C		
18	14.1	CH	155.3 (16)	1, 3, 5, 6
19	16	CH ₂	152.0 (16)	1, 3
20	16.7	CH	154.1 (16)	1, 3
21			10.98	1, 3, 5, 6

^{10}H resonance.

COSY, HMQC, and HMBC correlations. The ^1H HMR spectra (400°C) exhibited a broad multiplet resonance at δ 7.12 and 7.21 assigned to H-2 and H-5, respectively. A doublet resonance signal at δ 11.62 (exchangeable with D_2O) and a doublet ($J = 6.8\text{ Hz}$) at δ 5.85 are attributable to the hydrogen bonded OH, and the $\text{C}=\text{O}$ formed group. HMBC correlations of aromatic protons with the quaternary aromatic C-1 (δ 136.1) and C-3 (δ 141.1) resonances together with couplings at the methoxy proton with C-2 (δ 129.4) and the formyl proton with the C-1 (δ 136.1) confirmed the 2,5-substitution.

Resonance at δ 5.96 (2H), 5.56 (1H), and 7.43 (2H) indicated the presence of a benzene moiety, while a singlet at δ 2.97 (3H) and two doublets at δ 1.22 (2H) and 1.54 (3H) revealed the presence of an isobutanoic group. The AB quart system with doublets at δ 3.5 (3.8 Hz) = 57.4 Hz and 4.85, 1.5 ($J = 12.1\text{ Hz}$) were attributed to the C-9 and C-10 methylene protons, ranging to a vicinal ester and methine functions, respectively. The ^{13}C NMR spectroscopic data (100°C) showed 19 resonances including 2 carbon atoms that corresponded to two CH_2 , two CH , nine $\text{C}=\text{O}$ groups, and eight aromatic C atoms, according to a DEPT experiment.

The location of the ester groups was established via correlations observed in the HMBC experiment. The formyl

group was located at C-10 since the 15.11 methylene protons at δ 4.85 and 3.5 correlated with the carbonyl carbon at δ 166.1, which also correlated with the aromatic protons at δ 7.55. Therefore, the isobutanoic moiety must be placed at C-3. Structure 1 has been assigned to a natural product of the *A. glandulosus* (DC), based upon literature ^{13}C NMR, IR, and MS data.

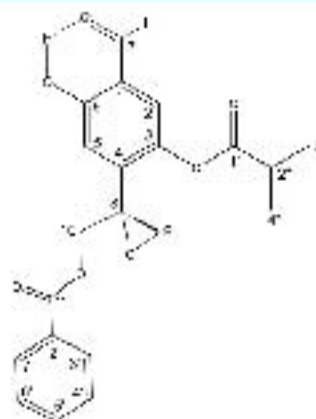


Figure 1. Structure of 14) (R_f) - (R_f) -supercritical hydrocarbon-benzene-supercritical-methanol-miscutrate (1).

The absolute configuration of 1 was defined by VCD spectroscopy in the mid-IR region. The most reliable involved computing the experimental and the density functional theory (DFT) level calculated wavenumbers. In this process, a conformational search was carried using the Merck Conformer based on the M3M198 protocol. This analysis provided 232 minimum energy conformers in a 10 kcal/mol energy window. The 100 conformers in the 5 kcal/mol gap were submitted to a single-point calculation at the B3LYP/6-31G(d,p) level. The first 10 conformers (1-10) in the 5 kcal/mol range were then optimized at the D3LYP/6-31G(d,p) level in the gas phase to provide 31 conformers in the initial 5 kcal/mol gap with no imaginary harmonic vibrational frequencies calculated at the same level of theory. Finally, the remaining 67 of these conformations were fully labeled. The number of conformers was reduced by eliminating those with a conformer population of less than 1% calculated according to Boltzmann distribution. The 19 conformers selected represented 94.5% of the conformer-out equilibrium. The dipole and rotational strengths of the IR and VCD spectra of each conformer were processed using Turbomole. Calculations with a bandwidth of 6 cm^{-1} . Finally, a Boltzmann-weighted spectrum was obtained. Table 2 shows the data obtained using the Gaussian09 software.²¹ The IR and VCD spectral similarity, σ_{IR} and σ_{VCD} are 86.3 and 50.8, respectively, with a confidence level of only 70%, showing that the experimental data did not match well and, therefore, a higher level of theory for the calculations was required.

Some reported cases of molecules with this behavior yielded better results when wavenumbers were using the B3LYP/6-31 correlation energy functional.^{22,23} On this basis, the same conformational search was followed with the B3LYP/6-31 functional. The IR and VCD spectra were computed considering only 19 conformers representing 94.5% of the total Boltzmann population. VCD data are apparently similar to

Table 2. Confidence Level Data for the IR and VCD Spectra of (–)-**1** (X) (R)-Epangylohydric-(R)-heptyl-(1S)-7-aminoindole Isohydrate (**1**). Calculated with DFT at Different Levels of Theory

method	IR ^a	IR ^b	IR ^c	IR ^d	IR ^e	VCD ^f	VCD ^g
B3LYP/6-31G(d,p)	97.1	98.7	98.8	98.7	98.8	96.9	97.8
B3LYP/6-31G(d,p)	94.0	92.8	92.9	92.4	92.2	90.0	90.8
B3LYP/6-31G(d,p)	100	99.7	99.7	94	93.1	90	94

^aAmplitude index for IR spectra and VCD spectra systems for the correct conformation. ^bVCD spectra similarity for the correct conformation. ^cAmplitude similarity index calculated as $\sigma = 5 \times \sqrt{\text{confidence level}}$ for the stereochemical assignments. ^dIR VCD assignment per confidence level using a scale of 0–100, precision of 0.01 units and 0.05 of RMS.

numbers increased significantly with a confidence level of 100%. Comparison of the calculated IR and VCD spectra with the corresponding experimental spectra of **1** shows that the B3LYP/6-31G(d,p) IR and VCD spectra are in better agreement with the experimental spectra than those calculated with the B3LYP functional (Table 2).

Although it is well known that B3LYP and B3LYP/6-31G(d,p) functionals overestimate the vibrational frequencies,^{34–36} the comparison of VCD spectra calculated with the Conformer-Dependent Confidence Indicator (IR spectrum scaling factor)³⁵ and the same basis set (Table 2) shows that although the similarity index of the IR spectra is smaller, the comparison of the VCD spectra is better with this functional than with the B3LYP and B3LYP/6-31G(d,p) functionals. Table 2 further shows that the CPU time using the B3LYP functional is almost half of the time or another when using the B3LYP/6-31G(d,p) functional and the same basis set. Table 3 shows the conformational distribution and relative energies of the 16 low-energy conformers, which represent 99.99% of the Boltzmann population, considered for the calculation of the spectra at this level of theory. The IR, VCD, and calculated VCD spectra, together with the experimental spectra, are

shown in Figure 2, thus permitting the assignment of the R_a absolute configuration of **1**.

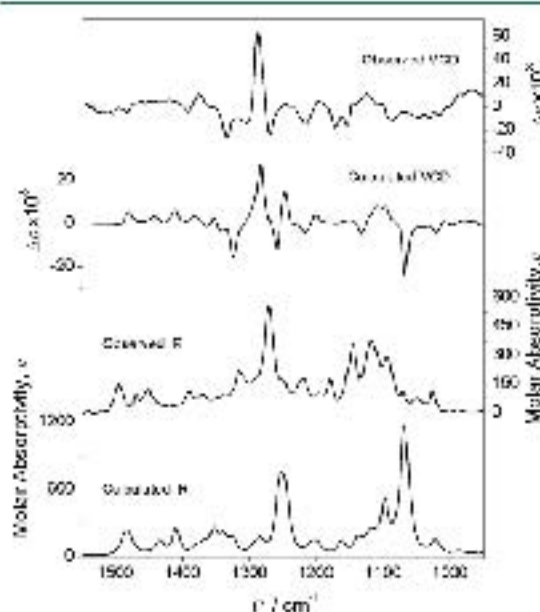


Figure 2. Comparison of the experimental and calculated IR and VCD spectra of **1** on the B3LYP/6-31G(d,p) level.

A single crystal of **1** was mounted on a X-ray diffractometer equipped with Cu K α monochromated radiation and a goniometer detector permitting the collection of the complete sphere of data. The molecular structure was solved by direct methods and refined to a discrepancy index of 0.03. The complete sphere dataset was used to calculate the harker points,³⁷ which for the enantiomer shown in Figure 1 was $\alpha = -0.12$, and the Harker parameter,³⁸ which was $\gamma = 0.02(5)$ for the harker stretch. These parameters were $\alpha = 0.12(5)$ and $\gamma = 0.06(5)$, respectively, hence the correct enantiomer is the one depicted in Figure 1, in agreement with the VCD result.

