



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**AISLAMIENTO, DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL Y  
EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE  
METABOLITOS SECUNDARIOS PROVENIENTES DE  
*Ageratina glabrata***

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICA**

**PRESENTA**

**VALERIA JULIANA VÁZQUEZ HEREDIA**

**DIRECTOR DE TESIS**

**DR. LEOVIGILDO QUIJANO**

**Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2018**





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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:**                   **Profesor: DEL RÍO PORTILLA JOSÉ FEDERICO**

**VOCAL:**                           **Profesor: GARCÍA VALDÉS JOSÉ DE JESÚS**

**SECRETARIO:**               **Profesor: QUIJANO LEOVIGILDO**

**1er. SUPLENTE:**               **Profesor: DÍAZ FLORES LUIS ALEJANDRO**

**2° SUPLENTE:**               **Profesor: REYES LÓPEZ ELIZABETH**

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**LABORATORIO 2-6, DEPARTAMENTO DE PRODUCTOS NATURALES DEL INSTITUTO DE QUÍMICA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.**

### **ASESOR DEL TEMA:**

**Dr. Leovigildo Quijano**

### **SUPERVISOR TÉCNICO:**

**Dra. Celia Bustos Brito**

### **SUSTENTANTE:**

**Valeria Juliana Vázquez Heredia**

## ÍNDICE

LISTA ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABLAS

1.INTRODUCCIÓN .....	1
2.ANTECEDENTES .....	3
2.1.ENFERMEDADES DIARREICAS .....	3
2.2.DIARREA.....	3
2.3.LOS PRODUCTOS NATURALES .....	5
2.4.EL METABOLISMO SECUNDARIO .....	6
2.5.GENERALIDADES DE LA FAMILIA ASTERACEAE .....	7
2.5.1.IMPORTANCIA DE LA FAMILIA ASTERACEAE.....	8
2.6.GÉNERO <i>Ageratina</i> .....	10
2.6.1.IMPORTANCIA DEL GÉNERO <i>Ageratina</i> .....	12
2.6.2.PRINCIPALES COMPONENTES QUÍMICOS DEL GÉNERO <i>Ageratina</i>	13
2.6.2.1.TERPENOS.....	13
2.6.2.2.FLAVONOIDES.....	17
2.7. <i>Ageratina glabrata</i> .....	19
2.7.1.DESCRIPCIÓN DE <i>Ageratina glabrata</i> .....	20
2.7.2.ESTUDIOS PRELIMINARES DE <i>A. glabrata</i> .....	22
3.JUSTIFICACIÓN .....	24
4.OBJETIVOS .....	25
4.1.OBJETIVO GENERAL .....	25
4.2.OBJETIVOS PARTICULARES .....	25
5.RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26

5.1.MONOTERPENOS DERIVADOS DE TIMOL.....	27
5.1.1.COMPUESTO 1.....	28
5.1.2.COMPUESTO 1a.....	34
5.1.3.COMPUESTO 2.....	37
5.1.4.COMPUESTO 3.....	40
5.1.5.COMPUESTO 4.....	43
5.1.6.COMPUESTO 5.....	46
5.1.7.COMPUESTO 6.....	48
5.1.8.COMPUESTO 7.....	51
5.1.9.COMPUESTO 7a.....	55
5.1.10.COMPUESTO 8.....	58
5.1.11.COMPUESTO 9.....	61
5.2.TRITERPENOS.....	66
5.3.OTROS COMPUESTOS .....	69
5.3.1.COMPUESTO 15.....	69
5.3.2.COMPUESTO 16.....	70
5.3.3.ÁCIDO BENZOICO (17) .....	73
5.3.4.β-SITOSTEROL (18) Y ESTIGMASTEROL (19).....	74
6.ENSAYOS DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA.....	65
7.CONCLUSIONES.....	75
8.DESARROLLO EXPERIMENTAL .....	77
8.1.MATERIALES Y EQUIPOS .....	78
8.2.MATERIAL VEGETAL .....	80
8.3.PREPARACIÓN DE EXTRACTOS.....	82
8.4.AISLAMIENTO DE METABOLITOS SECUNDARIOS .....	82

8.5.REACCIONES.....	88
8.6.ACTIVIDAD BIOLÓGICA.....	94
9.BIBLOGRAFÍA .....	97
10.ANEXO.....	104

## LISTA ABREVIATURAS

<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>
<i>A. glabrata</i>	<i>Ageratina glabrata</i>
AcOEt	Acetato de etilo
<i>c</i>	Señal cuádruple
CC	Cromatografía en columna
CCFA	Cromatografía en capa fina analítica
CCFP	Cromatografía en capa fina preparativa
CG-EM	Cromatografía de Gases – Espectrometría de Masas
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo deuterado
CHCl <sub>3</sub>	Cloroformo
CI <sub>50</sub>	Concentración Inhibitoria media
cm	Centímetro
cm <sup>-1</sup>	Centímetro a la menos uno
CoA	Coenzima A
CONABIO	Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad
COSY	“CORrelation SpectroscopY” Espectroscopia de Correlación <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H en dos dimensiones
<i>d</i>	Señal doble
<i>da</i>	Señal doble ancha
<i>dcd</i>	Señal doble de cuarteto de doble
DCM	Diclorometano
<i>dd</i>	Señal doble de dobles
<i>ddd</i>	Señal doble de doble de dobles
DEPT	“Distortionless Enhancement by Polarization Transfer” Incremento de señal sin distorsión por transferencia de polarización
DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	Dimetil sulfoxido deuterado
EM	Espectrometría de Masas
EtOH	Etanol
EM-DART-AR	Espectrometría de Masas, “Direct Analysis in Real Time”, Análisis directo en tiempo real de alta resolución
EM-ESI <sup>+</sup>	Espectrometría de Masas, “Electrospray Ionization” Ionización por electrospray modo positivo
g	Gramo
HCOOH	Ácido fórmico
HMBC	“Heteronuclear Multiple Bond Correlation” Correlación Heteronuclear <sup>13</sup> C- <sup>1</sup> H a larga distancia

HSQC	“Heteronuclear Single Quantum Correlation” Correlación Heteronuclear $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ a un enlace
IR	Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
<i>m</i>	Señal múltiple
<i>m/z</i>	Relación masa-carga
MeOH	Metanol
mg	Miligramo
MHz	Mega Hertz
mm	Milímetro
nm	Nanómetro
NOESY	“Nuclear Overhauser Effect EpectroscopY” Espectroscopía de efecto nuclear Overhauser
Pf	Punto de fusión
ppm	Partes por millón
<i>q</i>	Señal quintuple
RMN $^{13}\text{C}$	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN $^1\text{H}$	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno 1
<i>s</i>	Señal simple
<i>sa</i>	Señal simple ancha
<i>sep</i>	Señal séptuple
TMS	Tetrametilsilano
<i>tt</i>	Señal triple de triples
UV-Vis	Ultravioleta – Visible
$\delta$	Desplazamiento químico (ppm)
$\epsilon$	Coefficiente de extinción molar
$\lambda_{\text{máx}}$	Longitud de onda máxima
$^{\circ}\text{C}$	Grados centígrados



## LISTA DE FIGURAS

Figura	Título	Páginas
1	Especies de la familia Asteraceae.	7
2	Especies del género <i>Ageratina</i> .	10
3	Disposición de capítulos en panícula y corimbo. <i>A. altissima</i> inflorescencia, flores e involucro.	11
4	Estructura de las flores de disco y liguladas.	12
5	Isopreno. Unidad de cinco átomos de carbono.	14
6	Estructura del timol.	14
7	Derivados del timol aislados de especies del género <i>Ageratina</i> .	15
8	Biogénesis de triterpenos.	16
9	Algunos esqueletos de triterpenos pentacíclicos.	17
10	Estructura básica de los flavonoides, fenilcromona y clasificación.	18
11	Fotografía de Guillermo Ibarra Manríquez, <i>Ageratina glabrata</i> , CONABIO.	19
12	<i>Eupatorium glabratum</i> H.B.K. Rezendowski.	21
13	Estructura propuesta para un terpeno de <i>A. glabrata</i> .	22
14	Estructura de los compuestos <b>1</b> , <b>1a</b> , <b>2</b> y <b>4</b> .	22
15	Estructura propuesta por García P. y colaboradores.	23
16	Monoterpenos derivados del timol identificados en <i>A. glabrata</i> y derivados semisintéticos.	27
17	Estructura del compuesto <b>1</b> , isobutirato de (8S)-10-benzoiloxi-8,9-epoxi-6-hidroxitimol.	28
18	Interacciones NOESY H-3", H-4" y H-2.	30
19	Estructura cristalina del isobutirato de (8S)-10-benzoiloxi-8,9-epoxi-6-hidroxitimol <b>1</b> .	31
20	Estructura del compuesto <b>1a</b> , isobutirato del 10-benzoiloxi-8,9-epoxi-6-acetiloxitimol.	34
21	Estructura del compuesto <b>2</b> , isobutirato de 10-benzoiloxi-8,9-epoxi-6-metoxitimol.	37
22	Estructura del compuesto <b>3</b> , isobutirato de 10-benzoiloxi-8,9-epoxitimol.	40
23	Estructura del compuesto <b>4</b> , isobutirato de 10-benzoiloxi-8,9-dehidro-6-hidroxitimol.	43
24	Estructura del compuesto <b>5</b> , 10-benzoiloxi-8,9-dehidrotimol.	46
25	Estructura del compuesto <b>6</b> , 10-benzoiloxitimol.	48

26	Estructura del compuesto <b>7</b> , 10-benzoiloxi-6,8-dihidroxi-9-isobutiriloxitimol.	51
27	Espectro 400 MHz RMN <sup>1</sup> H (García <i>et. al.</i> , 2011), isobutirato de 10-benzoiloxi-6,8,9-trihidroxitimol.	53
28	Espectro 400 MHz RMN <sup>1</sup> H del 10-benzoiloxi-6,8-dihidroxi-9-isobutiriloxitimol <b>7</b> .	53
29	Estructura del compuesto <b>7a</b> , acetato de 10-benzoiloxi-6,8-O-diacetil-9-isobutiriloxitimol.	55
30	Estructura del compuesto <b>8</b> , 10-benzoiloxi-8-hidroxi-9-isobutiriloxi 6-metoxitimol.	58
31	Estructura del compuesto <b>9</b> , acetónido 8,9 del isobutirato de 10-benzoiloxi-6,8,9-trihidroxitimol.	61
32	Mecanismo de formación de artefactos provenientes de <b>1</b> .	64
33	Triterpenos pentacíclicos identificados en <i>A. glabrata</i> .	67
34	Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz) de la fracción FC protones vinílicos.	68
35	Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz) de la fracción FC después de la transesterificación, protones vinílicos.	69
36	Estructura del compuesto <b>15</b> , pectolarigenina.	71
37	Estructura del compuesto <b>16</b> , 5-acetil-2-metoxifenil- 3-metil-2-butenato.	72
38	Estructura del compuesto <b>17</b> , ácido benzoico.	75
39	Estructura del $\beta$ -sitosterol ( <b>18</b> ) y estigmasterol ( <b>19</b> ).	76
40	Ejemplar del Herbario Nacional del Instituto de Biología, UNAM	83
41	Diagrama del estudio químico del extracto 1 de DCM.	85
42	Mecanismo de reacción de acetilación de <b>1</b> .	90
43	Mecanismo de reacción de metilación de <b>1</b> .	91
44	Diagrama de fraccionamiento del extracto 2 de DCM.	92
45	Esquema de transesterificación de $\beta$ -amirina.	93

## LISTA DE TABLAS

Tabla	Título	Páginas
1	Especies de la familia Asteraceae de importancia económica.	9
2	Especies del género <i>Ageratina</i> de importancia económica.	13
3	Datos de <b>RMN <sup>1</sup>H</b> (400 MHz), <b>RMN <sup>13</sup>C</b> (100 MHz) en CDCl <sub>3</sub> del compuesto <b>1</b> .	33
4	Datos de <b>RMN <sup>1</sup>H</b> (400 MHz), <b>RMN <sup>13</sup>C</b> (100 MHz) en CDCl <sub>3</sub> del compuesto <b>1a</b> .	36
5	Datos de <b>RMN <sup>1</sup>H</b> (400 MHz), <b>RMN <sup>13</sup>C</b> (100 MHz) en CDCl <sub>3</sub> del compuesto <b>2</b> .	39
6	Datos de <b>RMN <sup>1</sup>H</b> (400 MHz), <b>RMN <sup>13</sup>C</b> (100 MHz) en CDCl <sub>3</sub> del compuesto <b>3</b> .	42
7	Datos de <b>RMN <sup>1</sup>H</b> (400 MHz), <b>RMN <sup>13</sup>C</b> (100 MHz) en CDCl <sub>3</sub> del compuesto <b>4</b> .	45
8	Datos de <b>RMN <sup>1</sup>H</b> (400 MHz), <b>RMN <sup>13</sup>C</b> (100 MHz) en CDCl <sub>3</sub> del compuesto <b>5</b> .	47
9	Datos de <b>RMN <sup>1</sup>H</b> (400 MHz), <b>RMN <sup>13</sup>C</b> (100 MHz) en CDCl <sub>3</sub> del compuesto <b>6</b> .	50
10	Datos de <b>RMN <sup>1</sup>H</b> (400 MHz), <b>RMN <sup>13</sup>C</b> (100 MHz) en CDCl <sub>3</sub> del compuesto <b>7</b> .	54
11	Datos de <b>RMN <sup>1</sup>H</b> (400 MHz), <b>RMN <sup>13</sup>C</b> (100 MHz) en CDCl <sub>3</sub> del compuesto <b>7a</b> .	57
12	Datos de <b>RMN <sup>1</sup>H</b> (400 MHz), <b>RMN <sup>13</sup>C</b> (100 MHz) en CDCl <sub>3</sub> del compuesto <b>8</b> .	60
13	Datos de <b>RMN <sup>1</sup>H</b> (500 MHz), <b>RMN <sup>13</sup>C</b> (125 MHz) en CDCl <sub>3</sub> del compuesto <b>9</b> .	63
14	Datos de <b>RMN <sup>1</sup>H</b> (400 MHz), <b>RMN <sup>13</sup>C</b> (100 MHz) del compuesto <b>16</b> .	74
15	Resultados de la evaluación de actividad antiprotozoaria y antidiarreica de algunos de los derivados del timol aislados de <i>A. glabrata</i> .	77

## **1. INTRODUCCIÓN**

## 1. INTRODUCCIÓN

En este trabajo se presenta el estudio fitoquímico de las hojas de *Ageratina glabrata*, una planta endémica de México ampliamente distribuida en el territorio nacional. Es conocida como “hierba de la paloma”, “chamisa blanca” o “hierba de Jesús”. En la herbolaria tradicional se utiliza para tratar malestares estomacales y aliviar dolores posparto, estos usos han despertado el interés por sus componentes químicos que puedan ser útiles como nuevos agentes farmacológicos.

En el estudio de la especie se identificaron 21 compuestos: once derivados del timol, seis de ellos productos naturales (**1-6**), tres artefactos (**7-9**, compuestos producto de reacciones que ocurren al tratar la muestra en el laboratorio) y dos derivados semisintéticos (**1a**, **7a**); además cinco triterpenos (**10-14**), un flavonoide (**15**), un derivado de la acetofenona (**16**), ácido benzoico (**17**) y dos fitoesteroles (**18** y **19**). Seis de los derivados del timol aislados en este trabajo (**5-9**, **7a**) y la acetofenona **16**, no habían sido descritos previamente en la literatura. Adicionalmente, se determinó la configuración absoluta del compuesto **1** como 8S mediante difracción de rayos X.

Los derivados del timol **1**, **1a**, **2**, **3**, **4**, **7** y **15** se evaluaron como inhibidores de actividad antiprotozoaria empleando el modelo de subcultivos de *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia* como organismos de prueba. Se observó que los compuestos **1** y **1a** son selectivos contra *Entamoeba histolytica* mostrando una actividad comparable con los fármacos utilizados como referencia emetina y metronidazol y los compuestos **3** y **7** mostraron actividad moderada. Los compuestos **1**, **1a**, **3**, **4** y **7** presentaron actividad moderada contra *Giardia lamblia*.

Estos compuestos también se evaluaron como antidiarreicos mediante el ensayo de inhibición de la hiperperistalsis utilizando carbón activado-goma acacia. Como resultado los compuestos **1a**, **2**, **3**, **7** y **15** mostraron actividad antidiarreica

significativa, mayor que la quercetina, pero menor que la loperamida y los compuestos **1** y **4** mostraron una actividad comparable con la quercetina.

Estos datos sugieren que los derivados del timol posiblemente juegan un papel importante en las propiedades medicinales de *Ageratina glabrata*. Los derivados del timol presentan estructuras líderes para el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de las enfermedades diarreicas.

El presente estudio representa una valiosa aportación al conocimiento químico de *Ageratina glabrata* y al sustento científico del uso tradicional de la especie para tratamiento de las enfermedades estomacales.

## **2. ANTECEDENTES**

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1. ENFERMEDADES DIARREICAS**

Datos descritos por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2017) indican que las enfermedades diarreicas son la segunda mayor causa de muerte de niños menores de cinco años, aproximadamente 525 000 niños mueren cada año a causa de este padecimiento pese a los avances significativos a nivel internacional en la atención de la salud de los infantes.

Según la Secretaría de Salud en su informe la salud de los mexicanos 2015, en México una de las principales causas de muerte en niños de 0 a 14 años se atribuye a padecimientos relacionados con enfermedades diarreicas y las infecciones intestinales causadas por microorganismos son la segunda causa de morbilidad en el país (Secretaría de Salud, 2015). Con todo esto, el tratamiento de las enfermedades diarreicas es uno de los principales retos que enfrenta el país.

### **2.2. DIARREA**

La diarrea se define según la OMS 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. Suele ser un síntoma de una infección del tracto digestivo, que puede estar ocasionada por diversos organismos bacterianos, víricos y parásitos. La infección se transmite por alimentos o agua de consumo contaminados, o bien de una persona a otra como resultado de una higiene deficiente (OMS, 2018).

Existen tres tipos clínicos de enfermedades diarreicas:

- La diarrea acuosa aguda, que dura varias horas o días y comprende el cólera,
- La diarrea con sangre aguda, también llamada disentería y
- La diarrea persistente que dura 14 días o más.



Entre las causas de la diarrea existen los agentes parasitarios que son organismos unicelulares de reproducción sexual y asexual en el huésped, son muy infecciosos y presentan larga supervivencia creando resistencia. Se pueden clasificar según la familia a la que pertenezca el parásito y la afección que provoque en los diferentes órganos y sistemas. Aunque algunas especies no requieren tratamiento porque no son patógenas para los humanos, existen otras que sí, como *Giardia lamblia* que afecta exclusivamente al aparato digestivo o *Entamoeba histolytica* que provoca amebiasis afectando el aparato digestivo y los tejidos del mismo (Fumadó, 2015).

*Giardia lamblia* es un protozoo que parasita a humanos y otros mamíferos terrestres y marinos. Su ciclo de vida comprende dos estadios: la forma vegetativa móvil que parasita el intestino delgado (trofozoíto) y la forma de vida libre e infecciosa (quiste). Se encuentra distribuido a nivel mundial y se identificó como uno de los principales agentes causales de episodios diarreicos en guarderías y asilos (Uribarren B., 2018).

*Entamoeba histolytica* es un protozoo agente causal de la amebiasis, amebiosis o disentería amebiana que parasita al hombre y otros mamíferos. Su ciclo de vida comprende dos estadios: la forma invasiva vegetativa ameboide (trofozoíto) y la forma inactiva e infecciosa (quiste). A nivel mundial se encuentra principalmente en áreas tropicales y subtropicales con condiciones higiénico-sanitarias deficientes como México, la India, Indonesia, las regiones subsaharianas y tropicales de África, partes de América Central y América del Sur (Uribarren B., 2017).

En los países en vías de desarrollo, las enfermedades diarreicas muestran una tasa de mortalidad alta a pesar del esfuerzo del gobierno por implementar nuevas estrategias para mejorar las condiciones de salud y bienestar de la población en general. El sector más afectado es el de escasos recursos y debido a la falta de accesibilidad a servicios de salud o medicamentos alopáticos, recurre al uso de plantas medicinales para su tratamiento.

Desde la antigüedad, el interés por las propiedades medicinales de las plantas ha sido importante para el desarrollo de civilizaciones y pueblos. El conocimiento acerca de las plantas curativas ha diferenciado la supervivencia de asentamientos humanos. En México, la diversidad en recursos naturales es muy amplia y, por tanto, el número de plantas con propiedades medicinales es considerable. Claro es el ejemplo del género *Ageratina*, conformado por especies que contienen una serie de compuestos aislados potencialmente útiles en el desarrollo de fármacos.

En la actualidad, los productos naturales han sido una fuente importante de nuevos compuestos activos útiles para el desarrollo de fármacos como la aspirina, la quinina, la reserpina, entre otros (Hassan G. & Rahaman A., 2005). El hallazgo de nuevos productos naturales ha permitido importantes avances químicos, bioquímicos y biotecnológicos.

### **2.3. LOS PRODUCTOS NATURALES**

Para que los organismos puedan vivir, crecer y reproducirse necesitan transformar una gran cantidad de compuestos orgánicos (Voet D., 2007). El conjunto de reacciones específicas que realiza un organismo para fabricar, transformar o degradar las sustancias que tienen como objetivo mantener la vida, se conoce como metabolismo (Ávalos A. & Urría C., 2009).

Las moléculas más importantes para la vida son las proteínas, los carbohidratos, los lípidos y los ácidos nucleicos. A pesar de las características extremadamente diferentes de los seres vivos, las rutas generales para modificar y sintetizar estas sustancias son esencialmente las mismas. Estos procesos se conocen como metabolismo primario y los compuestos implicados se conocen como metabolitos primarios (Gutiérrez R. & Estévez B., 2009).

A diferencia de otros organismos, las plantas destinan una cantidad significativa de carbono asimilado y de energía en la síntesis de una amplia variedad de moléculas

orgánicas. Estos compuestos no parecen tener una función directa en procesos fotosintéticos, respiratorios, de asimilación de nutrientes, de transporte de solutos o de síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos y se denominan metabolitos secundarios o productos naturales (Ávalos A. & Urría C., 2009). Los procesos químicos involucrados en su síntesis se conocen como metabolismo secundario y pueden ser únicos para una determinada familia, género o especie.

#### **2.4. EL METABOLISMO SECUNDARIO**

Paul M. Dewick de la escuela de ciencias farmacéuticas de la universidad de Nottingham, propone que la biosíntesis de los metabolitos secundarios puede explicarse a partir de la construcción de bloques de rutas biosintéticas. Las rutas utilizadas son de tres intermediarios químicos principales: acetil coenzima A, ácido shikímico y ácido mevalónico (Dewick M., 2002). A partir de estos compuestos, se biosintetizan los principales grupos de productos naturales como los ácidos grasos, antraquinonas, terpenos, esteroides, alcaloides, cumarinas, lignanos, etcétera (Gutiérrez R. & Estévez B., 2009).

Algunos esqueletos de productos naturales se biosintetizan utilizando fragmentos que provienen de más de una ruta específica. Por ejemplo, los flavonoides se forman a partir de la ruta del ácido mevalónico y del ácido shikímico. A estos compuestos se les denomina de biogénesis mixta (Gutiérrez R. & Estévez B., 2009).

Los metabolitos secundarios en las plantas no parecen ser necesarios para la supervivencia del organismo que las produce, pero pueden suponer una ventaja competitiva considerable respecto a otros. Algunos se utilizan como estrategia de defensa con la finalidad de reducir la herbivoría y evitar daño físico (Vilela E., 2011). También son importantes para la supervivencia e interacción con el entorno, algunos tienen una relación directa entre la co-evolución planta-planta, planta-insecto y planta-microorganismo (Delgado *et. al.*, 2015). Otros metabolitos se sintetizan en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, estando su

producción restringida (Gutiérrez R. & Estévez B., 2009). Las plantas han sido fuente importante de compuestos de uso farmacéutico o industrial, claro es el ejemplo de la familia Asteraceae que contiene diferentes especies donde se obtienen este tipo de compuestos.

## 2.5. GENERALIDADES DE LA FAMILIA ASTERACEAE

La familia Asteraceae constituye el grupo más diverso de plantas vasculares sobre el planeta, su distribución es prácticamente universal, con excepción de la Antártida. Es una de las familias más comunes en la mayor parte de los hábitats (García *et. al.*, 2014), conformada por un elevado número de especies y una muy amplia variación en cuanto a formas de vida, estructura floral, mecanismos de polinización y dispersión de semillas (**Figura 1**) (Funk *et. al.*, 2005). Incluye pequeñas hierbas desde 1 cm, hasta arboles de más de 30 m de altura (Katinas *et. al.*, 2007).



**Figura 1:** Especies de la familia Asteraceae de la **Tabla 1**.

La riqueza de la familia Asteraceae a nivel mundial se estima alrededor de 25 000 especies agrupadas en 1 500 géneros, con centros de diversificación importantes en la región de América del Sur, América del Norte, en la zona del Mediterráneo, la región del Cabo en África, Europa, Asia, Australia y Nueva Zelanda (Funk *et. al.*, 2005). La diversidad de ésta puede atribuirse a su plasticidad genética y química, que le permite adaptarse a diversas condiciones ecológicas contribuyendo a su éxito contra depredadores o competidores (Reyes M. & Martínez M., 2001).

En el caso particular de México, existen aproximadamente 3 012 especies agrupadas en 361 géneros, es decir, la concentración más cuantiosa de este grupo de plantas se encuentra en México, representando uno de los principales centros de diversificación de Asteráceas. En la familia se encuentra el género *Ageratina* que representa alrededor de 330 especies (Villaseñor, 2002).

### **2.5.1. IMPORTANCIA DE LA FAMILIA ASTERACEAE**

La familia Asteraceae tiene una amplia variedad respecto a otras en cuanto a subfamilias y tribus (Funk *et. al.*, 2005), incluyendo una gran cantidad de especies útiles para el ser humano. Aproximadamente 40 géneros de asteráceas son relevantes para la alimentación humana y animal, fuentes de aceites fijos, aceites esenciales, forraje, miel, edulcorantes, especias, colorantes, insecticidas, caucho, madera, leña o celulosa (Del Vito & Petenatti, 2009). Muchas son de interés tecnológico u ornamental y centenares proveen metabolitos secundarios de uso farmacéutico o industrial (Del Vito & Petenatti, 2015). En la **Tabla 1** se enlistan los ejemplos de asteráceas de la **figura 1** con su importancia.

**Tabla 1.** Especies de la familia Asteraceae de importancia.

	<b>Género</b>	<b>Nombre Común/Nombre científico</b>	<b>Importancia</b>
<b>A</b>	<i>Carthamus</i>	Cártamo/ <i>Carthamus tinctorius</i>	Ornamento, oleaginosa (Bergman <i>et. al.</i> , 2013)
<b>B</b>	<i>Chamaemelum</i>	Manzanilla/ <i>Chamaemelum nobile</i>	Medicinal (Amant A., 1983)
<b>C</b>	<i>Calendula</i>	Mercadela/ <i>Calendula officinalis</i>	Alimentación, medicinal (Etham <i>et.al.</i> , 2007)
<b>D</b>	<i>Gerbera</i>	Yerbera/ <i>Gerbera jamesonii</i>	Ornamental (Soroa M., 2005)
<b>E</b>	<i>Helianthus</i>	Girasol/ <i>Helianthus tinctorius</i>	Ornamento, oleaginosa (Jasso <i>et. al.</i> , 2003)
<b>F</b>	<i>Helianthus</i>	Tupinambo/ <i>Helianthus tuberosus</i>	Alimentación (Madrigal & Sangronis, 2007)
<b>G</b>	<i>Inula</i>	Romero marino/ <i>Inula crithmoides</i>	Medicinal (Belloum <i>et. al.</i> , 2013)
<b>H</b>	<i>Lactuca</i>	Lechuga/ <i>Lactuca sativa</i>	Alimentación (Orellana <i>et. al.</i> , 1997)
<b>I</b>	<i>Madia</i>	Melosa/ <i>Madia sativa</i>	Oleaginosas (SchMeda H., 1995)
<b>J</b>	<i>Parthenium</i>	Guayule/ <i>Parthenium argentatum</i>	Industrial (Ray T., 1993)

En cuanto a su composición química, en general, el grupo está caracterizado por dos grupos de sustancias consideradas como “marcadores quimiotaxonómicos” de la familia: las lactonas sesquiterpénicas y los compuestos poliacetilénicos (Del Vito & Petenatti, 2009). Además de la presencia de flavonoides e isoflavonoides, algunos de ellos comunes en la mayoría de especies, así como alcaloides pirrolizidínicos, triterpenos pentacíclicos y aceites esenciales en los que predominan mono- y sesquiterpenos.

## 2.6. GÉNERO AGERATINA

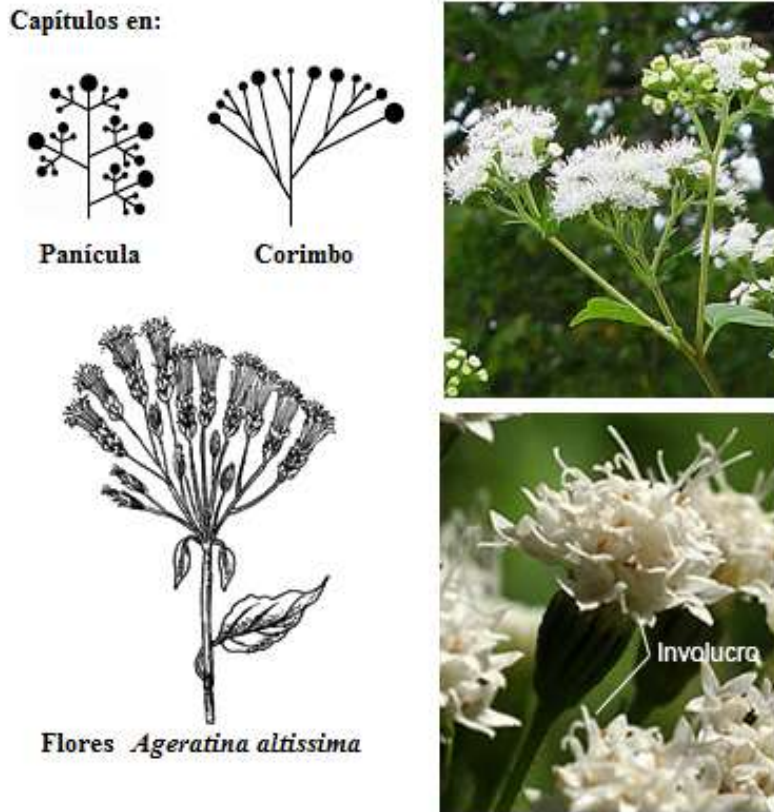
El género *Ageratina* comprende 364 especies descritas y de éstas, 334 han sido aceptadas (The Plant List A working list of all plant species, 2013), algunas especies se muestran en la **figura 2**. Se encuentran distribuidas en regiones tropicales y subtropicales, llegando a las zonas templadas, principalmente en la zona de México, América Central y los Andes, algunas especies crecen también en las regiones frías de Estados Unidos y Canadá (King & Robinson, 1970).



**Figura 2.** Especies del género *Ageratina*.

El género *Ageratina* está constituido por hierbas generalmente perennes, es decir, que viven durante más de dos años. Algunas especies son arbustos, hierbas o arboles cuyas hojas se encuentran opuestas o en ocasiones alternas. Las flores se

encuentran en capítulos homógamos, generalmente pequeños, dispuestos en inflorescencias de formas corimbiformes o paniculiformes como se muestra en la **figura 3**, rara vez solitarios.



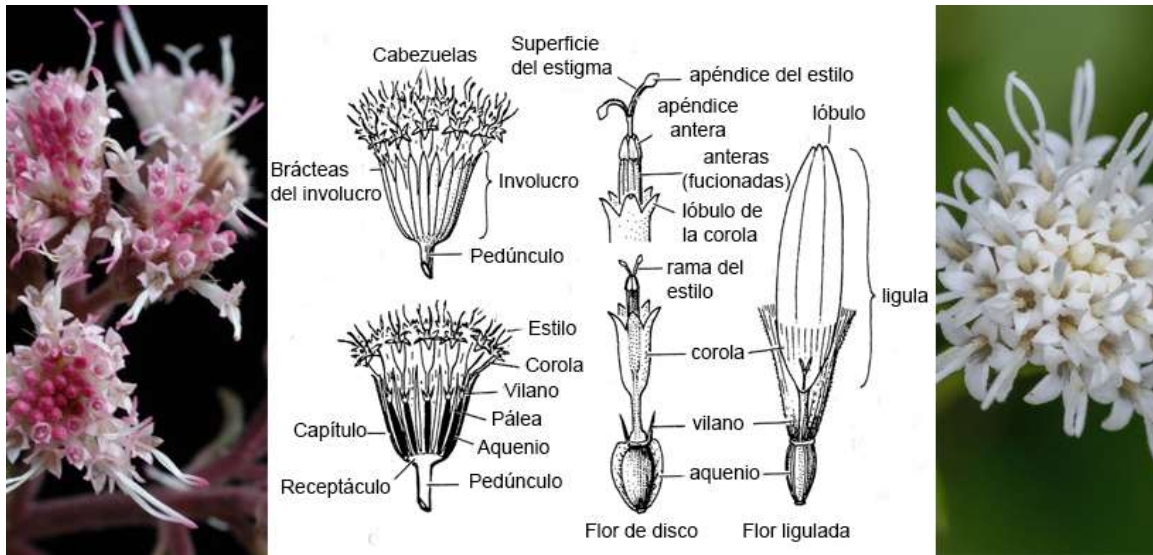
**Figura 3.** Disposición de capítulos en panícula y corimbo. *A. altissima* inflorescencia, flores e involucro.

El involucro es el conjunto de hojas modificadas (denominadas brácteas) que rodean o envuelven la inflorescencia, tiene forma cilíndrica, turbinada, campanulada o hemisférica (**Figura 3**); las brácteas se encuentran en número variable, dispuestas en dos o más series imbricadas de longitud similar y otras veces desiguales.

Las flores pueden ser pocas o numerosas, todas hermafroditas, blancas, rosadas, moradas o azulosas. Pueden ser flores de disco o liguladas. La corola (conjunto de



pétalos) es tubulosa y corta. En la **figura 4** se muestra la estructura floral y sus componentes (Calderon de R. & Rezendowski, 2010).



**Figura 4.** Estructura de las flores de disco y liguladas.

### 2.6.1. IMPORTANCIA DEL GÉNERO *AGERATINA*

Muchas especies del género *Ageratina* han sido utilizadas en la medicina tradicional (Sánchez *et. al.*, 2011) y en algunos casos se consideran como malas hierbas debido a su crecimiento y dispersión. Sin embargo, los estudios realizados de algunas especies muestran compuestos químicos con estructuras novedosas y actividad farmacológica interesante como antifúngica, antibacteriana, antimalárica, antiinflamatoria, antipirética, etcétera. En una revisión hecha por Zhang y col. (2008), se compilaron 149 compuestos aislados de especies del género, algunos presentan actividades biológicas como inmunomoduladores, citotóxicos y antimicrobianos. En la **tabla 2** se muestran algunas especies y su importancia farmacológica.

**Tabla 2.** Especies del género *Ageratina* de importancia farmacológica.

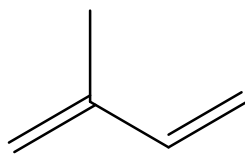
Nombre Común/Nombre científico	Importancia
Sándara/ <i>Ageratina adenophora</i>	Antibacteriana (Zhang <i>et. al.</i> , 2013)
Serpiente blanca/ <i>Ageratina altissima</i>	Tóxica (Davis <i>et. al.</i> , 2015)
<i>Ageratina arsenei</i>	Analgésica y Antiinflamatoria (Rojas <i>et. al.</i> , 2015)
<i>Ageratina cylindrica</i>	Antidiarreica, antiprotozoaria (Bustos <i>et. al.</i> , 2016b)
Raíz de serpiente/ <i>Ageratina havanensis</i>	Antiviral (Barrio <i>et. al.</i> , 2011)
<i>Ageratina jocotepecana</i>	Antibacteriana y repelente (García <i>et. al.</i> , 2014)
Hierba de ángel/ <i>Ageratina petiolaris</i>	Hipoglucemiante (Bustos <i>et. al.</i> , 2016a)

## 2.6.2. PRINCIPALES COMPONENTES QUÍMICOS DEL GÉNERO *AGERATINA*

El género *Ageratina* contiene compuestos en su mayoría benzofuranos, crómenos, flavonoides, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, poliacetilenos, en algunos casos, alcaloides pirrolizidínicos, entre otros (Zhang *et. al.*, 2008).

### 2.6.2.1. TERPENOS

Los terpenos son sustancias que constituyen el grupo más abundante de los aceites vegetales, son responsables de los aromas y sabores específicos de algunas plantas. Estos compuestos se forman a partir de unidades de cinco átomos de carbono, conocida como isopreno (**Figura 5**) y pueden tener desde una hasta un número indeterminado como en el hule y la gutapercha (Vázquez C., 2003).

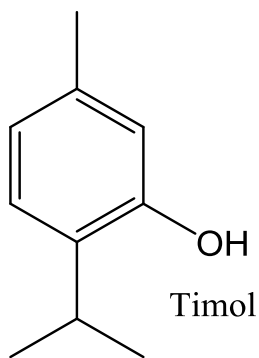


Isopreno

**Figura 5.** Isopreno. Unidad de cinco átomos de carbonos.

Los terpenos se clasifican por el número de unidades terpénicas (constituida por dos unidades isoprénicas) en: monoterpenos (C-10), sesquiterpenos (C-15), diterpenos (C-20), triterpenos (C-30), tetraterpenos (C-40) y politerpenos (C-10)<sub>n</sub>.

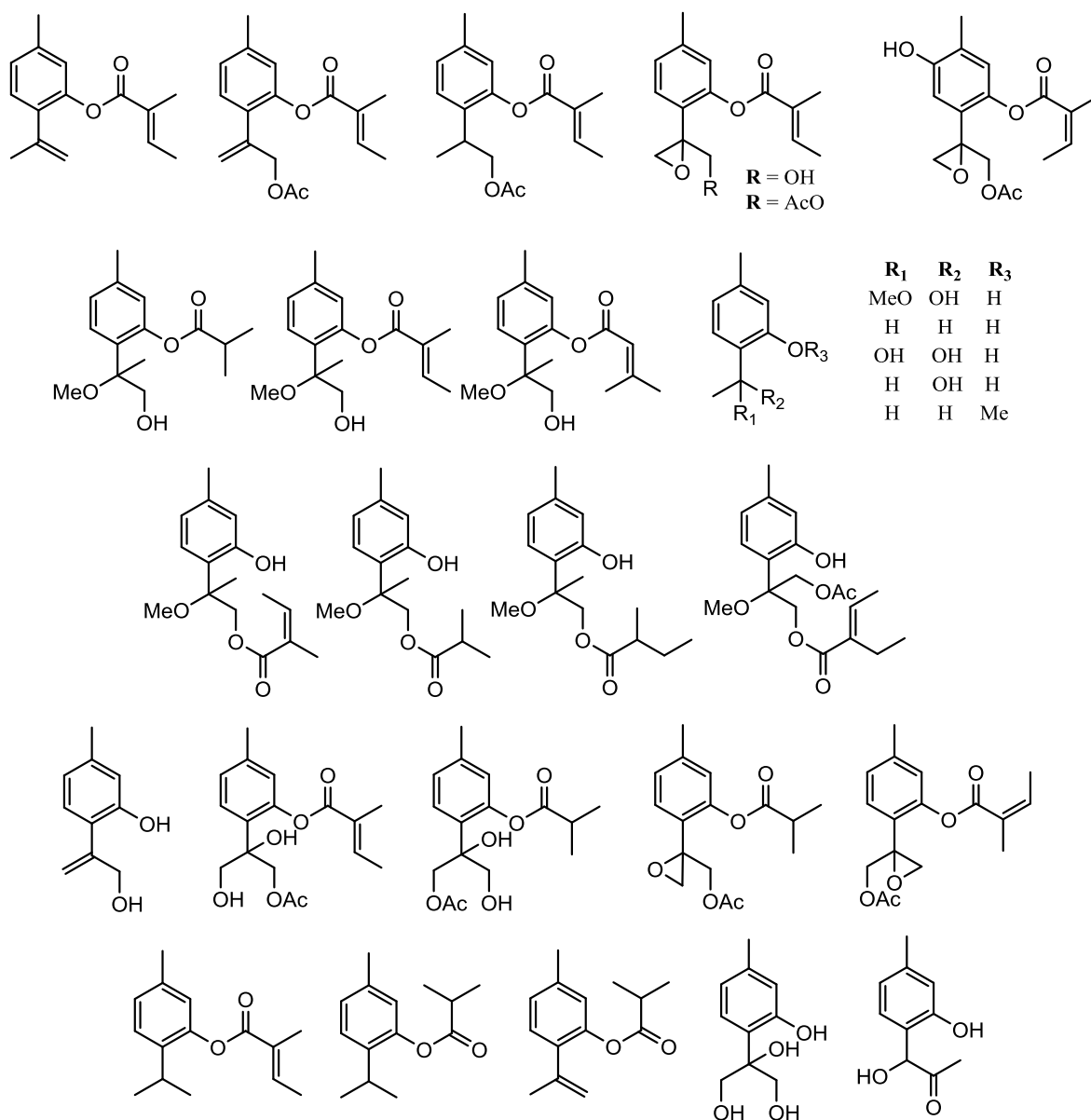
En el grupo de los monoterpenos se encuentran los derivados de timol (**Figura 6**), que son compuestos que destacan entre los componentes del género *Ageratina*. En cuanto a la actividad biológica de estos, se encuentra documentado que sólo alrededor del 10 % de los derivados del timol han sido evaluados biológicamente como antibacterianos, antiinflamatorios, antioxidantes, citotóxicos, piscicidas y agentes alelopáticos (Talavera *et. al.*, 2016).



Timol

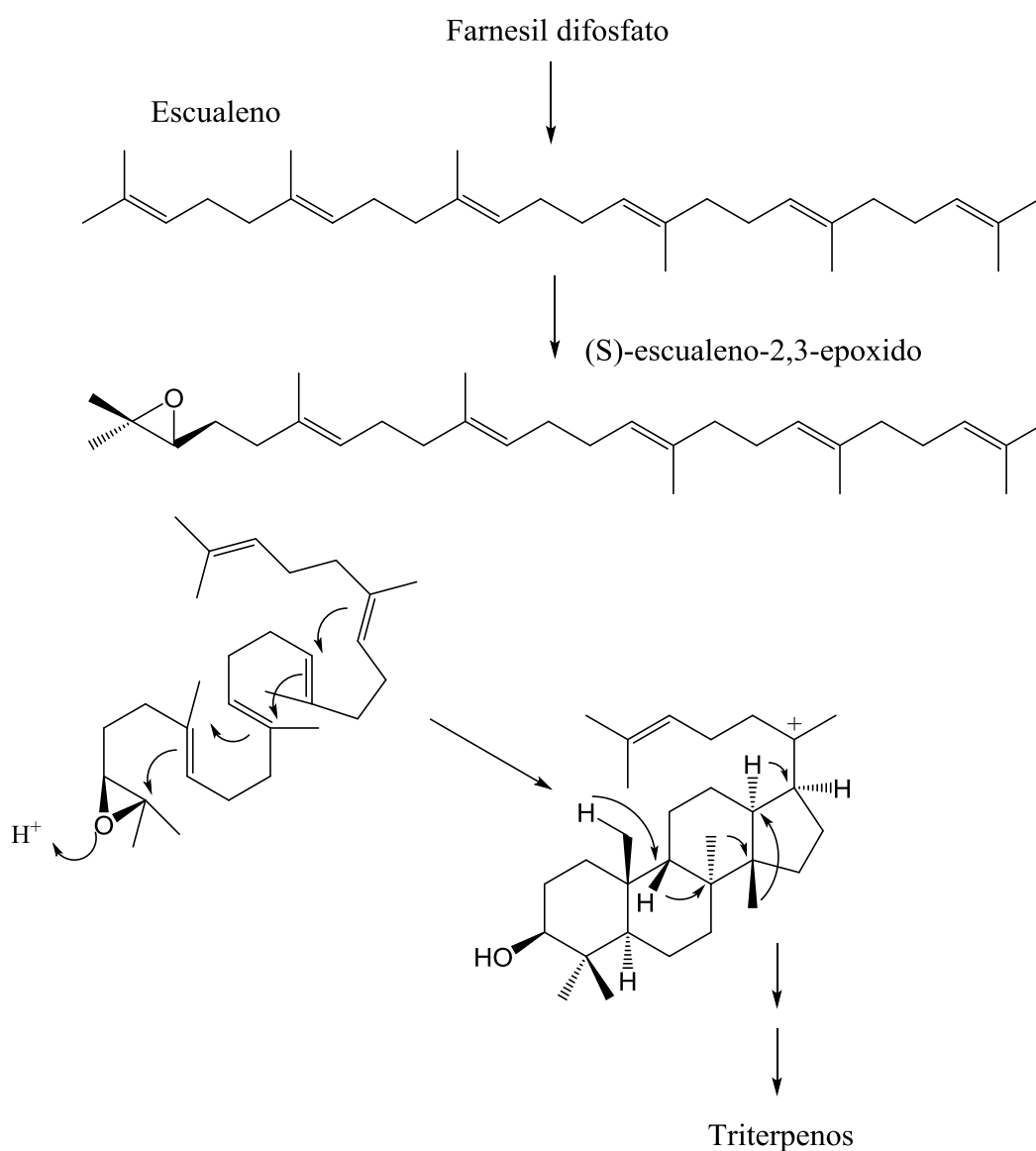
**Figura 6.** Estructura del timol.