Compound **1** was investigated for its optical activity (Table 4) against various chiral auxiliary and Glavin auxiliary, it showed weak activity against some proteins.^{39–42} On the charcoal-gum adsorbent, it was optically inactive in aq.⁴³

Table 3. Relative Energies and Conformational Populations (%) of **1**

conformer	$\Delta E_{\text{rel}}^{\text{B3LYP}}$	$\%_{\text{pop}}^{\text{B3LYP}}$	$\Delta E_{\text{rel}}^{\text{B3LYP/6-31G(d,p)}}$	$\%_{\text{pop}}^{\text{B3LYP/6-31G(d,p)}}$	$\Delta E_{\text{rel}}^{\text{B3LYP/6-31G(d,p)}}$	$\%_{\text{pop}}^{\text{B3LYP/6-31G(d,p)}}$	$\Delta E_{\text{rel}}^{\text{B3LYP/6-31G(d,p)}}$	$\%_{\text{pop}}^{\text{B3LYP/6-31G(d,p)}}$
a	0.0	18	0.00	55	0.00	17.9	0.00	48
b	2.80	7.6	0.32	2.7	2.50	10.7	2.71	15.3
c	1.90	5.9	0.19	5.8	1.77	10.8	1.96	9.1
d	2.00	5.8	0.19	5.8	1.83	10.5	1.94	9.3
e	4.90	1.9	0.58	1.9	4.36	10.9	4.37	6.1
f	3.00	3.1	1.10	2.7	2.78	10.8	2.78	3
g	3.10	2.9	0.19	2.9	2.90	10.7	2.91	3.5
h	2.21	4.6	0.31	4.5	2.00	10.4	2.01	5.0
i	1.30	4.8	0.65	3.1	2.00	8.4	1.63	12.3
j	2.30	3.7	0.19	3.6	1.60	10.7	1.78	7.1

^aRelative energy calculated with B3LYP method. ^bRelative energy calculated with B3LYP/6-31G(d,p) method. ^cPopulation calculated with B3LYP method. ^dPopulation calculated with B3LYP/6-31G(d,p) method. ^ePopulation calculated with B3LYP/6-31G(d,p) method. ^fPopulation calculated with B3LYP/6-31G(d,p) method. ^gPopulation calculated with B3LYP/6-31G(d,p) method. ^hPopulation calculated with B3LYP/6-31G(d,p) method. ⁱPopulation calculated with B3LYP/6-31G(d,p) method. ^jPopulation calculated with B3LYP/6-31G(d,p) method.

ent-Kaurene Glycosides from *Ageratina cylindrica*

Celia Bustos Brito,¹ Mariana Sánchez Castellanos,¹ Balduino Esquivel,¹ José S. Calderín,¹ Fernando Calzadilla,² Isabel Yáñez-Muñoz,³ Pedro Joseph Nathan,¹ Gabriel Cuevas,¹ and Isacvildin Quijano^{1,4*}

¹Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, México, D.F. 04510, México

²Unidad de Investigación Médica en Farmacología, 2.º Piso, COPEM, UMAP Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional SsA, Avda. Imbabura, Avenida Universidad 330, Col. Doctores, México, D.F. 06702, México

³Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, UNAM Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional SsA, Avda. Imbabura, Avda. de Ciudad Juárez, 330, Col. Doctores, México, D.F. 06725, México

⁴Departamento de Química, Centro de Investigación y de Estudios Científicos de la Universidad Nacional Autónoma de México, D.F. 07000, México

*Corresponding Author

ABSTRACT: The aqueous extract of the leaves of *Ageratina cylindrica* afforded six new ent-kaurene diol glycosides together with the known ent-kaurene pivalate V. The flavanone isoprenyl dihydrochalcone acid glycosides I–IV structures were elucidated mainly by NMR and MS methods and the absolute configuration was established by vibrational circular dichroism spectroscopy. The new compounds showed moderate antiparasitic activity against *Leishmania tropica* and *C. albicans*, moderate antifungal activity.



As a continuation of our search for antiparasitic compounds,¹ the chemical investigation of the aqueous extract of *Ageratina cylindrica* (Asteraceae) R. & S. King & H. Robinson (Asteraceae) yielded six new ent-kaurene diol glycosides. This type of compounds is seldomly found in species belonging to several families, we have reported in the literature,² although they are rarely found in the genera *Eupatorium* and *Ageratina*. Only three kaurenes have been isolated from *Ageratina macrocephala*.³ Kaurene glycosides and related compounds have attracted significant attention due to their therapeutic potential and economic value.⁴ In this regard, several glycosides isolated from the leaves of *Brownea concolor*, are natural sugar substrates against *Leishmania*,⁵ addition to the ethnomedical activities by analgesic,⁶ anticancer,⁷ antitumor,⁸ anti-epileptic,⁹ and anti-diarrheal agents.¹⁰

Leishmania kansasii and *Trypanosoma brucei* are parasites associated with parasitic infections for which metronidazole has proven to be effective. However, due to its adverse side effects, efforts for improving the drug for gastrointestinal amebiasis, dysentery are needed. In this sense, vegetal extracts have been used for many years in the treatment and prevention of several diseases, including parasitic infections. Some medicinal plants could be a source of new drugs with high activity and low toxicity. Hence, the isolation, structural characterization, and antiparasitic activity of six new ent-kaurene glycosides from *A. cylindrica* are discussed.

RESULTS AND DISCUSSION

Repeated chromatography of the aqueous extract of the leaves of *A. cylindrica* on Sephadex LH-20 and column chromatography silica gel, yielded six new compounds (1–6) together with the known ent-kaurene pivalate V ($[\alpha]_D^{25} + 10.8$),³ chlorogenic acid,¹¹ and a flavanone.¹² The compounds were fully characterized by their physical and spectroscopic properties including ¹H and ¹³C NMR data (Table 1 and 2). The resonances were assigned using COSY, HSQC, ROESY, and TOBSY correlations.

Compound 1 gave the molecular formula $C_{32}H_{48}O_{12}$ as determined by HRESIMS and ¹³C NMR data. The IR spectrum showed two proton bands for OH and C=O at 3301 and 1732 cm^{-1} , respectively. The ¹H and ¹³C NMR spectra of 1 were similar to those of 7. The ¹H NMR spectrum (Table 1) showed the absence of two methyl singlets at δ 1.28 and 1.30 and two olefinic singlets at δ 5.08 and 5.88 at an exocyclic methylene group, which showed crosspeaks with the methylene carbon signal at δ 105.8 in the HSQC experiment. The above data suggested an ent-kaurene diol acid derivative. Two doublets at δ 1.90 ($J = 8.0$ Hz) and δ 5.52 ($J = 8.0$ Hz), correlated with the carbon resonances at δ 107.7 and 96.2, respectively, were assigned to anomeric hydrogens, suggesting the presence of two sugar units. Their β -substitution follows from the

Received: June 9, 2015

Published: October 30, 2015

Table 1. NMR Data (^1H 100 MHz, ^{13}C 100 MHz, Pyridine- d_5) of 1 and 2

Position	1			2	
	$\delta_{\text{H}} (\text{ppm})$	$\delta_{\text{C}} (\text{ppm})$	Assignment	$\delta_{\text{H}} (\text{ppm})$	$\delta_{\text{C}} (\text{ppm})$
1a	1.53 (d, 3H)	41.3 (CD ₃)	2, 3, 9, 10, 17	1.78 (s)	41.3 (CD ₃)
1b	0.57 (d, 3H, $J = 6.9$)	33.0 (CD ₃)	5, 6, 11	0.76 (d, 3H, $J = 6.9$)	33.0 (CD ₃)
2a	2.13 (s)	39.0 (CD ₃)	8 (10 ³ Hz)	2.18 (s)	39.0 (CD ₃)
2b	1.83 (s)	18.9 (CD ₃)	1, 3, 9, 17	1.98 (s)	18.9 (CD ₃)
3a	2.59 (s)	18.9 (CD ₃)	2, 18, 19	2.18 (d, 1H, $J = 2.8$)	18.9 (CD ₃)
3b	1.93 (s)	—	5, 6, 11, 19	0.93 (d, 1H, $J = 4.9$)	—
4	—	44.6 (C)	—	—	44.6 (C)
5	1.72 (d, 2H, $J = 6.9$)	37.1 (C)	6, 10 (10, 19, 20)	1.10 (d, 2H, $J = 7.5$)	36.9 (C)
6a	2.48 (s, 3H)	11.9 (CD ₃)	4, 7, 8, 10	2.48 (s)	11.9 (CD ₃)
6b	3.19 (d, 2H, $J = 6.9$)	—	—	3.19 (s)	—
7a	2.55 (s)	19.0 (CD ₃)	22, 23 (10)	2.13 (s)	17.5 (CD ₃)
7b	1.88 (s)	—	6, 8	1.87 (s)	—
8	—	46.9 (C)	—	—	46.7 (C)
9	1.63 (s)	45.7 (C)	3, 10 (10, 14)	1.63 (s)	45.7 (C)
10	—	40.9 (C)	—	—	40.1 (C)
11	1.83 (s)	18.9 (CD ₃)	5, 10 (10)	1.91 (s)	18.9 (CD ₃)
12a	1.13 (s)	—	12	1.13 (s)	—
12b	1.91 (s)	34.1 (C)	13	1.83 (s)	34.1 (C)
13a	1.98 (s)	—	11, 14, 16, 17	1.44 (s)	—
13b	3.79 (s, s)	41.1 (C)	3, 11 (10, 19, 20)	3.78 (s, s)	41.1 (C)
14	1.35 (s)	37.1 (CD ₃)	9, 17 (19)	1.31 (s)	37.0 (CD ₃)
15a	1.93 (s)	—	9, 10 (10, 19, 20)	1.93 (d, 1H, $J = 10.1$)	—
15b	1.16 (1.27)	41.9 (CD ₃)	9, 16, 17	1.16 (1.24)	40.1 (CD ₃)
16	—	37.1 (C)	—	—	37.7 (C)
17a	3.55 (s, s)	18.0 (CD ₃)	12, 13, 15, 16	3.51 (s, s)	18.0 (CD ₃)
17b	3.43 (s, s)	—	17 (10, 19, 20)	3.59 (d, 1H)	—
18	1.28 (s)	39.1 (CD ₃)	5, 6, 11, 19	1.33 (s)	39.0 (CD ₃)
19	—	44.1 (C)	—	—	44.1 (C)
20	1.55 (s)	16.9 (CD ₃)	1, 3, 9, 10	1.58 (s)	16.9 (CD ₃)
21	0.57 (1.49)	37.1 (C)	17	0.47 (1.49)	37.0 (C)
22	1.91 (1.94)	37.4 (C)	1	1.75 (1.97)	37.1 (C)
23	4.12 (d, 2H, $J = 8.6$)	6.0 (CD ₃)	17 (8)	4.28 (d, 2H, $J = 4.9$)	6.5 (CD ₃)
24	1.41 (d, 2H, $J = 7.5$)	35.1 (C)	5	1.61 (d, 2H, $J = 7.5$)	35.1 (C)
25	3.63 (d, 1H, $J = 6.9$)	16.9 (CD ₃)	17 (10, 19)	3.63 (d, 1H, $J = 6.9$)	16.9 (CD ₃)
26	1.33 (1.37)	17.9 (CD ₃)	17 (8)	1.27 (1.31)	17.9 (CD ₃)
27	4.76 (1.49)	38.9 (C)	17 (9, 19)	4.78 (1.49)	38.7 (C)
28	1.72 (1.94)	39.9 (C)	17 (5, 10, 17)	1.75 (1.95)	39.9 (C)
29	4.12 (1.84)	6.5 (CD ₃)	27 (6)	4.18 (1.84)	6.5 (CD ₃)
30	1.36 (1.35)	31.9 (C)	17 (3, 6)	1.27 (1.35 (8.5))	31.9 (C)
31	4.43 (d, 2H, $J = 11.9$)	46.9 (CD ₃)	17 (10, 19, 20)	4.68 (d, 2H, $J = 11.9$)	46.9 (CD ₃)
32a	1.35 (d, 3H, $J = 7.5$)	17.9 (CD ₃)	17 (8)	1.27 (d, 3H, $J = 7.5$)	17.9 (CD ₃)
32b	4.43 (d, 1H, $J = 4.9$)	—	8	4.40 (d, 1H, $J = 4.9$)	—
CO ₂ CH ₃	—	—	—	1.91 (s)	31.1 (CD ₃)
OH	—	—	—	—	1.14 (C)

(*) in parentheses.

magnitude ($\delta = 11\%$) of the coupling constants. An additional methyl doublet at $\delta = 1.59$ ($J = 6.4$, 3H) suggested one of the sugar residues to be a methyl pentose moiety.

The location of the sugar moieties was determined by the 1D/2D correlations between the carbonyl groups at $\delta = 177$ (C-18) and the anomeric hydrogen at $\delta = 5.25$, indicating that one sugar moiety must be located at C-19 as an ester, while the other one must be located at C-15, since its anomeric doublet at $\delta = 4.82$ showed large coupling with ^1H carbonyl group at $\delta = 171$ ($J_{\text{CH}} = 4.11$) owing to its 1,5- d_2 J correlation. The spin system of the additional non-anomeric methyl ester and anomeric carbon of the hydrogen resonances were related through COSY and selective 1D TOCSY experiments. The NMR

correlation showed two spin systems from anomeric H-1' ($\delta_{\text{H}} = 6.28$ [$J = 9.8$ Hz]) to H-2' ($\delta_{\text{H}} = 4.42$, $J_{\text{H}} = 4.8$ Hz, 6.26) and from anomeric H-2'' ($\delta_{\text{H}} = 6.0$ [$J = 10.7$ Hz]) to H-3'' ($\delta_{\text{H}} = 5.9$ [$J = 17.8$ Hz]) (Table 1). Correlation of signals of H-H coupling constants and ^1H methyl resonances of the sugar moieties as β -phucopyranosyl and β -fucopyranosyl moieties, respectively.

The ^{13}C NMR data (Table 1) showed 33 resonances due to three methyl, 10 methylene, and 14 methine groups, four quaternary carbons, and one carbon of carbon-11, confirmed by DEPT experiment. Sixteen signals at low field are due, together with a carbonyl ($\delta = 174$) and a cyclohexenone ($\delta = 195.5$), are assignable to the laurene skeleton, while 10 methyls and one methylene in the $\delta = 5.26$ – 1.07 range

Table 3. NMR Data (^1H 400 MHz, ^{13}C 100 MHz, Pyridine- d_5) of 2–9.