A continuación en la **figura 7** se muestran algunos de los derivados de timol aislados en especies del género *Ageratina* (Zhang *et. al.*, 2008) exhibiendo la diversidad estructural de los derivados del timol.



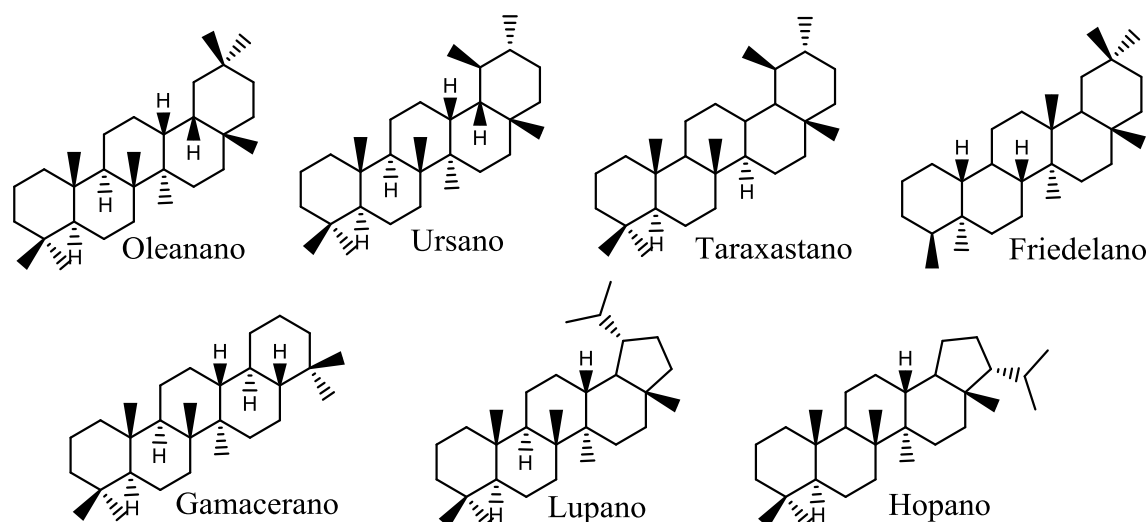
**Figura 7.** Derivados del timol aislados de especies del género *Ageratina*.

Los triterpenos pentacíclicos son compuestos de 30 átomos de carbono, provenientes de la unión de seis unidades de isopreno. La biogénesis de estos compuestos comienza con la oxidación y posterior ciclación del escualeno como se muestra en la **figura 8**. Pueden tener cuatro o cinco anillos de seis miembros y uno de cinco con modificaciones en su cadena lateral. Se conocen alrededor de 40 000 triterpenos ampliamente distribuidos en la naturaleza en forma libre, esterificados o como glicósidos (Muffer *et. al.*, 2011).



**Figura 8.** Biogénesis de triterpenos.

Algunos ejemplos de esqueletos de triterpenos pentacíclicos se muestran en la **figura 9**.



**Figura 9.** Algunos esqueletos de triterpenos pentacíclicos.

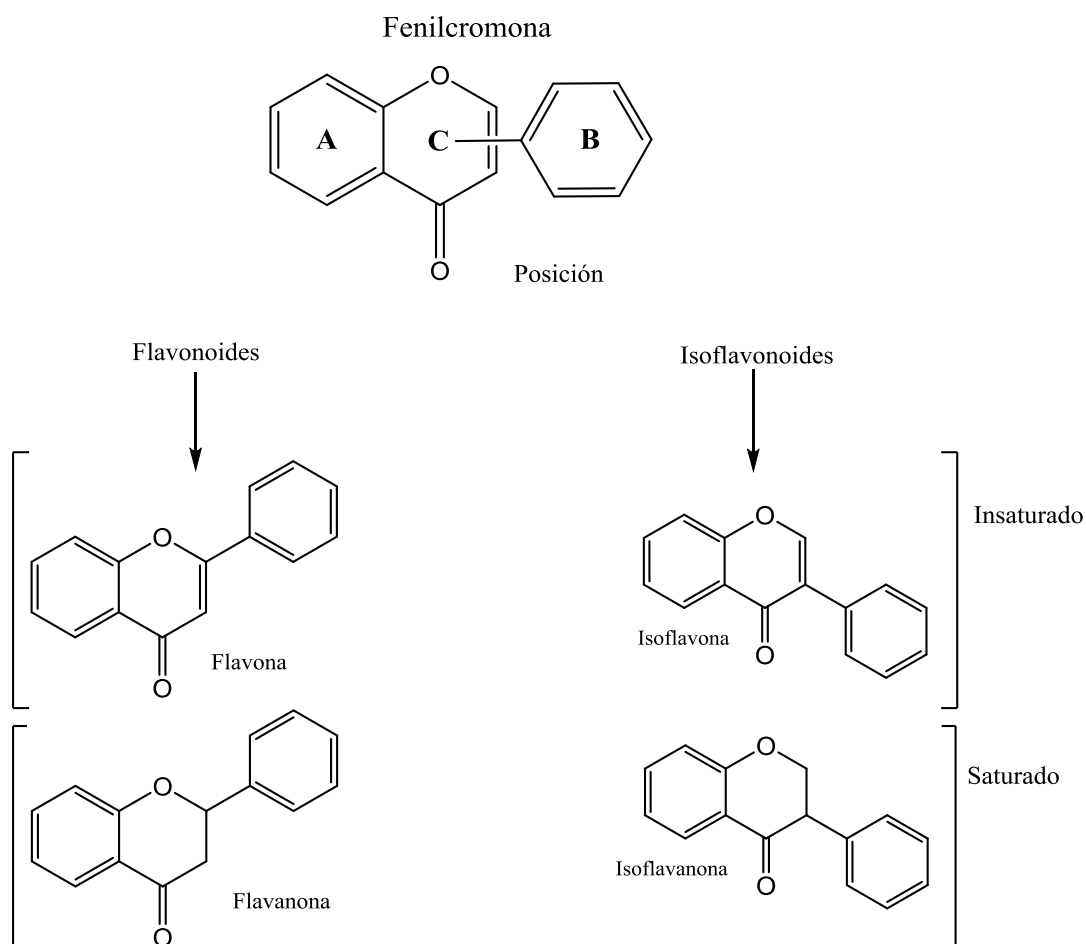
Los triterpenos han mostrado diversas actividades farmacológicas como anticancerosa, antiinflamatoria, antimalárica, antihelmíntica, hipoglucemiantes, hipolipemiantes y hepatoprotectores (Cheng *et. al.*, 2010), resaltando la importancia de este tipo de compuestos.

#### 2.6.2.2. FLAVONOIDES

Los flavonoides son un grupo de metabolitos secundarios que se encuentran en las plantas vasculares, siendo las rutáceas, poligonáceas, asteráceas y apiáceas las principales familias que los producen (Di Carlo *et. al.*, 1999). Tienen diversas funciones en las plantas como pigmentos en los pétalos, protección contra los rayos UV y ciertos flavonoides se sintetizan en las raíces estableciendo relaciones simbióticas con hongos formando micorrizas.

Se caracterizan por poseer un núcleo fenilcromona mostrado en la **figura 10** y dependiendo de la posición del anillo **B** se puede subdividir en flavonoides e

isoflavonoides. A su vez, estos compuestos se clasifican en flavonas, isoflavonas, flavonoles, flavanonas, isoflavanonas y flavanoles.



**Figura 10.** Estructura básica de los flavonoides, fenilcromona y clasificación.

Los flavonoides se originan a través de una ruta biosintética mixta, de los tres anillos, el **A** se biosintetiza a través de la ruta de los policétidos o ruta del acetato, mientras que el **B** y el **C** provienen de la ruta del ácido shikímico (Gutiérrez R. & Estévez B., 2009). Estos compuestos presentan diversas actividades farmacológicas como analgésicas, antialérgicas, anticancerosas, antidiabéticas, anticancerosas, antiinflamatorias, antiespasmódicas, antiulcerosas y con mayor frecuencia probados como antioxidantes (Bonkanka T., 2006) mostrando excelentes resultados.

## 2.7 *Ageratina glabrata*

*Ageratina glabrata* es una planta endémica de México conocida con los nombres comunes de chamisa, hierba de la paloma, hierba verde, hierba de Jesús o sopilla (**Figura 11**), se encuentra distribuida a lo largo del territorio mexicano en los estados de Durango, Guanajuato, Hidalgo, Ciudad de México, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Puebla, Tlaxcala y Veracruz (Tropicos, 2017).

Estudios previos muestran que la especie posee propiedades analgésicas y antiinflamatorias (García *et. al.*, 2010). Se encuentra documentado que se utiliza en la herbolaria tradicional mexicana en baños posparto y para curar desordenes estomacales (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009). Estos usos han generado interés por sus principios activos y componentes.



**Figura 11.** Fotografía de *Ageratina glabrata*, Guillermo Ibarra Manríquez, CONABIO.



### 2.7.1. DESCRIPCIÓN DE *Ageratina glabrata*

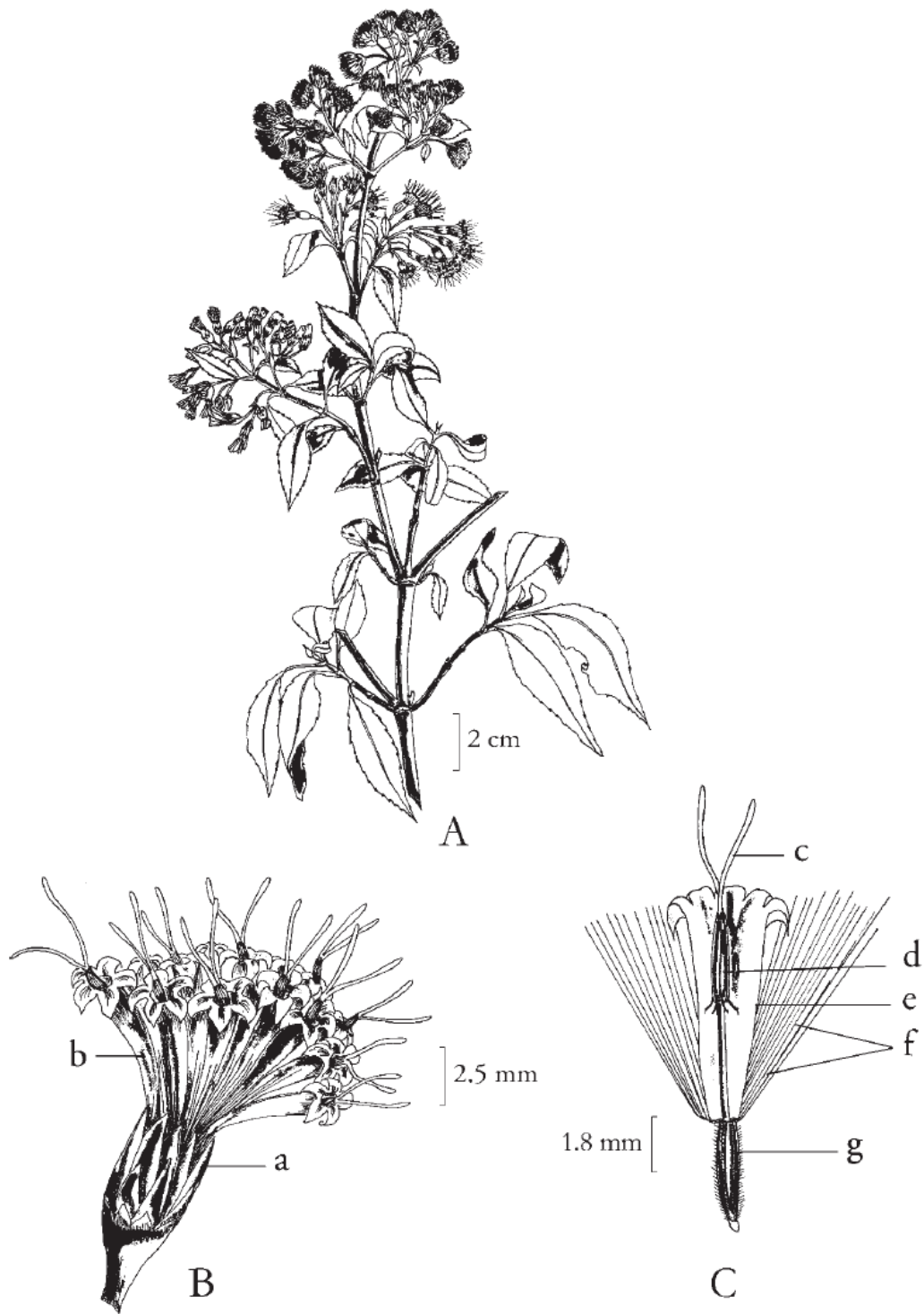
Según Rezendowski y Calderón de R., *Ageratina glabrata* se describe como:

***Eupatorium glabratum*** H.B.K. (*Ageratina glabrata* H.B.K. King & Rob.)

Es un arbusto hasta de 2.5 m de altura. Sus tallos son leñosos, cilíndricos, de 2 a 3 mm de diámetro hacia la parte superior, estriados, amarillentos, glabros (lisos), a veces algo resinoso-lustrosos. Las hojas se encuentran opuestas, su lámina es de forma oblonga, de 1.5 a 8 cm de largo por 0.5 a 4 cm de ancho, el borde aserrado, el reverso glabro y glanduloso-punteado frecuentemente resinoso-lustroso. El peciolo (la unión al tallo) es de 0.5 a 2 cm de largo, glabro con su ápice agudo u obtuso (**A, figura 12**).

Las inflorescencias (**A, figura 12**) contienen numerosos capítulos de 7 a 15 mm de largo dispuestos en corimbos terminales, pedicelos glabros, resinoso-lustrosos. El involucreo es campanulado de 5 mm de largo por 4 mm de ancho, cubriendo menos de la mitad del largo de las corolas (**B, a, b, figura 12**). Sus brácteas dispuestas en 3 series algo desiguales, oblongas u ovado-lanceoladas, agudas u obtusas, verdes, a veces algo oscuras o con tinte rojizo en el ápice, glabras, estriadas y algo resinoso-lustrosas.

Las flores son numerosas de entre 15 a 18 en cada cabezuela. La corola de aproximadamente 7 mm de largo, blanca, a veces con tinte rosado en los lóbulos, glabra. El aquenio (base de las flores) de alrededor de 3 mm de largo algo piloso y finalmente el vilano (corona de filamentos que cubren las semillas) casi del largo de la corola como cerdas blancas (**C, figura 12**). (Calderon de R. & Rezendowski, 2010) En la **figura 12** se muestra un esquema de *A. glabrata* donde se señalan algunas de las partes mencionadas de la especie.

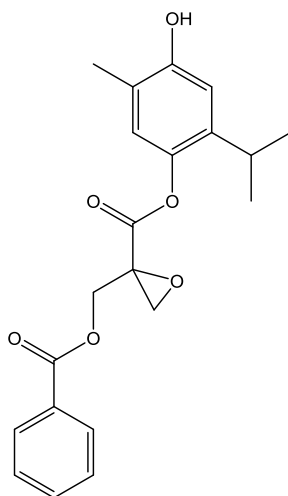


**Figura 12:** *Eupatorium glabratum* H.B.K.: **A.** Rama con inflorescencias e infrutescencias; **B.** Inflorescencia: bráctea del involucre a, cabezuela b; **C.** ramas del estilo c, anteras d, corola e, cerdas de vilano f, aquenio g. (Calderon de R. & Rezendowski, 2010)

## 2.7.2. ESTUDIOS PRELIMINARES DE LOS COMPONENTES DE *A. GLABRATA*

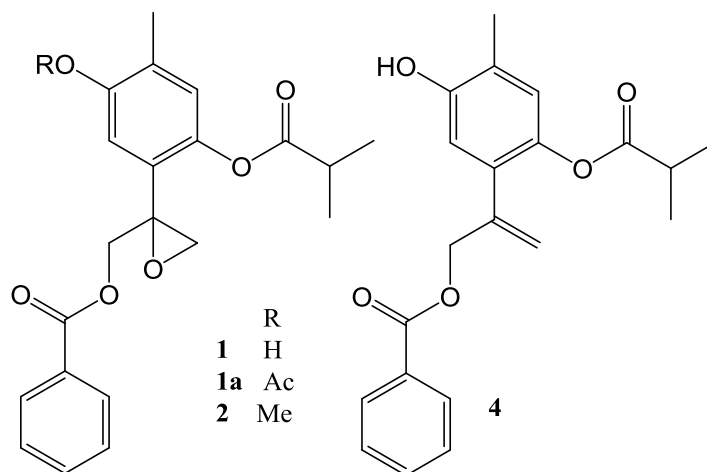
Algunos de los primeros trabajos sobre *A. glabrata* fueron:

Romo de Vivar y col. (1971) publicaron el artículo titulado “Eupaglabrin, a terpene from *Eupatorium glabratum*”. En él, se propuso la estructura de la **figura 13**, como un nuevo terpeno que denominaron eupaglabrina.



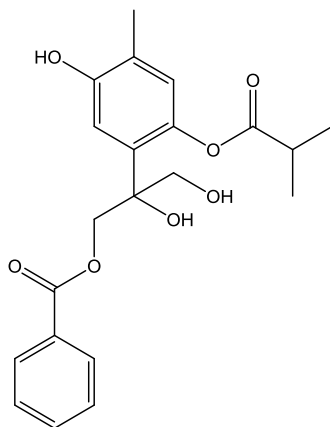
**Figura 13.** Estructura propuesta para eupaglabrina un terpeno de *A. glabrata*.

Bohlmann y col. (1977) aislaron de *A. glabrata* dos derivados del timol a los que les asignaron las estructuras **1**, **2** y **4** además de un derivado semisintético **1a** (**Figura 14**). La publicación describe únicamente datos incompletos de RMN  $^1\text{H}$  e IR.



**Figura 14.** Estructura de los compuestos **1**, **1a**, **2** y **4**.

García y col. (2010) probaron el efecto analgésico del extracto de diclorometano de las hojas de *A. glabrata*. Y en el 2011 aislaron un derivado del timol al que asignaron la estructura que se muestra en la **figura 15** (García *et. al.*, 2011).



**Figura 15.** Estructura propuesta por García P. y colaboradores.

Pimienta R. L. y col. (2015) mostraron que el aceite esencial de *A. glabrata* actúa como insecticida, repelente y fungicida.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

### 3. JUSTIFICACIÓN

Los estudios fitoquímicos de especies del género *Ageratina* han mostrado que estas contienen principalmente monoterpenos, diterpenos y flavonoides, varios de ellos con actividades biológicas interesantes como antioxidante, insecticida, analgésica, hipoglucemiante, antidiarreica, etcétera. El estudio de *Ageratina glabrata* ampliará el conocimiento de la composición química del género y de especies endémicas de México.

La diarrea suele ser un síntoma de una infección del tracto digestivo, que puede estar ocasionada por diversos organismos bacterianos, víricos y parásitos. En países en vías de desarrollo como México, las enfermedades diarreicas son una de las principales causas de enfermedad y muerte en niños menores de cinco años, sin embargo, debido a la falta de accesibilidad a servicios de salud o medicamentos alopáticos la población recurre al uso de plantas como *A. glabrata* para su tratamiento, por lo que este estudio sustentará científicamente las propiedades medicinales que se le adjudican a la especie para tratar las enfermedades estomacales.

## **4. OBJETIVOS**

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. OBJETIVO GENERAL

Aislar, purificar, determinar la estructura química y evaluar la actividad biológica de metabolitos secundarios provenientes de *Ageratina glabrata* a fin de contribuir al conocimiento químico de las especies del género *Ageratina* y de las plantas endémicas de México.

### 4.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Aislar los metabolitos secundarios presentes en el extracto de diclorometano de las hojas de *Ageratina glabrata* mediante técnicas cromatográficas para determinar la composición química de la especie.
- Identificar los componentes aislados y determinar su estructura química mediante el uso de técnicas espectroscópicas modernas como Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT y 2D homo y heteronuclear (COSY, HMBC, HSQC y NOESY), así como espectrometría en infrarrojo (IR), espectrometría de masas (EM) y en su caso Rayos X.
- Evaluar la actividad antiprotozoaria y antidiarreica de los metabolitos secundarios aislados, con el fin de encontrar algún compuesto con actividad biológica, demostrando científicamente el uso que se le da a la especie en la herbolaria tradicional mexicana.



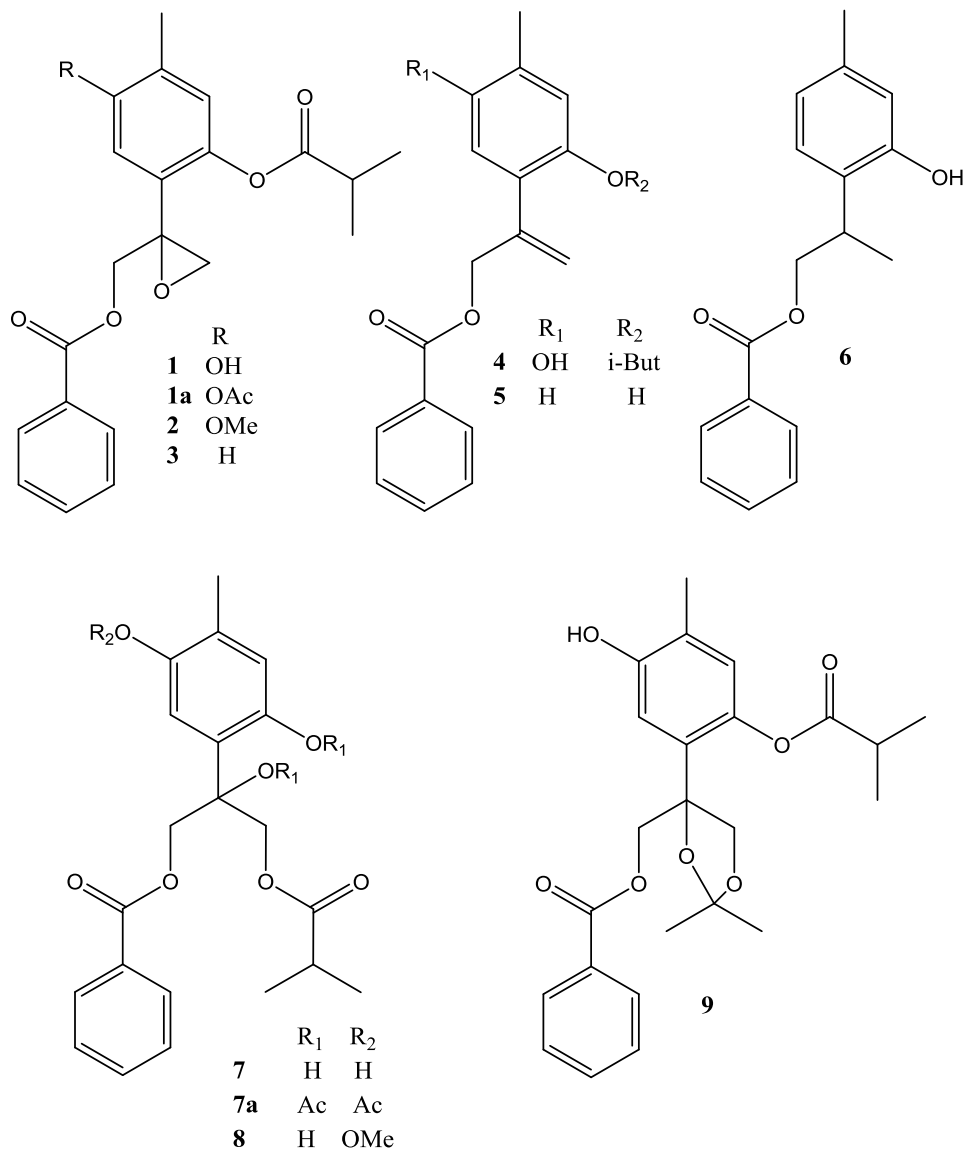
## **5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El estudio fitoquímico de los extractos de diclorometano (DCM) de *Ageratina glabrata* condujo al aislamiento y la determinación estructural de 21 compuestos. El análisis y elucidación estructural de los compuestos aislados se ha dividido en tres secciones principales para la mejor comprensión del trabajo: monoterpenos derivados del timol, triterpenos y otro tipo de compuestos.

## 5.1. MONOTERPENOS DERIVADOS DE TIMOL

De los extractos de DCM se aislaron seis derivados del timol como productos naturales (**1-6**); se aislaron además otros tres compuestos que se identificaron como artefactos (**7-9**) y se prepararon dos derivados (**1a**, **7a**) mostrados en la **figura 16**.

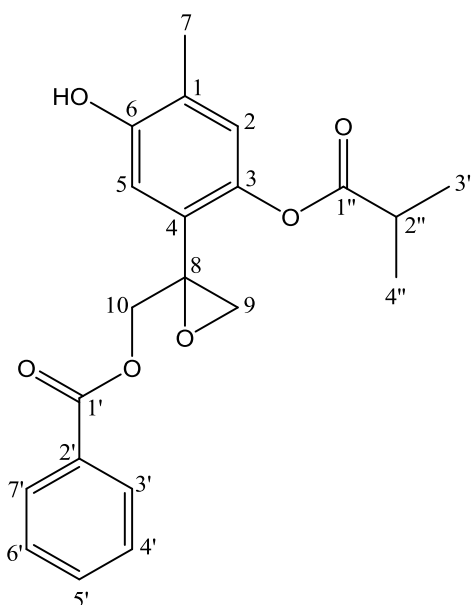


**Figura 16.** Monoterpenos derivados del timol identificados en *A. glabrata* y derivados semisintéticos.

A continuación, se discuten los datos que condujeron a la elucidación estructural de los compuestos antes mencionados.

### 5.1.1. COMPUESTO 1

El compuesto **1** se identificó como el isobutirato de (8*S*)-10-benzoiloxi-8,9-epoxi-6-hidroxitimol (**Figura 17**), se aisló como cristales incoloros con punto de fusión de 110 – 112 °C, cuya composición molecular se determinó como C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>O<sub>6</sub> con base en el ion [M + H<sup>+</sup>] obtenido por EM-DART-AR, *m/z* 371.15003 (calculado para C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>O<sub>6</sub> 371.14946) indicando once grados de insaturación. Este monoterpeno es el compuesto que denominaron eupaglabrina Romo de Vivar y col. (1971) y que la estructura correcta fue propuesta por Bohlmann y col. (1977).



**Figura 17:** Estructura del compuesto **1**, isobutirato de (8*S*)-10-benzoiloxi-8,9-epoxi-6-hidroxitimol.

El espectro en el Infrarrojo muestra las bandas de absorción características de grupos hidroxilo en 3599 y 1273 cm<sup>-1</sup>, grupos metilos y metilenos en 2980 cm<sup>-1</sup> y grupos carbonilo de ésteres en 1752 y 1722 cm<sup>-1</sup>. Estos datos concuerdan con los obtenidos por Bolhmann y col. (1977).

El espectro de resonancia magnética nuclear (RMN) de <sup>13</sup>C (Espectro A2, **Tabla 3**) muestra 19 señales correspondientes a los 21 carbonos de la estructura. Estos corresponden a tres metilos (CH<sub>3</sub>), dos metilenos (CH<sub>2</sub>), ocho metinos (CH) y ocho

a carbonos cuaternarios de acuerdo con los experimentos DEPT (Experimentos de incremento de la señal sin distorsión por transferencia de polarización, donde se pueden diferenciar los CH, CH<sub>2</sub> y CH<sub>3</sub>).

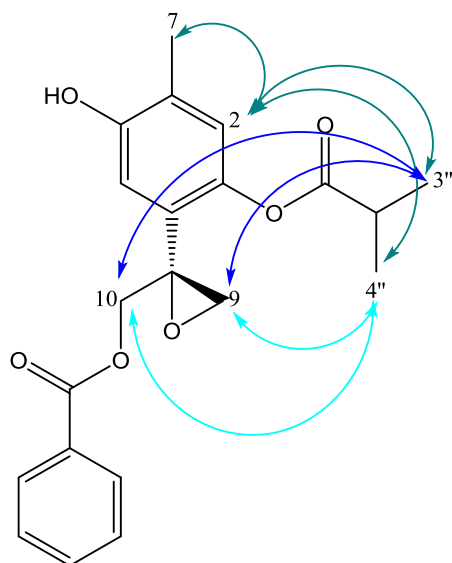
El espectro de RMN <sup>1</sup>H (Espectro A1, **Tabla 3**) exhibió dos señales simples en la región de protones aromáticos a  $\delta$  6.79 y 6.94 asignadas a los protones H-2 y H-5 respectivamente, indicando una tetra sustitución 1, 3, 4, 6 del anillo del timol. Lo anterior fue confirmado con los acoplamientos a dos (<sup>2</sup>J) y tres (<sup>3</sup>J) enlaces observados en el experimento HMBC (Experimentos de correlación entre carbono y protón separados a dos y tres enlaces de distancia, espectro A3) entre el protón H-2 ( $\delta$  6.79) con los carbonos cuaternarios del anillo C-1 ( $\delta$  126.2), C-3 ( $\delta$  141.7), C-4 ( $\delta$  127.2), C-6 ( $\delta$  152.1) y con el carbono del metilo en C-1 (C-7,  $\delta$  15.8), y el protón H-5 ( $\delta$  6.94) con los carbonos cuaternarios C-1 ( $\delta$  126.2), C-3 ( $\delta$  141.7), C-6 ( $\delta$  152.1) y C-8 ( $\delta$  57.3). Se observó una señal simple aguda en  $\delta$  2.18 (3H) correspondiente al metilo de C-7 ( $\delta$  15.8) y una señal simple ancha a  $\delta$  5.78 intercambiable con agua deuterada correspondiente al protón del grupo hidroxilo ubicado en la posición 6 del anillo del timol.

En la región de los protones alifáticos se observa una señal séptuple en  $\delta$  2.83 (1H,  $J = 7.2$  Hz) y dos señales dobles en  $\delta$  1.312 y 1.307 (3H,  $J = 7.2$  Hz) revelando la presencia de un grupo isobutirato en la molécula. En el espectro de RMN <sup>13</sup>C, los carbonos correspondientes para el isobutirato se ubicaron en C-1'' ( $\delta$  176.2), C-2'' ( $\delta$  34.3), C-3'' y C-4'' ( $\delta$  19.1, 19.2).

Se observan además dos sistemas AB en  $\delta$  3.12, 2.86 ( $J = 5.2$ ) y  $\delta$  4.77, 4.48 ( $J = 12.3$ ) correspondientes a los protones de los metilenos C-9 y C-10, que soportan un grupo epoxi y un benzoato, respectivamente. El experimento HMBC mostro las interacciones a larga distancia entre los protones del metileno C-10 con el carbono cuaternario a  $\delta$  57.3 (C-8) y el carbono metilénico a  $\delta$  51.3 (C-9), sugiriendo la presencia del grupo oxirano en C-8 - C-9.

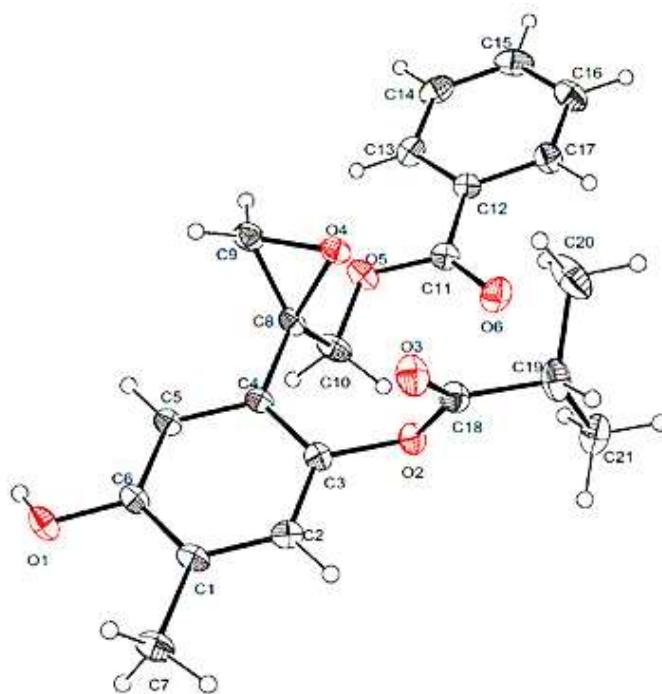
En la región aromática se observan las señales características en  $\delta$  7.97 (2H), 7.55 (1H) y 7.40 (2H) que indican la presencia del grupo benzoato. En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  los carbonos del benzoato C-7' y C-3' se encuentran en 129.67 ppm, C-6' y C-4' en 128.4 ppm, C-5' en 133.1 ppm, C-2' en 129.72 ppm y C-1' en 165.9 ppm. La posición relativa del benzoato fue establecida con base en las correlaciones observadas en el experimento HMBC (**Tabla 3**). De acuerdo con este experimento, los protones metilénicos de C-10 ( $\delta$  4.77, 4.48) presentan acoplamiento a tres enlaces ( $^3J$ ) con el carbonilo C-1' ( $\delta$  166.3) del benzoato y éste muestra a su vez acoplamiento ( $^3J$ ) con los protones de los carbonos C-3' y C-7' ( $\delta$  7.97) del grupo fenilo del benzoato.

Por otra parte, el experimento NOESY (Experimento que permite determinar qué átomos de hidrógeno de una molécula, con una cierta arquitectura, se aproximan de manera apreciable entre sí en el espacio, espectro A4) mostró interacciones entre los protones del isobutirato ( $\text{CH}_3\text{-3''}$ ,  $\text{CH}_3\text{-4''}$ ) y los protones de los metilenos C-9 y C-10, mientras que el protón aromático H-2 mostró acoplamientos con H-3'', H-4'', y los protones de metilo C-7' (**Figura 18**). Por lo tanto, el grupo isobutirato debe estar unido a C-3.



**Figura 18.** Interacciones NOESY H-3'', H-4'' y H-2.

Debido a que el compuesto se aisló como cristales se realizó rayos X. Los resultados indicaron que éste cristaliza como dos moléculas cristalográficamente independientes, en el sistema monoclinico y el grupo espacial  $P2_1$ . La estructura se resolvió por métodos directos utilizando una matriz completa de mínimos cuadrados. La configuración absoluta se determinó usando el efecto de dispersión anómala en las mediciones de difracción en el cristal, el parámetro de Flack para el enantiómero mostrado en la **figura 19** fue  $x = -0.03$  (15), permitiendo así la confirmación de la estructura propuesta y la definición de la configuración absoluta del compuesto **1** como 8S. La configuración absoluta determinada para el compuesto **1** es consistente con la de otro derivado del timol aislado anteriormente de *A. cylindrica* (Bustos *et. al.*, 2014).



**Figura 19.** Estructura cristalina del isobutirato de (8S)-10-benzoiloxi-8,9-epoxi-6-hidroxitimol.

Los datos cristalográficos (excluyendo los factores estructurales) se han depositado en el Centro de Datos Cristalográficos de Cambridge bajo el número de referencia CCDC 1490853. Algo importante a destacar es que, aunque el compuesto **1** había sido aislado previamente por Bohlmann (1977), solamente se encuentran

publicados datos incompletos de RMN  $^1\text{H}$  e IR. En este trabajo se completaron sus datos y se mostró la asignación correcta para las señales.

A continuación, se muestran los datos físicos y espectroscópicos del isobutirato de (8S)-10-benzoiloxi-8,9-epoxi-6-hidroxitimol (**1**).

**Peso obtenido (g):** 1.5469

**Punto de fusión:** 110 – 112 °C

**Obtención:** Producto natural de *A. glabrata*

**IR  $\nu_{\text{máx}}$  ( $\text{CHCl}_3$ ):** 3599, 2980, 1752, 1722, 1273  $\text{cm}^{-1}$

**UV-Vis  $\lambda_{\text{máx}}$  ( $\log \epsilon$ ) (MeOH):** 204 (4.71), 225 (4.52), 280 (3.30) nm

**EM-DART-AR:**  $m/z$  371.15003 [ $\text{M} + \text{H}^+$ ] calculado para  $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{O}_6$  371.14946

**Rotación óptica:**  $[\alpha]_{589} +14.5$  (c 0.001, MeOH) a 25 °C

**Rayos X:** Cristales incoloros de 0.376 x 0.188 x 0.098  $\text{mm}^3$ , con fórmula empírica  $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_6$  y Masa relativa = 370.39, cristalizados en un sistema de cristal Monoclínico,  $\text{P}2_1$ , con parámetros de celda  $a = 10.0148$  (8) Å,  $b = 7.6733$  (6) Å y  $c = 24.814$  (2) Å.  $V = 1872.2$  (3) Å $^3$ ,  $Z = 4$ ,  $D_{\text{calcd}} = 1.314$   $\text{Mg}/\text{m}^3$ ,  $m\mu 0.796$   $\text{mm}^{-1}$ ,  $F(000) = 784.0$ .

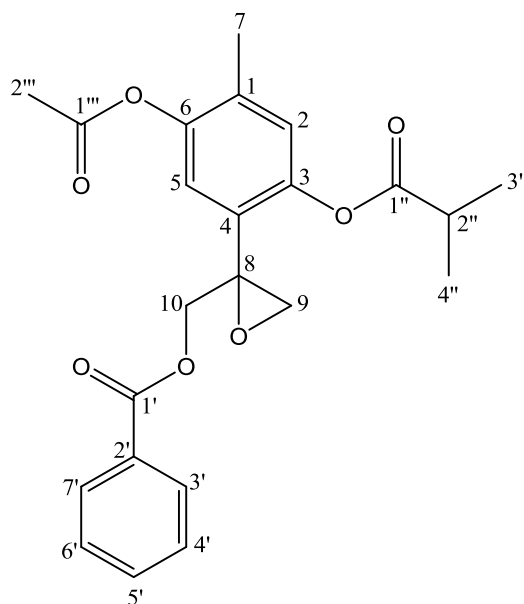


**Tabla 3.** Datos de **RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz) y **RMN <sup>13</sup>C** (100 MHz), del compuesto **1** en CDCl<sub>3</sub>.

Posición	$\delta^{13}\text{C}$ ppm	Tipo	$\delta^1\text{H}$ ppm	HMBC
1	126.2	C		
2	124.8	CH	6.79, <i>d</i> (0.8)	1, 3, 4, 6, 7
3	141.7	C		
4	127.2	C		
5	114.8	CH	6.94, <i>s</i>	1, 3, 6, 8
6	152.1	CH		
7	15.8	CH <sub>3</sub>	2.18, <i>s</i>	1, 2, 6
8	57.3	C		
9a	51.3	CH <sub>2</sub>	3.12, <i>d</i> (5.2)	4, 8, 10
9b			2.86, <i>d</i> (5.2)	4, 8, 10
10a	65.6	CH <sub>2</sub>	4.77, <i>d</i> (12.3)	1', 4, 8, 9
10b			4.48, <i>d</i> (12.3)	1', 4, 8, 9
1'	166.3	C		
2'	129.7	C		
3'	129.8	CH	7.97, <i>m</i>	1', 5'
4'	128.5	CH	7.40, <i>m</i>	3', 5', 7'
5'	133.4	CH	7.55, <i>tt</i> (7.5, 1.3)	3', 7'
6'	128.5	CH	7.40, <i>m</i>	3', 5', 7'
7'	129.8	CH	7.97, <i>m</i>	1', 5'
1''	176.2	C		
2''	34.3	CH	2.83, <i>sep</i> (7.2)	1'', 3'', 4''
3'', 4''	19.1, 19.2	CH <sub>3</sub>	1.30, 1.31, <i>d</i> (7.2)	1'', 2''
6-OH			5.78, <i>sa</i>	

### 5.1.2. COMPUESTO 1a

El derivado acetilado del compuesto **1** (**1a**, **Figura 20**) se obtuvo mediante una reacción de acetilación del compuesto **1** con piridina y anhídrido acético. La composición molecular se determinó como  $C_{23}H_{24}O_7$  con base en el ion  $[M + H^+]$  obtenido por EM-DART-AR,  $m/z$  413.16040 (calculado para  $C_{23}H_{25}O_7$  413.16003) indicando doce grados de insaturación.



**Figura 20:** Estructura del compuesto **1a**, Isobutirato del 10-benzoiloxi-8,9-epoxi-6-acetiloxitímol.

El espectro en el IR de **1a** mostró las bandas de absorción características de los carbonilos de los grupos éster en  $1721\text{ cm}^{-1}$  y a diferencia de **1** la banda del hidroxilo alrededor de  $3600\text{ cm}^{-1}$ , ya no se observa.

El espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **1a**, mostró desplazamientos químicos similares al compuesto **1**, así como las señales inherentes a la presencia del grupo acetato en  $\delta$  2.31 correspondiente al metilo C-2''' (Espectro A5). En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , se observan dos carbonos adicionales, uno a  $\delta$  168.9 (C-1''') y el segundo a  $\delta$  20.8 (C-2''') (Espectro A6, **tabla 4**). La posición de los grupos éster se confirmaron de

igual manera con base en los acoplamientos  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  a larga distancia ( $^2J$  y  $^3J$ ) observados en el experimento HMBC (Espectro A7, **Tabla 4**)

Al igual que **1**, el compuesto **1a** también fue preparado y descrito por Bohlmann y col. (1977); sin embargo, los datos publicados también eran incompletos, por lo que en este trabajo se realizó la asignación completa de las señales de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ .

A continuación, se mencionan los datos físicos y espectroscópicos del isobutirato del 10-benzoiloxi-8,9-epoxi-6-acetiloxitimol (**1a**).

**Peso obtenido (g):** 0.0300

**Obtención:** Acetilación de **1** con piridina y anhídrido acético.

**IR**  $\nu_{\text{máx}}$  ( $\text{CHCl}_3$ ): 2979, 2937, 1757, 1721, 1270  $\text{cm}^{-1}$

**UV-Vis**  $\lambda_{\text{máx}}$  ( $\log \epsilon$ ) (MeOH): 203 (4.47), 252 (4.52), 273 (4.51) nm

**EM-DART-AR:**  $m/z$  413.16040 [ $\text{M} + \text{H}^+$ ] calculado para  $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{O}_7$  413.16003.

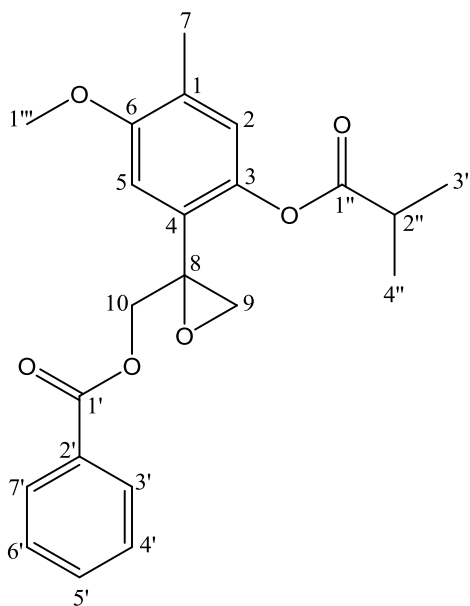
**Rotación óptica:**  $[\alpha]_{589} +14.7$  (c 0.002, MeOH) a 25 °C

**Tabla 4.** Datos de **RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz), **RMN <sup>13</sup>C** (100 MHz) en CDCl<sub>3</sub> del compuesto **1a**.

Posición	$\delta^{13}\text{C}$ ppm	Tipo	$\delta^1\text{H}$ ppm	HMBC
1	132.2	C		
2	125.0	CH	6.96, <i>sa</i>	1, 3, 4, 6, 7, 8
3	146.2	C		
4	127.9	C		
5	122.7	CH	7.23, <i>s</i>	1, 3, 6, 8
6	147.0	CH		
7	16.3	CH <sub>3</sub>	2.17, <i>s</i>	1, 2, 6
8	56.9	C		
9a	51.2	CH <sub>2</sub>	3.11, <i>d</i> (5.2)	4, 8, 10
9b			2.87, <i>d</i> (5.2)	4, 8, 10
10a	65.9	CH <sub>2</sub>	4.76, <i>d</i> (12.2)	4, 8, 9, 1'
10b			4.47, <i>d</i> (12.2)	4, 8, 9, 1'
1'	166.1	C		
2'	129.0	C		
3'	129.9	CH	7.97, <i>m</i>	1', 5'
4'	128.5	CH	7.42, <i>m</i>	3', 5', 7'
5'	133.3	CH	7.55, <i>tt</i> (7.5, 1.3)	3', 7'
6'	128.5	CH	7.42, <i>m</i>	3', 5', 7'
7'	129.9	CH	7.97, <i>m</i>	1', 5'
1''	175.3	C		
2''	34.3	CH	2.84, <i>sep</i> (7.2)	1'', 3'', 4''
3'', 4''	19.0, 19.1	CH <sub>3</sub>	1.31, 1.32, <i>d</i> (7.2)	1'', 2''
1'''	168.9	C		
2'''	20.8	CH <sub>3</sub>	2.31	1'''

### 5.1.3. COMPUESTO 2

El compuesto **2** se identificó como isobutirato de 10-benzoiloxi-8,9-epoxi-6-metoxitímol (**Figura 21**). Se aisló en pequeñas cantidades como un aceite incoloro, cuya composición molecular se determinó como  $C_{22}H_{24}O_6$  según el ion  $[M + H^+]$  obtenido por EM-DART-AR,  $m/z$  385.16429 (calculado para  $C_{22}H_{25}O_6$  385.16511), indicando once grados de insaturación. Además, se prepararon cantidades adicionales mediante una metilación del compuesto **1** con diazometano.



**Figura 21:** Estructura del compuesto **2**, isobutirato de 10-benzoiloxi-8,9-epoxi-6-metoxitímol.

El espectro en el IR a diferencia de **1**, no muestra la banda del hidroxilo alrededor de 3600 de manera similar al compuesto **1a**. Las bandas de absorción características de los carbonilos de grupos éster se observan en 1751, 1722  $cm^{-1}$ , así como de los metilos y metilenos en 2979, 2938  $cm^{-1}$ .

El espectro de RMN  $^1H$ , muestra desplazamientos químicos similares al compuesto **1**, así como la presencia de una señal simple en  $\delta$  3.82 (3H) correspondiente al metilo C-1''', que indica la presencia de un grupo metoxilo (Espectro A8). La señal en  $\delta$  55.9, así como el desplazamiento de C-6 de 152.1 a 155.6 ppm en el espectro

de RMN  $^{13}\text{C}$  confirmó lo anterior (Espectro A9, **tabla 5**). Y el espectro HMBC confirmó la posición del metoxilo en el carbono C-6 ya que se observa la correlación del metilo del metoxilo con C-6 del anillo del timol (Espectro A10).

El compuesto **2** también había sido obtenido anteriormente de la misma especie (Bohlman *et. al.*, 1977) y los datos estaban incompletos, por lo que en este trabajo se presenta la determinación y asignación completa de los datos de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ .

El compuesto **2** al ser almacenado en cloroformo por un tiempo aproximado de treinta días se descompuso. De la mezcla de descomposición, se aisló el compuesto **8**, cuya elucidación estructural se discutirá más adelante en este trabajo.

A continuación, se muestran los datos físicos y espectroscópicos del isobutirato de 10-benzoiloxi-8,9-epoxi-6-metoxitimol (**2**).

**Peso obtenido (g):** 0.0138

**Obtención:** Producto natural de *A. glabrata* y resultado de la metilación de **1** con diazometano.

**IR  $\nu_{\text{máx}}$  ( $\text{CHCl}_3$ ):** 2979, 2938, 1751, 1722, 1272  $\text{cm}^{-1}$

**UV-Vis  $\lambda_{\text{máx}}$  ( $\log \epsilon$ ) (MeOH):** 204 (4.54), 225 (4.34), 276 (3.70) nm

**EM-DART-AR:**  $m/z$  385.16429  $[\text{M} + \text{H}^+]$  calculado para  $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{O}_6$  385.16511

**Rotación óptica:**  $[\alpha]_{589} +14.6$  (c 0.0015,  $\text{CHCl}_3$ ) a 25 °C

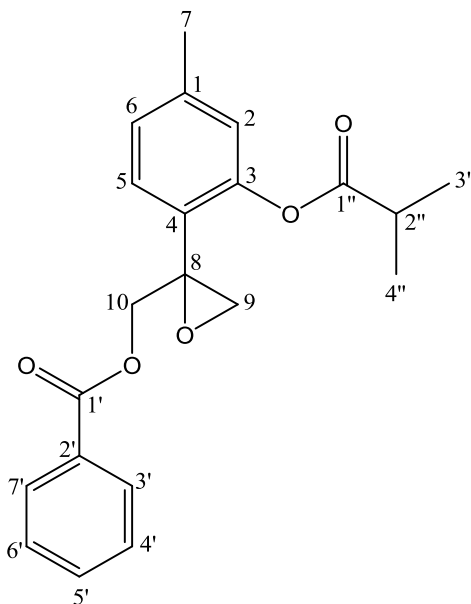
**Tabla 5.** Datos de **RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz), **RMN <sup>13</sup>C** (100 MHz) en CDCl<sub>3</sub> del compuesto **2**.

Posición	$\delta^{13}\text{C}$ ppm	Tipo	$\delta^1\text{H}$ ppm	HMBC
1	128.6	C		
2	124.6	CH	6.83, <i>sa</i>	3, 4, 6, 7, 8*
3	141.6	C		
4	126.9	C		
5	109.9	CH	6.97, <i>s</i>	3, 4, 6, 7*, 8
6	155.6	CH		
7	16.2	CH <sub>3</sub>	2.19, <i>da</i> (0.4)	1, 2, 4*, 5*, 6
8	57.3	C		
9 <sup>a</sup>	51.3	CH <sub>2</sub>	3.13, <i>d</i> (5.2)	4, 8, 10
9 <sup>b</sup>			2.87, <i>d</i> (5.2)	4, 8, 10
10 <sup>a</sup>	65.8	CH <sub>2</sub>	4.79, <i>d</i> (12.2)	4, 8, 9, 1'
10 <sup>b</sup>			4.48, <i>d</i> (12.2)	4, 8, 9, 1'
1'	166.1	C		
2'	129.9	C		
3'	129.8	CH	7.99, <i>m</i>	1', 4', 5', 6'
4'	128.5	CH	7.43, <i>m</i>	3', 7'
5'	133.3	CH	7.55, <i>m</i>	3', 7'
6'	128.5	CH	7.42, <i>m</i>	3', 7'
7'	129.8	CH	7.99, <i>m</i>	1', 4', 5', 6'
1''	175.9	C		
2''	34.3	CH	2.83, <i>sep</i> (7.2)	1'', 3'', 4''
3'', 4''	19.1, 19.2	CH <sub>3</sub>	1.31, 1.32, <i>d</i> (7.2)	1'', 2''
1'''	55.9	CH <sub>3</sub>	3.82, <i>s</i>	6

\* 4 J

### 5.1.4. COMPUESTO 3

El compuesto **3** se identificó como el isobutirato de 10-benzoiloxi-8,9-epoxitimol (**Figura 22**). Se aisló como un aceite incoloro, cuya composición molecular se determinó como  $C_{21}H_{22}O_5$  según el ion  $[M + H^+]$  obtenido por EM-DART-AR,  $m/z$  355.15516 (calculado para  $C_{21}H_{23}O_5$  355.15455), indicando once grados de insaturación.



**Figura 22:** Estructura del compuesto **3**, isobutirato de 10-benzoiloxi-8,9-epoxitimol.

El espectro en el IR muestra las bandas de absorción características de los carbonilos de los grupos éster ( $1757, 1725\text{ cm}^{-1}$ ) y los metilos y metilenos presentes ( $2976, 2938\text{ cm}^{-1}$ ).

El espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Espectro A12, **Tabla 6**) muestra 18 señales correspondientes a los 21 C de la estructura, correspondientes a tres  $\text{CH}_3$ , dos  $\text{CH}_2$ , nueve CH y siete a carbonos cuaternarios, de acuerdo con los experimentos DEPT.

El espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Espectro A11) de **3** es similar al del compuesto **1**. A diferencia de **1**, el espectro de RMN  $^1\text{H}$  muestra que el anillo del timol en el compuesto **3** está tri sustituido, ya que se observa en la región de protones



aromáticos tres señales asignables a H-2 ( $\delta$  6.88) como una señal doble con acoplamiento *meta* ( $J = 0.7$  Hz), H-6 ( $\delta$  7.07) como una señal doble de doble de dobles con acoplamientos *orto* con H-5 ( $J = 7.8$  Hz), *meta* con H-2 ( $J = 0.7$ ) y acoplamiento bencílico con los protones de C-7 ( $J = 1.6$ ) y H-5 ( $\delta$  7.43) como una señal doble con una constante de acoplamiento de 7.8 Hz con el protón de la posición *orto* (H-6).

Los acoplamientos a dos y tres enlaces ( $^2J$  y  $^3J$ ) observados en el experimento HMBC (**Tabla 6**, Espectro A13) entre el protón H-2 ( $\delta$  6.88) con los carbonos C-3 ( $\delta$  148.7), C-4 ( $\delta$  126.1), C-6 ( $\delta$  126.8) y el carbono del metilo C-7 ( $\delta$  21.1), así como el acoplamiento a cuatro enlaces ( $^4J$ ) con C-8. El protón H-5 ( $\delta$  7.43) con los carbonos C-1 ( $\delta$  140.0), C-3 ( $\delta$  148.7) y C-8 ( $\delta$  57.0). Y finalmente, el H-6 con los carbonos C-2 ( $\delta$  123.1), C-4 ( $\delta$  126.1), C-5 ( $\delta$  128.9) y C-7 ( $\delta$  21.1), permitieron la asignación completa de los datos de RMN para el compuesto **3** (Tabla 6).

A continuación, se muestran los datos físicos y espectroscópicos del isobutirato de 10-benzoiloxi-8,9-epoxitímol (**3**).

**Peso obtenido (g):** 0.0179

**Obtención:** Producto natural de *A. Glabrata*.

**IR  $\nu_{\text{máx}}$  (CHCl<sub>3</sub>):** 2976, 2938, 1757, 1725, 1271 cm<sup>-1</sup>

**UV-Vis  $\lambda_{\text{máx}}$  (log  $\epsilon$ ) (MeOH):** 203 (4.27), 221 (4.16) nm

**EM-DART-AR:** m/z 355.15516 [M + H<sup>+</sup>] calculado para C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>O<sub>5</sub> 355.15455

**Rotación óptica:**  $[\alpha]_{589} -3.9$  (c 0.002, CHCl<sub>3</sub>) a 25 °C

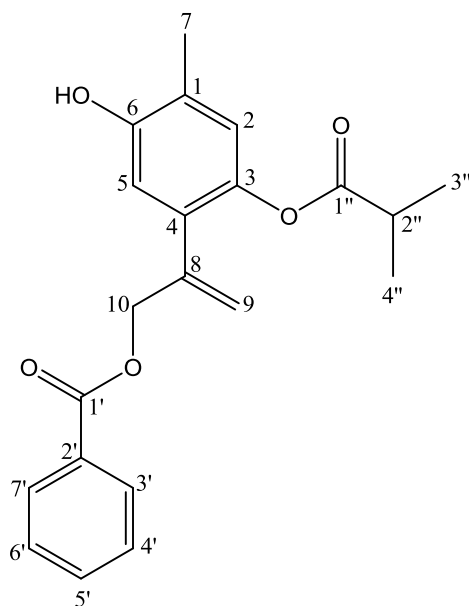
**Tabla 6.** Datos de **RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz), **RMN <sup>13</sup>C** (100 MHz) en CDCl<sub>3</sub> del compuesto **3**.

Posición	$\delta^{13}\text{C}$ ppm	Tipo	$\delta^1\text{H}$ ppm	HMBC
1	140.0	C		
2	123.1	CH	6.88, <i>da</i> (0.7)	3, 4, 6, 7, 8*
3	148.7	C		
4	126.1	C		
5	128.9	CH	7.43, <i>d</i> (7.8)	1, 3, 8
6	126.8	CH	7.07, <i>ddd</i> (7.8, 1.6, 0.7)	2, 4, 5, 7
7	21.1	CH <sub>3</sub>	2.35, <i>s</i>	1, 2, 6
8	57.0	C		
9 <sup>a</sup>	50.9	CH <sub>2</sub>	3.12, <i>d</i> (5.3)	4, 8, 10
9 <sup>b</sup>			2.85, <i>d</i> (5.3)	4, 8, 10
10 <sup>a</sup>	65.9	CH <sub>2</sub>	4.76, <i>d</i> (12.2)	1', 4, 8, 9
10 <sup>b</sup>			4.47, <i>d</i> (12.2)	1', 4, 8, 9
1'	165.9	C		
2'	129.72	C		
3'	129.67	CH	7.98, <i>m</i>	1', 5'
4'	128.4	CH	7.42, <i>m</i>	3', 5', 7'
5'	133.1	CH	7.55, <i>tt</i> (7.6, 1.3)	3', 7'
6'	128.4	CH	7.42, <i>m</i>	3', 5', 7'
7'	129.67	CH	7.98, <i>m</i>	1', 5'
1''	175.3	C		
2''	34.2	CH	2.83, <i>sep</i> (7.0)	1'', 3'', 4''
3'', 4''	18.9, 19.0	CH <sub>3</sub>	1.32, 1.33, <i>d</i> (7.0)	1'', 2''

\* 4<sup>J</sup>

### 5.1.5. COMPUESTO 4

El compuesto **4** se identificó como el isobutirato de 10-benzoiloxi-8,9-dehidro-6-hidroxitimol (**Figura 23**). Se aisló como un aceite incoloro, cuya composición molecular se determinó como  $C_{21}H_{22}O_5$  de acuerdo con el ion  $[M + H^+]$  obtenido por EM-DART-AR,  $m/z$  355.15630 (calculado para  $C_{21}H_{23}O_5$  355.15455) indicando once grados de insaturación.



**Figura 23:** Estructura del compuesto **4**, isobutirato de 10-benzoiloxi-8,9-dehidro-6-hidroxitimol.

El espectro en el IR de **4** muestra las bandas de absorción características de los grupos hidroxilo en  $3522$  y  $1291\text{ cm}^{-1}$ , los carbonilos de los grupos éster en  $1757$ ,  $1713\text{ cm}^{-1}$  y finalmente las bandas de los metilos y metilenos en  $3014$ ,  $2927\text{ cm}^{-1}$ .

Los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de **4** (Espectro A15 y A16) son similares al compuesto **1** e indican que la principal diferencia se debe a la ausencia del grupo epoxi en C8/C9. De acuerdo con lo anterior, en el espectro de RMN  $^1\text{H}$  no se observan las señales del sistema AB típico de los protones del metileno C-9 que soporta el grupo epoxi característico de los compuestos **1-3**; sin embargo, el espectro muestra la presencia de dos señales en la región de los protones vinílicos

que aparecen como cuartetos a 5.48 ppm ( $J = 1.6$  Hz) y 5.25 ppm ( $J = 1.2$  Hz) asignables a los protones vinílicos del metileno terminal C-9. Los valores de  $J$  se deben al acoplamiento alílico con los protones del metileno C-10, observados como un doble de dobles ancho a 5.0 ppm ( $J = 1.6, 1.2$  Hz), lo que confirma la anterior aseveración. De manera similar en el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  se puede apreciar en la región de los vinílicos, las señales para los carbonos del metileno terminal C-8 ( $\delta$  140.2) y C-9 ( $\delta$  117.3), en vez de los carbonos del grupo epóxido.

A continuación, se muestran los datos físicos y espectroscópicos del isobutirato de 10-benzoiloxi-8,9-dehidro-6-hidroxitimol (**4**).

**Peso obtenido (g):** 0.0133

**Obtención:** Producto natural de *A. glabrata*.

**IR  $\nu_{\text{máx}}$  ( $\text{CHCl}_3$ ):** 3522, 3014, 2927, 1757, 1713, 1291  $\text{cm}^{-1}$

**UV-Vis  $\lambda_{\text{máx}}$  ( $\log \epsilon$ ) (MeOH):** 204 (4.31), 225 (4.23), 276 (3.58) nm

**EM-DART-AR:**  $m/z$  355.15360 [ $\text{M} + \text{H}^+$ ] calculado para  $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{O}_5$  355.15455

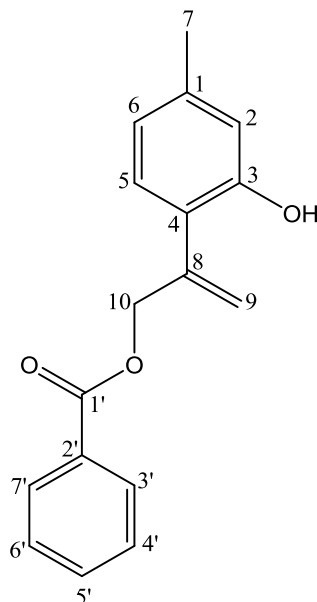
**Tabla 7.** Datos de **RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz), **RMN <sup>13</sup>C** (100 MHz) en CDCl<sub>3</sub> del compuesto **4**.

Posición	$\delta^{13}\text{C}$ ppm	Tipo	$\delta^1\text{H}$ ppm	HMBC
1	125.0	C		
2	124.9	CH	6.80, <i>sa</i>	3, 4, 6, 7
3	141.4	C		
4	130.9	C		
5	115.9	CH	6.74, <i>s</i>	1, 3, 6, 8
6	151.6	CH		
7	15.8	CH <sub>3</sub>	2.22, <i>sa</i>	1, 6
8	140.2	C		
9 <sup>a</sup>	117.3	CH <sub>2</sub>	5.48, <i>c</i> (1.6)	4, 10
9 <sup>b</sup>			5.25, <i>c</i> (1.2)	
10	66.7	CH <sub>2</sub>	5.0, <i>dd</i> (1.6, 1.2)	4, 8, 9, 1'
1'	166.3	C		
2'	130.2	C		
3'	129.8	CH	8.03, <i>m</i>	1', 5', 7'
4'	128.6	CH	7.43, <i>m</i>	2', 6'
5'	133.2	CH	7.55, <i>tt</i> (7.4, 1.4)	3', 7'
6'	128.6	CH	7.43, <i>m</i>	2', 4'
7'	129.8	CH	8.03, <i>m</i>	1', 3', 5'
1''	176.1	C		
2''	34.2	CH	2.75, <i>sep</i> (7.0)	3'', 4''
3'', 4''	19.1	CH <sub>3</sub>	1.27, <i>d</i> (7.0)	2''

\* 4 *J*, \*\* 5 *J*

### 5.1.6. COMPUESTO 5

El compuesto **5** se identificó como el isobutirato del 10-benzoiloxi-8,9-dehidrotimol (**Figura 24**). Se aisló como un aceite incoloro.



**Figura 24:** Estructura del compuesto **5**, 10-benzoiloxi-8,9-dehidrotimol.

El espectro en el IR muestra las bandas de absorción características de grupos hidroxilo ( $3382\text{ cm}^{-1}$ ), carbonilos de grupos éster ( $1721\text{ cm}^{-1}$ ) y de metilos y metilenos ( $3011, 2928\text{ cm}^{-1}$ ).

En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Espectro A18) se observan señales para tres protones aromáticos que indican que el anillo aromático del timol se encuentra trisustituido. La multiplicidad y constantes de acoplamiento indican una sustitución similar al compuesto **3**. El espectro muestra además señales similares en 5.56 y 5.31 ppm que indican la presencia de dos protones vinílicos como en el caso del compuesto **4**, de un metileno terminal. A diferencia de este último el 3-OH del anillo del timol se encuentra libre ya que en el espectro no se observan las señales correspondientes al isobutirato.

Como en los compuestos **1-4**, el espectro muestra también las señales características del grupo benzoato, cuya posición relativa fue confirmada con base en las correlaciones observadas en el experimento HMBC (Espectro A20).

El espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Espectro A19, **tabla 8**) muestra 15 señales correspondientes a los 17 C de la estructura, que corresponden a un  $\text{CH}_3$ , dos  $\text{CH}_2$ , ocho CH y seis a carbonos cuaternarios, de acuerdo con la estructura propuesta.

A continuación, se muestran los datos físicos y espectroscópicos del 10-benzoiloxi-8,9-dehidrotimol (**5**).

**Peso obtenido (g):** 0.0038

**Obtención:** Producto natural de *A. Glabrata*

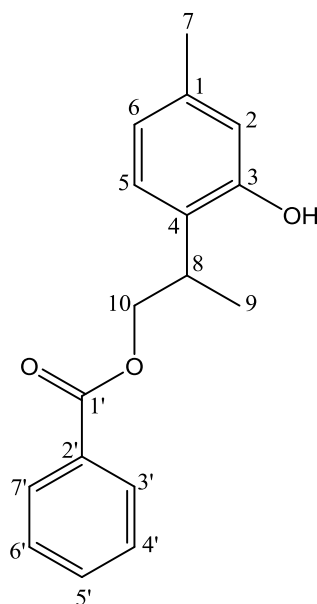
**IR  $\nu_{\text{máx}}$  ( $\text{CHCl}_3$ ):** 3382, 3011, 2928, 1722  $\text{cm}^{-1}$

**Tabla 8.** Datos de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz), RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) en  $\text{CDCl}_3$  del compuesto **5**.

Posición	$\delta^{13}\text{C}$ ppm	Tipo	$\delta^1\text{H}$ ppm	HMBC
1	140.2	C		
2	116.9	CH	6.78, <i>d</i> (0.7)	6
3	153.5	C		
4	122.6	C		
5	129.3	CH	7.03, <i>d</i> (7.7)	1, 3
6	121.2	CH	6.71, <i>ddd</i> (7.7, 1.7, 0.7)	2, 4
7	21.4	$\text{CH}_3$	2.32, <i>s</i>	1, 2, 6
8	141.9	C		
9a	116.7	$\text{CH}_2$	5.56, <i>q</i> (1.6)	4, 10
9b			5.31, <i>q</i> (1.2)	
10	66.6	$\text{CH}_2$	5.99, <i>dd</i> (1.6, 1.2)	8, 8, 1'
1'	167.2	C		
2'	129.8	C		
3'	129.9	CH	8.09, <i>m</i>	1', 5', 7'
4'	128.7	CH	7.47, <i>m</i>	2', 6
5'	133.6	CH	7.60, <i>tt</i> (7.2, 1.3)	3', 7'
6'	128.7	CH	7.47, <i>m</i>	2', 4'
7'	129.9	CH	8.09, <i>m</i>	1', 3', 5'

### 5.1.7. COMPUESTO 6

El compuesto **6** se identificó como el 10-benzoiloxitimol (**Figura 25**). Se aisló como polvo blanco con punto de fusión de 94-97 °C, cuya composición molecular se determinó como C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>O<sub>3</sub>, de acuerdo con el ion [M + H<sup>+</sup>] obtenido por EM-DART-AR, *m/z* 271.13261 (calculado para C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>O<sub>3</sub> 271.13342) indicando nueve grados de insaturación.



**Figura 25:** Estructura del compuesto **6**, 10-benzoiloxitimol.

El espectro de IR muestra las bandas de absorción características de grupos hidroxilo (3401 y 1279 cm<sup>-1</sup>), carbonilo de éster (1715 cm<sup>-1</sup>) y metilos y metilenos (2970, 2928 cm<sup>-1</sup>).

El espectro de RMN <sup>13</sup>C (Espectro A22, **tabla 9**) muestra 15 señales correspondientes a los 17 carbonos de la estructura, correspondientes a dos CH<sub>3</sub>, un CH<sub>2</sub>, nueve CH y cinco a carbonos cuaternarios.

El espectro de RMN <sup>1</sup>H (Espectro A21, **tabla 9**) es muy similar al del compuesto **5**. En el espectro se observan tres señales en la región de protones aromáticos, H-2 (δ 6.68), H-5 (δ 7.10), H-6 (δ 6.74), indicando la tri sustitución del anillo del timol. Se



observa una señal simple en  $\delta$  2.28 (3H) correspondiente al metilo de C-7 ( $\delta$  21.1) del anillo del timol. Se observan también las señales características del grupo benzoato, cuya posición fue confirmada de acuerdo con el experimento HMBC (Espectro A23).

El espectro RMN  $^1\text{H}$  indica que el compuesto **6** es el dihidro-derivado del compuesto **5**, ya que en él se observa la señal doble de un metilo secundario H-9 en 1.42 ppm ( $J = 6.8$  Hz, 3H) como la parte  $X_3$  de un sistema  $\text{ABMX}_3$  conformado por los protones H-8, H-9 y H-10. La señal del protón H-8 a 3.50 ppm se observa como un doble de cuarteto de dobles ( $J = 8.0, 6.8, 4.8$  Hz, 1H) como la parte M y los protones del metileno C-10 que soporta el grupo benzoiloxi conforman la parte AB con señales a 4.19 ppm ( $dd, J = 10.9, 8.0$  Hz) y 4.53 ppm ( $dd, J = 10.9, 4.8$  Hz).

A continuación, se muestran los datos físicos y espectroscópicos del 10-benzoiloxitimol (**6**).

**Peso obtenido (g):** 0.0258

**Obtención:** Producto natural de *A. glabrata*

**Punto de fusión:** 94-97 °C

**IR  $\nu_{\text{máx}}$ ( $\text{CHCl}_3$ ):** 3401, 2970, 2928, 1715, 1279  $\text{cm}^{-1}$

**UV-Vis  $\lambda_{\text{máx}}$  (log  $\epsilon$ ) (MeOH):** 205 (3.87), 224 (3.80), 275 (3.21) nm

**EM-DART-AR:**  $m/z$  271.13261 [ $\text{M} + \text{H}^+$ ] calculado para  $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{O}_3$  271.13342

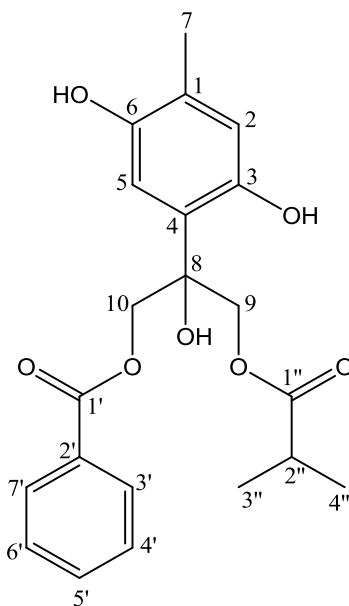
**Rotación óptica:**  $[\alpha]_{589} +12.27$  (c 0.002,  $\text{CHCl}_3$ ) a 25 °C

**Tabla 9.** Datos de **RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz), **RMN <sup>13</sup>C** (100 MHz) en CDCl<sub>3</sub> del compuesto **6**.

Posición	$\delta^{13}\text{C}$ ppm	Tipo	$\delta^1\text{H}$ ppm	HMBC
1	138.0	C		
2	116.8	CH	6.68, <i>d</i> (0.8)	3, 4, 6, 7
3	154.0	C		
4	125.3	C		
5	127.2	CH	7.10, <i>d</i> (7.8)	1, 3, 8
6	121.6	CH	6.74, <i>ddd</i> (7.6, 0.8, 0.4)	2, 4, 7
7	21.1	CH <sub>3</sub>	2.28, <i>s</i>	1, 2, 6
8	32.4	CH	3.50, <i>dcd</i> (8.0, 6.8, 4.8)	3, 4, 5, 9, 10
9	16.7	CH <sub>3</sub>	1.42, <i>d</i> (6.8)	4, 8, 10
10a	70.2	CH <sub>2</sub>	4.53, <i>dd</i> (10.9, 4.8)	4, 8, 9, 1'
10b			4.19, <i>dd</i> (10.9, 8.0)	
1'	167.5	C		
2'	130.3	C		
3'	129.8	CH	8.04, <i>m</i>	1', 5', 7'
4'	128.5	CH	7.56, <i>tt</i> (7.2, 1.6)	2', 6'
5'	133.2	CH	7.44, <i>m</i>	3', 7'
6'	128.5	CH	7.56, <i>tt</i> (7.2, 1.6)	2', 4'
7'	129.8	CH	8.04, <i>m</i>	1', 3', 5'

### 5.1.8. COMPUESTO 7

El compuesto **7** se identificó como 10-benzoiloxi-6,8-dihidroxi-9-isobutiriloxitimol (**Figura 26**), se aisló como aceite incoloro. El espectro de masas obtenido por la técnica EM-DART-AR no mostro el ion  $[M + H]^+$  de  $m/z$  389 ( $C_{21}H_{25}O_7$ ); en su lugar se observó un ion de  $m/z$  371, cuya masa exacta 371.14833 corresponde a una formula molecular  $C_{21}H_{23}O_6$  (calculado para  $C_{21}H_{23}O_6$  371.14946), es decir al ion  $[M - H_2O]^+$ , originado por la pérdida de una molécula de agua a partir del ion molecular.



**Figura 26:** Estructura del compuesto **7**, 10-benzoiloxi-6,9-dihidroxi-9-isobutiriloxitimol.

El espectro en el IR muestra las bandas de absorción características de los grupos hidroxilo ( $3398, 1210\text{ cm}^{-1}$ ), carbonilo de éster ( $1725\text{ cm}^{-1}$ ) y metilos y metilenos ( $2979, 2936\text{ cm}^{-1}$ ).

Los espectros de RMN  $^1H$  y  $^{13}C$  (Espectros A24, A25) fueron muy similares a los del compuesto **1**. En ellos se observan señales para los metinos aromáticos CH-2 ( $\delta_{H/C}$  6.66/120.2), CH-5 ( $\delta_{H/C}$  6.60/113.0), así como las señales características del isobutirato ( $\delta_{H/C}$  2.53/34.1, 1.10, 1.08/19.0, 18.9) y el benzoato ( $\delta_{H/C}$  7.98/129.9, 7.55/133.6 y 7.41/128.7) (**Tabla 10**).

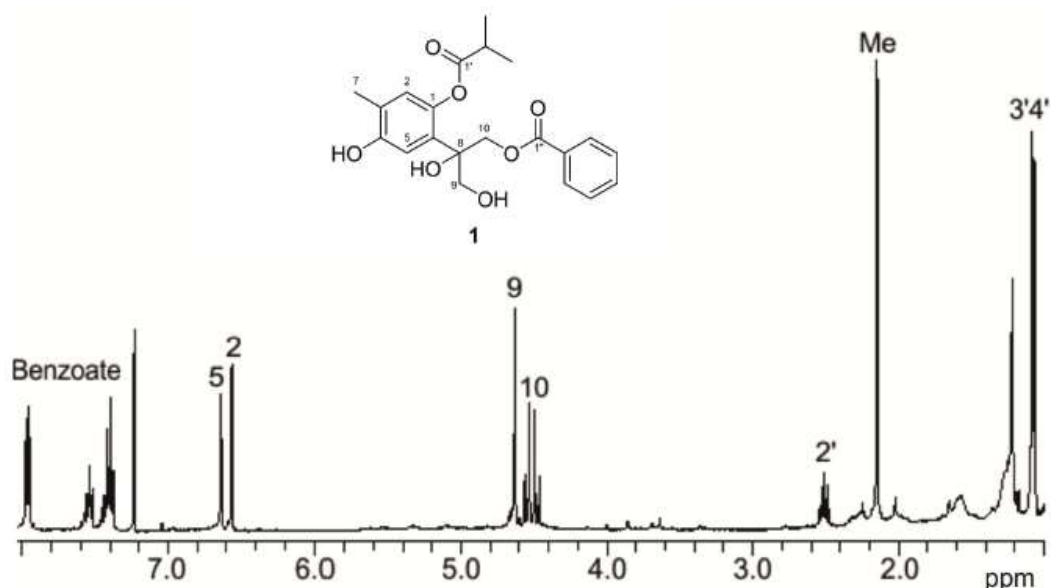
La diferencia entre los espectros de **1** y **7** radica en la multiplicidad y en los desplazamientos químicos de las señales debidas a los grupos metileno unidos a oxígeno. El espectro RMN  $^1\text{H}$  del compuesto **7** mostró dos sistemas AB asignables a los protones no equivalentes de los metilenos C-9 y C-10, el primero en  $\delta_{\text{H/C}}$  4.51, 4.58 ppm ( $d$ ,  $J = 11.6$  Hz) / 67.5, ( $\text{CH}_2$ -9) y el segundo en  $\delta_{\text{H/C}}$  4.65, 4.68 ppm ( $d$ ,  $J = 12.0$  Hz) / 68.1 ( $\text{CH}_2$ -10).

En el experimento HMBC (Espectro A26) se observaron acoplamiento a dos y tres enlaces entre los protones de ambos sistemas AB ( $-\text{CH}_2$ -9 y  $-\text{CH}_2$ -10) con los carbonos cuaternarios C-8 ( $\delta$  78.3) y C-4 ( $\delta$  120.3). Los protones del  $-\text{CH}_2$ -9 mostraron también acoplamiento con el carbonilo C-1'' ( $\delta$  177.9), éste a su vez se encuentra acoplado con señal séptuple ( $\delta_{\text{H/C}}$  2.53/34.1) correspondiente al metino del isobutirato y las señales dobles de los metilos del mismo grupo ( $\delta_{\text{H/C}}$  1.05, 1.08/19.0). Mientras que los protones del  $-\text{CH}_2$ -10 mostraron acoplamiento con el carbonilo C-1' ( $\delta$  167.1), que muestra también acoplamiento con los protones del anillo aromático del benzoato H-3'/7' ( $\delta_{\text{H/C}}$  7.98/129.9). De acuerdo con lo anterior, el isobutirato se ubicó en C-9 y el benzoato en C-10.

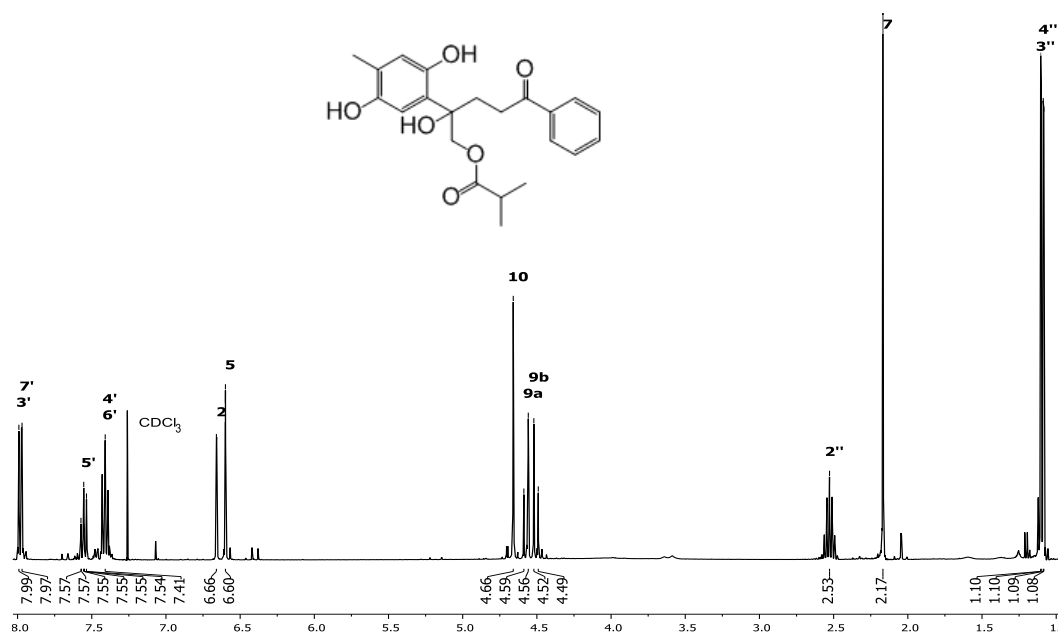
De acuerdo con los datos anteriores, la estructura del compuesto **7** se estableció como el 10-benzoiloxi-6,8-dihidroxi-9-isobutiriloxitímol (**7**).

Se ha documentado que este tipo de compuestos pueden ser artefactos originados por la apertura hidrolítica del epóxido seguido de la transesterificación del isobutirato de la posición C-3 del anillo del tímol a la posición C-9 durante el proceso de aislamiento y purificación o durante el almacenamiento (Maldonado *et. al.*, 1992) (Bohlmann *et.al.*, 1969). Lo anterior fue comprobado experimentalmente ya que después algún tiempo de almacenamiento del compuesto **1** a temperatura ambiente, éste se transformó al compuesto **7**.

Con referencia a lo anterior, en el trabajo publicado por García P. (2011), se describe un derivado del timol, cuya estructura se estableció como como el isobutirato de 10-benzoiloxi-6,8,9-trihidroxitimol (**figura 27**); sin embargo, el análisis detallado de los datos espectroscópicos que los autores publicaron llevó a la conclusión que la estructura debe corresponder al compuesto **7** (**figura 28**).



**Figura 27.** Espectro 400 MHz RMN  $^1\text{H}$  (García *et. al.*, 2011), isobutirato de 10-benzoiloxi-6,8,9-trihidroxitimol.



**Figura 28.** Espectro de 400 MHz RMN  $^1\text{H}$ , del 10-benzoiloxi-6,8-dihidroxi-9-isobutiriloxithimol **7**.

A continuación, se muestran los datos físicos y espectroscópicos del 10-benzoiloxi-6,9-dihidroxi-9-isobutiriloxitímol (**7**).

**Peso obtenido (g):** 0.3133

**Obtención:** artefacto producido a partir del compuesto **1**.

**IR  $\nu_{\text{máx}}$ (CHCl<sub>3</sub>):** 3398, 2979, 2936, 1725, 1210 cm<sup>-1</sup>

**UV-Vis  $\lambda_{\text{máx}}$  (log  $\epsilon$ ) (MeOH):** 205 (4.96), 228 (4.89), 294 (4.40) nm

**EM-DART-AR:** m/z 371.14833 [M – H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> calculado para C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>O<sub>6</sub> 371.14946

**Rotación óptica:**  $[\alpha]_{589} +0.00$  (c 0.001, CHCl<sub>3</sub>) a 25 °C

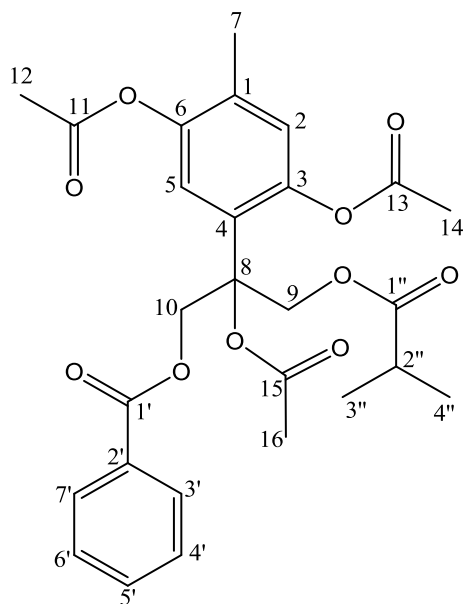
**Tabla 10.** Datos de **RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz), **RMN <sup>13</sup>C** (100 MHz) en CDCl<sub>3</sub> del compuesto **7**.

Posición	$\delta^{13}\text{C}$ ppm	Tipo	$\delta^1\text{H}$ ppm	HMBC
1	126.2	C		
2	120.2	CH	6.66, <i>da</i>	3, 4, 6, 7
3	149.8	C		
4	120.3	C		
5	113.0	CH	6.60, <i>sa</i>	1, 3, 6, 7*, 8
6	147.2	CH		
7	15.7	CH <sub>3</sub>	2.17, <i>sa</i>	1, 2, 6
8	78.3	C		
9a	67.5	CH <sub>2</sub>	4.58, <i>d</i> (11.6)	4, 8, 10, 1''
9b			4.51, <i>d</i> (11.6)	
10a	68.1	CH <sub>2</sub>	4.68, <i>d</i> (11.2)	4, 8, 9, 1'
10b			4.65, <i>d</i> (11.2)	
1'	167.0	C		
2'	129.4	C		
3'	129.9	CH	7.98, <i>m</i>	1', 5', 7'
4'	128.7	CH	7.41, <i>m</i>	2', 6'
5'	133.6	CH	7.55, <i>tt</i> (7.5, 0.8)	3', 7'
6'	128.7	CH	7.41, <i>m</i>	2', 4'
7'	129.9	CH	7.98, <i>m</i>	1', 3', 5'
1''	177.9	C		
2''	34.1	CH	2.53, <i>sep</i> (7.0)	1'', 3'', 4''
3'', 4''	18.9, 19.0	CH <sub>3</sub>	1.08, 1.10 <i>d</i> (7.0)	1'', 2''

\*4 J

### 5.1.9. COMPUESTO 7a

La acetilación del compuesto **7** produjo el triacetato **7a** (acetato de 10-benzoiloxi-6,8-O-diacetil-9-isobutiriloxitímol) (**Figura 29**). Se obtuvo como un aceite incoloro cuya composición molecular se determinó como C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>7</sub>, según el ion [M + Na] obtenido por la técnica EM-ESI<sup>+</sup> *m/z* 537.4, indicando 13 grados de insaturación.



**Figura 29:** Estructura del compuesto **7a**, acetato de 10-benzoiloxi-6,8-O-diacetiloxi-9-isobutiriloxitímol.

El espectro en el IR es similar al espectro de **7** excepto por la ausencia las bandas de absorción características de los grupos hidroxilo. Se observan las bandas características de los carbonilos de los grupos éster (1759 cm<sup>-1</sup>) y metilos y metilenos (2979, 2936 cm<sup>-1</sup>).

El espectro de RMN <sup>13</sup>C (Espectro A29) muestra 24 señales correspondientes a seis CH<sub>3</sub>, dos a CH<sub>2</sub>, seis a CH y diez a carbonos cuaternarios. A diferencia de **7** en los espectros de RMN <sup>1</sup>H (Espectro A28) y <sup>13</sup>C, se aprecian las señales inherentes a la presencia de 3 grupos acetato. Las señales de los metilos en δ 2.31 (3H, s, CH<sub>3</sub>-12), 2.38 (3H, s, CH<sub>3</sub>-14), 2.00 (3H, s, CH<sub>3</sub>-16) y sus respectivos carbonos en δ 21.3

(C-12), 20.9 (C-14), 21.4 (C-16), así como los carbonilos en  $\delta$  169.4 (C-11), 168.8 (C-12 y C-15).

A continuación, se muestran los datos físicos y espectroscópicos del acetato de 10-benzoiloxi-6,8-O-diacetil-9-isobutiriloxitimol (**7a**).

**Peso obtenido (g):** 0.0182

**Obtención:** Acetilación de (**7**) con piridina y anhídrido acético.

**IR  $\nu_{\text{máx}}$  (CHCl<sub>3</sub>):** 2978, 2936, 1759, 1271 cm<sup>-1</sup>

**UV-Vis  $\lambda_{\text{máx}}$  (log  $\epsilon$ ) (MeOH):** 204 (6.32), 223 (6.16), 274 (5.27) nm

**EM-ESI<sup>+</sup>:**  $m/z$  537.4 para el ion [M+Na]

**Rotación óptica:**  $[\alpha]_{589} +3.60$  (c 0.001, CHCl<sub>3</sub>) a 25 °C



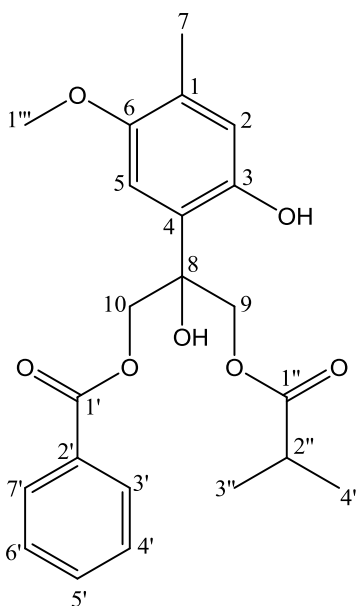
**Tabla 11.** Datos de **RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz), **RMN <sup>13</sup>C** (100 MHz) en CDCl<sub>3</sub> del compuesto **7a**.