position	3		4		4'	
	δ , (m, s)	δ	δ , (m, s)	δ	δ , (m, s)	δ
1 ^a	7.41 s	417.11	7.41 s	418.01 ₂	7.41 s	417.11 ₂
1 ^b	7.88, m (123.44 ^b)		8.37, m (136.67 ^b)		8.81, m (138.42 ^b)	
2	7.71 s	329.11 ₂	7.71 s	329.01 ₂	7.71 s	329.11 ₂
3	7.30 s		7.15 s		7.15 s	
3 ^a	7.51 m	360.18 ₂	7.99, m (135.64 ^b)	360.08 ₂	7.15 s	360.18 ₂
3 ^b	7.51 s		7.71 s		8.59, m (139.75 ^b)	
4		445.1		445.0		445.11
5	8.21 s	318.27 ^b	7.71 s	329.07 ^b	7.71, m (137.76 ^b)	318.27 ^b
6 ^a	7.61 m	374.11 ₂	7.11 m	368.01 ₂	7.11, m (139.01 ^b)	374.11 ₂
6 ^b	7.11 m		7.11 m		7.11 m	
7 ^a	7.22, m	372.05 ₂	7.71, m (139.01 ^b)	373.05 ₂	7.71, m (139.43 ^b)	372.05 ₂
7 ^b	7.01 m		7.71 m		7.71, m (139.01 ^b)	
8		463.0		463.0		463.0
9	7.71 m	357.11	7.71 m	357.01	7.15, m (137.01 ^b)	357.11
10		403.0		403.0		403.0
11	6.81 m	362.18 ₂	7.11 m	357.08 ₂	7.11 m	362.18 ₂
11	7.51 s		7.11 s		7.11 s	
12 ^a	7.61 m	343.11 ₂	7.11 m	338.01 ₂	7.11 m	343.11 ₂
12 ^b	7.51 s		7.11 s		7.11 s	
13	7.21, m, s	41.11	7.21 s	41.101	7.21 s	41.11
14 ^a	7.21 m	342.11 ₂	7.11, m (139.01 ^b)	343.01 ₂	7.11, m (139.01 ^b)	342.11 ₂
14 ^b	7.01 m		7.71, m (139.01 ^b)		7.71, m (139.43 ^b)	
15	7.01, m (74 ^b)	312.11	7.11 m	312.01	7.11, m (137.01 ^b)	312.11
16		372.0		372.0		372.0
17 ^a	7.51 s	357.11 ₂	7.11 s	357.01 ₂	7.11 s	357.11 ₂
17 ^b	7.01, m (139.01 ^b)		7.11, m (139.01 ^b)		7.11 s	
18	7.71 s	360.18 ₂	7.11 s	360.08 ₂	7.11 s	360.18 ₂
19		374.1		373.0		374.1
20	7.01 s	358.18 ₂	7.11 s	358.08 ₂	7.11 s	358.18 ₂
1	1.82, s (15 ^b)	37.127 ^b	1.81, s (8.0 ^b)	37.027 ^b	1.81, s (8.0 ^b)	37.127 ^b
2	4.61, m (17.0, 30 ^b)	37.027 ^b	4.44, m (17.0, 30 ^b)	37.027 ^b	4.39, m (17.0, 30 ^b)	37.027 ^b
3	5.15, m (19.0, 30 ^b)	38.511	4.74, m (19.0, 30 ^b)	38.501	4.39, m (19.0, 30 ^b)	38.511
4	4.21, m (6.0, 38 ^b)	75.027 ^b	4.79, m (6.0, 38 ^b)	75.127 ^b	5.66, m (6.0, 38 ^b)	75.027 ^b
5	3.81, m (4.0, 38 ^b)	71.511	3.45, m (4.0, 38 ^b)	71.501	3.45, m (4.0, 38 ^b)	71.511
6	1.34, s (6 ^b)	174.05 ₂	1.64, s (8.0 ^b)	173.05 ₂	1.42, s (6.0 ^b)	174.05 ₂
7	1.71, m (20 ^b)	357.11				357.11
8	1.11, m (8 ^b)	329.27 ^b				329.27 ^b
9 ^a	1.53, m (8.0 ^b)	360.18 ₂				360.18 ₂
9 ^b	1.53, m (8.0 ^b)	312.27 ^b				312.27 ^b
10 ^a	1.05, m (20.0, 40.0, 5.0 ^b)	329.18 ₂				329.18 ₂
10 ^b	1.71, m (17.0, 30 ^b)	357.27 ^b				357.27 ^b
11 ^a	4.39, m (123.44 ^b)					
COCH ₃	1.90	174.11 ₂			1.90 s	174.11 ₂
COOCH ₃		172.0				172.0

^aNMR was run in a 90 MHz for ^1H and 125 MHz for ^{13}C .

together with a methyl signal at δ 17.8, are due to the sugar moieties.

In the case of ent-kauric acid derivatives (i.e., C-13 configuration has been assigned by NOE effects between H-15/H-9 or H-15/H-14 for the *rac* and *pro* isomers, respectively²⁹ although these interactions were not observed in 1–6. Analysis of the multiplicity of the H-15 signal has also been used to assign the configuration at C-13. Nevertheless, inspection of the ^1H NMR data of related molecules reveals that the multiplet for H-15 have been reported either as a broad singlet or a doublet or a doublet of doublets, thus causing some ambiguity in the assignment of the configuration at C-13.³¹ Consequently, it was assumed to be unadvisable to assign the C-13 *rac* versus

configuration (*rac*) of the new compounds and, at the same time, to verify that they are enantiomers.

Comparison of the calculated and experimental vibrational circular dichroism (VCD) spectra is a sensitive technique for determining the *AC* of a single stereogenic center in the presence of several centers, and has allowed the determination of the *AC* of a significant number of natural products.³² VCD of natural product ester derivatives has shown good correlation analysis of free alcohols or acids, which often show intermolecular hydrogen-bond associations that can be compared with experimental and density functional theory (DFT)-calculated spectra,³³ and therefore it was decided to calculate model compound.

Chart 1

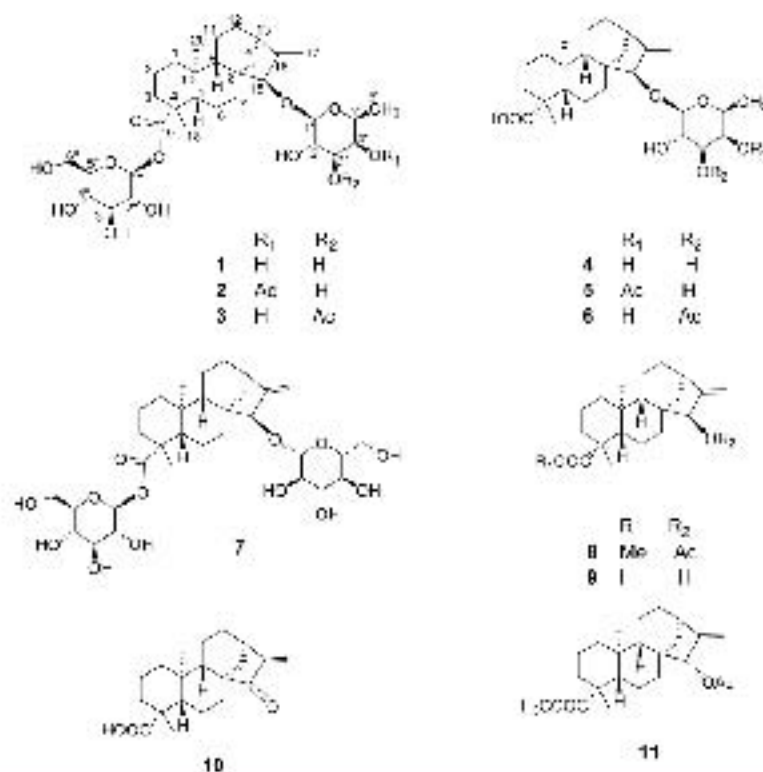


Table 3. Relative Energies and Conformational Populations of 8 and 11

conformer	ΔE_{rel}^a	ΔG_{rel}^b	ΔH_{rel}^c	ΔS_{rel}^d	ΔE_{rel}^a	ΔG_{rel}^b	ΔH_{rel}^c	ΔS_{rel}^d
8a	0.00	21.4	0.00	21.7	0.00	24.6	0.00	22.2
8b	0.04	6.17	0.01	6.11	0.00	6.60	0.00	6.60
11a	0.00	26.6	0.01	26.4	0.00	27.1	0.00	25.2
11b	0.14	4.6	0.07	4.62	0.00	6.26	0.00	6.26

^aMeaning: absolute energy (in kcal/mol) for 8 and 11, only. ^bMeaning: absolute population (in %), only. ^crelative energy (the lowest energy conformer of 8 and 11 were 0.00 kcal/mol and 0.00 kcal/mol, respectively). ^dConformational population energy (in kcal/mol) for conformer 8a (100%), 8b (94.9%), and conformer 11a (100%), 11b (85.0%) and for 8 (100%), 11 (137.0%) for conformer 11.

As a first step at 1 with various 5% HCl did not yield target compound 9. Instead, the carboxylic acid 10 was observed in addition to heptanoic and octanoic acid, which were identified as that of methylated derivatives by GC and IR positive ($3500\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$, e.g. for ν_{OH}) spectral rotations of the carboxylic acid derivatives, respectively. It is known that malic acid with a 1,2-dihydroxy group undergoes a Wagner-Meerwein rearrangement to which is related with a normal and its diastereoisomer (malic acid) while the epimeric 2,3-dihydroxy group is stable under these reaction conditions. This result suggested the pre-formation of the bicyclic moiety at C-15 (1).

With a view to obtaining 9 and to prevent the protomethylated Wagner-Meerwein rearrangement of 1 to 10, the oxidation/elimination sequence¹² was selected. Alkaline hydrolysis of 1 gave furfuryl derivative 1, which when treated with Na_2CO_3 and KOH gave decarboxylated acid (9)¹³ which without purification was subjected to acetylation followed by esterification with diazomethane to give methyl xylopic (9).