Posición	$\delta^{13}\text{C}$ ppm	Tipo	$\delta^1\text{H}$ ppm	HMBC
1	132.3	C		
2	126.7	CH	6.96, <i>da</i> (0.4)	4, 5*, 6, 7
3	145.3	C		
4	127.7	C		
5	121.8	CH	7.16, <i>s</i>	1, 2*, 3, 6, 8
6	147.1	CH		
7	16.1	CH <sub>3</sub>	2.16, <i>sa</i>	1, 2, 6
8	80.8	C		
9a	62.9	CH <sub>2</sub>	4.96, <i>d</i> (11.2)	4, 8, 1''
9b			4.81, <i>d</i> (11.2)	4, 1''
10a	63.6	CH <sub>2</sub>	4.92, <i>d</i> (11.6)	4, 8, 1'
10b			5.12, <i>d</i> (11.6)	4, 1'
1'	165.8	C		
2'	129.6	C		
3'	129.8	CH	7.95, <i>m</i>	1', 5', 7'
4'	128.6	CH	7.43, <i>m</i>	2', 6'
5'	133.4	CH	7.56, <i>tt</i> (7.4, 1.4)	3', 7'
6'	128.6	CH	7.43, <i>m</i>	2', 4'
7'	129.8	CH	7.95, <i>m</i>	1', 3', 5'
1''	176.3	C		
2''	34.0	CH	2.52, <i>sep</i> (7.0)	1'', 3'', 4''
3'', 4''	18.8, 18.9	CH <sub>3</sub>	1.08, 1.10, <i>d</i> (7.2, 7.2)	1'', 2''
11	169.4	C		
12	21.3	CH <sub>3</sub>	2.37, <i>s</i>	11
13	168.8	C		
14	20.9	CH <sub>3</sub>	2.31, <i>s</i>	13
15	168.8	C		
16	21.4	CH <sub>3</sub>	2.00, <i>s</i>	15

\*4 J

### 5.1.10. COMPUESTO 8

El compuesto **8** (**Figura 30**) se identificó como el 10-benzoiloxi-8-hidroxi-9-isobutiriloxi 6-metoxitimol. Se obtuvo como un aceite incoloro cuya composición molecular se determinó como  $C_{22}H_{26}O_7$  según el ion  $[M + H^+]$  obtenido por EM-DART-AR,  $m/z$  403.17520 (calculado para  $C_{22}H_{27}O_7$  403.17568), indicando diez grados de insaturación.



**Figura 30.** Estructura del compuesto **8**, 10-benzoiloxi-8-hidroxi-9-isobutiriloxi 6-metoxitimol.

El espectro en el IR muestra las bandas de absorción características de grupos hidroxilo ( $3385, 1271\text{ cm}^{-1}$ ), carbonilos de grupos éster ( $1723\text{ cm}^{-1}$ ) y metilos y metilenos ( $2973, 2932\text{ cm}^{-1}$ ).

En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **8** (Espectro A32) es similar al del compuesto **7**. La diferencia más sobresaliente es la presencia de una señal simple que integra para tres protones en  $3.72\text{ ppm}$  correspondiente al metilo del metoxilo en el C-6 del anillo del timol y su respectivo carbono en  $56.3\text{ ppm}$  (Espectro A33).

Al igual que el compuesto **7**, el compuesto **8** es un artefacto producido a partir de **2**, ya que se obtuvo después de unos días de almacenamiento a temperatura ambiente de este último.

A continuación, se muestran los datos físicos y espectroscópicos del 10-benzoiloxi-8-hidroxi-9-isobutiriloxi 6-metoxitímol (**8**).

**Peso obtenido (g):** 0.0058

**Obtención:** A partir de la descomposición en  $\text{CDCl}_3$  del compuesto **2**.

**IR  $\nu_{\text{máx}}$  ( $\text{CHCl}_3$ ):** 3385, 2973, 2932, 1723, 1721  $\text{cm}^{-1}$

**UV-Vis  $\lambda_{\text{máx}}$  ( $\log \epsilon$ ) (MeOH):** 207 (3.83), 228 (4.28), 293 (5.49) nm

**EM-DART-AR:**  $m/z$  403.17520  $[\text{M} + \text{H}^+]$  calculado para  $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{O}_7$  403.17568.

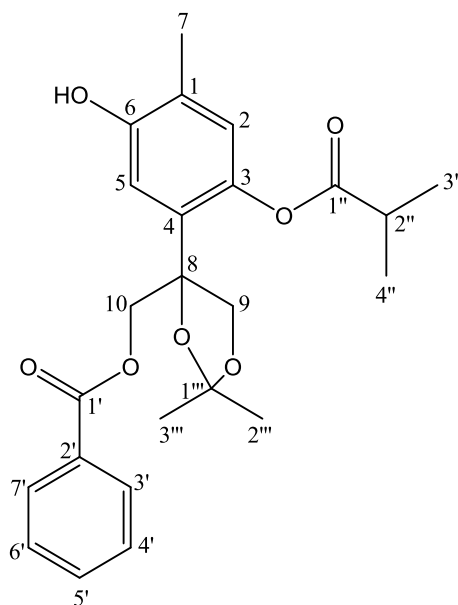
**Tabla 12.** Datos de **RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz), **RMN <sup>13</sup>C** (100 MHz) en CDCl<sub>3</sub> del compuesto **8**.

Posición	$\delta^{13}\text{C}$ ppm	Tipo	$\delta^1\text{H}$ ppm	HMBC
1	129.2	C		
2	108.9	CH	6.57 s	1, 3, 6, 8
3	150.1	C		
4	119.2	C		
5	120.6	CH	6.70 s	3, 4, 6, 7*
6	151.3	C		
7	16.0	CH <sub>3</sub>	2.16 s	1, 5*, 6
8	78.8	C		
9a	68.1	CH <sub>2</sub>	4.64 d, (12.1)	1''
9b			4.53 d, (12.1)	
10a	67.6	CH <sub>2</sub>	4.72 d, (11.9)	4, 8, 1'
10b			4.68 d, (11.9)	
1'	166.8	C		
2'	129.5	C		
3'	129.9	CH	8.00 m	1', 7', 5'
4'	128.7	CH	7.44 m	2'
5'	133.7	CH	7.58 tt, (7.0, 1.3)	3', 7'
6'	128.7	CH	7.44 m	2'
7'	129.9	CH	8.00 m	1', 3', 5'
1''	177.7	C		
2''	34.1	CH	2.55 sep, (7.2)	3'', 4''
3'', 4''	19.0, 19.0	CH <sub>3</sub>	1.11, 1.12 d, (7.2)	2'', 1''
1'''	56.3	CH <sub>3</sub>	3.72	6
3-OH		OH	8.14 sa	3
8-OH		OH	4.29 sa	

\* 4J

### 5.1.11. COMPUESTO 9

El compuesto **9** se identificó como el acetónido 8,9 del isobutirato de 10-benzoiloxi-6,8,9-trihidroxitimol (**Figura 31**). Se obtuvo como aceite incoloro, cuya composición molecular se determinó como  $C_{24}H_{28}O_7$  según el ion  $[M + H^+]$  obtenido por EM-DART-AR,  $m/z$  429.18951 (calculado para  $C_{24}H_{29}O_7$  329.19133) indicando once grados de insaturación.



**Figura 31:** Estructura del compuesto **9**, acetónido 8,9 del isobutirato de 10-benzoiloxi-6,8,9-trihidroxi timol.

El espectro en el IR se observan las bandas de absorción características de grupos hidroxilo ( $3601, 1238 \text{ cm}^{-1}$ ), las bandas características de los carbonilos de grupos éster ( $1720 \text{ cm}^{-1}$ ) y metilos y metilenos ( $2931, 2857 \text{ cm}^{-1}$ ).

El espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Espectro A35) es similar al del compuesto **1**. La diferencia entre **1** y **9** radica en la presencia de las señales de dos metilos geminales, una en 1.30 ppm y la otra en 1.51 ppm correspondientes a un grupo acetónido en C-8 ( $\delta$  82.5) y C-9 ( $\delta$  71.4), la posición del acetónido se comprobó mediante el experimento

HMBC (Espectro A37, **Tabla 13**) que muestra correlación de H-9 con el carbono C-1''' del acetónido.

El espectro de RMN <sup>13</sup>C (Espectro A36) muestra 22 señales correspondientes a cinco CH<sub>3</sub>, dos a CH<sub>2</sub>, ocho a CH y nueve a carbonos cuaternarios. En comparación con **1** se aprecian las señales correspondientes a los metilos ( $\delta$  34.5, 26.9) y el carbono cuaternario C-1''' del acetónido en 110.4 ppm.

El compuesto **9** podría corresponder a un artefacto producido por la apertura hidrolítica del epóxido y la posterior adición de la acetona usada como disolvente durante el proceso de aislamiento.

A continuación, se muestran los datos físicos y espectroscópicos del acetónido 8,9 del isobutirato de 10-benzoiloxi-6,8,9-trihidroxitimol (**9**).

**Peso obtenido (g):** 0.0062

**Obtención:** Probable producto de descomposición del compuesto **1**.

**IR  $\nu_{\text{máx}}$  (CHCl<sub>3</sub>):** 3601, 2931, 2857, 1721, 1238 cm<sup>-1</sup>

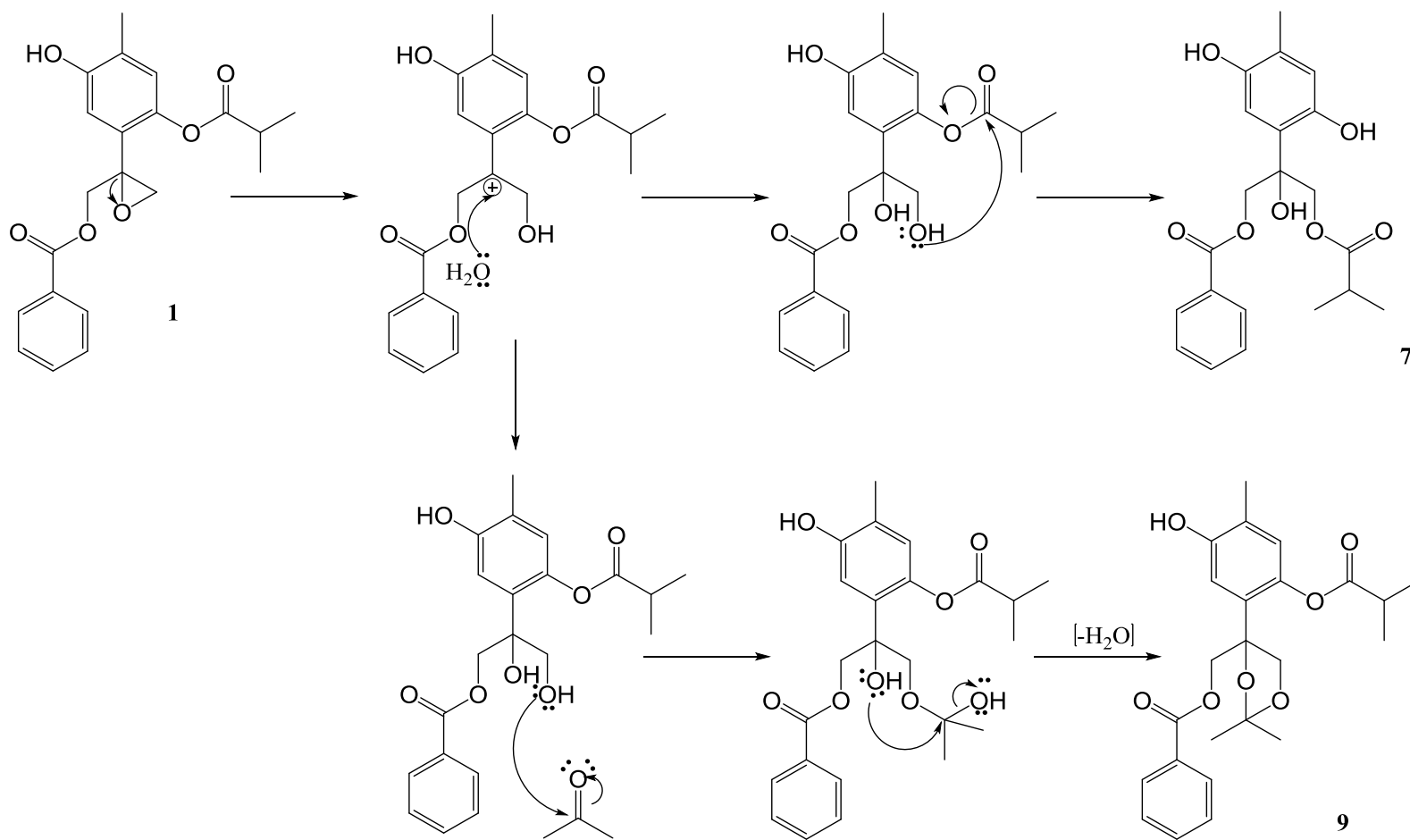
**UV-Vis  $\lambda_{\text{máx}}$  (log  $\epsilon$ ) (MeOH):** 204 (4.70), 228 (4.64), 280 (4.56) nm

**EM-DART-AR:** m/z 429.18951 [M + H<sup>+</sup>] calculado para C<sub>24</sub>H<sub>29</sub>O<sub>7</sub> + H<sup>+</sup> 429.19133

**Tabla 13.** Datos de **RMN <sup>1</sup>H** (500 MHz), **RMN <sup>13</sup>C** (125 MHz) en CDCl<sub>3</sub> del compuesto **9**.

Posición	$\delta^{13}\text{C}$ ppm	Tipo	$\delta^1\text{H}$ ppm	HMBC
1	124.9	C		
2	125.3	CH	6.82, s	3, 4, 6, 7
3	140.3	C		
4	132.1	C		
5	113.9	CH	7.15, s	2, 3, 6, 8
6	151.4	CH		
7	15.7	CH <sub>3</sub>	2.23, sa	2, 6
8	82.5	C		
9a	71.4	CH <sub>2</sub>	4.48, d (8.8)	10, 1'''
9b			4.09, d (8.8)	4, 10
10a	68.3	CH <sub>2</sub>	4.53, d (11.5)	1'
10b			4.35, d (11.5)	8, 9, 1'
1'	166.5	C		
2'	130.2	C		
3'	129.9	CH	8.04, m	5'
4'	128.5	CH	7.43, m	2', 6'
5'	133.2	CH	7.55, tt (7.5, 1.3)	2'
6'	128.5	CH	7.43, m	2', 4'
7'	129.9	CH	8.04, m	5'
1''	175.8	C		
2''	34.5	CH	2.80, sep (7.0)	3'', 4''
3'', 4''	19.2, 19.0	CH <sub>3</sub>	1.32, 1.31 d (7.0)	1'', 2''
1'''	110.4	C		
2'''	25.4	CH <sub>3</sub>	1.30, sa	1''', 3'''
3'''	27.0	CH <sub>3</sub>	1.51, sa	1''', 2'''

A continuación, en la **figura 32** se muestra el mecanismo propuesto para la formación de los artefactos **7** y **9** a partir de **1**. El proceso de **1** a **7** correspondería al mismo proceso de **2** a **8**.



**Figura 32.** Mecanismo de formación de artefactos provenientes de **1**.



Los compuestos **1-4** son entidades químicas ya descritas anteriormente, sin embargo, sus características físicas y espectroscópicas se habían descrito de forma errónea y/o incompleta por lo que este trabajo representa una aportación a la elucidación estructural y la asignación completa de los datos de RMN de dichos compuestos. Por otro lado, los compuestos **5-9** corresponden a entidades químicas no descritas previamente en la literatura.

## 5.2. TRITERPENOS

Las fracciones FC y FD del extracto 2 se caracterizaron de acuerdo con su perfil de RMN  $^1\text{H}$  como mezcla de esteres grasos de triterpenos pentacíclicos. Los triterpenos identificados por RMN  $^1\text{H}$  a 500 MHz en las fracciones FC y FD del extracto 2 de DCM fueron  $\alpha$ -amirina (10),  $\beta$ -amirina (11), taraxasterol (12), *pseudo*-taraxasterol (13) y lupeol (14), (Figura 33).

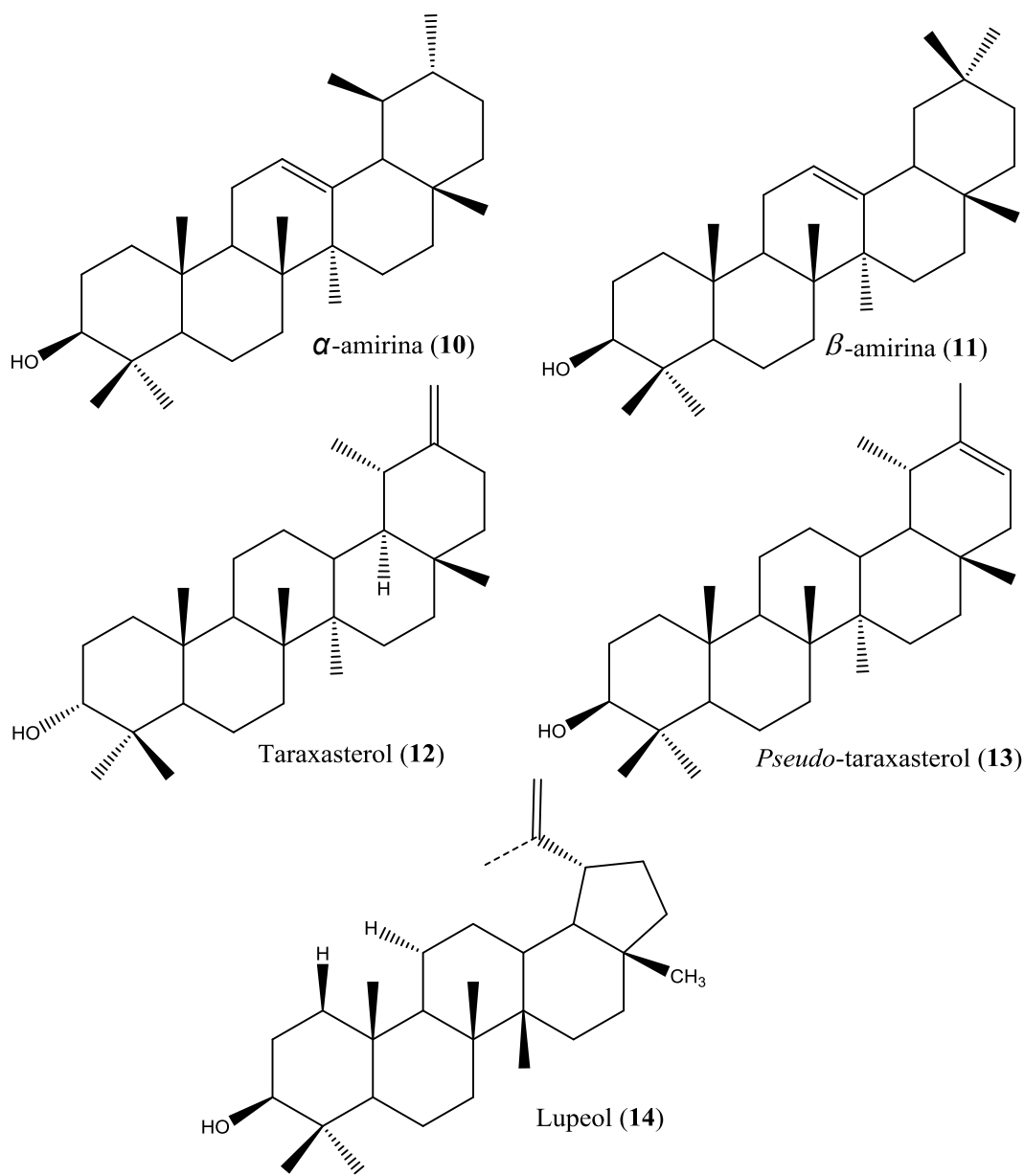
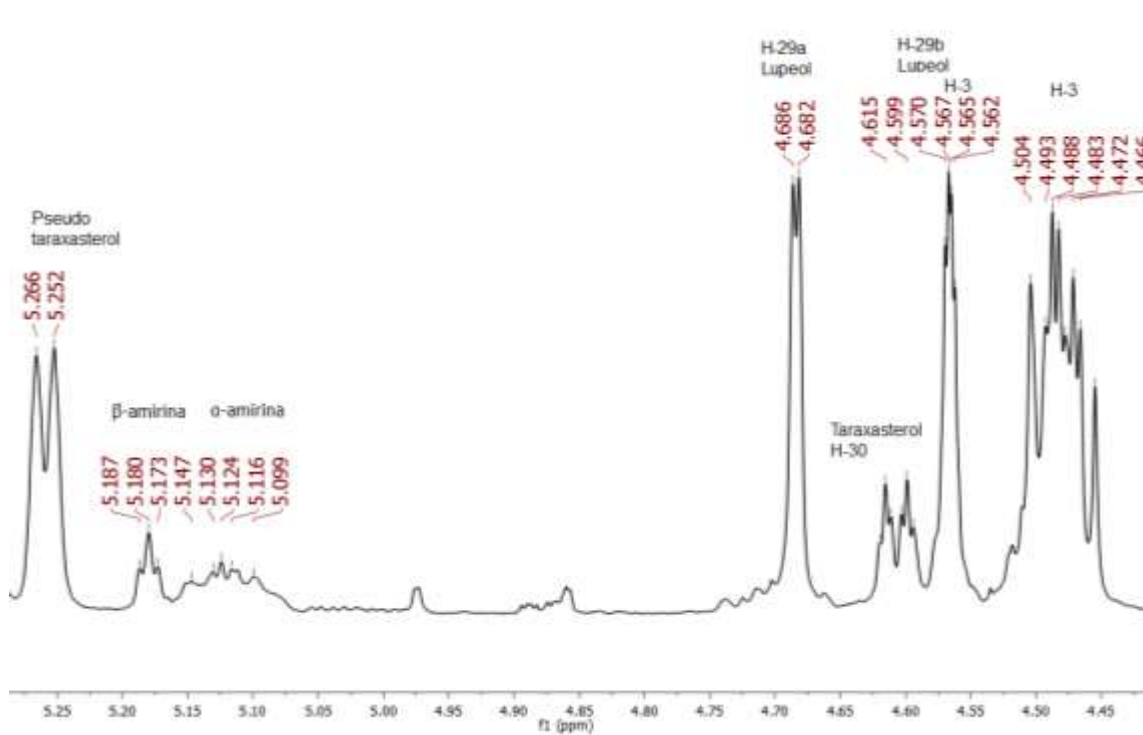


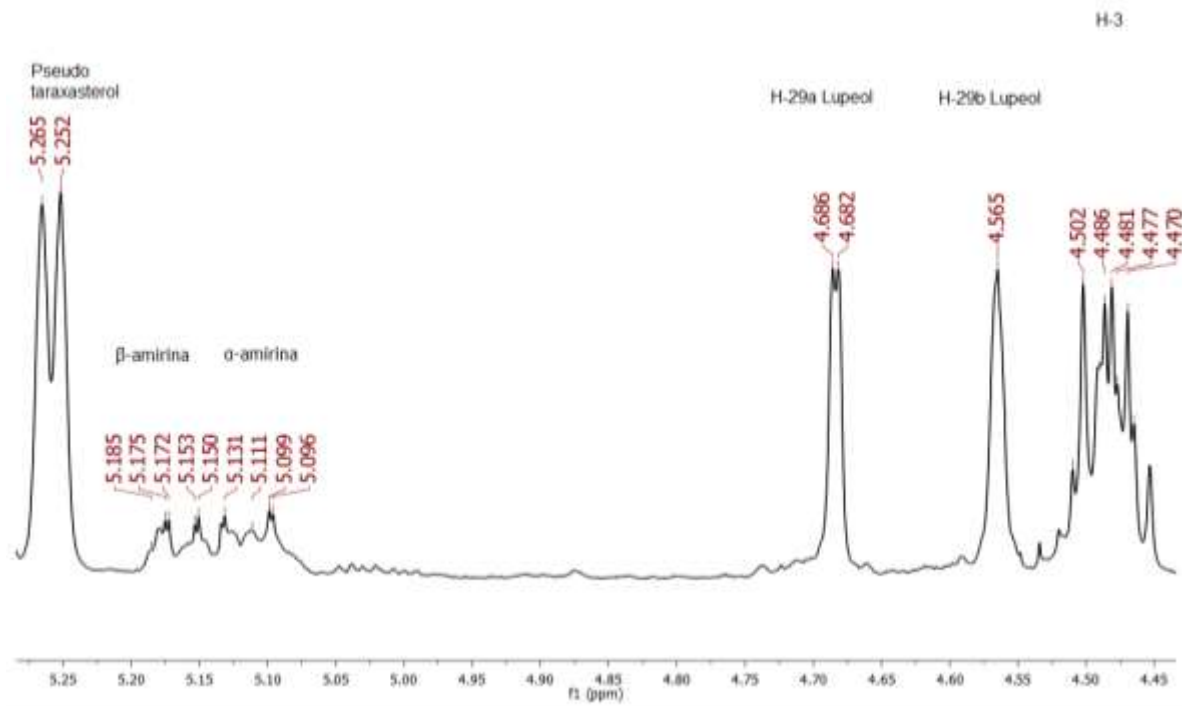
Figura 33. Triterpenos pentacíclicos identificados en *A. glabrata*.

En la **figura 34** se muestra la región de protones vinílicos del espectro de RMN  $^1\text{H}$  de la fracción FC, donde se observaron las señales características de los protones vinílicos para los triterpenos pentacíclicos,  $\alpha$ -amirina y  $\beta$ -amirina ( $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$ ) cuyas señales características para el protón vinílico H-12 se encuentran en  $\delta$  5.12 y 5.18, respectivamente (Saeed & Sabir, 2003), los protones del metileno exocíclico (C-30) del taraxasterol ( $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$ ) en  $\delta$  4.61 y 4.60, el protón vinílico H-21 *pseudo*-taraxasterol ( $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}$ ) en  $\delta$  5.26 (M. Xue-Mei *et. al.*, 2008) y finalmente las señales características del metileno del isopropilideno (C-29) del lupeol ( $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$ ) a  $\delta$  4.68 y 4.57 (Saeed & Sabir, 2003).



**Figura 34.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) de la fracción FC, protones vinílicos.

También se puede apreciar una señal simple ancha en 1.25 ppm y una señal triple en 2.29 ppm con una constante de acoplamiento de 7.3 Hz, así como la señal de H-3 desplazada en 4.59, lo que sugiere que los triterpenos pentacíclicos presentes en la fracción se encuentran como ésteres de ácidos grasos (Espectro A38).



**Figura 35.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) de la fracción FC después de la transesterificación, protones vinílicos.

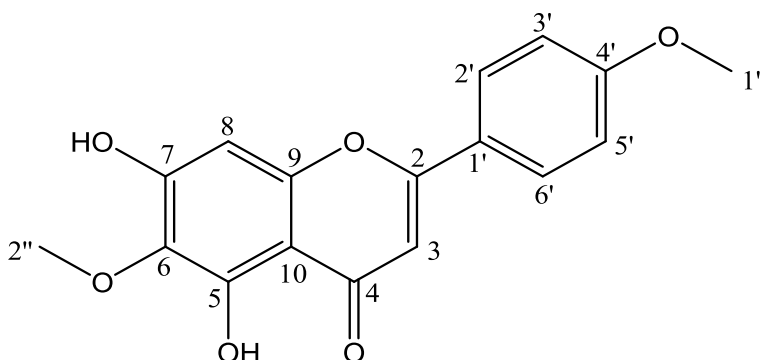
La reacción de metanólisis y transesterificación de la mezcla produjo los triterpenos libres y los ésteres metílicos de ácidos grasos. Después de la reacción de transesterificación, en el espectro de RMN  $^1\text{H}$  (**Figura 35**) se observó la presencia:  $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina, *pseudo*-taraxasterol y lupeol. El desplazamiento de los protones vinílicos de estos es similar a los anteriores; sin embargo, las señales correspondientes al taraxasterol no se observaron y en su lugar, la señal del pseudotaraxasterol fue mucho más intensa indicando que en el medio ácido, se produjo la isomerización del doble enlace.

Estos compuestos han sido aislados de especies de diferentes géneros y se han identificado en otras especies de *Ageratina*, como en *A. fastigiatum* (Gonçalves L., 2010). Sus actividades biológicas como antiinflamatoria, antiartrítica y antitumoral han sido evaluadas resaltando su importancia farmacológica.

### 5.3. OTROS COMPUESTOS

#### 5.3.1. COMPUESTO 15

El compuesto **15** se identificó como pectolinarigenina (**Figura 36**). Se aisló como cristales amarillos con una temperatura de fusión de 202-205 °C.



**Figura 36:** Estructura del compuesto **15**, pectolinarigenina.

Este flavonoide ya ha sido aislado de otras especies de la familia Asteraceae. Los datos físicos y espectroscópicos son congruentes con la literatura (Ru Deng *et. al.*, 2004) y (Tokunaru *et. al.*, 1998). Entre su importancia biológica destaca cómo un compuesto con actividad antiinflamatoria.

A continuación, se muestran los datos físicos y espectroscópicos de pectolinarigenina (**15**).

**Peso obtenido (g):** 0.0355

**Punto de fusión:** 202 – 205 °C

**Obtención:** Producto natural de *A. glabrata*.

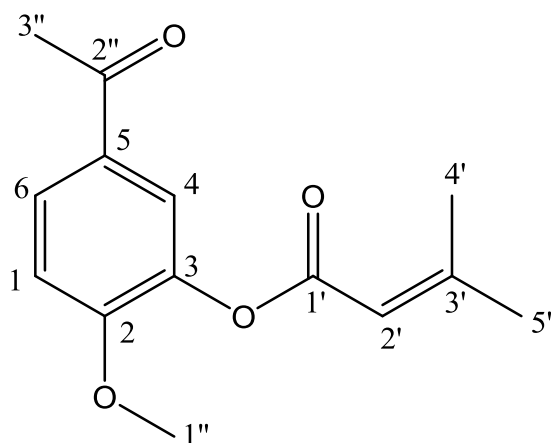
**IR  $\nu_{\text{máx}}$  (CHCl<sub>3</sub>):** 3501, 2939, 2844, 1233 cm<sup>-1</sup>

**UV-Vis  $\lambda_{\text{máx}}$  (log  $\epsilon$ ) (MeOH):** 216 (3.23), 275 (4.11), 330 (4.93) nm

**EM-DART-AR:** m/z 315.08729 [M + H<sup>+</sup>] calculado para C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub> + H<sup>+</sup> 315.08686

### 5.3.2. COMPUESTO 16

El compuesto **16** se identificó como 5-acetil-2-metoxifenil-3'-metil-2'-butenoato (**Figura 37**). Se aisló como un aceite amarillo cuya composición molecular se determinó como  $C_{14}H_{16}O_4$ , según el ion  $[M + Na]$  obtenido por la técnica EM-ESI<sup>+</sup>,  $m/z$  271.0, indicando siete grados de insaturación.



**Figura 37:** Estructura del compuesto **16**, 5-acetil-2-metoxifenil- 3'-metil-2'-butenoato.

En el espectro de IR se observan las bandas de absorción características de metilos y metilenos ( $2925, 2853\text{ cm}^{-1}$ ) y la banda de los carbonilos de grupos éster ( $1732\text{ cm}^{-1}$ ).

El espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Espectro A40) muestra las señales de los protones de los metilos  $\text{CH}_3\text{-4}'$  ( $\delta = 2.25$ ,  $d$ ,  $J = 1.0$ ) y  $\text{CH}_3\text{-5}'$  ( $\delta = 1.99$ ,  $d$ ,  $J = 1.0$ ) como señales dobles anchas. Una señal séptuple en  $\delta = 6.59$  con  $J = 1.0$  es correspondiente con el protón vinílico  $\text{H-2}'$  que se encuentra acoplado a  $\text{H-4}'$  y  $\text{H-5}'$  según sus constantes de acoplamiento.

Se observan los protones del metilo  $\text{CH}_3\text{-3}''$  ( $3\text{H}$ ,  $s$ ,  $\delta = 2.58$ ) correspondiente a la metilcetona como un simple y los protones del metoxilo  $\text{CH}_3\text{-1}''$  ( $3\text{H}$ ,  $s$ ,  $\delta = 3.95$ ) como un simple.

Se observan tres señales en la región de los protones aromáticos indicando la tri sustitución del anillo aromático, se observó la señal de H-1 como un doble (1H,  $\delta = 7.00$ ,  $J = 8.7$ ), la señal de H-4 como un doble (1H,  $\delta = 8.14$ ,  $J = 2.3$ ) y finalmente la señal de H-6 como un doble de dobles (1H,  $\delta = 8.07$ ,  $J = 8.7, 2.3$ ) mostrando el acoplamiento de H-6 con los protones H-4 y H-1.

El espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Espectro A41) muestra 14 señales correspondientes a cuatro  $\text{CH}_3$ , cuatro a CH y seis a carbonos cuaternarios, dos de estos carbonilos corresponden a C-1' ( $\delta = 191.9$ ) y C-2'' ( $\delta = 196.4$ ).

La posición relativa de los sustituyentes fue establecida mediante el experimento HMBC (Espectro A42, **Tabla 15**). Para el grupo metoxilo se observó acoplamiento de este con el C-2 ( $\delta = 161.1$ ).

Este compuesto no ha sido reportado anteriormente en la literatura, por lo que se considera una nueva entidad química aislada de *A. glabrata*.

A continuación, se muestran los datos físicos y espectroscópicos del 5-acetil-2-metoxifenil- 3-metil-2-butenato (**16**).

**Peso obtenido (g):** 0.0136

**Obtención:** Producto natural de *A. glabrata*.

**IR  $\nu_{\text{máx}}$  ( $\text{CHCl}_3$ ):** 3422, 2925, 2853, 1732, 1223  $\text{cm}^{-1}$

**UV-Vis  $\lambda_{\text{máx}}$  ( $\log \epsilon$ ) (MeOH):** 261 (2.79), 206 (2.20), 238 (2.55) nm

**EM-ESI<sup>+</sup>:**  $m/z$  271.0 de acuerdo al ion  $[\text{M} + \text{Na}]$

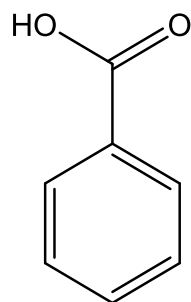
**Tabla 14.** Datos de **RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz), **RMN <sup>13</sup>C** (100 MHz) del compuesto **16**.

<b>Posición</b>	<b>δ<sup>13</sup>C ppm</b>	<b>Tipo</b>	<b>δ<sup>1</sup>H ppm</b>	<b>HMBC</b>
1	111.4	CH	7.00 <i>d</i> (8.7)	5
2	161.1	C		
3	130.8	C		
4	131.1	CH	8.14 <i>d</i> (2.3)	2, 6
5	130.1	C		
6	132.6	CH	8.07 <i>dd</i> (8.7, 2.3)	2, 4
1'	191.9	C		
2'	124.9	CH	6.59 <i>sep</i> (1.0)	4', 5'
3'	156.6	C		
4'	21.4	CH <sub>3</sub>	2.25 <i>da</i> (1.0)	2', 3', 5'
5'	28.1	CH <sub>3</sub>	1.99 <i>da</i> (1.0)	2', 3', 4'
1''	56.0	CH <sub>3</sub>	3.95 <i>s</i>	2
2''	196.4	C		
3''	26.4	CH <sub>3</sub>	2.58 <i>s</i>	2''



### 5.3.3. ÁCIDO BENZOICO (17)

El compuesto **17** se identificó como ácido benzoico (**figura 38**) y se aisló como cristales blancos.



**Figura 38:** Estructura del compuesto **17**, ácido benzoico.

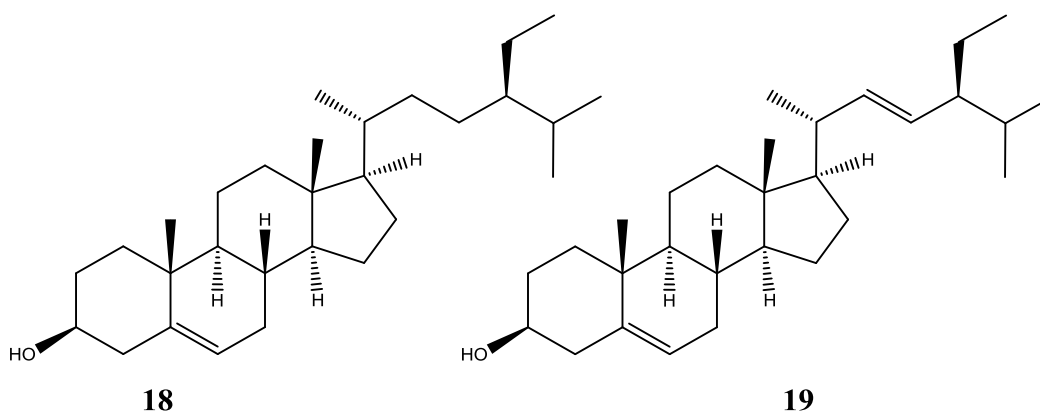
**Peso obtenido (g):** 0.0136

**Obtención:** Producto natural de *A. glabrata*

**Punto de fusión:** 121-123 °C.

Este compuesto se encuentra de forma natural en las plantas desempeñando importantes papeles en el metabolismo como un precursor de una amplia gama de metabolitos primarios y secundarios (Qualley *et al.*, 2012). Se ha encontrado que desempeña un papel importante en cuanto al crecimiento, tolerancia al estrés y en la anatomía y morfología de algunas especies. Además, participa en las señales internas que regulan la respuesta de defensa de las plantas frente a diversas condiciones bióticas y abióticas (Williams *et al.*, 2003). Hablando específicamente de *A. glabrata*, este compuesto es el precursor de los derivados del timol aislados en este estudio, ya que como se observa en todos compuestos aislados, los timoles se encuentran como éster del ácido benzoico.

#### 5.3.4. $\beta$ -SITOSTEROL (18) Y ESTIGMASTEROL (19)



**Figura 39:** Estructura de los compuestos  $\beta$ -sitosterol (18) y estigmasterol (19).

Los compuestos **18** y **19** fueron identificados como  $\beta$ -sitosterol (**18**) y estigmasterol (**19**) (**Figura 39**), éstos son esteroides de origen vegetal cuya estructura química es muy similar a la del colesterol, sin embargo, difieren estructuralmente por la presencia de sustituyentes de tipo etilo en la cadena lateral de la molécula (Valenzuela & Ronco, 2004). Los fitoesteroides son particularmente abundantes en el reino vegetal, están presentes en los frutos, semillas, hojas y tallos de prácticamente todos los vegetales conocidos. Se han identificado alrededor de 25 estructuras diferentes de fitoesteroides, pero existen tres que son más comunes:  $\beta$ -sitosterol, campesterol y el estigmasterol, que constituyen el 95%-98% de los fitoesteroides identificables en extractos vegetales (Ling & Jones, 1995). Su función, al igual que el colesterol en los animales, es formar parte de la estructura celular.

## **6. ENSAYOS DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA**

## 6. ENSAYOS DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Considerando que algunos timoles aislados de otras especies de *Ageratina* mostraron tener buena actividad antidiarreica (Bustos *et. al.*, 2016b) (Bustos *et. al.*, 2014), los derivados del timol **1**, **1a**, **2**, **3**, **4**, **7** y el compuesto **15** se evaluaron como inhibidores de actividad protozoaria empleando el modelo de subcultivos, tomando a *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia* como organismos de prueba y como antidiarreicos en el ensayo de inhibición de la hiperperistalsis. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 15**.

**Tabla 15:** Resultados de la evaluación de actividad antiprotozoaria y antidiarreica de algunos de los derivados del timol aislados de *A. glabrata*.

Compuesto	Actividad antiprotozoaria		Actividad antidiarreica
	CI <sub>50</sub> µM (CI)		DI <sub>50</sub> µmol/Kg ± SD
	<i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Giardia lamblia</i>	Inhibición de hiperperistalsis
<b>1</b>	1.6 (1.8-1.57)	36.9 (38.3-5.9)	2.000 ± 0.003
<b>1<sup>a</sup></b>	0.84 (0.87-0.80)	24.2 (24.7-24.0)	0.810 ± 0.021
<b>2</b>	169.6 (171.3-168.9)	191.2 (192.1-190.8)	0.457 ± 0.004
<b>3</b>	25.9 (26.2-25.7)	48.3 (48.4-45.4)	0.740 ± 0.003
<b>4</b>	61.2 (62.3-59.8)	68.0 (69.7-67.4)	1.430 ± 0.006
<b>7</b>	45.6 (44.9-41.9)	60.7 (62.3-56.9)	0.380 ± 0.003*
<b>15</b>	184.9 (186.9-180.7)	68.7 (70.3-67.4)	0.598 ± 0.001
Emetina	2.18 (2.2-2.14)	0.83 (0.87-0.82)	
Metronidazol	0.23 (0.58-0.17)	1.22 (1.57-0.81)	
Quercetina			1.1±0.001
Loperamida			0.2±0.001

En el ensayo *in vitro* de actividad antiprotozoaria se observó que los compuestos **1** y **1a** son selectivos contra *Entamoeba histolytica* y representan entidades químicas con importante actividad antiprotozoaria comparable con los fármacos utilizados como referencia, emetina y metronidazol. Los compuestos **3** y **7** mostraron actividad

moderada. Y contra *Giardia lamblia* los compuestos **1, 1a, 3, 4, 7 y 15** presentaron actividad moderada.

En cuanto a la inhibición de la hiperperistalsis, los compuestos **1a, 2, 3, 7 y 15** mostraron actividad antidiarreica significativa, mayor que la quercetina, pero menor que la loperamida. Y los compuestos **1 y 4** presentan actividad equiparable a la quercetina.

Estos datos sugieren que los derivados del timol son los responsables del efecto de la planta en el tratamiento de los malestares estomacales, ya sea inhibiendo el crecimiento de los microorganismos en el intestino o disminuyendo la motilidad intestinal. Como consecuencia, el estudio químico y biológico de *A. glabrata* representa una valiosa aportación al sustento científico del uso tradicional de la especie para tratamiento de las enfermedades estomacales.

Por otro lado, se puede sugerir a los derivados del timol como estructuras líderes para el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de las enfermedades diarreicas.

## **7. CONCLUSIONES**

## 7. CONCLUSIONES

Los resultados presentados en este trabajo representan una contribución al conocimiento químico y biológico de especies endémicas mexicanas pertenecientes al género *Ageratina* y reafirman la importancia de las plantas como fuente de nuevas entidades químicas con potencial estructura líder para el desarrollo de nuevos fármacos en el tratamiento de diferentes enfermedades.

El estudio fitoquímico del extracto de diclorometano de *Ageratina glabrata* condujo a la identificación de 21 compuestos: once derivados del timol (**1-6**) incluyendo dos derivados semisintéticos (**1a**, **7a**) y tres artefactos (**7-9**), un flavonoide (**15**), una acetofenona (**16**), ácido benzoico (**17**), dos fitosteroles (**18**, **19**) y cinco triterpenos (**10-14**). Los compuestos **1-4** son entidades químicas ya descritas; sin embargo, sus características físicas y espectroscópicas eran incompletas y en algunos casos se detectaron incongruencias, por lo que en este trabajo se describe su elucidación estructural y asignación completa e inambigua de los datos de RMN. Para el compuesto **1** se determinó su configuración absoluta como 8S mediante difracción de rayos X. Por otro lado, los compuestos **5-9**, **7a** y **16** corresponden a entidades químicas no descritas previamente en la literatura, donde los compuestos **1-7a** se publicaron en el artículo “Antidiarrheal Thymol Derivatives from *Ageratina glabrata*. Structure and Absolute Configuration of 10-Benzoyloxy-8,9-epoxy-6-hydroxythymol Isobutyrate” en la revista *Molecules* 21, 1132 (2016), anexado al final de este trabajo.

En cuanto a la evaluación de la actividad biológica, los compuestos **1**, **1a**, **2**, **3** y **7** representan entidades químicas con actividad antiprotozoaria y/o antidiarreica significativas, pudiéndose atribuir a éstos las propiedades de *Ageratina glabrata* como planta medicinal. Además, los derivados del timol pueden ser considerados como estructuras líderes para el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de las enfermedades diarreicas.

## **8. DESARROLLO EXPERIMENTAL**



## **8. DESARROLLO EXPERIMENTAL**

### **8.1. MATERIALES Y EQUIPOS**

Para el aislamiento y purificación de los metabolitos secundarios, se realizaron separaciones mediante cromatografía en columna (CC) en gel de sílice (230/400), en una proporción de 1:20 por gramo de extracto y sephadex (LH-20). También se utilizó cromatografía en capa fina preparativa (CCFP) en cromatoplasmas ALUGRAM de marca MACHEREY NAGEL de 20x20 cm y 2 mm, 1 mm, 0.5 mm y 0.1 mm de espesor, en una relación de aproximadamente 200 mg, 100 mg, 50 mg, 10 mg respectivamente de extracto por placa (según el caso), así como cromatoplasmas MACHEREY NAGEL de 5x10 cm y 0.25 mm de espesor, en una relación de 10 miligramos de muestra por placa.

Durante el fraccionamiento se realizó el monitoreo constante por cromatografía en capa fina analítica (CCFA) de gel de sílice 60G UV<sub>254</sub> ALUGRAM de marca MACHEREY NAGEL 20x20 cm y 0.20 mm de espesor. La detección por exposición a la luz UV se observó en una lámpara portátil Spectroline Longlife Filterer, con longitud de onda de 254 nm y su posterior revelado por aspersion con solución reveladora de "OLEUM" preparada con 200 mL de ácido acético, 10 mL de ácido sulfúrico y 40 mL de agua o solución de sulfato cérico preparada con 350 g de hielo, 12 g de sulfato cérico y 22.2 mL de ácido sulfúrico y calentamiento en ambos casos.

Los disolventes utilizados (metanol, acetona, acetato de etilo, hexano, diclorometano y tolueno) fueron obtenidos de manera comercial y se destilaron en el laboratorio, previo a su uso. En algunos casos se utilizó cierta cantidad de ácido fórmico de grado analítico para la separación.

Para la concentración de los extractos y fracciones se utilizó un evaporador rotatorio marca BUCHI modelo RII y R215, con su respectivo baño de agua B-RII y B491.

Los espectros en el Infrarrojo (IR) fueron realizados en un espectrofotómetro Bruker tensor 27, utilizando la técnica de disolución en cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ) o en película.

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY, DEPT 90, DEPT 135, HSQC, HMBC y NOESY fueron realizados en espectrómetros modelos, Bruker Ascend 500 MHz, Varian Unity Inova 500 MHz, Bruker Avance III 400 MHz, Jeol Eclipse 300 MHz y Bruker Fourier 300 MHz. Se utilizó como disolvente cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) o dimetil sulfoxido deuterado ( $\text{DMSO-}d_6$ ).

Los espectros de masas (EM) se obtuvieron en un espectrómetro Jeol AccuTOF JMS-T100LC por la técnica DART (Direct Analysis in Real Time) y ESI<sup>+</sup> modo positivo (Electrospray Ionization).

Los espectros UV-Vis se obtuvieron en un espectrómetro UV-Visible Shimadzu, U160 en metanol (MeOH).

Se determinó la estructura cristalina por difracción de rayos X en un equipo Bruker D8 Venture  $\kappa$ -geometría con una fuente de rayos X de microfoco y un espejo multicapa Helios como monocromador. Se irradió el compuesto con radiación  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda = 1,54178 \text{ \AA}$ ). Se utilizó el programa APEX 3 a 150 K. La reducción de datos se logró utilizando el programa SAINT. Se recogieron 23 784 reflexiones totales, donde 6 748 ( $R_{\text{int}} = 0.0767$ ) fueron utilizadas. La estructura se resolvió mediante métodos directos y luego se refinó con los programas SHELXS y SHELXL con mínimos cuadrados de matriz completa en F2. Los valores finales  $S = 1.064$ ,  $R_1 = 0.0479$  y  $wR_2 = 0.1092$  se basaron en 6 748 reflexiones observadas.

## 8.2. MATERIAL VEGETAL

### Información de la colecta

La *Ageratina glabrata* fue recolectada el 25 de febrero de 2015 a orillas de la carretera México-Cuernavaca aproximadamente en el Km. 33.5 (coordenadas 19°11'24.8" N y 99°09'32.2" W aprox.), en un terreno pedregoso y cultivado. La planta se secó a temperatura ambiente; se fragmentó manualmente y se pesó (peso seco 720 g).

El segundo estudio se realizó con las hojas de *A. glabrata* recolectada en diciembre del 2016 en la misma ubicación de la primera colecta. La planta se secó a temperatura ambiente; se fragmentó en un molino de cuchillas y se pesó (peso seco 810 g).

## Identificación del espécimen

La identificación botánica de la especie fue realizada por el Dr. Oscar Hinojosa Espinoza del Instituto de Biología y un ejemplar se encuentra depositado en el Herbario Nacional del instituto de Biología de la UNAM (MEXU) (**Figura 40**).



**Figura 40.** Ejemplar del Herbario Nacional del Instituto de Biología, UNAM.

### 8.3. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS

#### Preparación del extracto 1

El extracto 1 se preparó por la técnica de maceración en diclorometano (DCM). El disolvente se eliminó por destilación utilizando un evaporador rotatorio. Se obtuvieron 18 g de extracto seco.

#### Preparación del extracto 2

Se preparó un segundo extracto por percolación eluyendo primero con hexano y posteriormente con DCM (extracto 2). Obteniendo 40 g de extracto seco.

### 8.4. AISLAMIENTO DE METABOLITOS SECUNDARIOS

El extracto 1 (DCM, 18 g) se separó mediante CC utilizando gel de sílice como soporte, empleando mezclas de hexano–acetona (100:0 - 0:100) como eluyente. Se colectaron 30 fracciones de 150 mL cada una, se reunieron en 17 fracciones primarias (A-Q) con base en su perfil cromatográfico mostrado en cromatografía de capa fina analítica (CCFA). La **figura 41** muestra el diagrama del aislamiento de los componentes del extracto 1, las letras mayúsculas corresponden a fracciones provenientes de columnas y las letras minúsculas a separación por CCPF.

# Extracto 1 (18g)

## A - Q

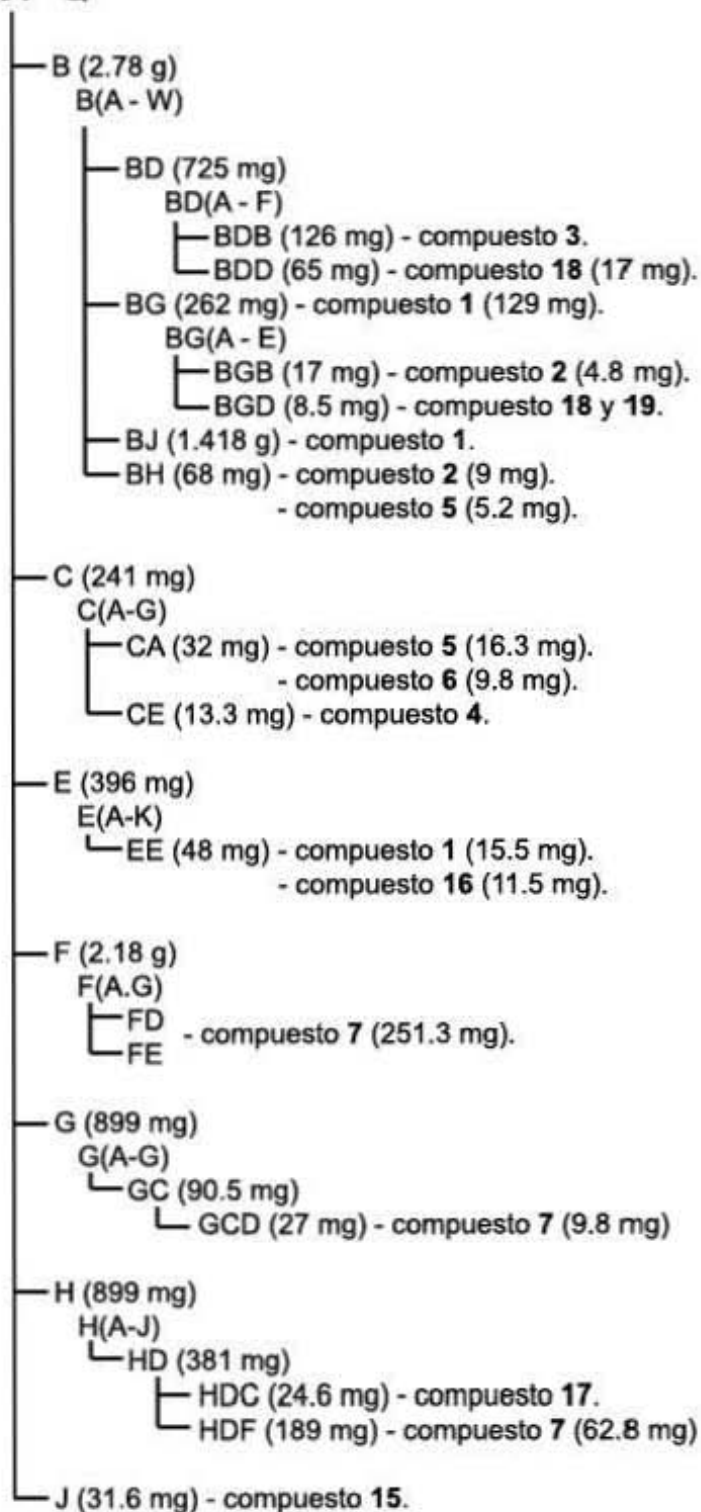


Figura 41. Diagrama del estudio químico del extracto 1.

A continuación, se describe el tratamiento de las fracciones estudiadas.

### **Tratamiento de la fracción B**

La fracción B (2.78 g) se separó mediante CC utilizando gel de sílice como soporte, empleando eluyente mezclas de hexano-acetato de etilo (AcOEt) de polaridad ascendente (90:10 - 0:100). Se colectaron 58 fracciones de 150 mL y se reunieron en 25 fracciones (A-W) de acuerdo con su perfil cromatográfico en CCFA.

La fracción BD (725 mg) se separó mediante CC utilizando gel de sílice como soporte, empleando DCM como eluyente. Se colectaron 22 fracciones de 100 mL y se reunieron en 6 fracciones (A-F) de acuerdo con su perfil cromatográfico en CCFA.

De la fracción BDB (126 mg) se obtuvo el compuesto **3** como un aceite incoloro.

La fracción BDD (65 mg) se purificó por CCFP en una placa de 20x20 cm y 1 mm de espesor, utilizando como eluyente una mezcla de hexano-acetona (7:3). El compuesto **18** (17.9 mg) se aisló puro de la franja C como un sólido blanco de punto de fusión 135-137 °C.

El compuesto **1** se obtuvo por cristalización en DCM-hexano de la fracción BJ y BG. El compuesto **1** (1.5469 g) cristalizó como monocristales incoloros de punto de fusión de 110-112 °C.

La fracción BG (262 mg) se separó mediante CC utilizando gel de sílice como soporte, empleando como eluyente DCM. Se colectaron 12 fracciones de 20 mL y se reunieron en 5 fracciones (A-E) de acuerdo con su perfil cromatográfico en CCFA.

La fracción BGB (17 mg) se purificó por CCFP en una placa de 5x10 cm y 1 mm de espesor, utilizando como eluyente una mezcla de DCM-acetona (99:1). El compuesto **2** (4.8 mg) se aisló puro de la franja **a** como un aceite incoloro.

En la fracción BGD (8.5 mg) se identificó una mezcla de los compuestos **18** y **19**.

La fracción BH (68 mg) se purificó por CCFP en una placa de 20x20 cm y 1 mm de espesor, utilizando como eluyente DCM. El compuesto **2** (9 mg) se aisló nuevamente de la franja **a** y el compuesto **5** (5.2 mg) se aisló de la franja **d** como un aceite incoloro.

### **Tratamiento de la fracción C**

La fracción C (241 mg) se separó mediante CC utilizando gel de sílice, empleando como eluyente una mezcla de DCM-hexano (1:1). Se colectaron 40 fracciones de 125 mL y se reunieron en 7 fracciones (A-G) de acuerdo con su perfil cromatográfico en CCFA.

La fracción CA (32 mg) se purificó por CCFP en una placa de 20x20 cm y 1 mm de espesor, utilizando como eluyente una mezcla de hexano-AcOEt (7:3). El compuesto **5** (16.3 mg) se aisló puro de la franja **a** y el compuesto **6** (9.8 mg) de la franja **C** como un sólido blanco.

En la fracción CE (13.3 mg) se identificó el compuesto **4** y se aisló puro como un aceite incoloro.

### **Tratamiento de la fracción E**



La fracción E (396 mg) se separó mediante CC utilizando gel de sílice como soporte, empleando como eluyente DCM. Se colectaron 46 fracciones de 50 mL y se reunieron en 11 fracciones (A-K) de acuerdo con su perfil cromatográfico en CCFA.

La fracción EE (48 mg) se purificó por CCFP en una placa de 20x20 cm y 0.5 mm de espesor, utilizando como eluyente una mezcla de hexano-AcOEt (7:3). Se obtuvieron cantidades adicionales del compuesto **1** (15.5 mg) y el compuesto **16** (11.5 mg) fue aislado puro de la franja C como un aceite amarillo.

#### **Tratamiento de la fracción F**

La fracción F (2.18 g) se separó mediante CC utilizando gel de sílice como soporte, empleando como eluyente una mezcla de DCM-acetona (98:2). Se colectaron 52 fracciones de 250 mL y se reunieron en 7 fracciones (A-G) de acuerdo con su perfil cromatográfico en CCFA. En las fracciones FD y FE se identificó el compuesto **7** (251.3 mg) como un aceite incoloro.

#### **Tratamiento de la fracción G**

La fracción G (899 mg) se separó mediante CC utilizando sephadex (50g) como soporte, empleando como eluyente MeOH. Se colectaron 32 fracciones de 10 mL y se reunieron en 7 fracciones (A-G) de acuerdo con su perfil cromatográfico en CCFA.

La fracción GC (90.5 mg) se separó mediante CC utilizando gel de sílice como soporte, empleando como eluyente DCM. Se colectaron 19 fracciones de 5 mL y se reunieron en 7 fracciones (A-G) de acuerdo con su perfil cromatográfico en CCFA.

La fracción GCD (27 mg) se purificó por CCFP utilizando una placa de 20x20 cm y 0.5 mm de espesor, empleando como eluyente una mezcla de hexano-AcOEt-

acetona-etanol (EtOH) (70:18:9:3), obteniéndose cantidades adicionales del compuesto **7** (9.8 mg).

### **Tratamiento de la fracción H**

La fracción H (899 mg) se separó por CC utilizando sephadex (50 g) como soporte, empleando como eluyente MeOH. Se colectaron 32 fracciones de 10 mL y se reunieron en 10 fracciones (A-J) de acuerdo con su perfil cromatográfico en CCFA.

La fracción HD (381 mg) se separó mediante CC utilizando gel de sílice como soporte, empleando como eluyente una mezcla de DCM-acetona (97:3). Se colectaron 62 fracciones de 5 mL y se reunieron en 8 fracciones (A-H) de acuerdo con su perfil cromatográfico en CCFA.

La fracción HDF (189 mg) se purificó por CCFP en placa de 20x20 cm y 1 mm de espesor, utilizando como eluyente una mezcla de tolueno-ácido acético-acetona-MeOH (80:10:5:5) obteniendo cantidades adicionales del compuesto **7** (62.8 mg).

De la fracción HDC se obtuvo el compuesto **17** como agujas blancas con punto de fusión 120 – 122 °C (24.6 mg).

### **Tratamiento de la fracción J**

El compuesto **15** cristalizó en la fracción J, como agujas amarillas con un punto de fusión de 202-205 °C en DCM. Fue purificado con lavados con DCM obteniéndose 31.6 mg.

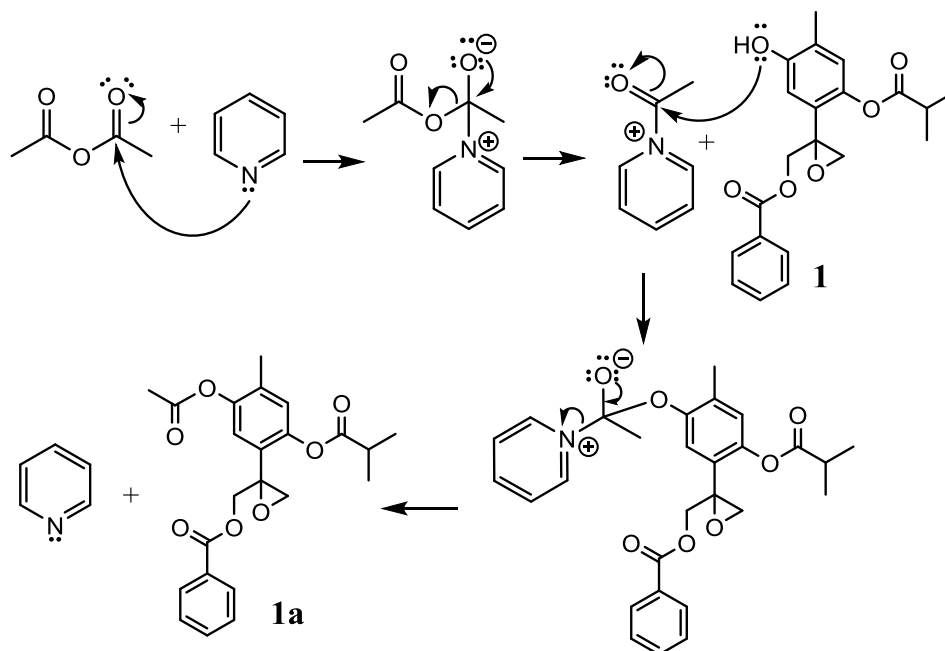
El compuesto **8** se obtuvo como producto de descomposición de **2** en cloroformo. Para el aislamiento de **8**, 15.9 mg de los productos de descomposición de **2** se separaron por CCFP en una placa de 20x20 cm y 1 mm de espesor, utilizando como

eluyente una mezcla de DCM-acetona (96:4). Se obtuvo el compuesto **8** (3 mg) de la franja **d** como un aceite incoloro.

## 8.5. REACCIONES

### Acetilación

El compuesto **1a** se obtuvo mediante la acetilación de **1** con anhídrido acético y piridina durante 24 horas a temperatura ambiente. En la **figura 42** se muestra el mecanismo de la reacción de acetilación.

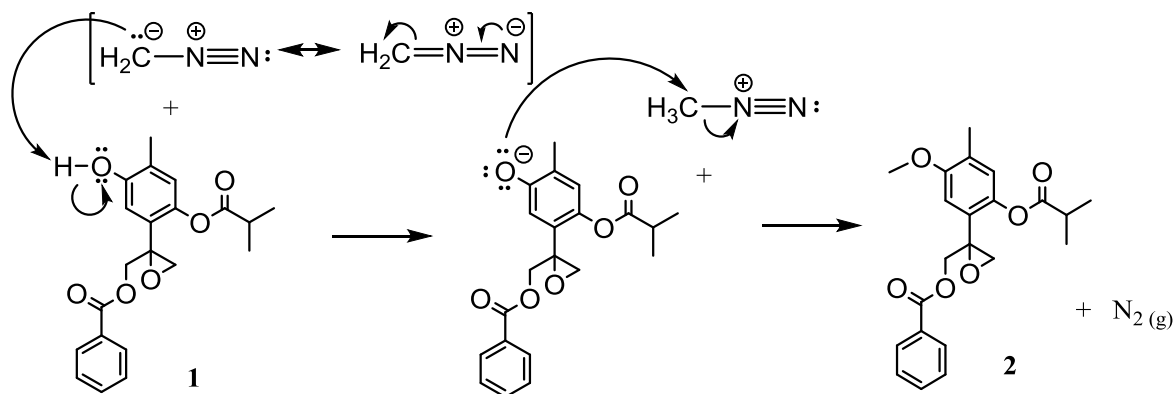


**Figura 42.** Mecanismo de reacción de acetilación de **1**.

El compuesto **7a** se obtuvo mediante la acetilación de **7**. El procedimiento fue el mismo que para la obtención de **1a**.

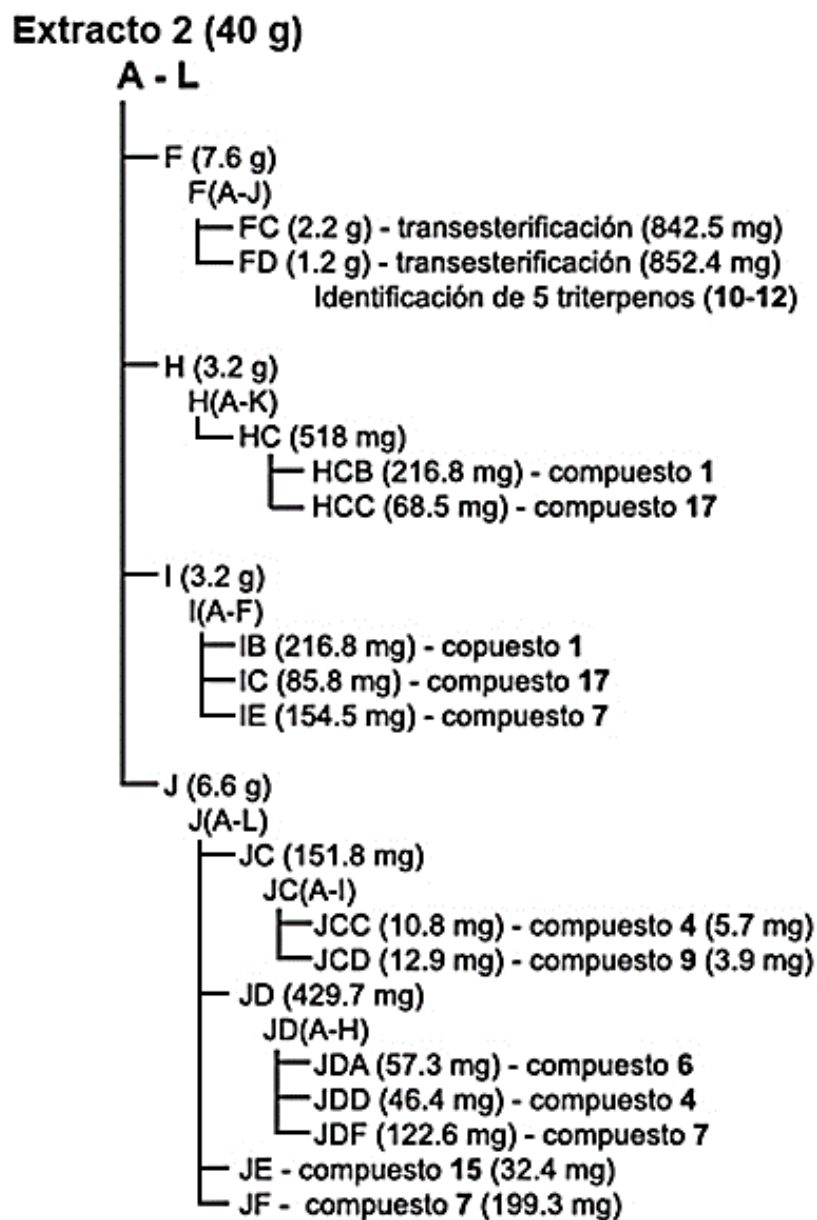
## Metilación

El compuesto **2** se obtuvo mediante la reacción metilación de **1** con diazometano. El diazometano se preparó *in situ* utilizando N-Nitrosometilurea como precursor. El producto de reacción (30 mg) se purificó mediante una CCFP en placa de 20x20 cm y 0.25 mm de espesor, utilizando como eluyente DCM. Se obtuvo el compuesto **2** (19 mg) de la franja **b** como un aceite incoloro. En la **figura 43** se muestra el mecanismo de reacción de la metilación de **1**.



**Figura 43.** Mecanismo de reacción de metilación de **1**.

El extracto 2 (DCM, 49 g) se separó mediante CC utilizando gel de sílice como soporte, empleando mezclas de hexano-acetona (100:0 - 0:100) como eluyente. Se colectaron 88 fracciones de 250 mL cada una y se reunieron en 12 fracciones primarias (A-L) con base en su perfil cromatográfico mostrado en CCFA. La **figura 44** muestra el diagrama del aislamiento de los componentes del extracto 2.



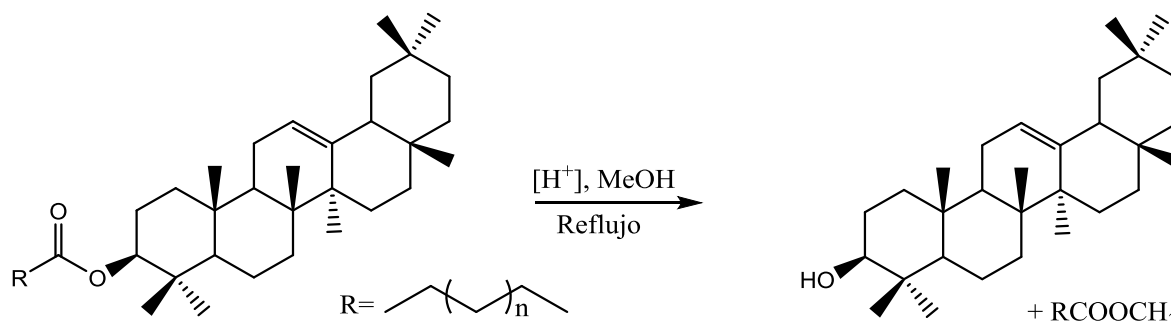
**Figura 44.** Diagrama del estudio químico del extracto 2.

A continuación, se describe el tratamiento de las fracciones estudiadas.

### Tratamiento de la fracción F

La fracción F (7.6 g) se separó mediante CC utilizando gel de sílice como soporte, empleando como eluyente una mezcla de hexano-acetona (9:1). Se colectaron 51 fracciones de 100 mL y se reunieron en 10 fracciones (A-J) de acuerdo con su perfil cromatográfico en CCFA.

En las fracciones FC (2.2 g) y FD (1.2 g) se identificó una mezcla de ésteres grasos de triterpenos pentacíclicos mediante RMN  $^1\text{H}$ . Parte de estas fracciones fueron sometidas a una transesterificación con MeOH en medio ácido. En la **figura 45** se muestra como ejemplo la reacción de transesterificación de la  $\beta$ -amirina.



**Figura 45.** Esquema de transesterificación de  $\beta$ -amirina.

Posteriormente, las mezclas se analizaron de igual manera por RMN  $^1\text{H}$ .

### Tratamiento de la fracción H

La fracción H (3.2 g) se separó mediante CC utilizando gel de sílice como soporte, empleando como eluyente mezclas de hexano-AcOEt (9:1). Se colectaron 59 fracciones de 150 mL y se reunieron en 11 fracciones (A-K) de acuerdo con su perfil cromatográfico en CCFA.

La fracción HC (518 mg) se separó mediante CC utilizando gel de sílice como soporte, empleando como eluyente una mezcla de hexano-acetona-AcOEt (80:12:8). Se colectaron 25 fracciones de 20 mL y se reunieron en 3 fracciones (A-C) de acuerdo con su perfil cromatográfico en CCFA.

De la fracción HCB se obtuvieron cantidades adicionales de **1** (216.8 mg).

De la fracción HCC se obtuvieron cantidades adicionales de **17** (68.5 mg).

### **Tratamiento de la fracción I**

La fracción I (3.2 g) se separó mediante CC utilizando gel de sílice como soporte, empleando como eluyente una mezcla de hexano-acetona-ácido fórmico (HCOOH) (74:21:5). Se colectaron 29 fracciones de 50 mL y se reunieron en 6 fracciones (A-F) de acuerdo con su perfil cromatográfico en CCFA.

De la fracción IB se obtuvieron cantidades adicionales de **1** (216.8 mg).

De la fracción IC se obtuvieron cantidades adicionales de **17** (85.8 mg).

De la fracción IE se obtuvieron cantidades adicionales de **7** (154.5 mg).

### **Tratamiento de la fracción J**

La fracción J (6.6 g) se separó mediante CC utilizando gel de sílice como soporte, empleando como eluyente una mezcla de hexano-DCM-MeOH-HCOOH (57:33:8:2). Se colectaron 66 fracciones de 50 mL y se reunieron en 12 fracciones (A-L) de acuerdo con su perfil cromatográfico en CCFA.

La fracción JC (151.8 mg) se separó mediante CC utilizando gel de sílice como soporte, empleando como eluyente una mezcla de hexano-acetona-MeOH-EtOH (96:2.8:0.8:0.4). Se colectaron 22 fracciones de 20 mL y se reunieron en 9 fracciones (A-I) de acuerdo con su perfil cromatográfico en CCFA.

La fracción JCC (10.8 mg) se purificó por CCFP en placa de 20x5 cm y 0.25 mm de espesor, utilizando como eluyente una mezcla de DCM-acetona (95:5) obteniéndose cantidades adicionales del compuesto **4** (5.7 mg).

La fracción JCD (12.9 mg) se purificó por CCFP en placa de 20x5 cm y 0.25 mm de espesor, utilizando como eluyente una mezcla de DCM-acetona (95:5) obteniéndose cantidades adicionales del compuesto **9** (3.9 mg).

La fracción JD (429.7 mg) se separó mediante CC utilizando gel de sílice como soporte, empleando como eluyente una mezcla de DCM-acetona (99:1). Se colectaron 83 fracciones de 25 mL y se reunieron en 8 fracciones (A-H) de acuerdo con su perfil cromatográfico en CCFA.

De la fracción JDA se obtuvieron cantidades adicionales del compuesto **6** (57.3 mg).  
De la fracción JDD se obtuvieron cantidades adicionales del compuesto **4** (46.4 mg).  
De la fracción JDF se obtuvieron cantidades adicionales del compuesto **7** (122.6 mg).

De la fracción JE se obtuvieron cantidades adicionales del compuesto **15** (32.4 mg).  
De la fracción JF se obtuvieron cantidades adicionales de **7** (199.3 mg).



## 8.6. ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Los ensayos de la actividad antiprotozoaria y antidiarreica se realizaron en el Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional "Siglo XXI" del IMSS, a cargo del Dr. Fernando Calzada y la Dra. Lilian Yépez Mulia.

### Ensayo antiprotozoario

La cepa HM1-IMSS de *Entamoeba histolytica* utilizada en todos los experimentos se cultivó axénicamente (una sola especie microbiana) a 37°C en medio TYI-S-33 suplementado con 10% de suero bovino inactivado por calor. En el caso de *Giardia lamblia*, se cultivó la cepa IMSS: 8909:1 en medio modificado TYI-S-33 suplementado con 10% de suero bovino y bilis bovina. Los trofozoítos se mantuvieron axénicamente y para los ensayos se emplearon en la fase logarítmica del crecimiento.

Las pruebas de susceptibilidad *in vitro* se realizaron utilizando un método de subcultivo. Trofozoitos de *E. histolytica* ( $6 \times 10^3$ ) o *G. lamblia* ( $5 \times 10^4$ ) se incubaron durante 48 h a 37 °C en presencia de diferentes concentraciones (2.5 a 200 µg/mL) del extracto crudo o compuestos puros en dimetilsulfóxido (DMSO). Se utilizó metronidazol como fármaco amebicida y giardicida como estándar, un control (medio de cultivo más trofozoítos y DMSO) y un blanco (medio de cultivo). Después de la incubación, los trofozoítos se separaron por enfriamiento y se subcultivaron muestras de 50 µl de cada tubo en medio fresco durante otras 48 h. El número final de parásitos se determinó con un hemocitómetro y los porcentajes de inhibición del crecimiento de trofozoitos se calcularon por comparación con el cultivo control.

Los resultados se confirmaron mediante un método colorimétrico: los trofozoítos, se lavaron y se incubaron durante 45 min a 37 °C en solución salina buffer de fosfatos con MTT (3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio) y metosulfato de fenazina. El colorante producido (formazan) se extrajo y la absorbancia se

determinó a 570 nm. Los experimentos se realizaron por duplicado para cada protozooario y se repitieron al menos tres veces.

### **Ensayo Antidiarreico**

Estos estudios se realizaron con la aprobación del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional "Siglo XXI" del IMSS (Número de aprobación: R-2012-3601-182) y de acuerdo con la norma oficial mexicana NOM 0062-ZOO-1999 titulada "Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio".

Ratas macho Sprague-Dawley (200-250 g) del bioterio del IMSS, se mantuvieron en ayuno durante la noche con disponibilidad de agua *ad libitum*, hasta el inicio de los experimentos.

El método descrito por Williamson y col. (1996) se adoptó para estudiar el efecto de los compuestos sobre hiperperistalsis en ratas. Los animales de prueba se dividieron en grupos de seis individuos para formar el grupo de control y el grupo de prueba. Las ratas se trataron por vía oral con cada compuesto (0.01, 0.1, 1.0, 10, 20, 40 mg/kg en 1 mL de una solución al 2% de dimetilsulfóxido (DMSO) en agua) o vehículo (1 mL de una solución de DMSO al 2% en agua) o clorhidrato de loperamida (Sigma) (0.1, 1.0, 10, 20, 40 mg/kg en 1 mL de una solución de DMSO al 2% en agua).

Después de 20 minutos, cada uno de estos animales recibió 1 mL de una suspensión de carbón al 10% en goma arábica acuosa al 5%, por vía oral. Todos los animales se sacrificaron después de 30 minutos, se extrajo el estómago y el intestino delgado y se extendieron sobre una superficie de vidrio limpio. La distancia recorrida por la suspensión de carbón se midió y luego se expresó como el porcentaje de la distancia desde el píloro hasta el ciego.

Posteriormente, se construyó una gráfica del porcentaje de inhibición frente a la concentración, la mejor línea recta se determinó mediante análisis de regresión y

se calcularon los valores de concentración inhibidora al 50% ( $IC_{50}$ ). Se calculó el coeficiente de regresión, su nivel de significación (p) y el coeficiente de correlación. Los experimentos se realizaron seis veces para cada concentración.

## **9. BIBLOGRAFÍA**

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Amat G., A., **1983**, “Morfología y Anatomía comparadas de *Chamaemelum nobile* (L.) All., *Chamomilla recutita* L. Rausch y especies adulterantes”, *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 1 (2): 81-94.
- Ávalos G., A., Pérez U. C., E., **2009**, “Metabolismo secundario de plantas” *Reduca Bio.*, Serie Fisiología Vegetal, 2(3): 119-145.
- Balloum Z., Bouheroum M., Benayache F., Benayache S., **2013**, “Secondary Metabolites from the aerial part of *Inula crithmoides*” *Chemistry of Natural Compounds*, 49 (4): 763-764.
- Bergman J., Kandel H., **2013**, “Safflower Production”, *NDSU Agriculture and Extension*, pp. 870-874.
- Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, UNAM, **2009**, Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, Chamisa *Eupatorium glabratum*, [Página web], consultado: el 15 de septiembre del 2017, <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Chamisa&id=7150>.
- Bohlmann F., Jakupovic J., Lonitz M., **1977**, “Über Inhaltsstoffe der *Eupatorium*-Gruppe”, *Chemische Berichte*, 110 (1): 301-314.
- Bonkanka T., C.X., **2006**, “Evolución farmacológica de terpenos y flavonoides de origen vegetal”, Universidad de la Laguna.
- Bustos B., C., Andrade C., A., Giraldo A., J. D., Moreno V., A. D., Quijano, L., **2016**, “Acute hypoglycemic effect and phytochemical composition of *Ageratina petiolaris*”, *Journal of Ethnofarmacology*, 185: 341-346.
- Bustos B. C., Sánchez C. M., Esquivel B., Calderón J. S., Calzada F., Yopez M.L., Hernández B. A., Nathan J. P., Cuevas G., Quijano L., **2014**, “Structure, Absolute Configuration, and Antidiarrheal Activity of a Thymol Derivative from *Ageratina cylindrica*”, *Journal of Natural Products*, 77: 358-369.
- Bustos B., C., Esquivel, B., Calzada, F., Yopez M., L., Calderón, J. S., Porras R., J., Quijano, L., **2016**, “Further Thymol Derivatives from *Ageratina cylindrica*”, *Chemistry and biodiversity*, 13: 1291-1289.

- Calderón de R., G., Rzendowski, J., **2010**, “Flora fanerogámica del Valle de México”, CONABIO e Instituto de Ecología A. C., México, D.F., pp. 1406 (794-802), Ver. electrónica.
- Cheng Chun-Ru, Yue Qing-Xi, Wu Zhi-Yuan, Song Xiao-Yi, Tao Si-Jia, Wu Xiao-Hui, Xu Ping-Ping, Liu Xuan, Guan Shu-Hong, Guo De-An, **2010**, “Cytotoxic triterpenoids from *Ganoderma lucidum*”, *Pytochemistry*, 71: 1579-1585.
- Davis Z., T., Lee S.T., Collett M. G., Stegelmeier B.L., Green B.T., Buck S.R., Pfister J.A., **2015**, “Toxicity of White Snakeroot (*Ageratina altissima*) and Chemical Extracts of White Snakeroot in Goats”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63: 2092-2097.
- Delgado G., A., Romo de Vivar, **2015**, “Temas selectos de química de productos naturales”, *UNAM, Instituto de Química*, 1- 541 pp.
- Del Barrio G., Spengler I., García T., Roque A., Alvarez A.L., Calderon J.S., Parra F., **2011**, “Antiviral activity of *Ageratina havenensis* and major chemical compounds from the most active fraction”, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 21(5): 912-920.
- Del Vito, L.A., Petenatti, E.M., **2009**, “Asteraceas de importancia económica y ambiental. Primera parte. Sinopsis morfológica y taxonómica, importancia ecológica y plantas de interés industrial” *Multequina*, 18 (2): 87-115.
- Del Vito, L.A., Petenatti, E.M., **2015**, “Asteraceas de importancia económica y ambiental. Segunda parte. Otras plantas útiles y nocivas”, *Multequina*, 24: 47-74.
- Deng Yan-Ru, Song Ai-Xin, Wang Han-Qing, **2004**, “Chemical Components of *Serophidium santolium* Poljak”, *Journal of the Chinese Chemical Society*, 51: 629-636.
- Dewick Paul M., **2002**, “Medicinal Natural Products, a biosynthetic approach”, *Medicinal Natural Products*, Wiley J. & Sons, Ltd, 1-487 pp.
- Di Carlo, G., Mascolo, N., Izzo, A. A., Capasso, F., **1999**, “Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs”, *Life Sciences*, 65 (4), 337-353.

- Ethan B., Bent S., Foppa I., Haskim S., Kroll D., Mele M., Szapary P., Ulbrich C., Vora M., Yong S., **2007**, “Marigold (*Calendula officinalis* L.): An Evidence-Based Systematic Review by the Natural Standard”, *Journal of Herbal Pharmacotherapy*, 159.
- Funk V. A., Bayer R.J., Keeley S., Chan R., Watson L., Gemeinholzer B., Schilling E., Panero J.L., Baldwin B.G., Garcia J. N., Susanna A. y Jansen R.K., **2005**, “Everywhere but Antarctica: Using a supertree to understand the diversity and distribution of the Compositae”, *Journal Biologiske Skrifter*, 55: 343-374.
- Fumadó V., **2015**, “Párasitos intestinales”, *Pediatr Integral*, XIX (1): 58-65.
- García P., G., García S., E., Martínez G., I., F. Scior, T. R., Salvador, J. L., Martínez M., M., E. del Río, R., **2011**, “Analgesic effect of leaf extract from *Ageratina glabrata* in the hot plate test”, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 21(5): 928-935.
- García P., G., del Río T, R. E., Guzmán M., R., Martínez G., M. I., F. Scior, T. R., **2010**, “Estudios preliminares sobre el efecto analgésico del extracto de hojas de *Ageratina glabrata* en dos modelos térmicos de dolor agudo”, *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 42 (1): 45-51.
- García S., E., Ramírez L., C. B., Talavera A., A., León H., A., Martínez M., R. E., Martínez P., M. M., Gómez H., M. A., Cerda G. R., C. M., Nathan J., P., E. del Río, R., **2014**, “Absolute configuration of (13R)- and (13S)-labdane iterpenos Coexisting in *Ageratina jocotepecana*”, *Journal of Natural Products*, 77: 1005-1012.
- García S, C. A., Sánchez G., A., Villaseñor, J.L., **2014**, “La familia Asteraceae en el parque nacional los Mármoles, Hidalgo, México”, *Acta Botánica de México*, 106: 97-116.
- Gonçalves, L. D., Almeida R. H., M. de Olivera P., Loprd P. N., Turatti C., I. C., Archanjo C. F., Grael F., C. F., **2010**, “Contribution for the phytochemical studies of *Ageratum fastigiatum*”, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 21(6): 936-942.
- Gutiérrez R., A., Estévez B., A., **2009**, “Relevancia de los productos naturales en el descubrimiento de nuevos fármacos en el S. XXI”, *Revista de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. (Esp)*, 103 (2): 409-419.