The absolute configuration of 8 and of its C-15 isomer 11, prepared from an authentic sample of grandifloric acid, was obtained by comparing the experimental and calculated IR and ^{13}C NMR spectra. A molecular model was constructed with the MMFF94 force field (provided 12 conformations) and the energy minima for each molecule ($\pm 0.001\text{ kcal/mol}$ energy window). Two conformers of each isomer with energy in the 0.2 kcal/mol gap (Table 3) accounted for 44.9% of the conformational populations of 8 and 11. These four conformations were submitted to single point calculation with the P3/6-31G hybrid functionals and the DGDZVP basis set. Same conformers 8a and 8b, as well as 11a and 11b, ranked within similar energy ranges, they were optimized at the same level of theory (Table 3). The dipole and rotational strengths, calculated at the B-3PW91/6-31G(d,p) level, were converted into molar absorptivity of each conformer using Lorentzian functions with a bandwidth of 6 cm^{-1} . Finally, the Boltzmann-weighted factor for each conformer obtained with the Gasteiger energy was

used to generate the calculated IR and VCD spectra. The solvent subtracted and calculated IR and VCD spectra for 8 and 11 are shown in Figures 1 and 2, respectively. Table 4 shows

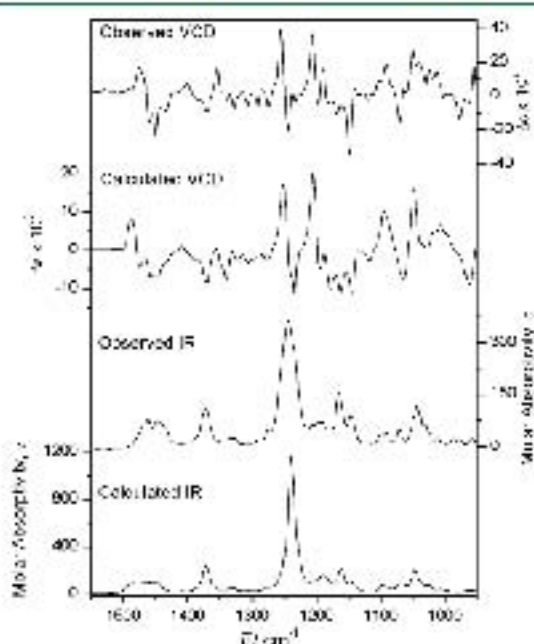


Figure 1. Comparison of the experimental and calculated IR and VCD spectra of 8.

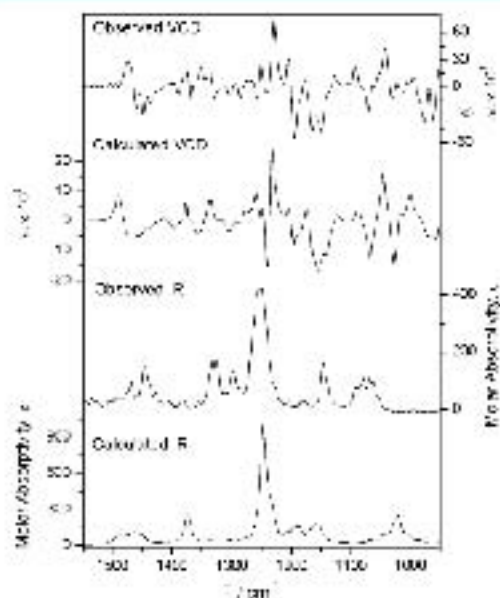


Figure 2. Comparison of the experimental and calculated IR and VCD spectra of 11.

the data obtained using the CompareVCD software.¹⁷ For compound 8 the IR and VCD spectra similarities, S_1 and S_2 ,¹⁸ are 95.1 and 86.1, respectively, with a confidence level of 100%, while for compound 11 the values are 97.0 and 83.9 with the

Table 1. Confidence Level Data for the IR and VCD Spectra of 8 and 11 and Cross-Comparisons

Compound	S_1 ^a	S_2 ^b	S_3 ^c	S_4 ^d	S_5 ^e	S_6 ^f
8	0.951	0.861	0.61	0.77	0.41	0.11
11	0.970	0.839	0.57	0.85	0.53	0.07
8 vs 11 ^g	0.999	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0
11 vs 8 ^h	0.970	0.51	0.07	0.0	0.0	0.0

^aMeasurements using ¹²C spectra similarity; ^bVCD spectra similarity for the correct enantiomer; ^cVCD spectra similarity for the incorrect enantiomer; ^dIR spectra similarity for the correct enantiomer; ^eIR spectra similarity for the incorrect enantiomer; ^fConfidence level for the stereochemical assignment; ^gExperiment 8 vs calculated 11 spectra comparison; ^hExperiment 11 vs calculated 8 spectra comparison.

same confidence level. As also shown in Table 1, cross-comparisons of the calculated and experimental spectra of 8 and 11 and vice versa show high values of the similarity of the IR and VCD spectra, but the confidence similarity index (ESI) and the confidence level are lower than those of the correct configuration, thus eliminating any doubt of the assignment of the IR spectra calculated for 8 and 11. It is important to note that the VCD spectra of 8 and 11 did not exhibit VCD pattern coupling¹⁹ of the carbonyl group signals.

The coupling axis at 1147 cm⁻¹ of compound 8 was also supported by the NOE effect between H-3 at δ 3.51 (2.5) and H-4 at δ 4.01 (1.20). Thus, the structure of 1 was defined as *anti*-15*R*-(3*R*)-fluorooxycarbonyl-15-en-19-*oic* and *beta*-glucopyranoside (3).

Compound 2 displayed a $[M]_D^{25} + 16.0$ (c 0.99) (99.93%) as determined by IRMSD5, which supports the molecular formula C₂₀H₂₈O₇. The ¹H and ¹³C NMR spectra (Table 1) of 2 displayed a pattern similar to that of 1, except for the presence of a sharp methyl singlet at δ 1.81 in the ¹H NMR spectrum and two extra carbon resonances (δ 17.4 and 21.1) in the ¹³C NMR spectrum associated with the presence of an acetate group. The ¹H NMR chemical shifts of the sugar moieties of 2 were comparable with those of 1, except for the deshielding of H-4' at δ 5.68 (dd, 3.6, 1.2 Hz) indicative of the presence of a C-4'. The HMQC correlations between the signal at δ 5.68 (1.4) and the methyl protons at δ 1.81 with the carbon resonance at δ 17.4 revealed the presence of an acetate group at C-4'. Consequently the structure of 2 was defined as *anti*-15*R*-(3*R*)-acetoxy-*beta*-fluorooxycarbonyl-15-en-19-*oic* acid *beta*-glucopyranoside ester.

Compound 3, as in the case of 2, showed a $[M]_D^{25} + 16.0$ (c 0.99) (99.93%), which together with the ¹³C NMR data indicated the molecular formula C₂₀H₂₈O₇. The ¹H and ¹³C NMR spectra (Table 1) showed resonances similar to those of 2, except for the chemical shifts of H-2' and H-4'. While in 2 the H-2' signal was deshielded to δ 5.42 (dd, 10.1, 3.2 Hz), H-2' was shielded as compared with compound 2, indicating the presence of the acetate group at C-2' in 3, and therefore 3 is a regioisomer of 2 possessing the *anti*-15*R*-(3*R*)-acetoxy-*beta*-fluorooxycarbonyl-15-en-19-*oic* acid *beta*-glucopyranoside ester structure.

The IRMSD5 data of 4 showed a $[M]_D^{25} + 16.0$ (c 0.99) (99.93%) (calculated for C₂₀H₂₈O₇ = Na, 480.2572), which supported the molecular formula C₂₀H₂₈O₇. The ¹³C NMR spectrum of 4 showed 26 carbon signals, 20 of them due to the glycerol moiety and six due to coupling with the ¹H and ¹³C NMR data (11.5%) of 4 were a fifth to three of 1, but added the glucose moiety resonances. Therefore, the structure of 4

was stabilized as an 15% (w/v) aqueous solution in 19 octanol.

A minor amount of a mixture of 5 and 6 (4.5 mg) was isolated. Their ^1H and ^{13}C NMR data (Table 2 for 5 and Supplemental Section for 6) were similar to those of 2 and 3, respectively, except for the absence of the glucose moiety resonances in 1–3. Although 5 and 6 were isolated as natural products, they could not be fully identified. Thus, enzymatic hydrolysis of a mixture of 1–3 using *Aspergillus* from almonds gave a sufficient quantity of 5 for its complete characterization, as shown in the Experimental Section and Table 2.

The antiprotozoal activity of 1–4 was tested on *Leishmania* and *Giardia lamblia* trophozoites (Table 3).

Table 3. In Vitro Antiprotozoal Activity of Compounds 1–4

Compound	IC ₅₀ (μM)***	
	<i>Leishmania</i>	<i>Giardia</i>
1	412 (45.8–412)	401 (32.1–412)
2	613 (591–613)	603 (569–613)
3	127 (123–127)	84 (5.9–107)
4	176 (138–214)	92 (33.2–114)
Control	32.5 (23–41.1)	0.51 (0.27–0.92)
Reference ^b	107 (103–111)	1.7 (1.17–2.41)

***IC₅₀ are expressed as mean (s.d.). CI, 95% confidence interval; standard deviation. **IC₅₀ and CI are \pm 0.05. *Positive controls.

general, all compounds showed moderate activity against both protozoa at IC₅₀ values ranging from 42.3 to 73.5 μM for *Leishmania* and from 1.9 to 99.0 μM for *G. lamblia*.