- Hassan G., A., Atta-ur-Rahman, **2005**, “Trends in ethnopharmacology”, *Journal of Ethnopharmacology*, 100: 43-49.
- Horie T., Ohtsuru Y., Shibata K., Yamashita K., Tsukayama M., Kawamura Y., **1998**, “<sup>13</sup>C NMR Spectral assignment of the A-ring of polyoxygenated flavones”, *Phytochemistry*, 47(5): 865-874.
- Jasso C., D., Phillips, B. S., Rodriguez G., R. S., Angulo S., J. L., **2003**, “Sunflower: grain production, oil content and fatty acids composition of varieties cultivated under dry land conditions in northern Mexico”, *Universidad Autónoma Agraria*, Antonio Narro. pp. 316-321.
- Katinas, L., Gutiérrez, G. D., Grossi, M. A., Crisci, J. V., **2007**, “Panorama de la familia Asteraceae en la república Argentina”, *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 42(1-2):113-129.
- King R. M., Robinson H., **1970**, [en línea] “Studies in the *Eupatorieae* (*Compositae*). XIX. New combinations in *Ageratina*”, *Phytologia*, 19 (4): 208-229, Consultado el 19 de septiembre del 2017, <http://www.biodiversitylibrary.org/page/13020676#page/220/mode/1up>.
- Ling W.H., Jones P., J. H., **1995**, “Dietary phytosterols: A review of metabolism, benefits and side effects”, *Life Sciences*, 57(3): 195-206.
- Madrigal, L., Sangronis, E. **2007**, “La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales”, *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 57 (4): 387-396.
- Maldonado, E., Márquez, L. C., Ortega, A, **1992**, “A thymol derivative from *Calea nelsonii*” *Phytochemistry*, 1(7): 2527-2528.
- Missouri Botanical Garden, **2017**, *Ageratina glabrata* distribution, [Página web], consultado: el 14 de septiembre del 2017, <http://www.tropicos.org/Name/2712231?tab=distribution>.
- Muffler, K., Leipold, D., Scheller, M. C., Haas, C., Steingroewer, J., Bley, T., Neuhaus, H. E., Mirata, M. A., Schrader, J., Ulber, R., **2011**, “Biotransformation of triterpenes”, *Process Biochemistry*, 46: 1-15.
- Organización Mundial de la Salud, OMS, **2017**, Centro de Prensa, enfermedades diarreicas [Página web], consultado: el 15 de febrero del 2018, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/es/>

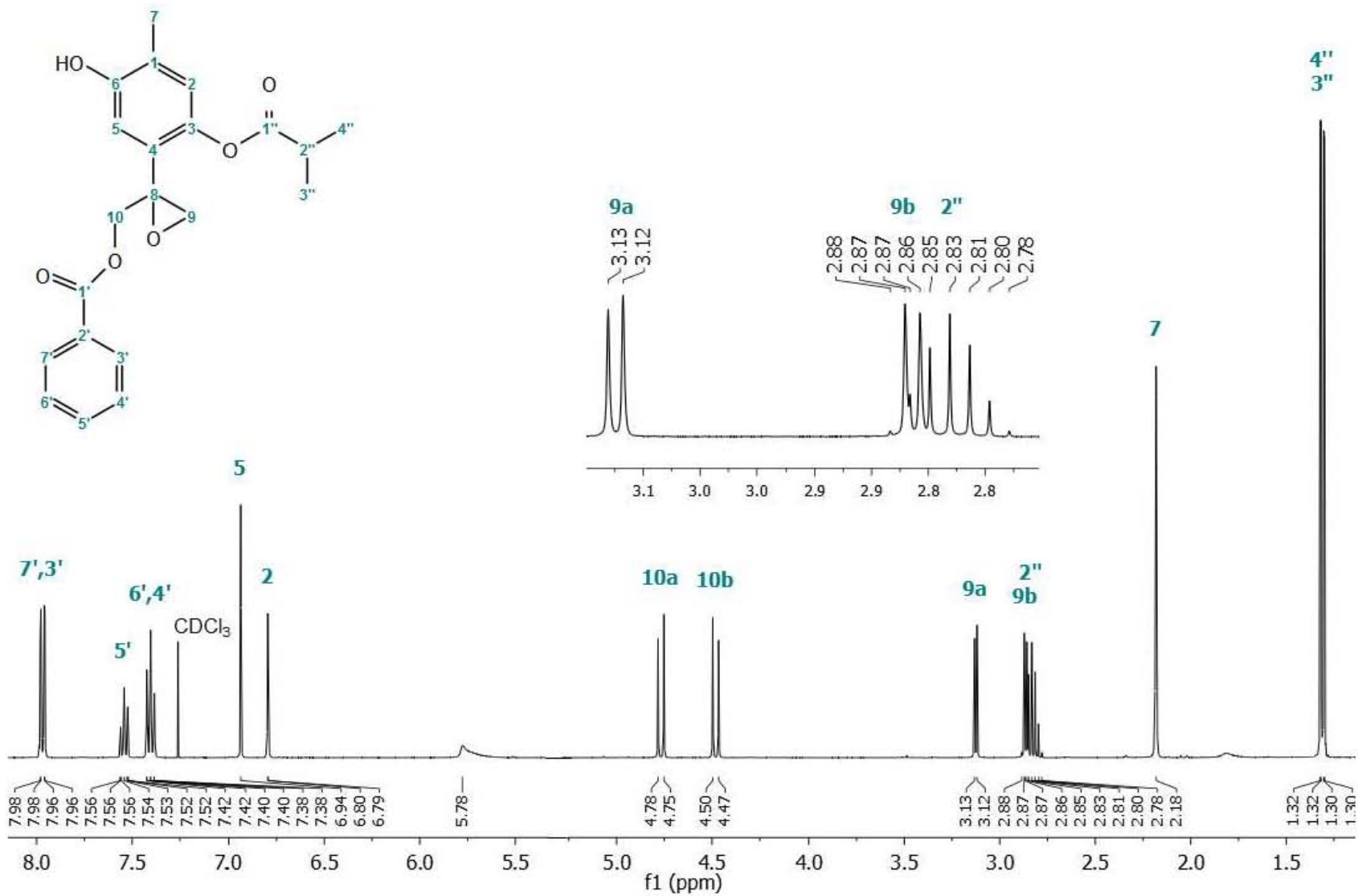


- Organización Mundial de la Salud, OMS, **2018**, Temas de salud, Diarrea [Página web], consultado: el 15 de febrero del 2018, <http://www.who.int/topics/diarrhoea/es/>
- Orellana S., J. F., Andriolo, J. L., Adeli B., G., Schneider, M. F., **1997**, “Comparison of growth and development of *Lettuce* plans (*Lactuca sativa* L.) inside and outside of a polyethylene greenhouse in Santa Maria, RS”, *Ciencia Rural*, 27 (1): 37-41.
- Pimienta R., L., García R., M. Y., Ríos R., E. M., Lindig C., R., Espinosa G., F. J., **2015**, “Chemical composition and evaluation of the essential oil from *Eupatorium glabratum* as biopesticide against *Sitophilus zeamais* and several stored maize fungi”, *Journal of Essential Oil Research*, 28(2): 113-120.
- Qualley A.V., Widhalm J.R., Adebessin F., Kish C.M., Dudereva N., **2012**, “Completion of the core  $\beta$ -oxidative pathway of benzoic acid biosynthesis in plants”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(40): 16383-16388.
- Ray T., D., **1993**, “Guayule: A source of Natural Rubber”, *New crops*, Wiley, New York, pp. 338-343.
- Reyes M., J. M., Martínez M., D., **2001**, “La plasticidad de las plantas” *Elementos*, 41: 39-43.
- Rojas C., A. D., Pardo N., J. C., del Río T., R. E., Gómez H., M. A., Limón, D., Luna, F., Martínez, I., **2015**, “Determinación del efecto analgésico del extracto hexánico de flores de *Eupatorium arsenei* en un modelo de dolor agudo en rata” *Revista Mexicana de Ciencias Farmacológicas*, 46 (1): 64-69.
- Romo de Vivar A., Cuevas L. A., Guerrero C., **1971**, “Eupaglabrin, a terpene from *Eupatorium glabratum*”, *Revista Latinoamericana de Química*, 2 (1): 32-34.
- Saeed, A., & Sabir, A., **2003**, “Irritant potential of some constituents from the seeds of *Caesalpinia bonducella* (L.) fleming” *Journal of Natural Products Research*, 35-41.

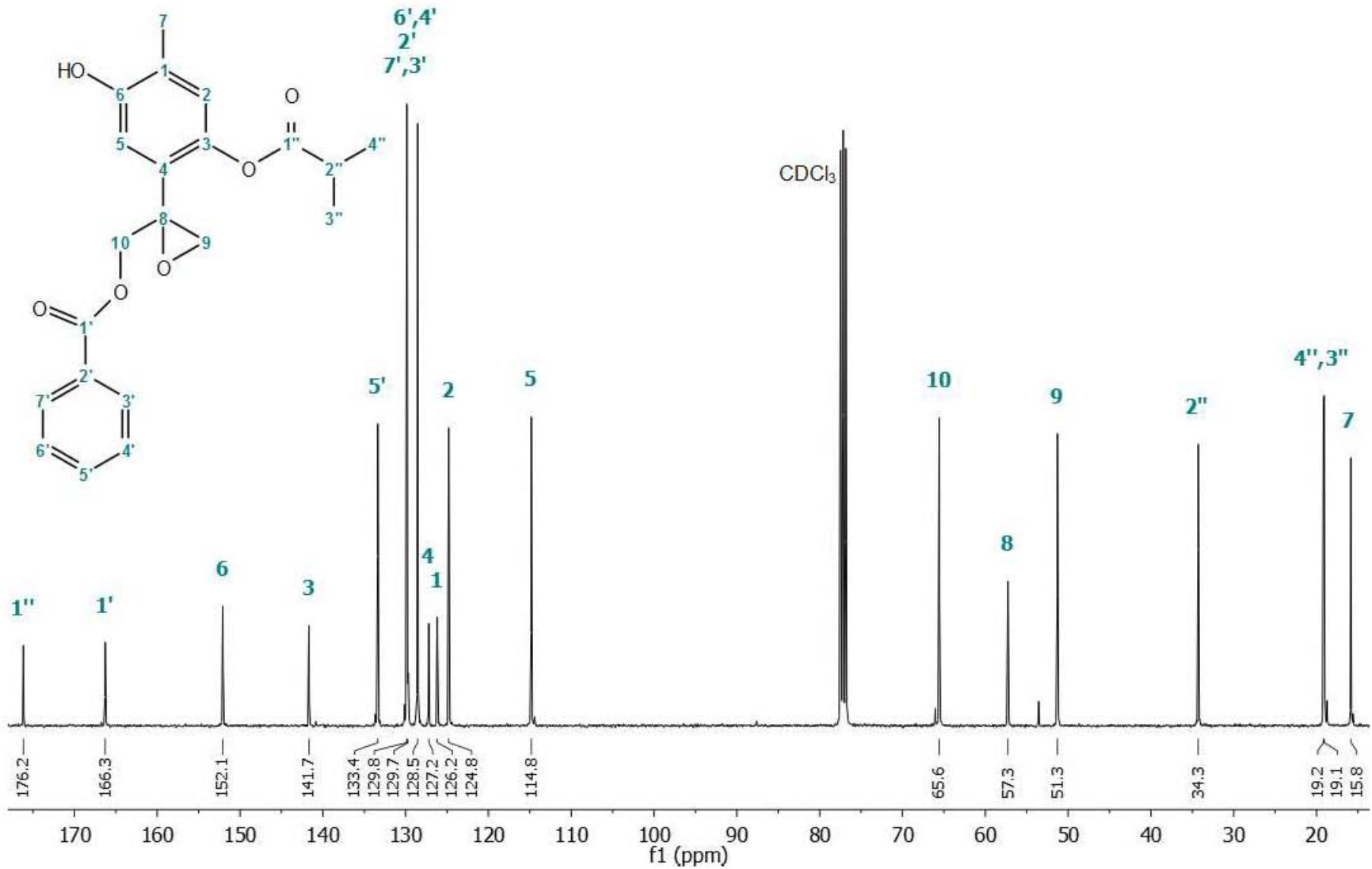
- Sánchez G., E., Ramirez L., del Rio Torres, R., Pacheco M., M. M., **2011**, “A revision of *Eupatorium* (Compositae: Eupatorieae) from Michoacan”, *International Journal of Experimental Botany*, 80: 139-146.
- Schemeda H., G. **1995**, “*Madia stavia*, a potential oil crop of central Chile”, *Economic Botany*, 49 (3): 257-259.
- SIDSS, DGED, **2015**, “*Informe la salud de los mexicanos 2015*”, México, CDMX, 1ra edición, [Disponible Web]  
[https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/64176/INFORME LA S  
ALUD DE LOS MEXICANOS 2015 S.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/64176/INFORME_LA_SALUD_DE_LOS_MEXICANOS_2015_S.pdf)
- Soroa, María R., **2005**, “Revisión bibliográfica *Garbera jamesonii* L. Bolus”, *Cultivos Tropicales*, 26 (4): 65-75.
- Talavera A. A., Rodríguez G. G., López I., García G., H. A., Torres V., J. M., E. del Río R., Cerda G.R. C.M., Nathan J.P., Gómez H. M.A., **2016**, “Systematic evaluation of thymol derivatives possessing stereogenic or prostereogenic centers”, *Rev Phytochem*, 15: 251-277.
- The Plant List. A working list of all plant species, Version 1.1. **2003**, [en línea] consultada el 28 de Septiembre del 2017.  
<http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Compositae/Ageratina/>
- Uribarren B., T., **2017**, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina UNAM, “Entamoebosis o Amibiasis o Amebiasis”, [Página Web] consultado: el 11 de enero del 2018.  
<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/amibiasis.html>
- Uribarren B., T., **2018**, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina UNAM, “Giardiasis o Giardiosis”, [Página Web] consultado: el 15 de enero del 2018.  
<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/giardiasis.html>
- Valdez S., L., Gonzales M., S., Mendoza B., **2015**, “Benzoic acid: biosynthesis, modification and function in plants”, *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 6(7): 1667-1678.
- Valenzuela A., Ronco A.M., **2004**, “Fitoesteroles y fotoestanoles: aliados naturales para la protección de la salud cardiovascular”, *Revista Chilena de Nutrición*, 21(1): 161-169.

- Vázquez C., E., **2003**, Bioquímica y Biología molecular en Línea, Terpenos, Actualizada 15 de octubre del 2003, [Página Web] consultado: el 11 de septiembre del 2017.  
<http://laguna.fmedic.unam.mx/~evazquez/0403/terpenos.html>
- Vilela, E. A., Gonzales P., L., Ravetta, D. A., **2011**, “Metabolismo secundario de plantas leñosas de zonas áridas: mecanismo de producción, funciones y posibilidades de aprovechamiento”, *Ecología Austral*, Asociación Argentina de Ecología, 21: 317:327.
- Villaseñor, J.L., **1993**, “La familia Asteraceae en México”, *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural*, 117-125.
- Voet, D. G., Voet, J. W., Pratt, C., **2007**, “Fundamentos de bioquímica metabólica” Ed. Tebar, 1130 pp, 14-16.
- Walsh J. A., **1986**, “Problems in Recognition and Diagnosis of Amebiasis: Estimation of the Global Magnitude of Morbidity and Mortality”, *Reviews of Infectious Diseases*, 8 (2): 228-238.
- Williams M., Senaratna T., Dicon K., Sivasithamparam K., **2003**, “Benzoic acid induces tolerance to biotic stress causes by *Phytophthora cinnamomi* in *Banksia attenuate*”, *Plant Growth Regulation*, 41(1): 89-91.
- Williamson, **1996**, “Pharmacological Methods in Phytotherapy Research: Selection, Preparation and Pharmacological Evaluation of Plant Material”, 28.
- Xue-Mei M., Duo-Long D., Yan-Ping S., **2008**, “Triterpenoids and steroids from *Ixeridium gracile*”, *Chemistry of Natural Compounds*, 44(3): 339-401.
- Zhang M., Liu Wan-Xue, Zheng Meng-Fei, Xu Qiao-Lin, Wan Fang-Hao, Wang Jing, Lei Ting., Zhou Zhong-Yu., Tan Jian-Wen., **2013**, “Bioactive Quinic Acid Derivatices from *Ageratina adenophora*”, *Molecules*, 18: 14096-14104.
- Zhang, M.L., Wu, M., Zhang, J.J., Irwin, D., Gu, Y.C., Shi Q. W., **2008**, “Chemical constituents of plants from the Genus *Eupatorium*”, *Chemistry and Biodiversity*, 5:40-55.

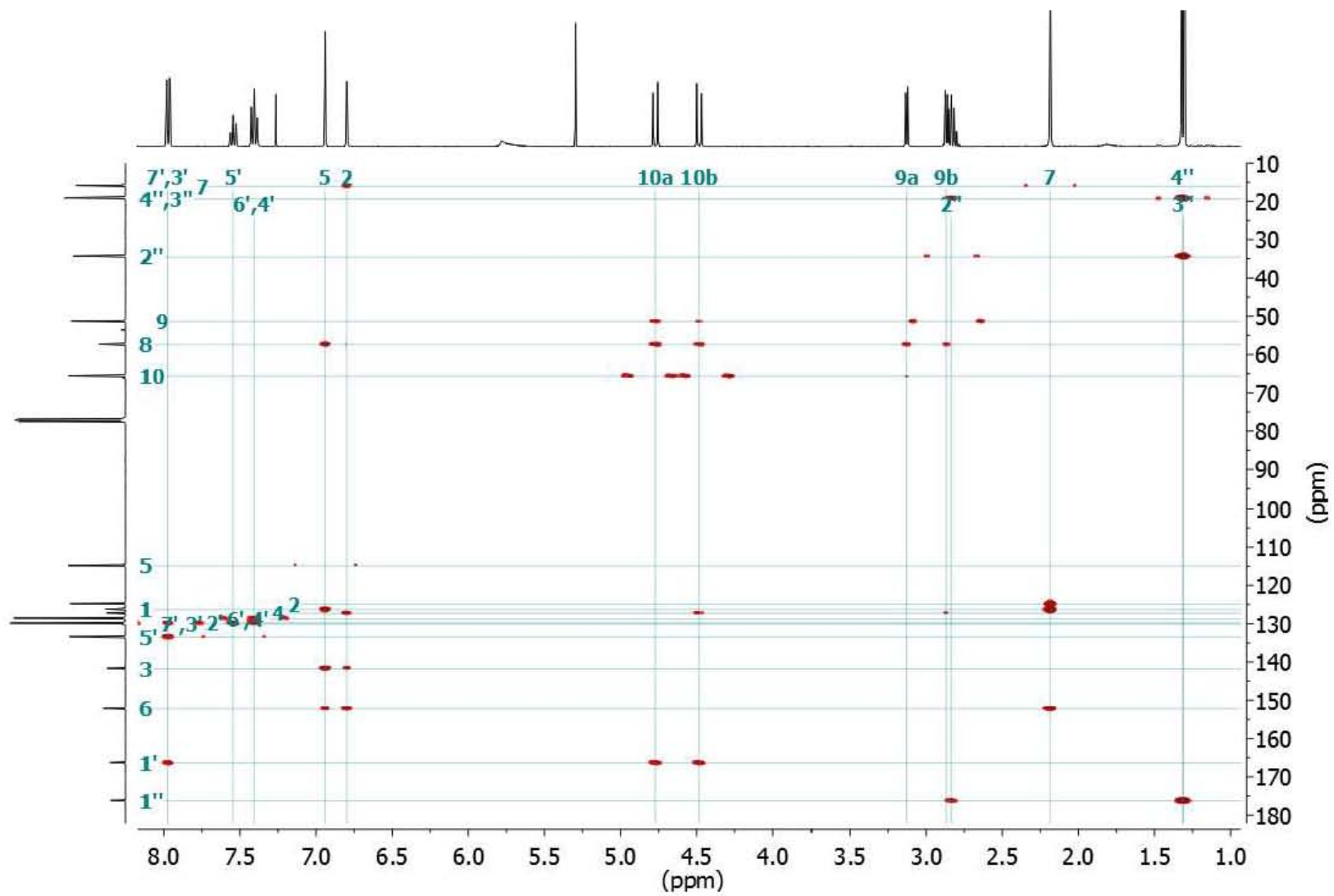
## **10. ANEXO**



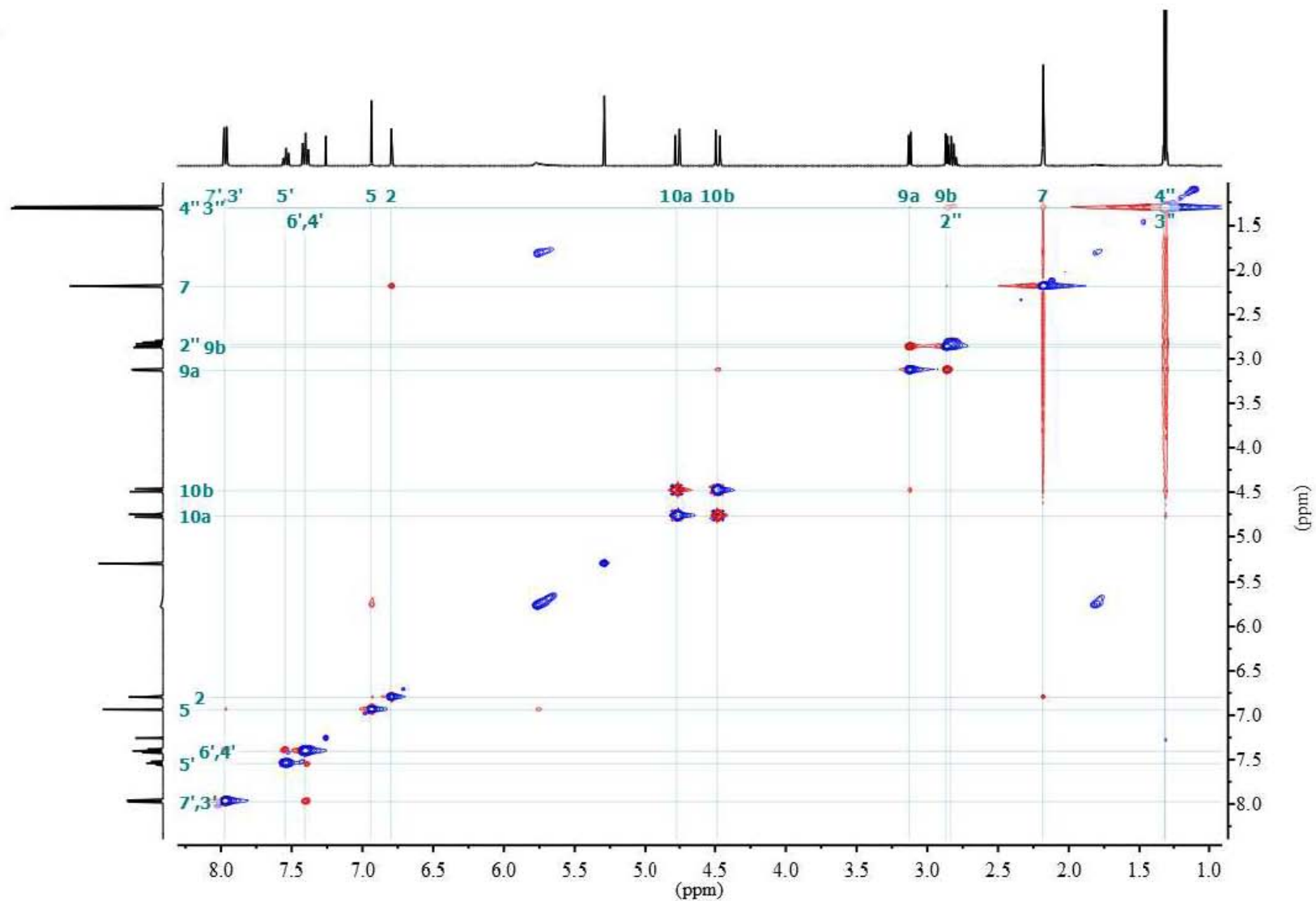
**ESPECTRO A1.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H del (8S)-10-benzoiloxi-8,9-epoxi-6-hidroxitimol, Eupaglabrina 1 (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



**ESPECTRO A2.** Espectro de RMN <sup>13</sup>C del (8S)-10-benzoiloxi-8,9-epoxi-6-hidroxitimol, Eupaglabrina 1 (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

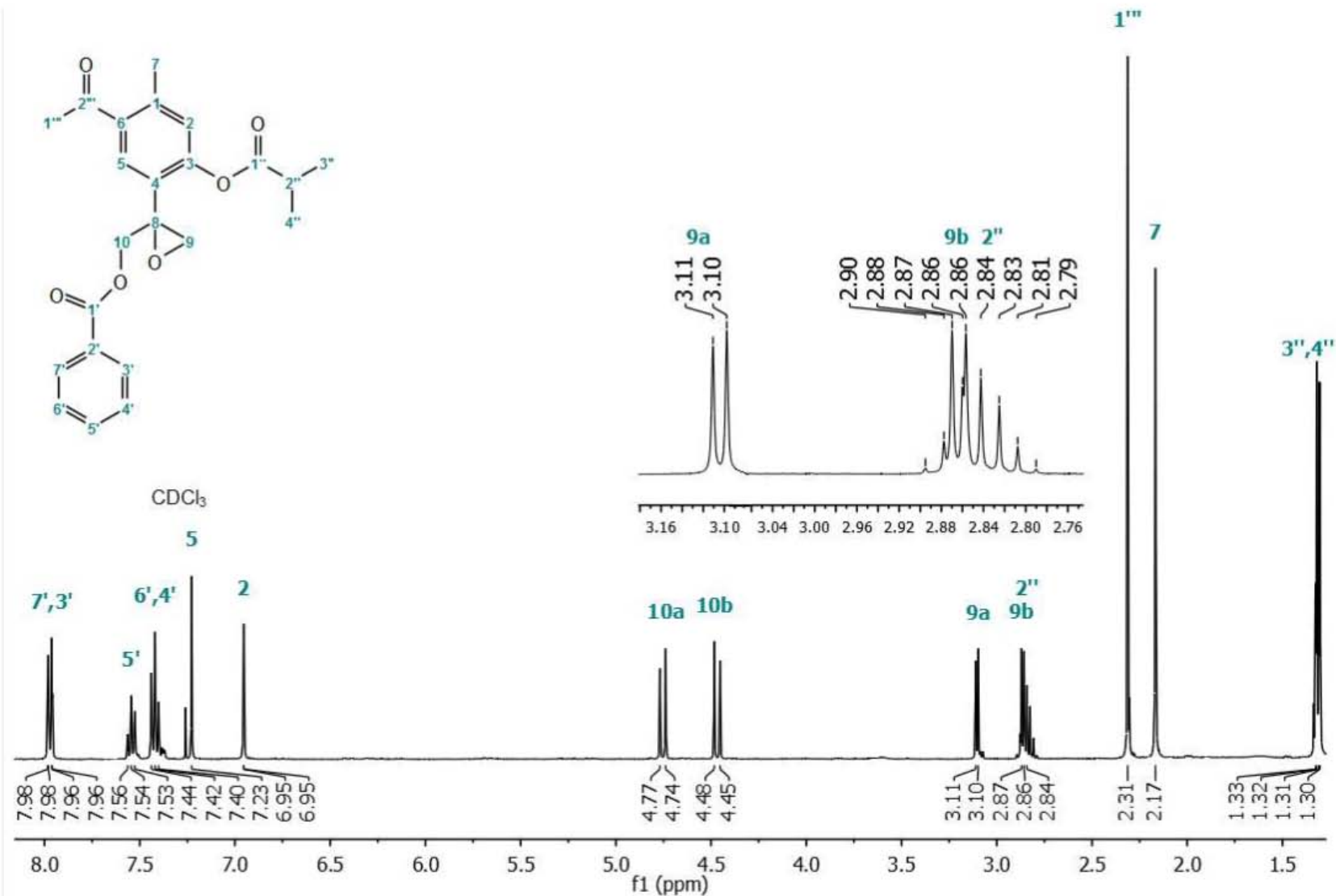


ESPECTRO A3. Espectro HMBC de 1 (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

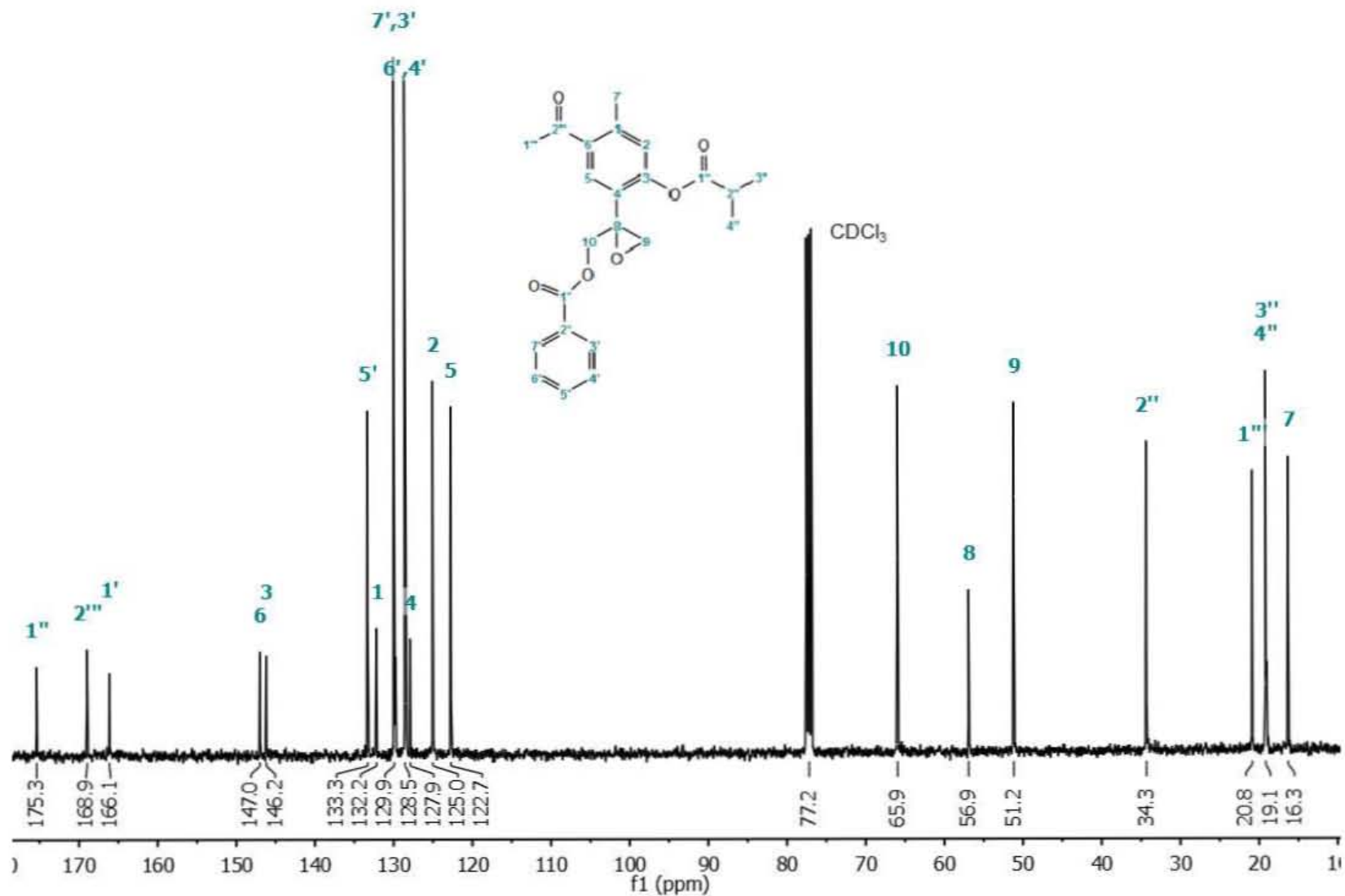


ESPECTRO A4. Espectro NOESY de 1 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

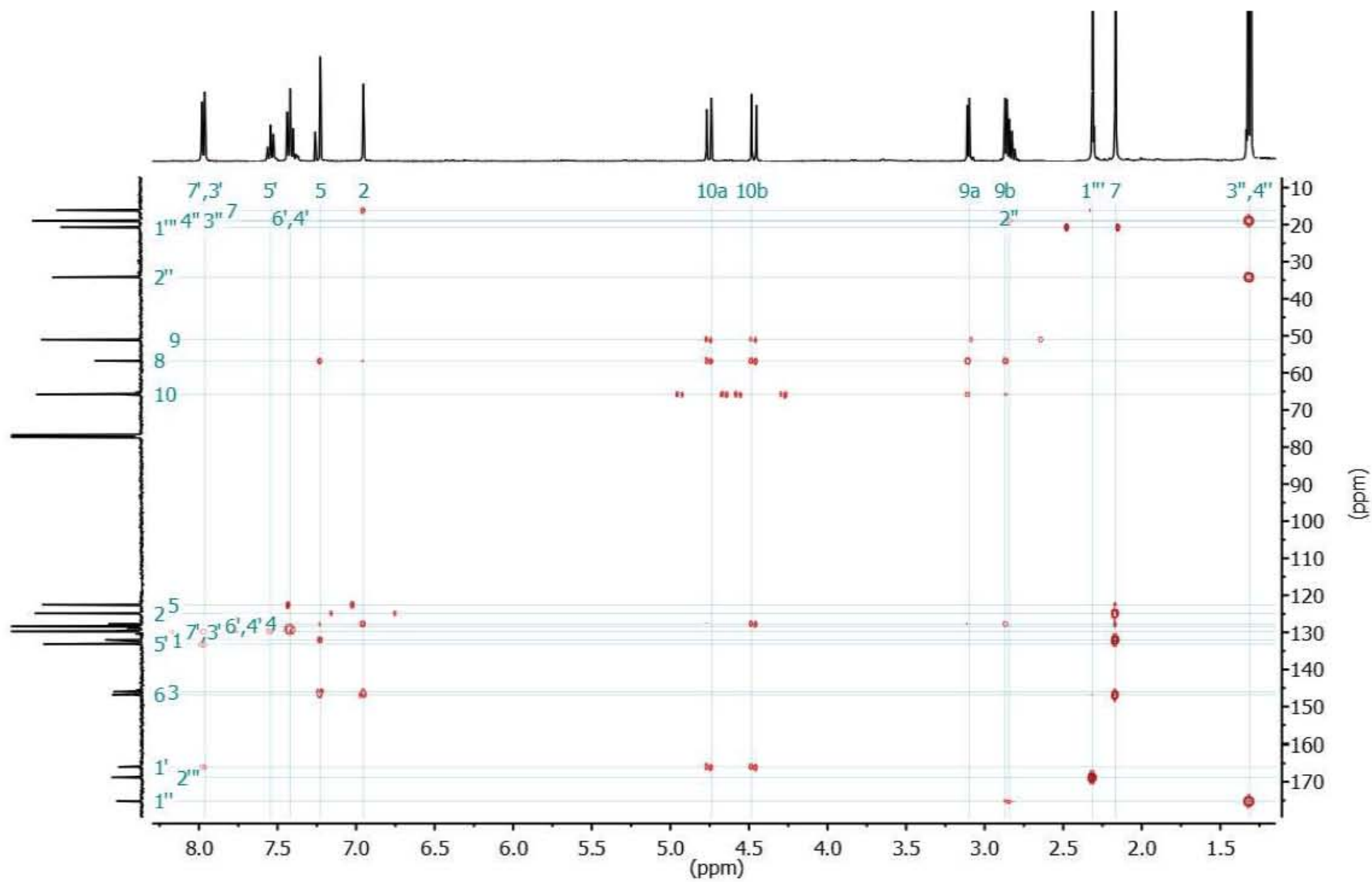




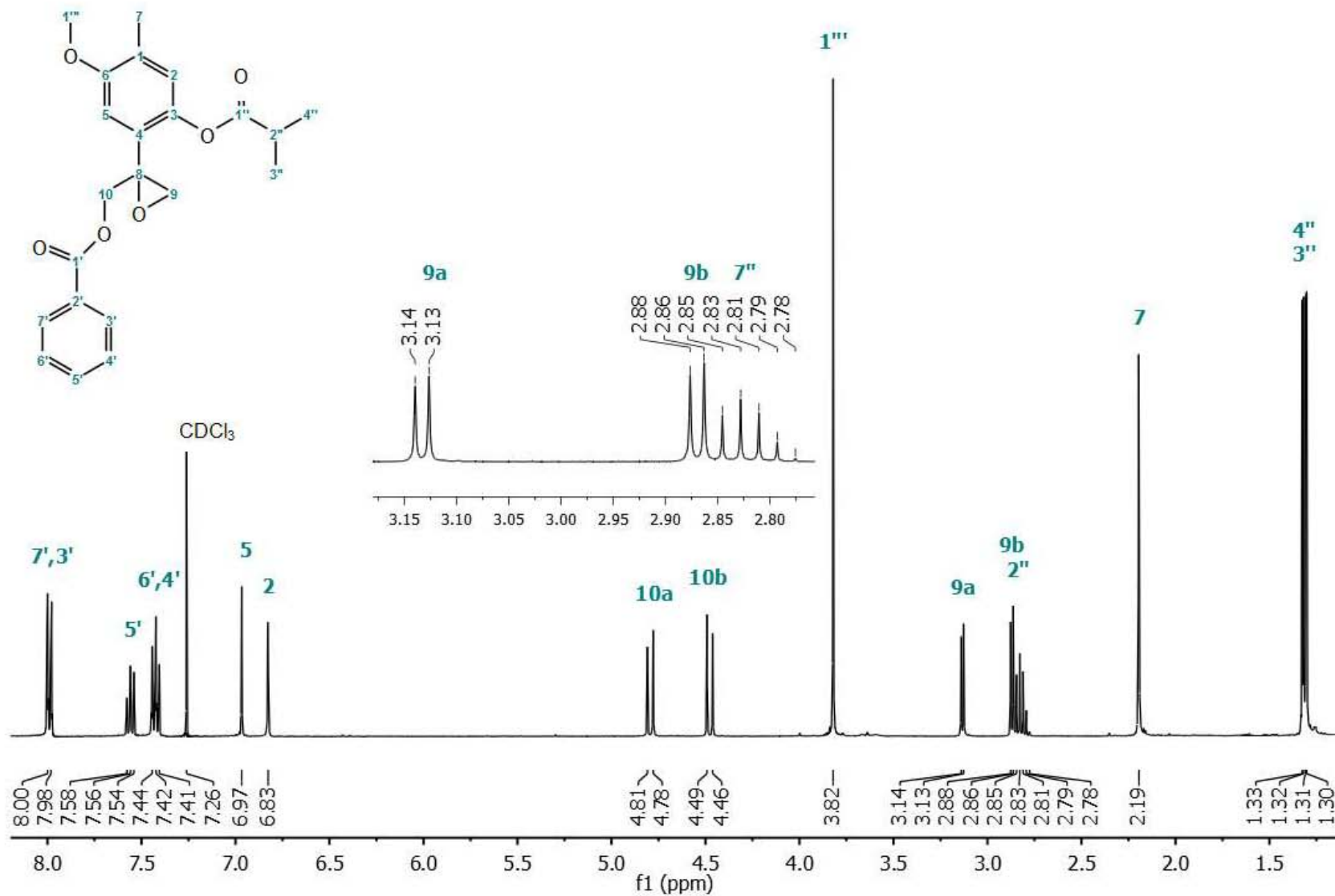
**ESPECTRO A5.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H del Isobutirato del 10-benzoiloxy-8,9-epoxi-6-acetoxitimidol **1a** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



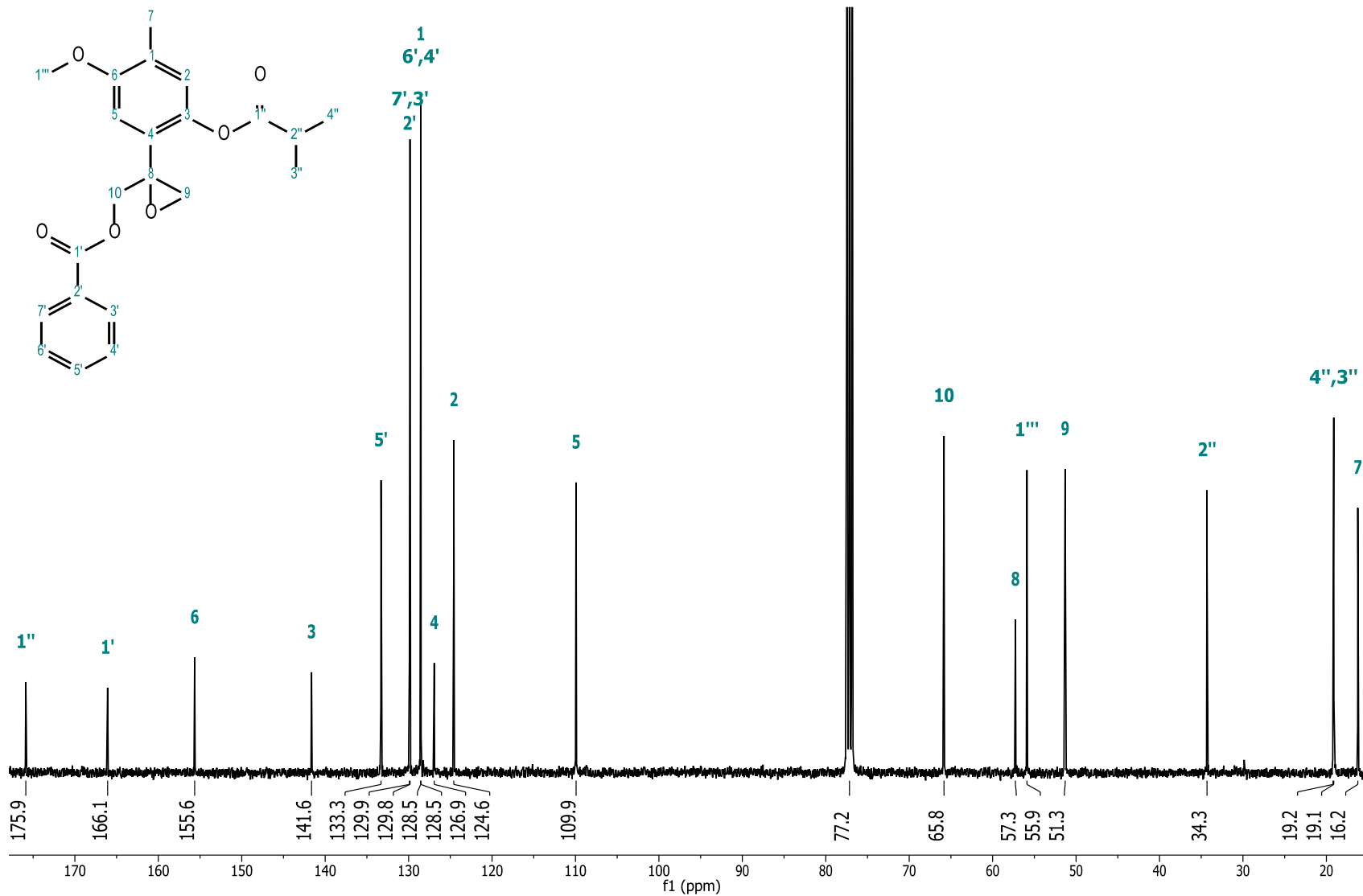
**ESPECTRO A6.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del Isobutirato del 10-benzoiloxi-8,9-epoxi-6-acetiloxitimol **1a** (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



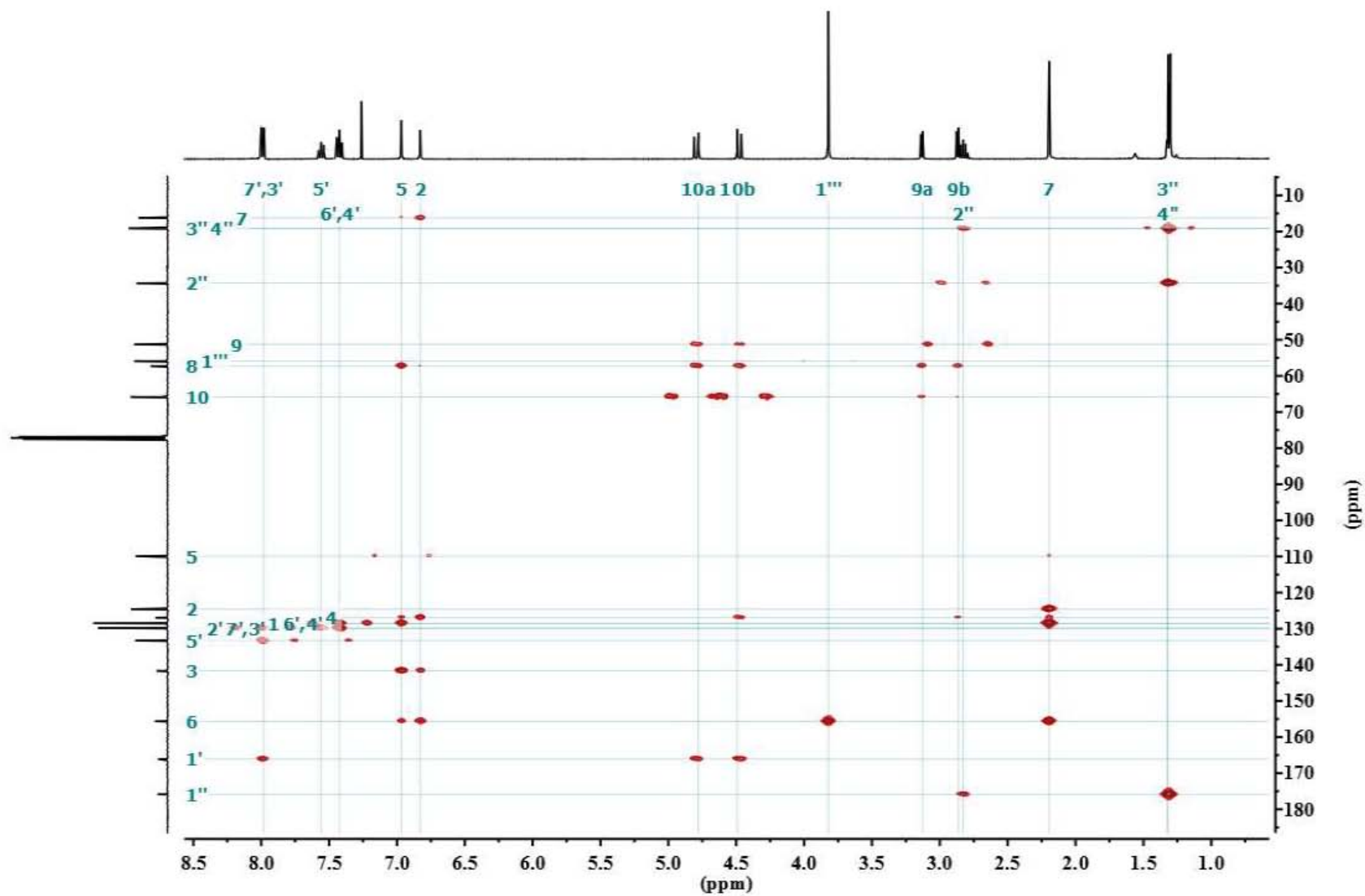
ESPECTRO A7. Espectro HMBC de 1a (400MHz, CDCl<sub>3</sub>).



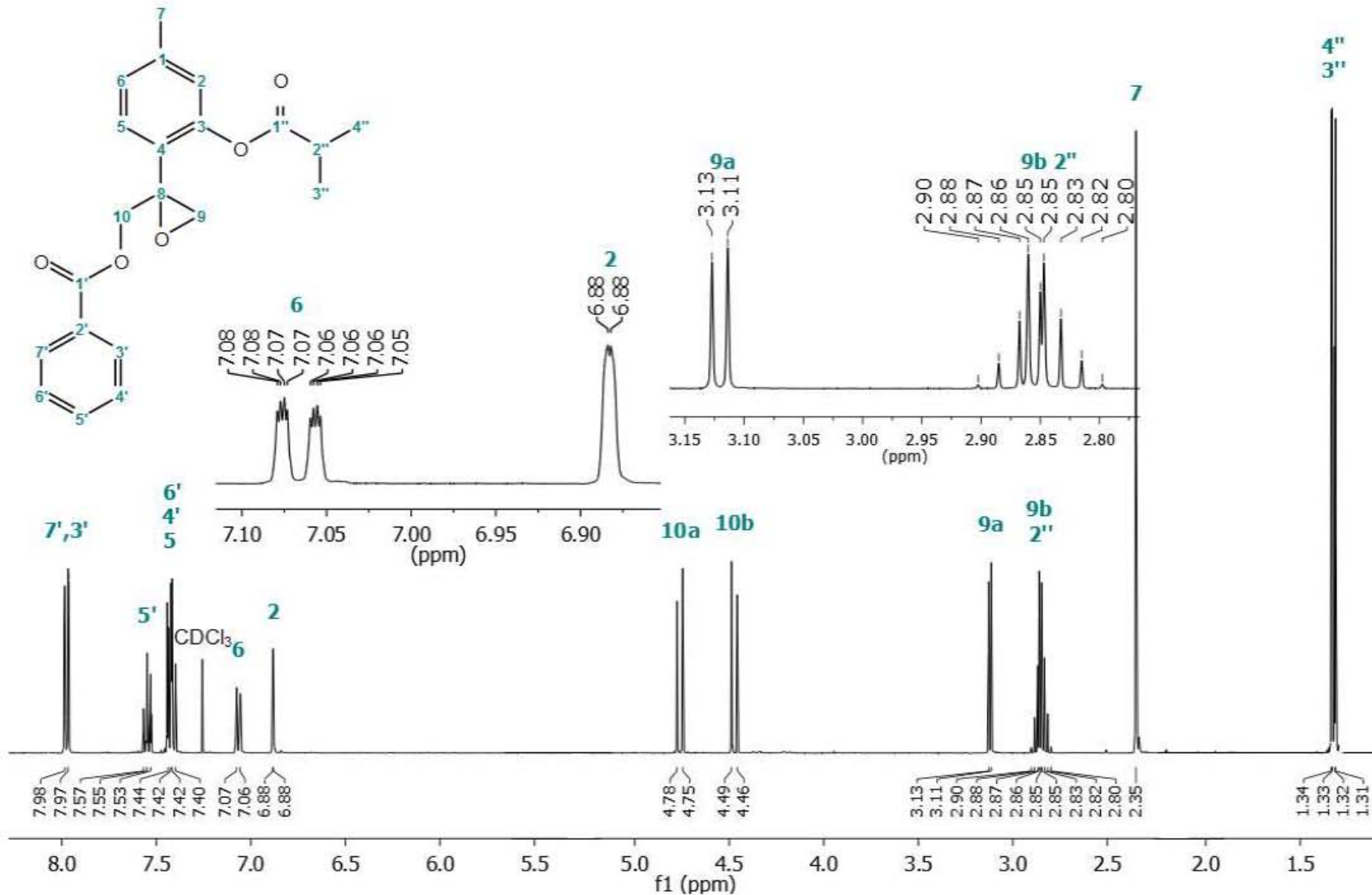
**ESPECTRO A8.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del Isobutirato de 10-benzoiloxi-8,9-epoxi-6-metoxitimidol **2** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



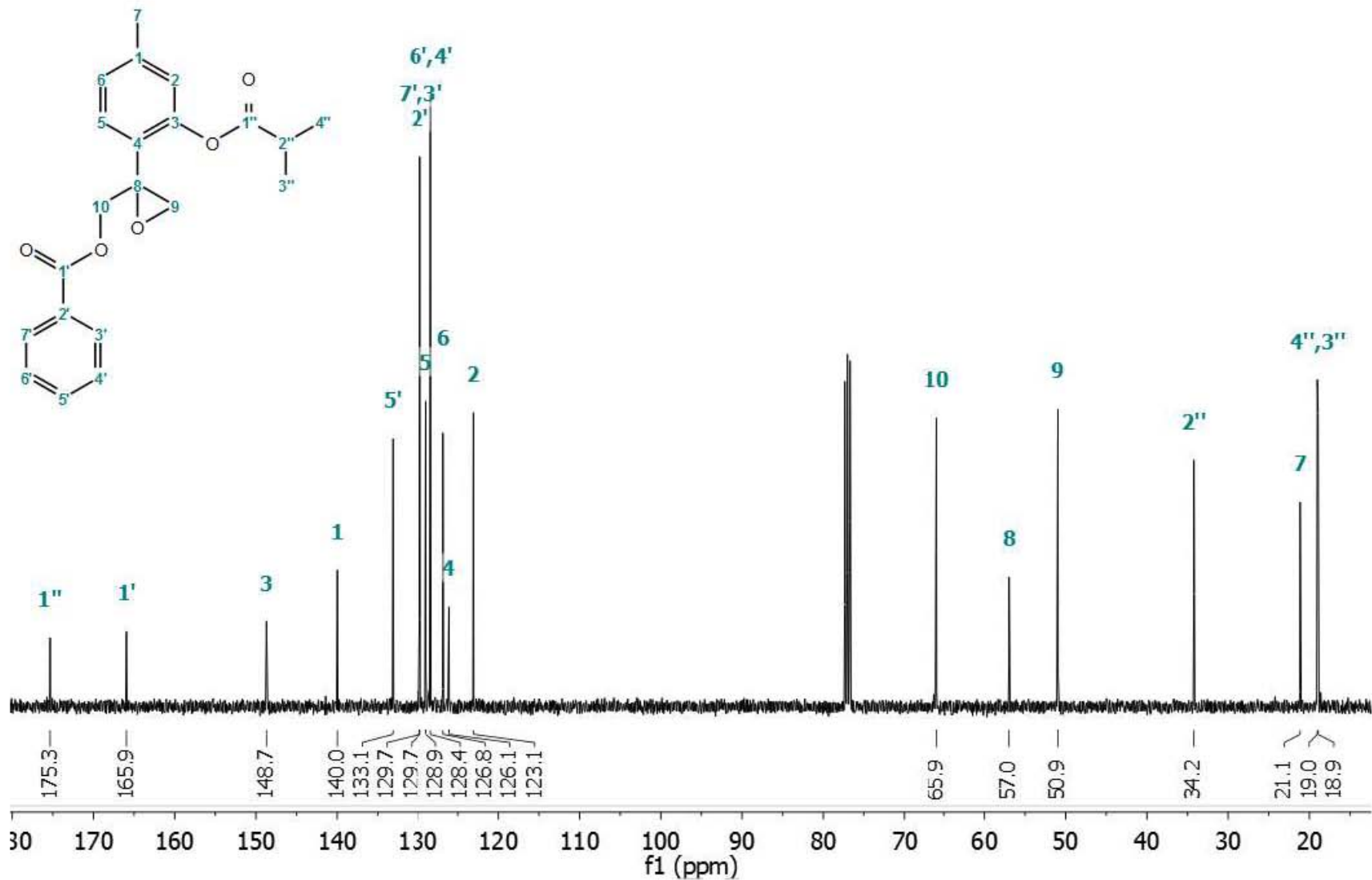
**ESPECTRO A9.** Espectro de RMN <sup>13</sup>C del Isobutirato de 10-benzoiloxi-8,9-epoxi-6-metoxitimol 2 (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



ESPECTRO A10. Espectro HMBC de 2 (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

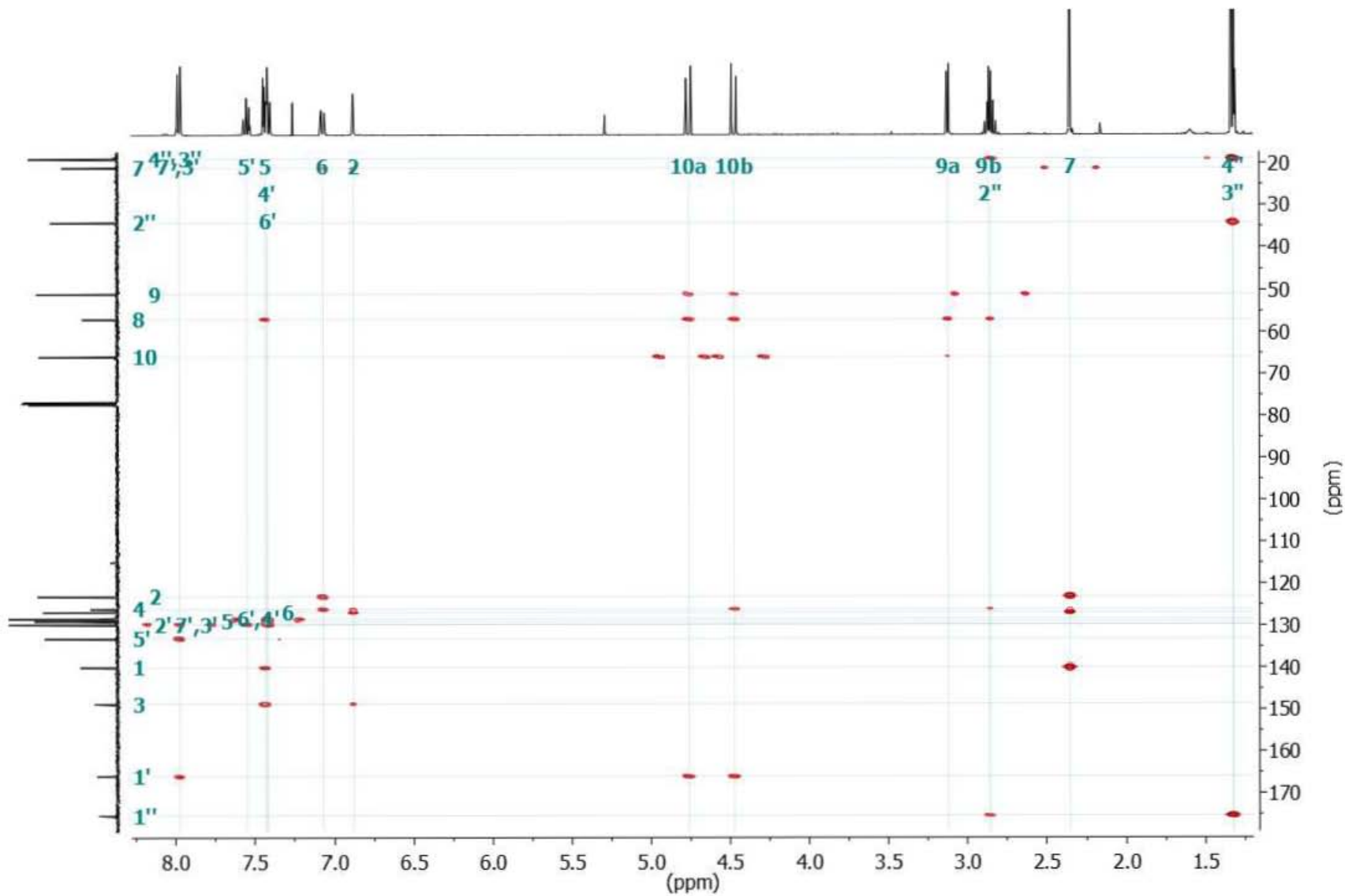


ESPECTRO A11. Espectro de RMN <sup>1</sup>H del Isobutirato de 10-benzoiloxi-8,9-epoxitimidol **3** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

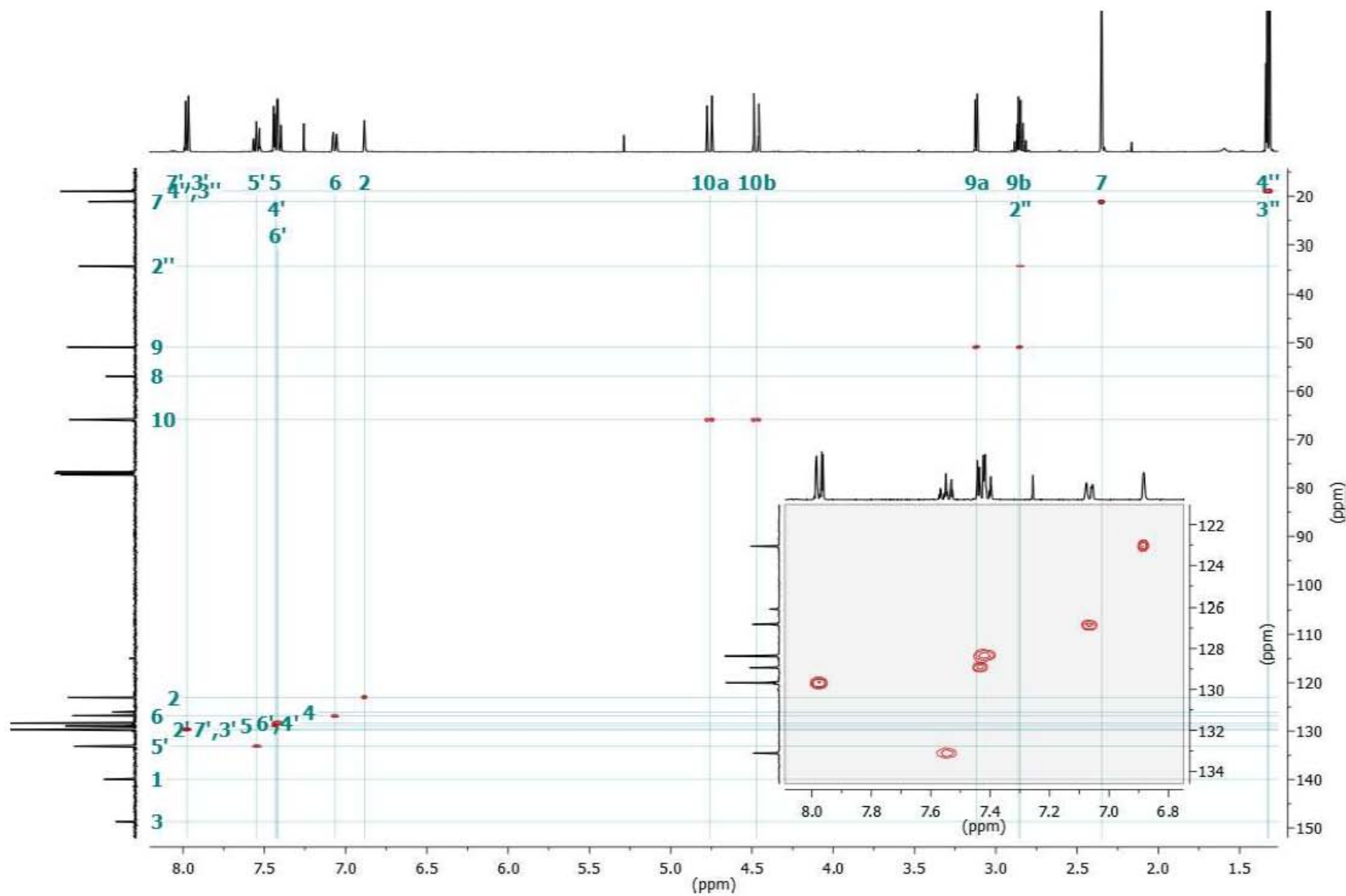


**ESPECTRO A12.** Espectro de RMN <sup>13</sup>C del Isobutirato de 10-benzoiloxi-8,9-epoxitimol **3** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

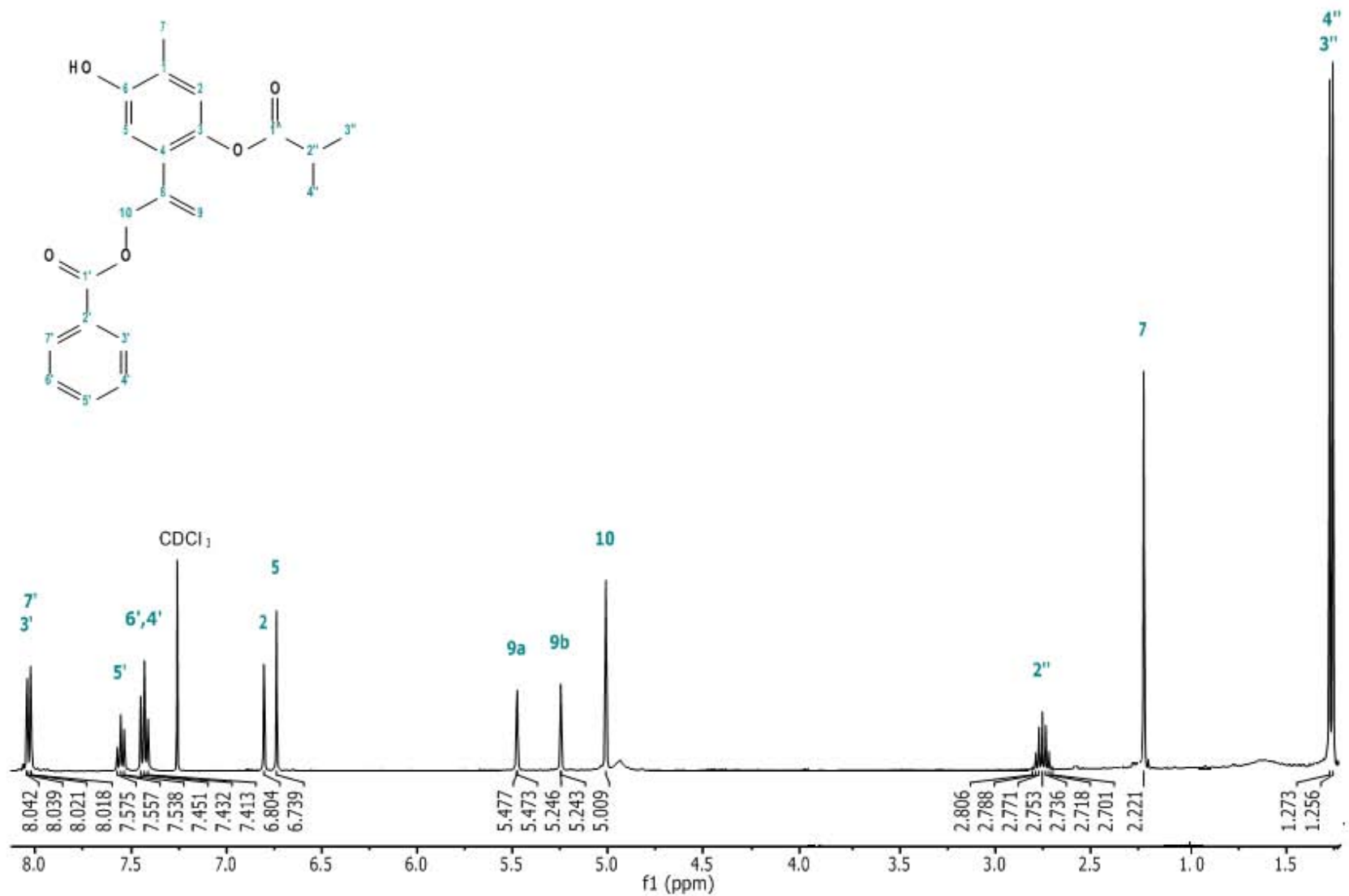




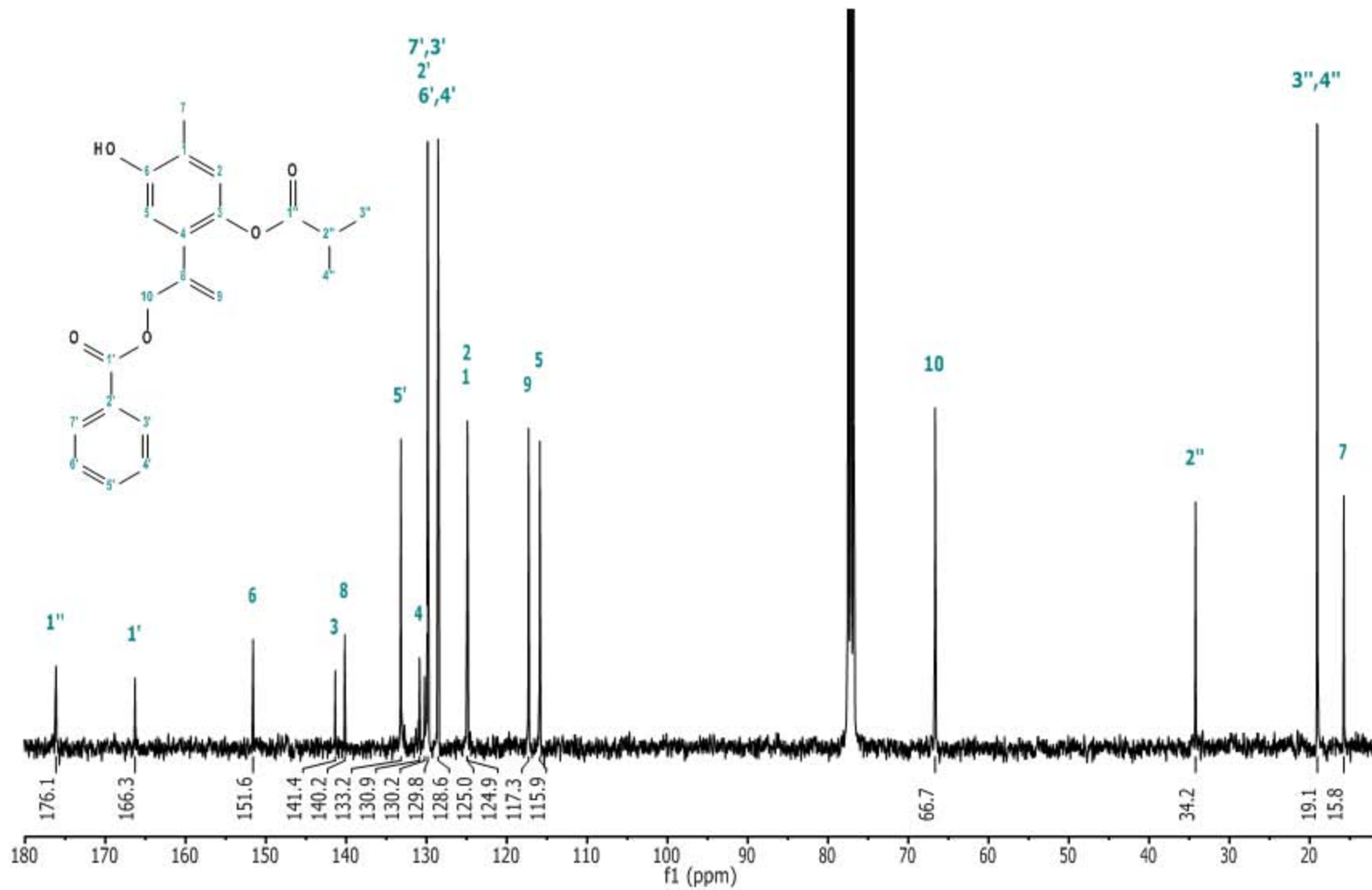
ESPECTRO A13. Espectro HMBC de 3 (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



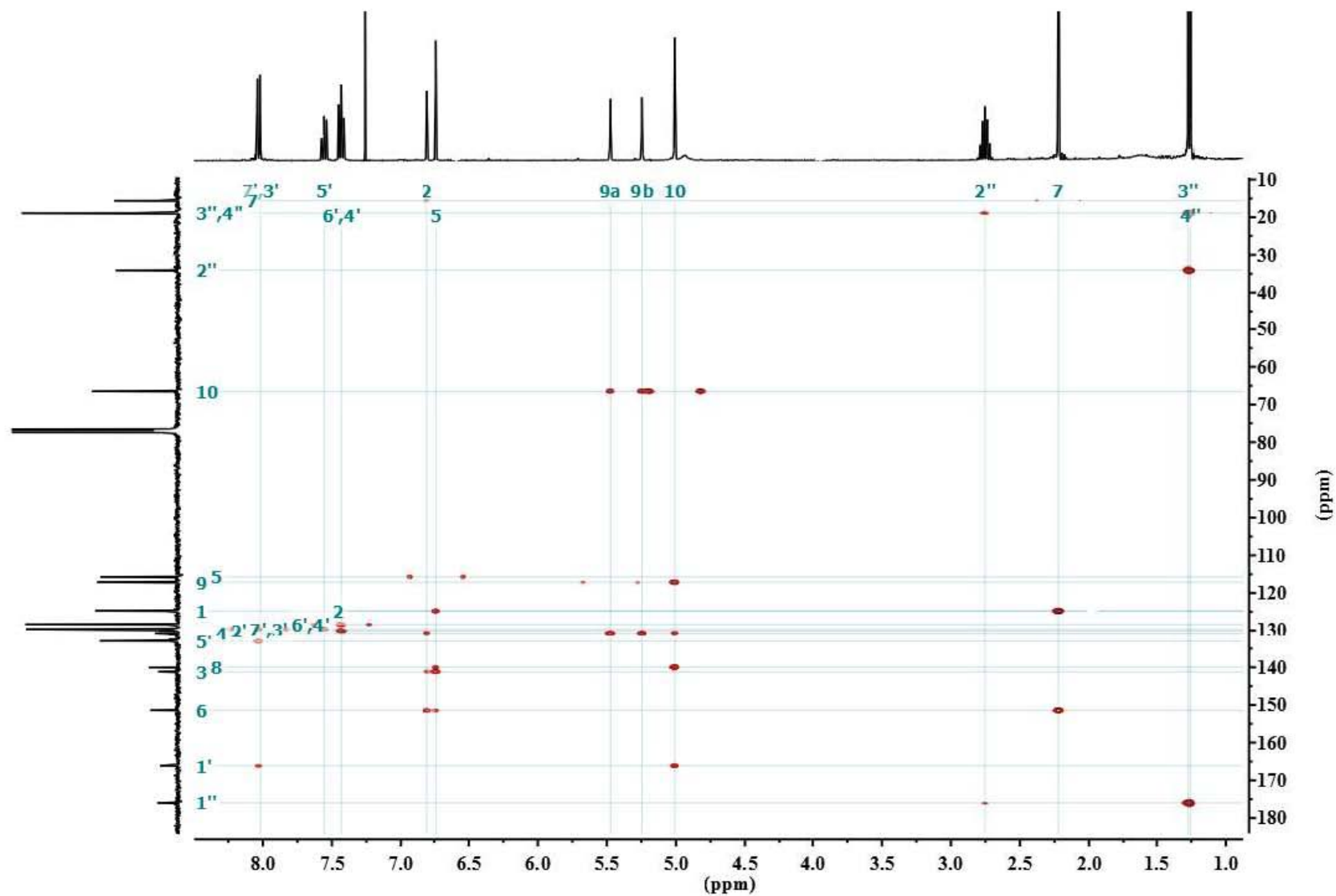
**ESPECTRO A14.** Espectro de RMN HSQC de **3** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>), con ampliación de los C aromáticos.



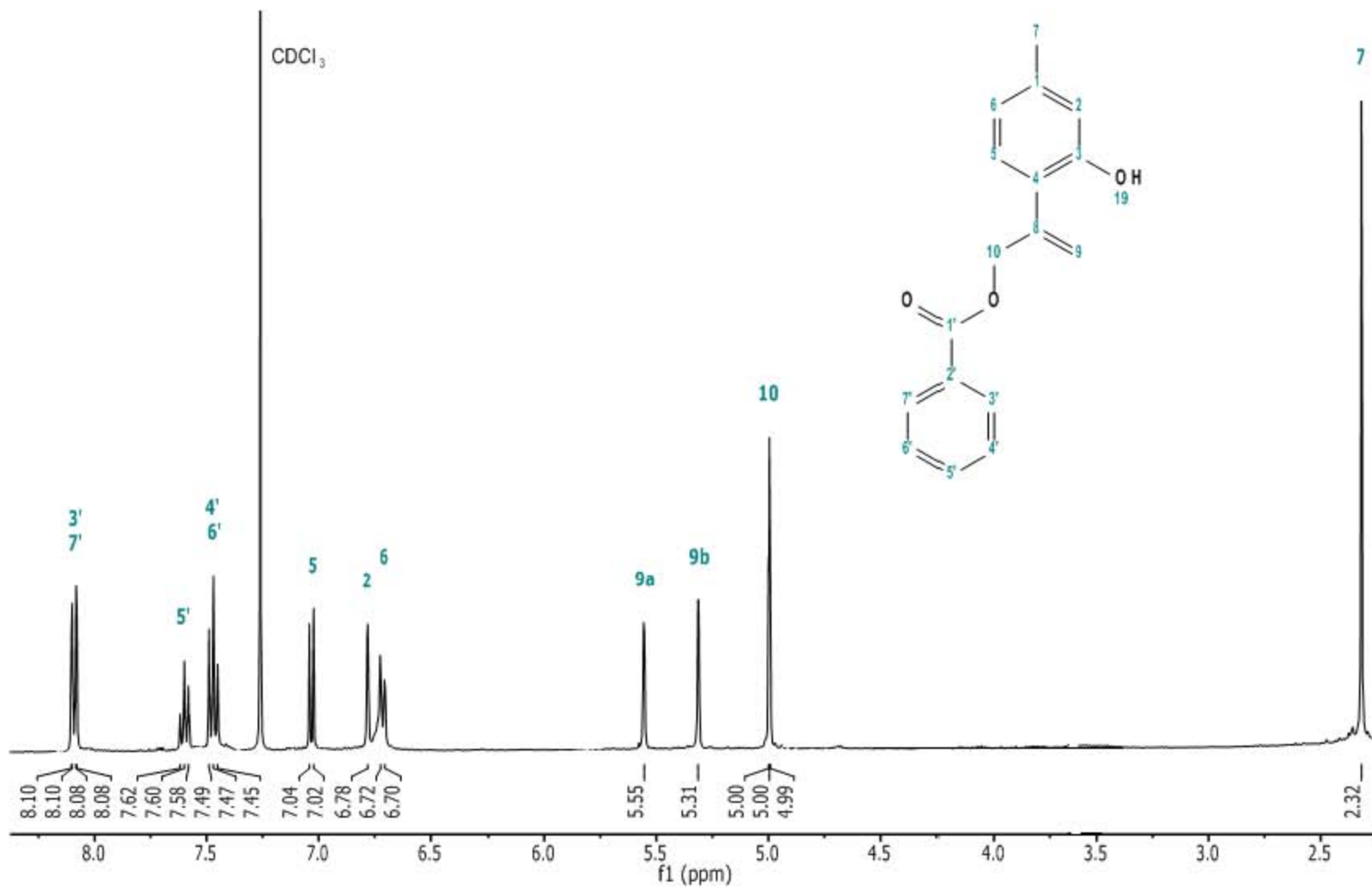
**ESPECTRO A15.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H del Isobutirato de 10-benzoiloxi-8,9-dehidro-6-hidroxitimol 4 (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



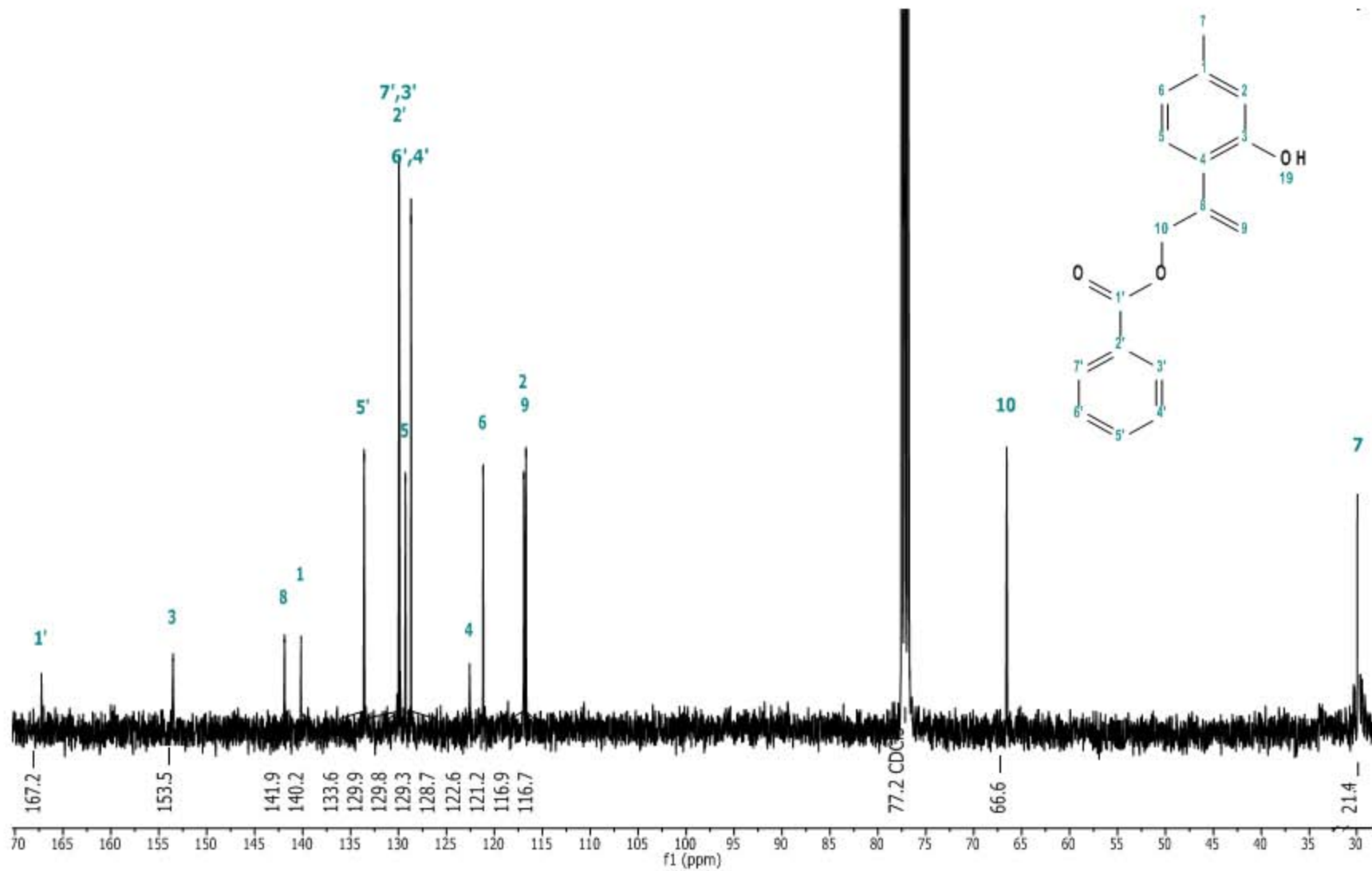
**ESPECTRO A16.** Espectro de RMN <sup>13</sup>C del Isobutirato de 10-benzoiloxi-8,9-dehidro-6-hidroxitimol 4 (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



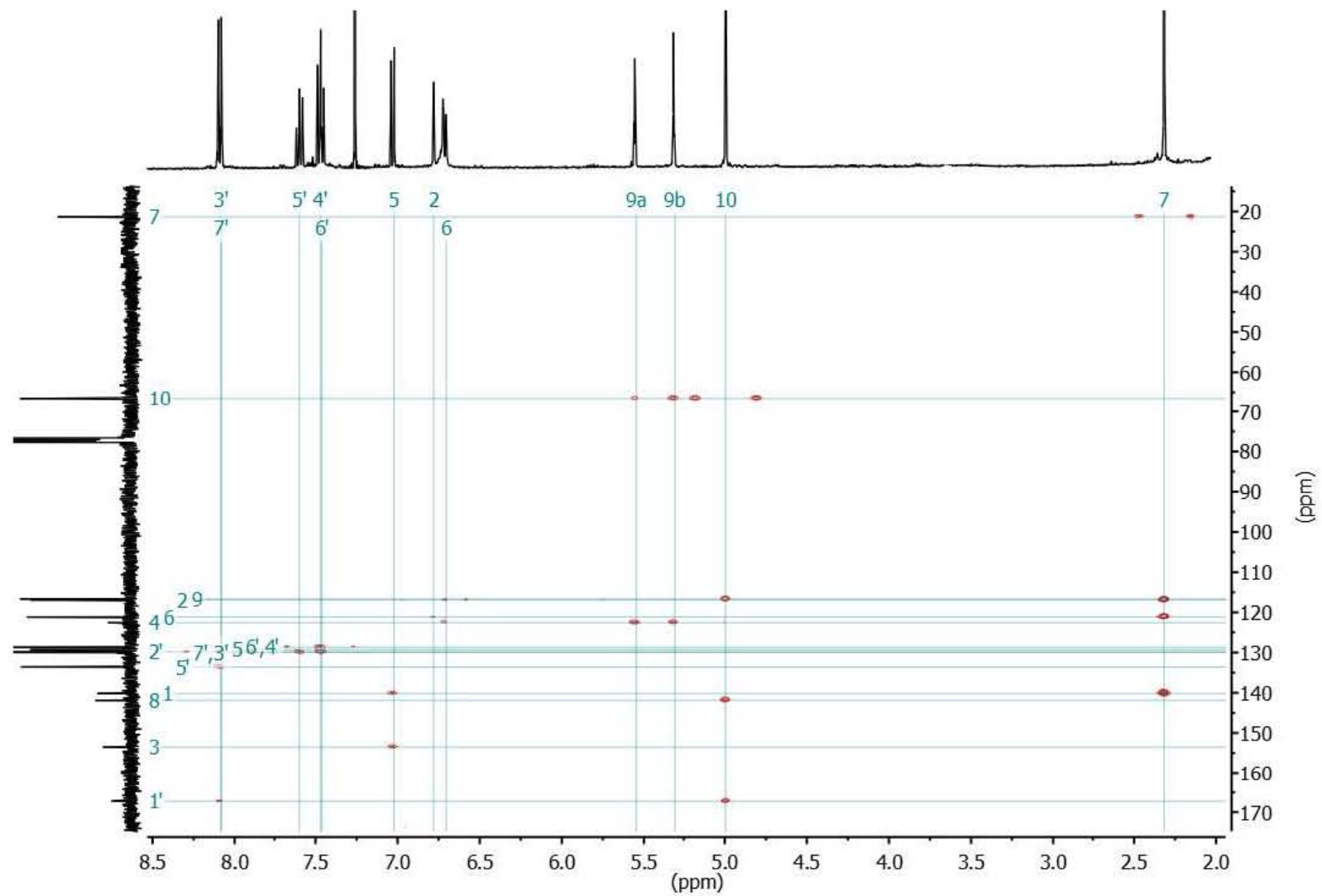
ESPECTRO A17. Espectro HMBC de 4 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



**ESPECTRO A18.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H del 10-benzoiloxi-8,9-dehidrotimol **5** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

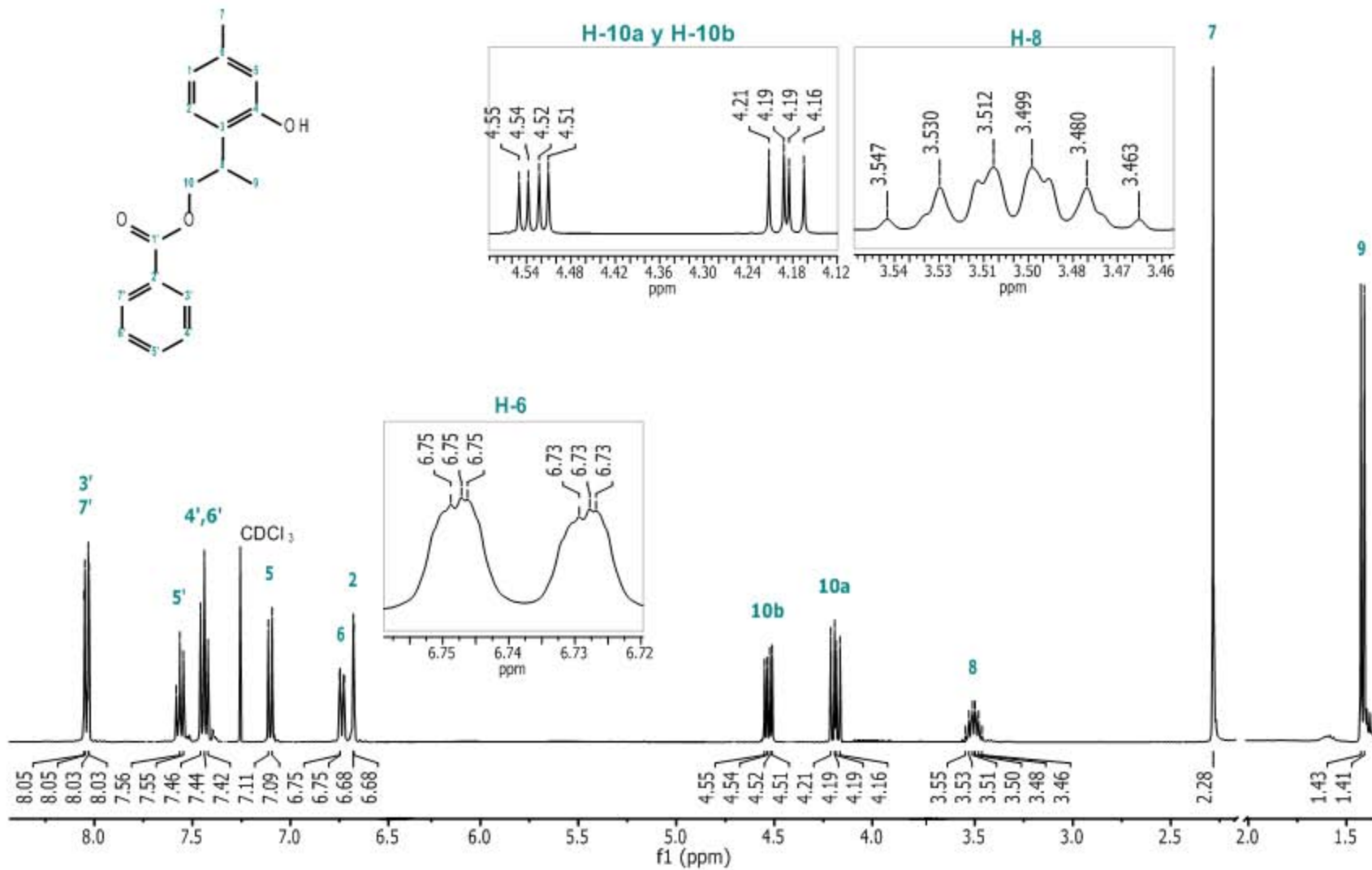


**ESPECTRO A19.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del 10-benzoiloxi-8,9-dehidrotimol **5** (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