EXPERIMENTAL SECTION

General Experimental Procedures. Boiling points were measured on a Dean-Stark apparatus and are uncorrected. IR spectra were recorded on a Bruker Tensor 27 spectrometer. ^1H NMR was recorded on a Bruker Avance 300M Avance FT 300 spectrometer (10, 100, 500 MHz). ^{13}C and 2D NMR experiments were performed on a Bruker Avance T spectrometer (400 MHz for ^1H and ^{13}C NMR) or a Varian Unity Inova 500 MHz for ^1H and ^{13}C NMR. Shifts were referenced to TMS and δ values are given in Hz. The HRMS data were recorded on a Waters Syn G5 HPLMS Q TOF mass spectrometer. The HPLC MS was performed on a Jvy AcroTOF (MS-T 100) mass spectrometer. Preparative TLC was carried out on activated Merck silica gel 70 (20% silica on 100 μm Evaporon, 40–60 μm, 400–400 mesh, Machery-Nagel, Stadstedt, L1120 (Pharmacia Biotech) and reversed-phase silica gel (Sigma-Aldrich) were used for semi-preparative purposes.

Plant Material. A specimen was collected from Tehuacan, State of Puebla, Mexico, in February 2013. The plant material was identified by José Luis Villaseca, and a voucher specimen (MEXU 1751) was deposited at the Jardín Botánico IMBIL, Jardín Botánico de México, UNAM, México City, Mexico.

Extraction and Isolation. The dried and ground leaves of *A. catalinae* (200 g) were added to boiling H₂O (1 L × 3) and filtered immediately. The mixture was filtered and then cooled to room temperature and evaporated to yield 83 g of residue. This material was fractionated over a Sephadex LH 20 column using MeOH as eluent to give four fractions (A–D). Fraction C (950 mg) was subjected to HPLC on a reversed-phase C₁₈ column (Phenomenex) using 10% silica gel, 90% isocratic mobile phase of MeOH:H₂O (1:3), 0.5% acetic acid, and a flow rate of 1 mL/min to obtain 20 fractions (25 mg each), which were numbered from 1 to 20. Fraction (70–110) by TLC evaluation (1–35 mg) was subjected to silica gel TLC eluting with 10% MeOH in CH₂Cl₂ (100:1), yielding 7 (25 mg, 1.20 mg)

was obtained from fraction 10, 3–102 mg (1 (25 mg, 0.01–0.02 mg) was isolated from fractions 18, 19, and 20), respectively (2.5 (1.7 mg) per a mixture of 5 and 6), and 1 (150 mg) crystallized from fraction 1, fraction C (1) (9 mg) eluted as a solid. The data are: ^1H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 4.60 (s, 1H, H-1), 4.60 (s, 1H, H-2), 4.60 (s, 1H, H-3), 4.60 (s, 1H, H-4), 4.60 (s, 1H, H-5), 4.60 (s, 1H, H-6), 4.60 (s, 1H, H-7), 4.60 (s, 1H, H-8), 4.60 (s, 1H, H-9), 4.60 (s, 1H, H-10), 4.60 (s, 1H, H-11), 4.60 (s, 1H, H-12), 4.60 (s, 1H, H-13), 4.60 (s, 1H, H-14), 4.60 (s, 1H, H-15), 4.60 (s, 1H, H-16), 4.60 (s, 1H, H-17), 4.60 (s, 1H, H-18), 4.60 (s, 1H, H-19), 4.60 (s, 1H, H-20), 4.60 (s, 1H, H-21), 4.60 (s, 1H, H-22), 4.60 (s, 1H, H-23), 4.60 (s, 1H, H-24), 4.60 (s, 1H, H-25), 4.60 (s, 1H, H-26), 4.60 (s, 1H, H-27), 4.60 (s, 1H, H-28), 4.60 (s, 1H, H-29), 4.60 (s, 1H, H-30), 4.60 (s, 1H, H-31), 4.60 (s, 1H, H-32), 4.60 (s, 1H, H-33), 4.60 (s, 1H, H-34), 4.60 (s, 1H, H-35), 4.60 (s, 1H, H-36), 4.60 (s, 1H, H-37), 4.60 (s, 1H, H-38), 4.60 (s, 1H, H-39), 4.60 (s, 1H, H-40), 4.60 (s, 1H, H-41), 4.60 (s, 1H, H-42), 4.60 (s, 1H, H-43), 4.60 (s, 1H, H-44), 4.60 (s, 1H, H-45), 4.60 (s, 1H, H-46), 4.60 (s, 1H, H-47), 4.60 (s, 1H, H-48), 4.60 (s, 1H, H-49), 4.60 (s, 1H, H-50), 4.60 (s, 1H, H-51), 4.60 (s, 1H, H-52), 4.60 (s, 1H, H-53), 4.60 (s, 1H, H-54), 4.60 (s, 1H, H-55), 4.60 (s, 1H, H-56), 4.60 (s, 1H, H-57), 4.60 (s, 1H, H-58), 4.60 (s, 1H, H-59), 4.60 (s, 1H, H-60), 4.60 (s, 1H, H-61), 4.60 (s, 1H, H-62), 4.60 (s, 1H, H-63), 4.60 (s, 1H, H-64), 4.60 (s, 1H, H-65), 4.60 (s, 1H, H-66), 4.60 (s, 1H, H-67), 4.60 (s, 1H, H-68), 4.60 (s, 1H, H-69), 4.60 (s, 1H, H-70), 4.60 (s, 1H, H-71), 4.60 (s, 1H, H-72), 4.60 (s, 1H, H-73), 4.60 (s, 1H, H-74), 4.60 (s, 1H, H-75), 4.60 (s, 1H, H-76), 4.60 (s, 1H, H-77), 4.60 (s, 1H, H-78), 4.60 (s, 1H, H-79), 4.60 (s, 1H, H-80), 4.60 (s, 1H, H-81), 4.60 (s, 1H, H-82), 4.60 (s, 1H, H-83), 4.60 (s, 1H, H-84), 4.60 (s, 1H, H-85), 4.60 (s, 1H, H-86), 4.60 (s, 1H, H-87), 4.60 (s, 1H, H-88), 4.60 (s, 1H, H-89), 4.60 (s, 1H, H-90), 4.60 (s, 1H, H-91), 4.60 (s, 1H, H-92), 4.60 (s, 1H, H-93), 4.60 (s, 1H, H-94), 4.60 (s, 1H, H-95), 4.60 (s, 1H, H-96), 4.60 (s, 1H, H-97), 4.60 (s, 1H, H-98), 4.60 (s, 1H, H-99), 4.60 (s, 1H, H-100), 4.60 (s, 1H, H-101), 4.60 (s, 1H, H-102), 4.60 (s, 1H, H-103), 4.60 (s, 1H, H-104), 4.60 (s, 1H, H-105), 4.60 (s, 1H, H-106), 4.60 (s, 1H, H-107), 4.60 (s, 1H, H-108), 4.60 (s, 1H, H-109), 4.60 (s, 1H, H-110), 4.60 (s, 1H, H-111), 4.60 (s, 1H, H-112), 4.60 (s, 1H, H-113), 4.60 (s, 1H, H-114), 4.60 (s, 1H, H-115), 4.60 (s, 1H, H-116), 4.60 (s, 1H, H-117), 4.60 (s, 1H, H-118), 4.60 (s, 1H, H-119), 4.60 (s, 1H, H-120), 4.60 (s, 1H, H-121), 4.60 (s, 1H, H-122), 4.60 (s, 1H, H-123), 4.60 (s, 1H, H-124), 4.60 (s, 1H, H-125), 4.60 (s, 1H, H-126), 4.60 (s, 1H, H-127), 4.60 (s, 1H, H-128), 4.60 (s, 1H, H-129), 4.60 (s, 1H, H-130), 4.60 (s, 1H, H-131), 4.60 (s, 1H, H-132), 4.60 (s, 1H, H-133), 4.60 (s, 1H, H-134), 4.60 (s, 1H, H-135), 4.60 (s, 1H, H-136), 4.60 (s, 1H, H-137), 4.60 (s, 1H, H-138), 4.60 (s, 1H, H-139), 4.60 (s, 1H, H-140), 4.60 (s, 1H, H-141), 4.60 (s, 1H, H-142), 4.60 (s, 1H, H-143), 4.60 (s, 1H, H-144), 4.60 (s, 1H, H-145), 4.60 (s, 1H, H-146), 4.60 (s, 1H, H-147), 4.60 (s, 1H, H-148), 4.60 (s, 1H, H-149), 4.60 (s, 1H, H-150), 4.60 (s, 1H, H-151), 4.60 (s, 1H, H-152), 4.60 (s, 1H, H-153), 4.60 (s, 1H, H-154), 4.60 (s, 1H, H-155), 4.60 (s, 1H, H-156), 4.60 (s, 1H, H-157), 4.60 (s, 1H, H-158), 4.60 (s, 1H, H-159), 4.60 (s, 1H, H-160), 4.60 (s, 1H, H-161), 4.60 (s, 1H, H-162), 4.60 (s, 1H, H-163), 4.60 (s, 1H, H-164), 4.60 (s, 1H, H-165), 4.60 (s, 1H, H-166), 4.60 (s, 1H, H-167), 4.60 (s, 1H, H-168), 4.60 (s, 1H, H-169), 4.60 (s, 1H, H-170), 4.60 (s, 1H, H-171), 4.60 (s, 1H, H-172), 4.60 (s, 1H, H-173), 4.60 (s, 1H, H-174), 4.60 (s, 1H, H-175), 4.60 (s, 1H, H-176), 4.60 (s, 1H, H-177), 4.60 (s, 1H, H-178), 4.60 (s, 1H, H-179), 4.60 (s, 1H, H-180), 4.60 (s, 1H, H-181), 4.60 (s, 1H, H-182), 4.60 (s, 1H, H-183), 4.60 (s, 1H, H-184), 4.60 (s, 1H, H-185), 4.60 (s, 1H, H-186), 4.60 (s, 1H, H-187), 4.60 (s, 1H, H-188), 4.60 (s, 1H, H-189), 4.60 (s, 1H, H-190), 4.60 (s, 1H, H-191), 4.60 (s, 1H, H-192), 4.60 (s, 1H, H-193), 4.60 (s, 1H, H-194), 4.60 (s, 1H, H-195), 4.60 (s, 1H, H-196), 4.60 (s, 1H, H-197), 4.60 (s, 1H, H-198), 4.60 (s, 1H, H-199), 4.60 (s, 1H, H-200), 4.60 (s, 1H, H-201), 4.60 (s, 1H, H-202), 4.60 (s, 1H, H-203), 4.60 (s, 1H, H-204), 4.60 (s, 1H, H-205), 4.60 (s, 1H, H-206), 4.60 (s, 1H, H-207), 4.60 (s, 1H, H-208), 4.60 (s, 1H, H-209), 4.60 (s, 1H, H-210), 4.60 (s, 1H, H-211), 4.60 (s, 1H, H-212), 4.60 (s, 1H, H-213), 4.60 (s, 1H, H-214), 4.60 (s, 1H, H-215), 4.60 (s, 1H, H-216), 4.60 (s, 1H, H-217), 4.60 (s, 1H, H-218), 4.60 (s, 1H, H-219), 4.60 (s, 1H, H-220), 4.60 (s, 1H, H-221), 4.60 (s, 1H, H-222), 4.60 (s, 1H, H-223), 4.60 (s, 1H, H-224), 4.60 (s, 1H, H-225), 4.60 (s, 1H, H-226), 4.60 (s, 1H, H-227), 4.60 (s, 1H, H-228), 4.60 (s, 1H, H-229), 4.60 (s, 1H, H-230), 4.60 (s, 1H, H-231), 4.60 (s, 1H, H-232), 4.60 (s, 1H, H-233), 4.60 (s, 1H, H-234), 4.60 (s, 1H, H-235), 4.60 (s, 1H, H-236), 4.60 (s, 1H, H-237), 4.60 (s, 1H, H-238), 4.60 (s, 1H, H-239), 4.60 (s, 1H, H-240), 4.60 (s, 1H, H-241), 4.60 (s, 1H, H-242), 4.60 (s, 1H, H-243), 4.60 (s, 1H, H-244), 4.60 (s, 1H, H-245), 4.60 (s, 1H, H-246), 4.60 (s, 1H, H-247), 4.60 (s, 1H, H-248), 4.60 (s, 1H, H-249), 4.60 (s, 1H, H-250), 4.60 (s, 1H, H-251), 4.60 (s, 1H, H-252), 4.60 (s, 1H, H-253), 4.60 (s, 1H, H-254), 4.60 (s, 1H, H-255), 4.60 (s, 1H, H-256), 4.60 (s, 1H, H-257), 4.60 (s, 1H, H-258), 4.60 (s, 1H, H-259), 4.60 (s, 1H, H-260), 4.60 (s, 1H, H-261), 4.60 (s, 1H, H-262), 4.60 (s, 1H, H-263), 4.60 (s, 1H, H-264), 4.60 (s, 1H, H-265), 4.60 (s, 1H, H-266), 4.60 (s, 1H, H-267), 4.60 (s, 1H, H-268), 4.60 (s, 1H, H-269), 4.60 (s, 1H, H-270), 4.60 (s, 1H, H-271), 4.60 (s, 1H, H-272), 4.60 (s, 1H, H-273), 4.60 (s, 1H, H-274), 4.60 (s, 1H, H-275), 4.60 (s, 1H, H-276), 4.60 (s, 1H, H-277), 4.60 (s, 1H, H-278), 4.60 (s, 1H, H-279), 4.60 (s, 1H, H-280), 4.60 (s, 1H, H-281), 4.60 (s, 1H, H-282), 4.60 (s, 1H, H-283), 4.60 (s, 1H, H-284), 4.60 (s, 1H, H-285), 4.60 (s, 1H, H-286), 4.60 (s, 1H, H-287), 4.60 (s, 1H, H-288), 4.60 (s, 1H, H-289), 4.60 (s, 1H, H-290), 4.60 (s, 1H, H-291), 4.60 (s, 1H, H-292), 4.60 (s, 1H, H-293), 4.60 (s, 1H, H-294), 4.60 (s, 1H, H-295), 4.60 (s, 1H, H-296), 4.60 (s, 1H, H-297), 4.60 (s, 1H, H-298), 4.60 (s, 1H, H-299), 4.60 (s, 1H, H-300), 4.60 (s, 1H, H-301), 4.60 (s, 1H, H-302), 4.60 (s, 1H, H-303), 4.60 (s, 1H, H-304), 4.60 (s, 1H, H-305), 4.60 (s, 1H, H-306), 4.60 (s, 1H, H-307), 4.60 (s, 1H, H-308), 4.60 (s, 1H, H-309), 4.60 (s, 1H, H-310), 4.60 (s, 1H, H-311), 4.60 (s, 1H, H-312), 4.60 (s, 1H, H-313), 4.60 (s, 1H, H-314), 4.60 (s, 1H, H-315), 4.60 (s, 1H, H-316), 4.60 (s, 1H, H-317), 4.60 (s, 1H, H-318), 4.60 (s, 1H, H-319), 4.60 (s, 1H, H-320), 4.60 (s, 1H, H-321), 4.60 (s, 1H, H-322), 4.60 (s, 1H, H-323), 4.60 (s, 1H, H-324), 4.60 (s, 1H, H-325), 4.60 (s, 1H, H-326), 4.60 (s, 1H, H-327), 4.60 (s, 1H, H-328), 4.60 (s, 1H, H-329), 4.60 (s, 1H, H-330), 4.60 (s, 1H, H-331), 4.60 (s, 1H, H-332), 4.60 (s, 1H, H-333), 4.60 (s, 1H, H-334), 4.60 (s, 1H, H-335), 4.60 (s, 1H, H-336), 4.60 (s, 1H, H-337), 4.60 (s, 1H, H-338), 4.60 (s, 1H, H-339), 4.60 (s, 1H, H-340), 4.60 (s, 1H, H-341), 4.60 (s, 1H, H-342), 4.60 (s, 1H, H-343), 4.60 (s, 1H, H-344), 4.60 (s, 1H, H-345), 4.60 (s, 1H, H-346), 4.60 (s, 1H, H-347), 4.60 (s, 1H, H-348), 4.60 (s, 1H, H-349), 4.60 (s, 1H, H-350), 4.60 (s, 1H, H-351), 4.60 (s, 1H, H-352), 4.60 (s, 1H, H-353), 4.60 (s, 1H, H-354), 4.60 (s, 1H, H-355), 4.60 (s, 1H, H-356), 4.60 (s, 1H, H-357), 4.60 (s, 1H, H-358), 4.60 (s, 1H, H-359), 4.60 (s, 1H, H-360), 4.60 (s, 1H, H-361), 4.60 (s, 1H, H-362), 4.60 (s, 1H, H-363), 4.60 (s, 1H, H-364), 4.60 (s, 1H, H-365), 4.60 (s, 1H, H-366), 4.60 (s, 1H, H-367), 4.60 (s, 1H, H-368), 4.60 (s, 1H, H-369), 4.60 (s, 1H, H-370), 4.60 (s, 1H, H-371), 4.60 (s, 1H, H-372), 4.60 (s, 1H, H-373), 4.60 (s, 1H, H-374), 4.60 (s, 1H, H-375), 4.60 (s, 1H, H-376), 4.60 (s, 1H, H-377), 4.60 (s, 1H, H-378), 4.60 (s, 1H, H-379), 4.60 (s, 1H, H-380), 4.60 (s, 1H, H-381), 4.60 (s, 1H, H-382), 4.60 (s, 1H, H-383), 4.60 (s, 1H, H-384), 4.60 (s, 1H, H-385), 4.60 (s, 1H, H-386), 4.60 (s, 1H, H-387), 4.60 (s, 1H, H-388), 4.60 (s, 1H, H-389), 4.60 (s, 1H, H-390), 4.60 (s, 1H, H-391), 4.60 (s, 1H, H-392), 4.60 (s, 1H, H-393), 4.60 (s, 1H, H-394), 4.60 (s, 1H, H-395), 4.60 (s, 1H, H-396), 4.60 (s, 1H, H-397), 4.60 (s, 1H, H-398), 4.60 (s, 1H, H-399), 4.60 (s, 1H, H-400), 4.60 (s, 1H, H-401), 4.60 (s, 1H, H-402), 4.60 (s, 1H, H-403), 4.60 (s, 1H, H-404), 4.60 (s, 1H, H-405), 4.60 (s, 1H, H-406), 4.60 (s, 1H, H-407), 4.60 (s, 1H, H-408), 4.60 (s, 1H, H-409), 4.60 (s, 1H, H-410), 4.60 (s, 1H, H-411), 4.60 (s, 1H, H-412), 4.60 (s, 1H, H-413), 4.60 (s, 1H, H-414), 4.60 (s, 1H, H-415), 4.60 (s, 1H, H-416), 4.60 (s, 1H, H-417), 4.60 (s, 1H, H-418), 4.60 (s, 1H, H-419), 4.60 (s, 1H, H-420), 4.60 (s, 1H, H-421), 4.60 (s, 1H, H-422), 4.60 (s, 1H, H-423), 4.60 (s, 1H, H-424), 4.60 (s, 1H, H-425), 4.60 (s, 1H, H-426), 4.60 (s, 1H, H-427), 4.60 (s, 1H, H-428), 4.60 (s, 1H, H-429), 4.60 (s, 1H, H-430), 4.60 (s, 1H, H-431), 4.60 (s, 1H, H-432), 4.60 (s, 1H, H-433), 4.60 (s, 1H, H-434), 4.60 (s, 1H, H-435), 4.60 (s, 1H, H-436), 4.60 (s, 1H, H-437), 4.60 (s, 1H, H-438), 4.60 (s, 1H, H-439), 4.60 (s, 1H, H-440), 4.60 (s, 1H, H-441), 4.60 (s, 1H, H-442), 4.60 (s, 1H, H-443), 4.60 (s, 1H, H-444), 4.60 (s, 1H, H-445), 4.60 (s, 1H, H-446), 4.60 (s, 1H, H-447), 4.60 (s, 1H, H-448), 4.60 (s, 1H, H-449), 4.60 (s, 1H, H-450), 4.60 (s, 1H, H-451), 4.60 (s, 1H, H-452), 4.60 (s, 1H, H-453), 4.60 (s, 1H, H-454), 4.60 (s, 1H, H-455), 4.60 (s, 1H, H-456), 4.60 (s, 1H, H-457), 4.60 (s, 1H, H-458), 4.60 (s, 1H, H-459), 4.60 (s, 1H, H-460), 4.60 (s, 1H, H-461), 4.60 (s, 1H, H-462), 4.60 (s, 1H, H-463), 4.60 (s, 1H, H-464), 4.60 (s, 1H, H-465), 4.60 (s, 1H, H-466), 4.60 (s, 1H, H-467), 4.60 (s, 1H, H-468), 4.60 (s, 1H, H-469), 4.60 (s, 1H, H-470), 4.60 (s, 1H, H-471), 4.60 (s, 1H, H-472), 4.60 (s, 1H, H-473), 4.60 (s, 1H, H-474), 4.60 (s, 1H, H-475), 4.60 (s, 1H, H-476), 4.60 (s, 1H, H-477), 4.60 (s, 1H, H-478), 4.60 (s, 1H, H-479), 4.60 (s, 1H, H-480), 4.60 (s, 1H, H-481), 4.60 (s, 1H, H-482), 4.60 (s, 1H, H-483), 4.60 (s, 1H, H-484), 4.60 (s, 1H, H-485), 4.60 (s, 1H, H-486), 4.60 (s, 1H, H-487), 4.60 (s, 1H, H-488), 4.60 (s, 1H, H-489), 4.60 (s, 1H, H-490), 4.60 (s, 1H, H-491), 4.60 (s, 1H, H-492), 4.60 (s, 1H, H-493), 4.60 (s, 1H, H-494), 4.60 (s, 1H, H-495), 4.60 (s, 1H, H-496), 4.60 (s, 1H, H-497), 4.60 (s, 1H, H-498), 4.60 (s, 1H, H-499), 4.60 (s, 1H, H-500), 4.60 (s, 1H, H-501), 4.60 (s, 1H, H-502), 4.60 (s, 1H, H-503), 4.60 (s, 1H, H-504), 4.60 (s, 1H, H-505), 4.60 (s, 1H, H-506), 4.60 (s, 1H, H-507), 4.60 (s, 1H, H-508), 4.60 (s, 1H, H-509), 4.60 (s, 1H, H-510), 4.60 (s, 1H, H-511), 4.60 (s, 1H, H-512), 4.60 (s, 1H, H-513), 4.60 (s, 1H, H-514), 4.60 (s, 1H, H-515), 4.60 (s, 1H, H-516), 4.60 (s, 1H, H-517), 4.60 (s, 1H, H-518), 4.60 (s, 1H, H-519), 4.60 (s, 1H, H-520), 4.60 (s, 1H, H-521), 4.60 (s, 1H, H-522), 4.60 (s, 1H, H-523), 4.60 (s, 1H, H-524), 4.60 (s, 1H, H-525), 4.60 (s, 1H, H-526), 4.60 (s, 1H, H-527), 4.60 (s, 1H, H-528), 4.60 (s, 1H, H-529), 4.60 (s, 1H, H-530), 4.60 (s, 1H, H-531), 4.60 (s, 1H, H-532), 4.60 (s, 1H, H-533), 4.60 (s, 1H, H-534), 4.60 (s, 1H, H-535), 4.60 (s, 1H, H-536), 4.60 (s, 1H, H-537), 4.60 (s, 1H, H-538), 4.60 (s, 1H, H-539), 4.60 (s, 1H, H-540), 4.60 (s, 1H, H-541), 4.60 (s, 1H, H-542), 4.60 (s, 1H, H-543), 4.60 (s, 1H, H-544), 4.60 (s, 1H, H-545), 4.60 (s, 1H, H-546), 4.60 (s, 1H, H-547), 4.60 (s, 1H, H-548), 4.60 (s, 1H, H-549), 4.60 (s, 1H, H-550), 4.60 (s, 1H, H-551), 4.60 (s, 1H, H-552), 4.60 (s, 1H, H-553), 4.60 (s, 1H, H-554), 4.60 (s, 1H, H-555), 4.60 (s, 1H, H-556), 4.60 (s, 1H, H-557), 4.60 (s, 1H, H-558), 4.60 (s, 1H, H-559), 4.60 (s, 1H, H-560), 4.60 (s, 1H, H-561), 4.60 (s, 1H, H-562), 4.60 (s, 1H, H-563), 4.60 (s, 1H, H-564), 4.60 (s, 1H, H-565), 4.60 (s, 1H, H-566), 4.60 (s, 1H, H-567), 4.60 (s, 1H, H-568), 4.60 (s, 1H, H-569), 4.60 (s, 1H, H-570), 4.60 (s, 1H, H-571), 4.60 (s, 1H, H-572), 4.60 (s, 1H, H-573), 4.60 (s, 1H, H-574), 4.60 (s, 1H,