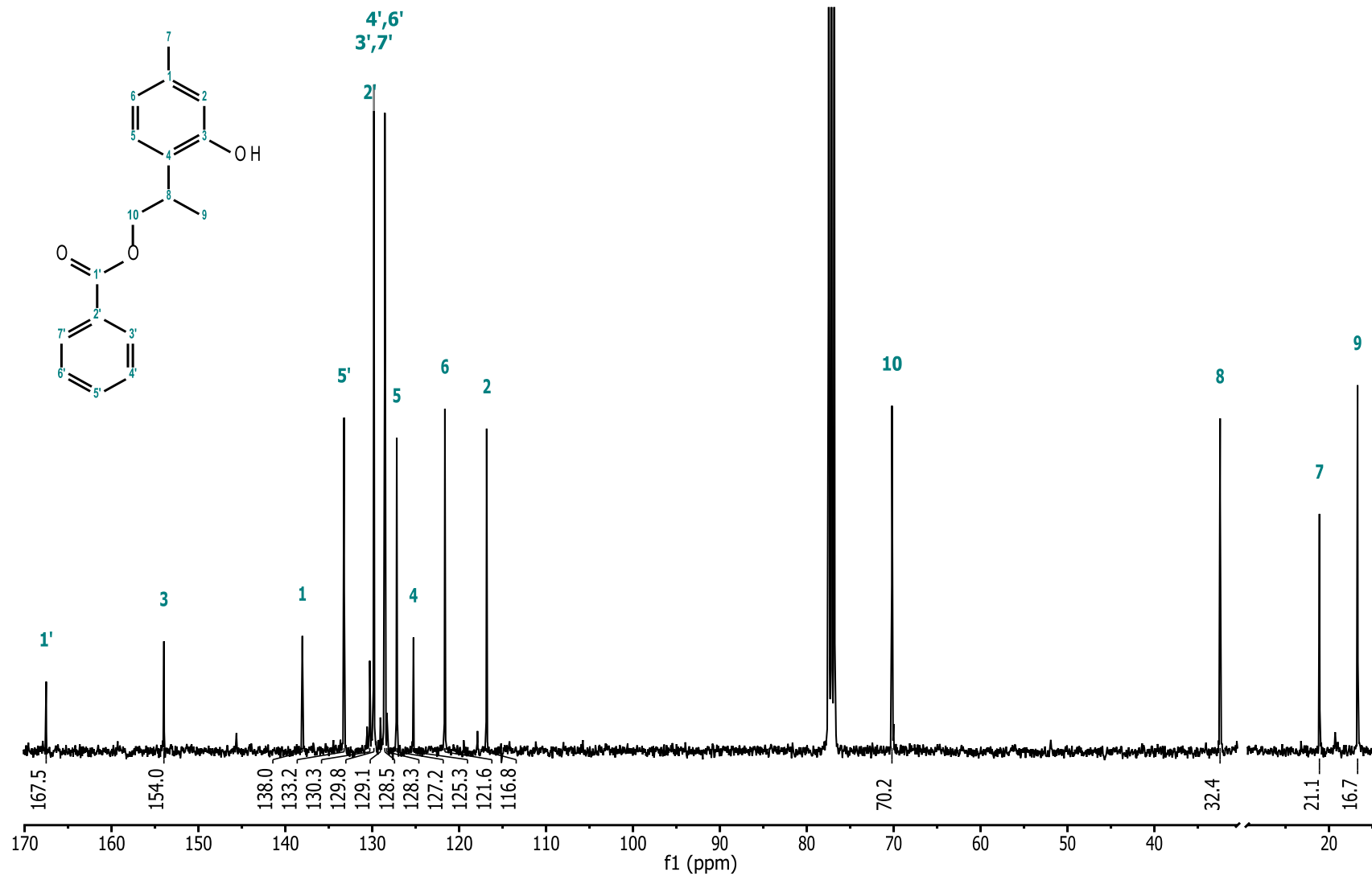


**ESPECTRO A20.** Espectro, HMBC de **5** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

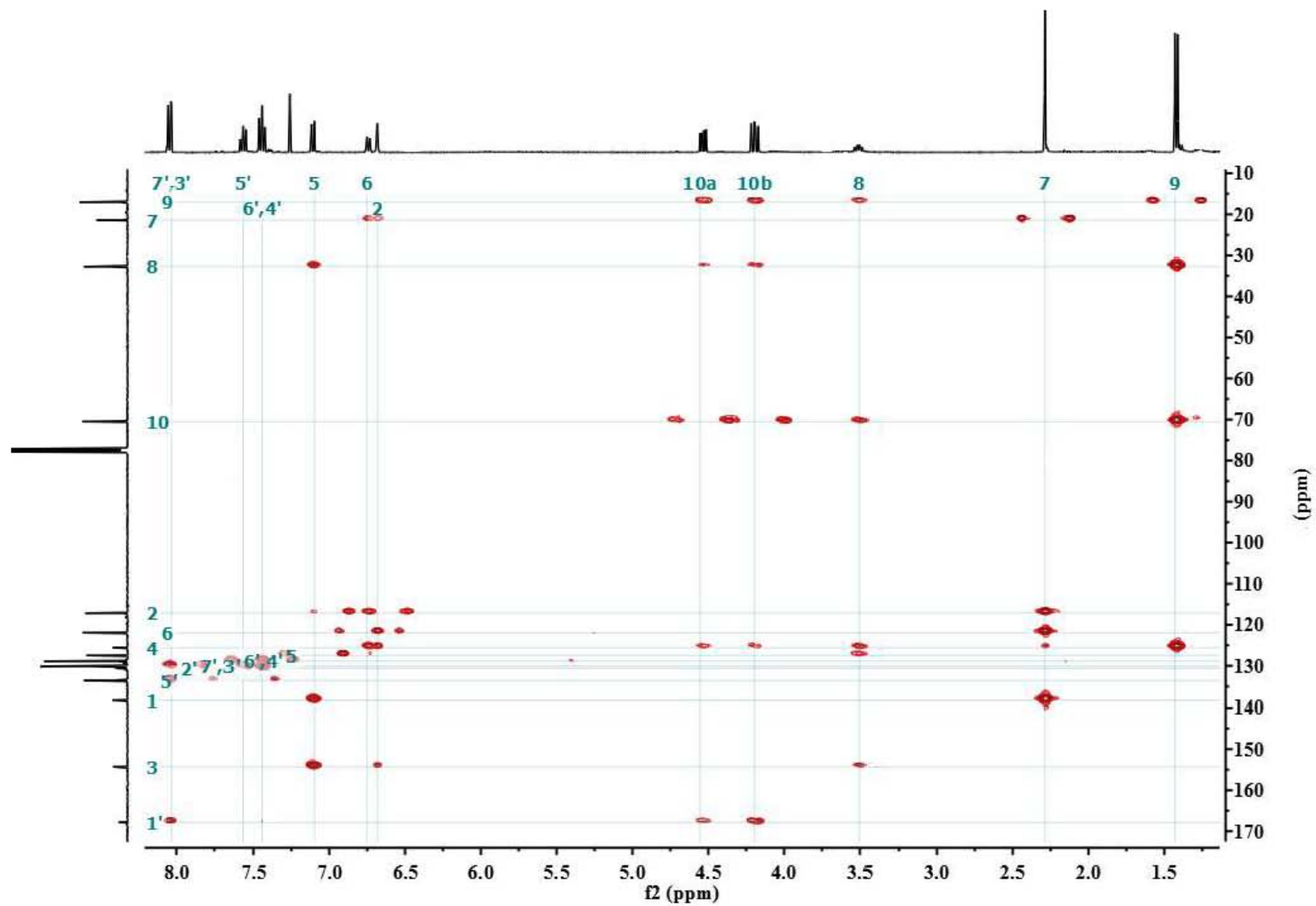




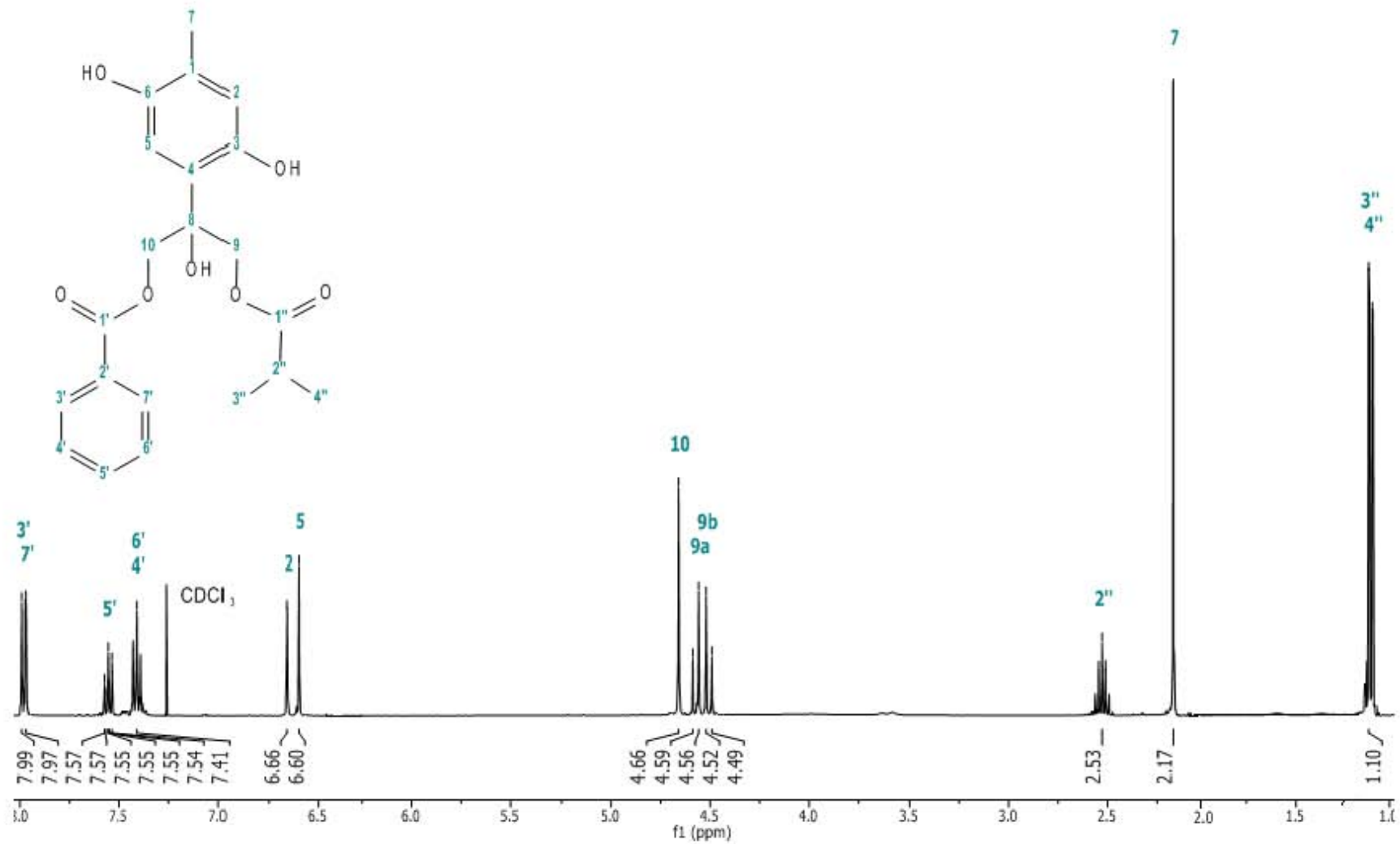
**ESPECTRO A21.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H del 10-benzoyloxitimol **6**, con ampliación de H-6, H-10a, H-10b y H-8 (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



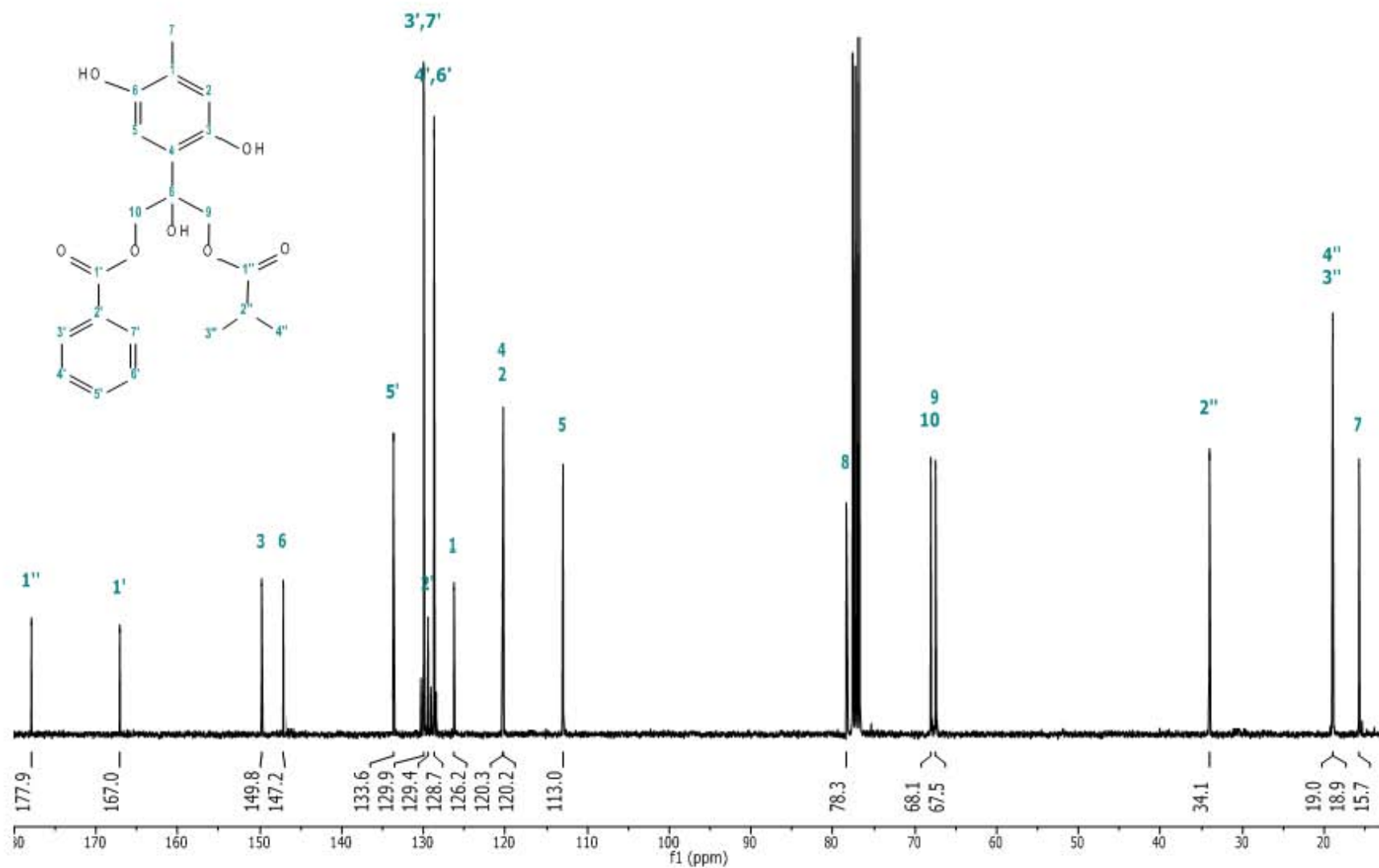
ESPECTRO A22. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del 10-benzoyloxitimol **6** (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



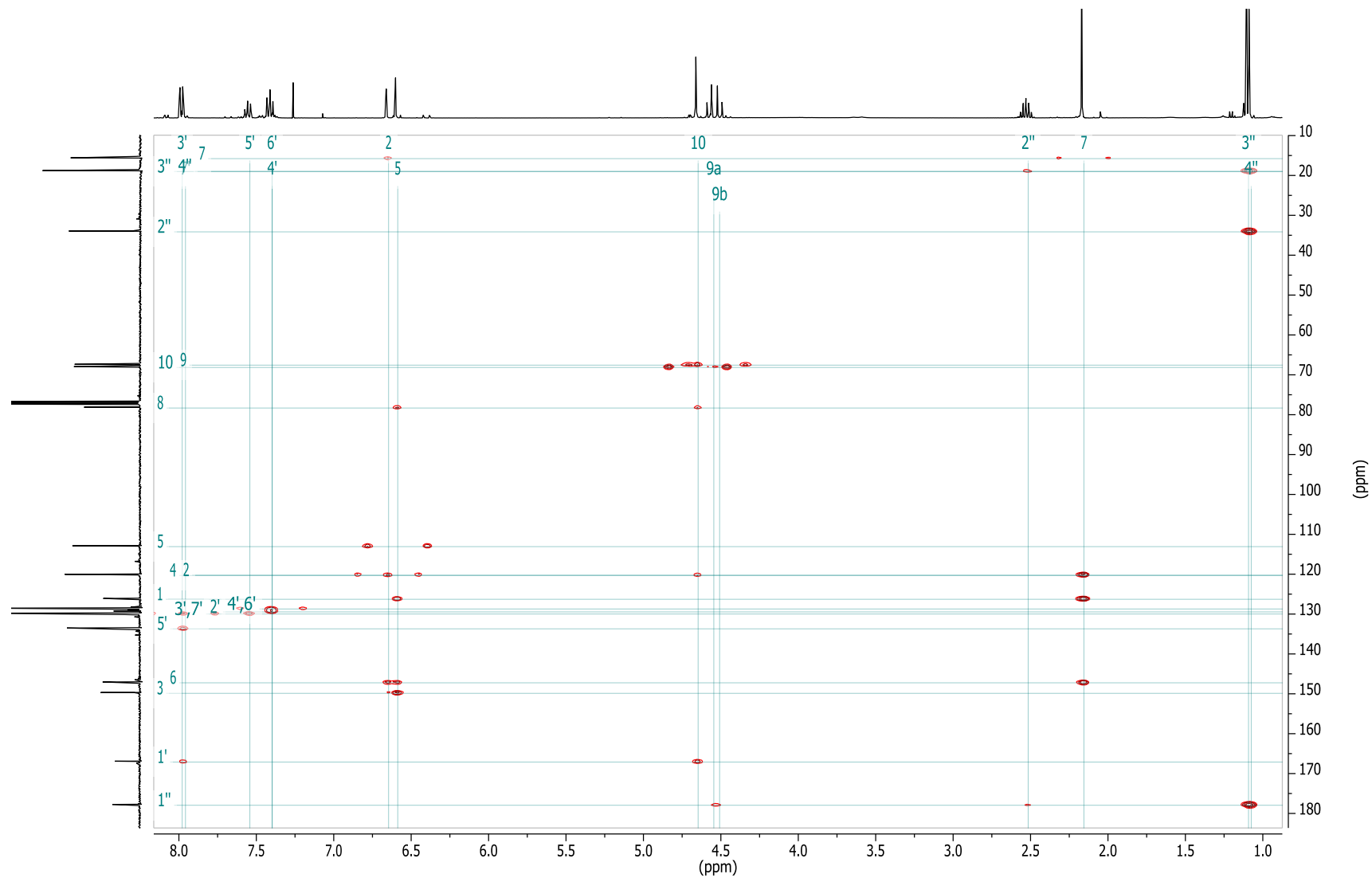
ESPECTRO A23. Espectro HMBC de 6 (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



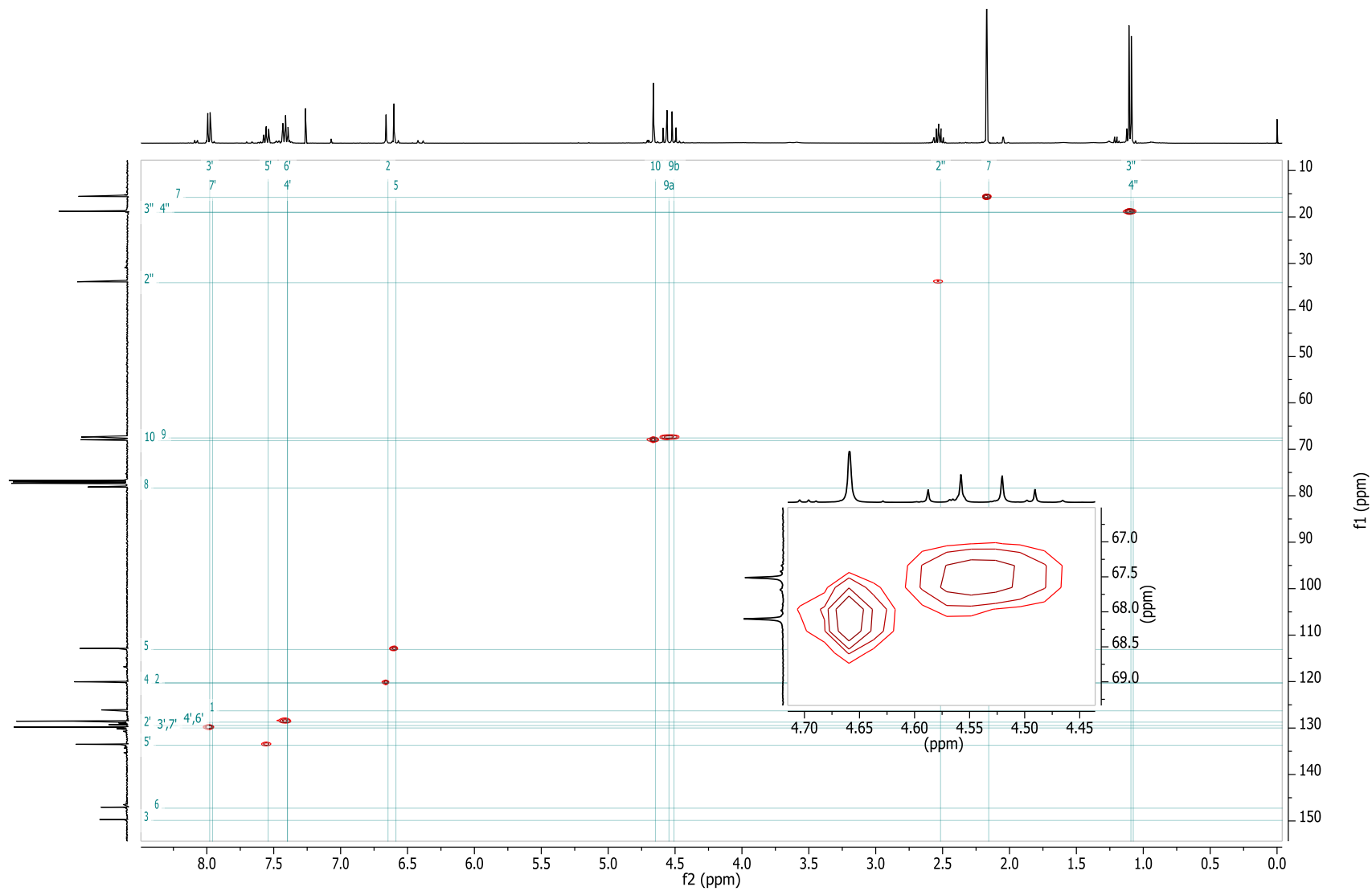
**ESPECTRO A24.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H del 10-benzoiloxi-6,9-dihidroxi-9-isobutiriloxitimo **7** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



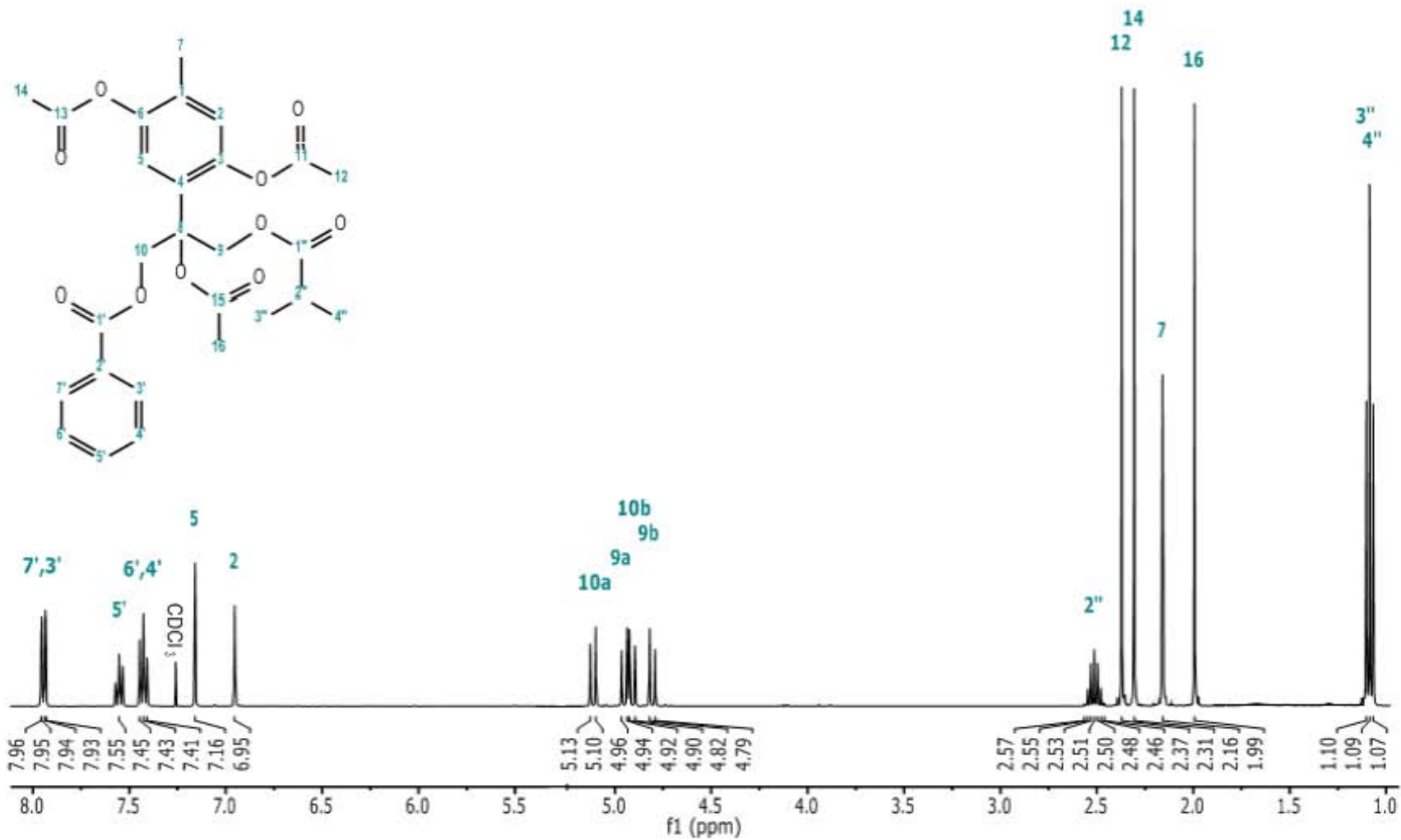
**ESPECTRO A25.** Espectro de RMN <sup>13</sup>C del 10-benzoiloxi-6,9-dihidroxi-9-isobutiriloxitimidol **7** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



ESPECTRO A26. Espectro HMBC de 7 (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

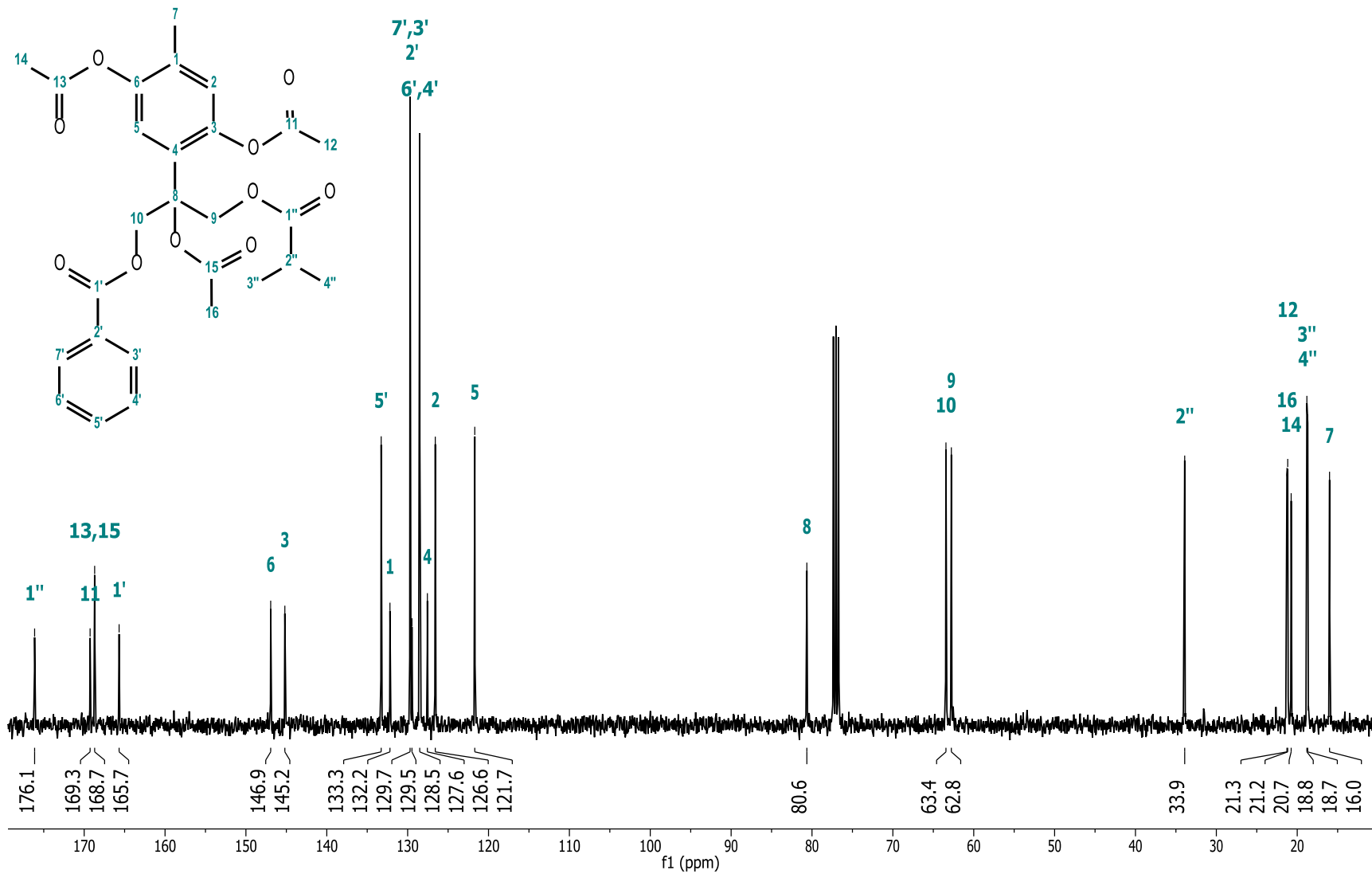


ESPECTRO A27. Espectro HSQC de **7** con ampliación C-9, C-10 (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

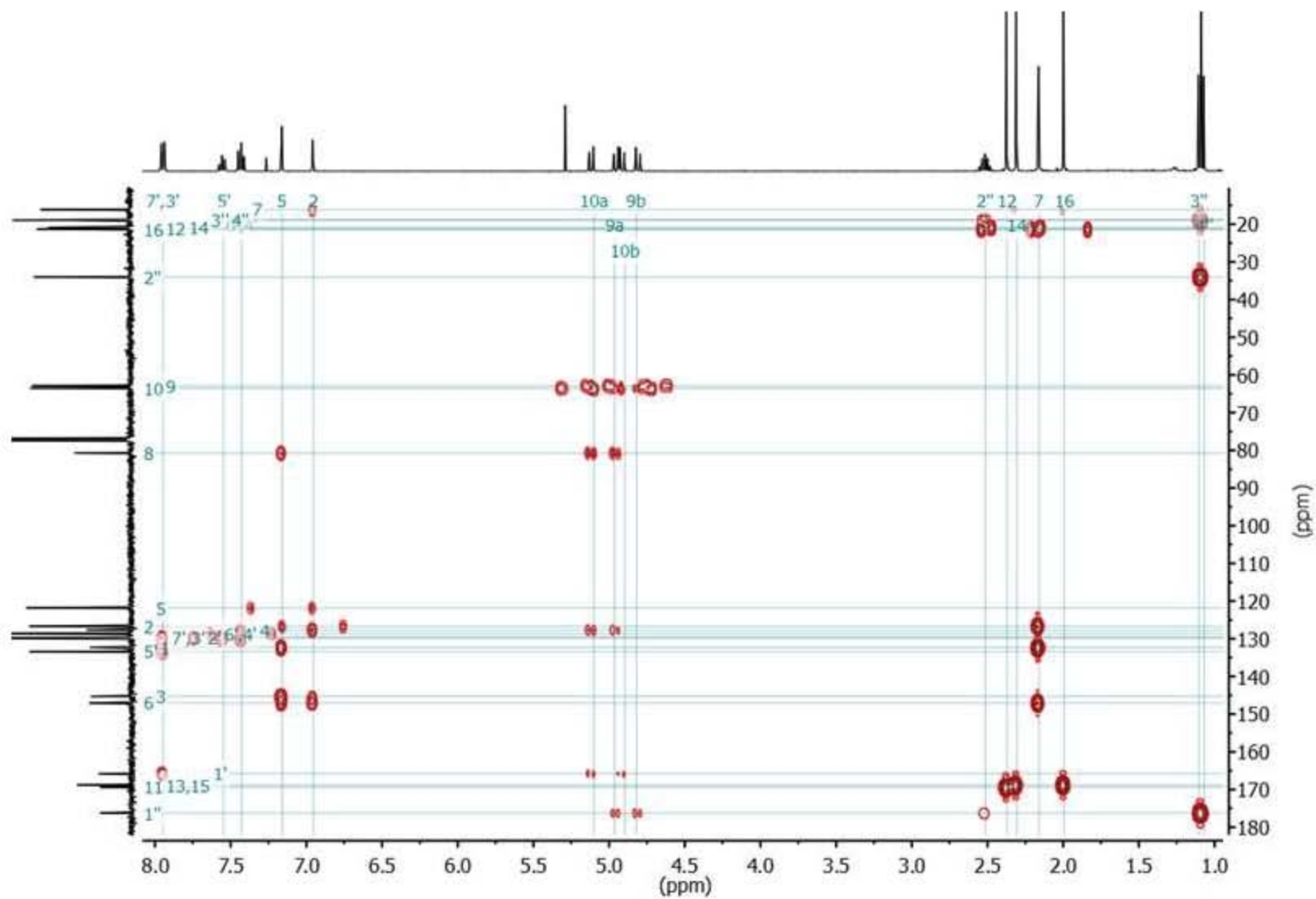


**ESPECTRO A28.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H del Acetato de 10-benzoiloxi-6,8-diacetiloxi-9-isobutirilotimol **7a** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

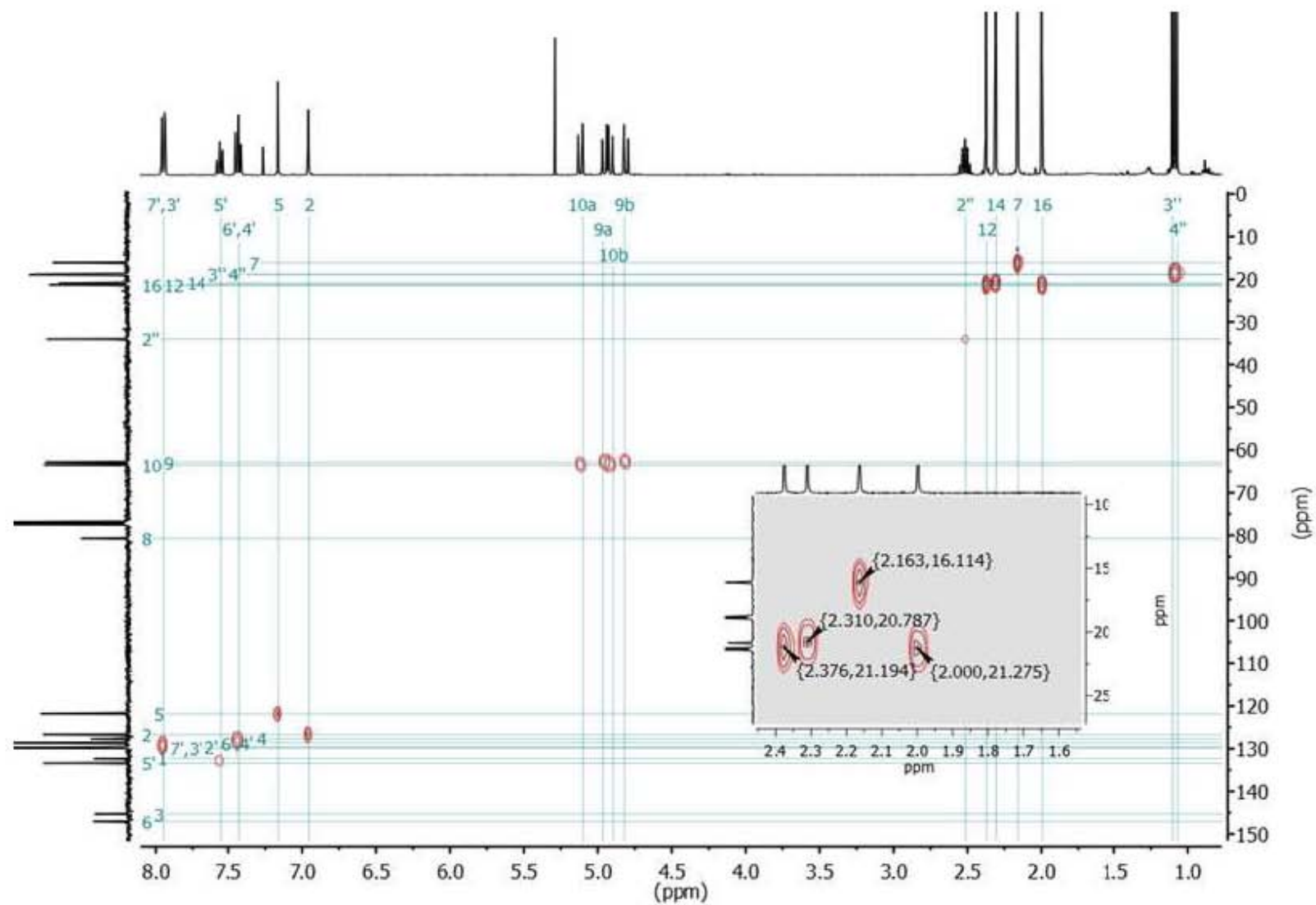




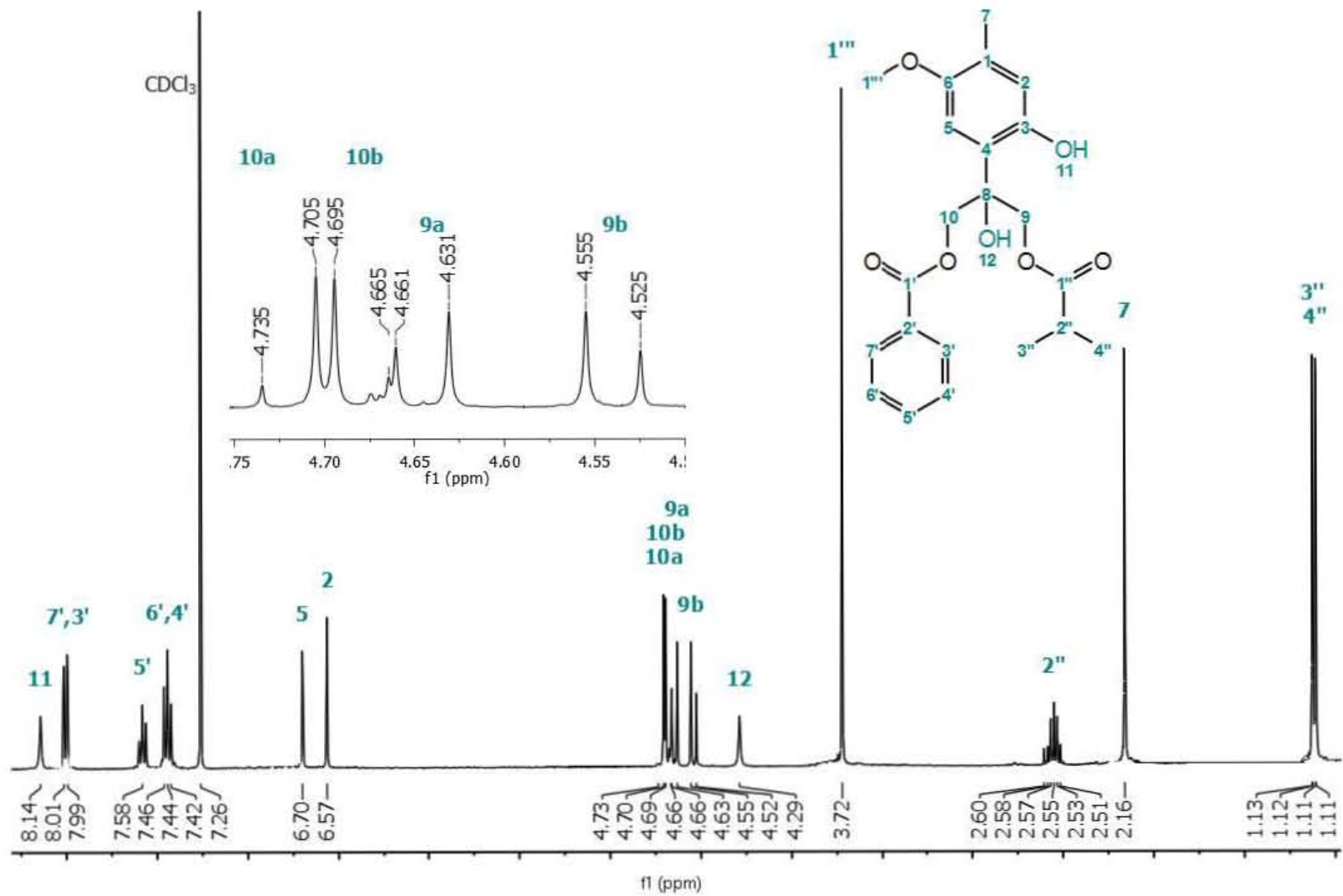
**ESPECTRO A29.** Espectro de RMN <sup>13</sup>C del Acetato de 10-benzoiloxi-6,8-diacetiloxi-9-isobutirilotimol **7a** (100 MHz, CDC<sub>3</sub>).



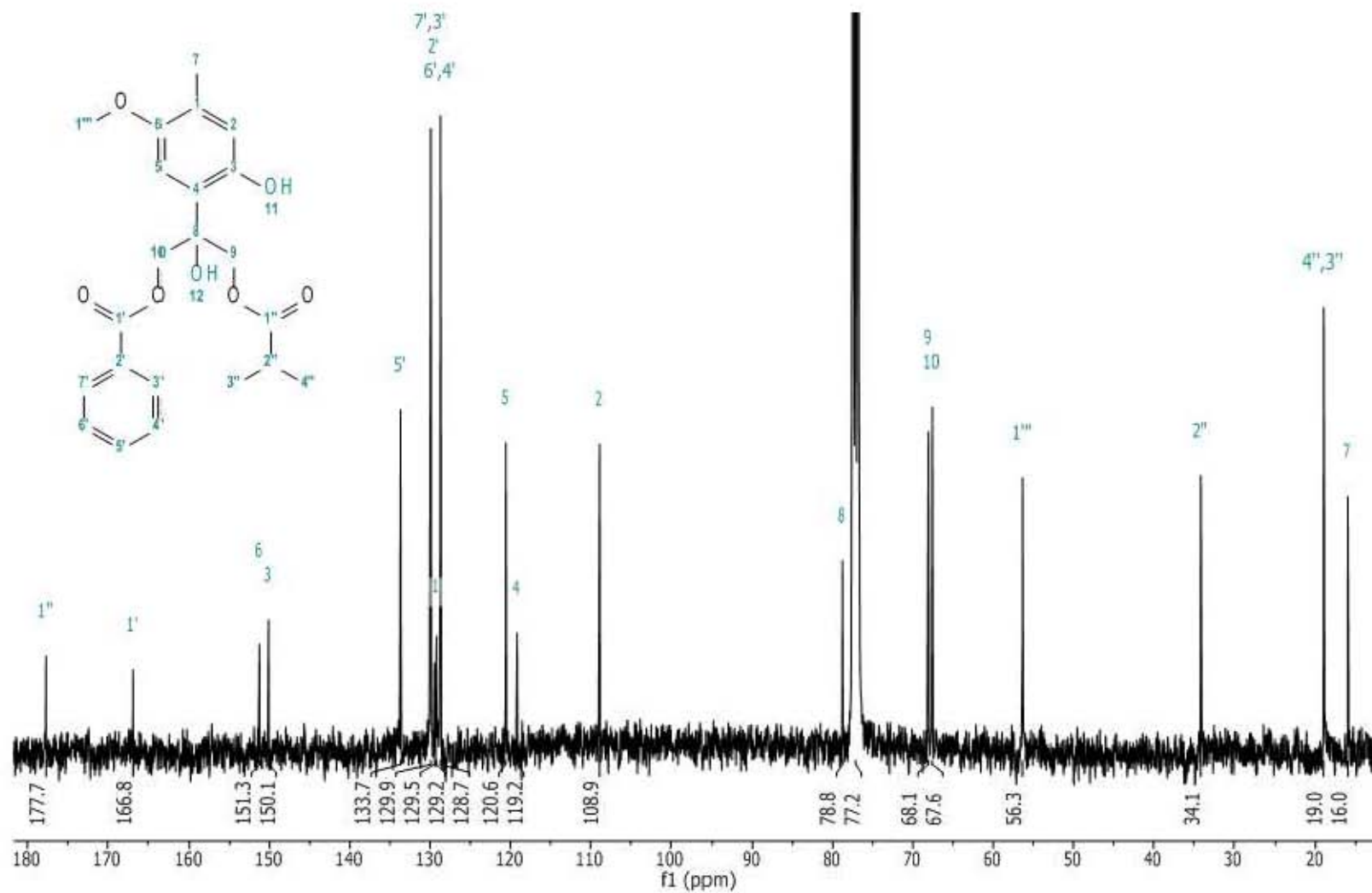
ESPECTRO A30. Espectro HMBC de 7a (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



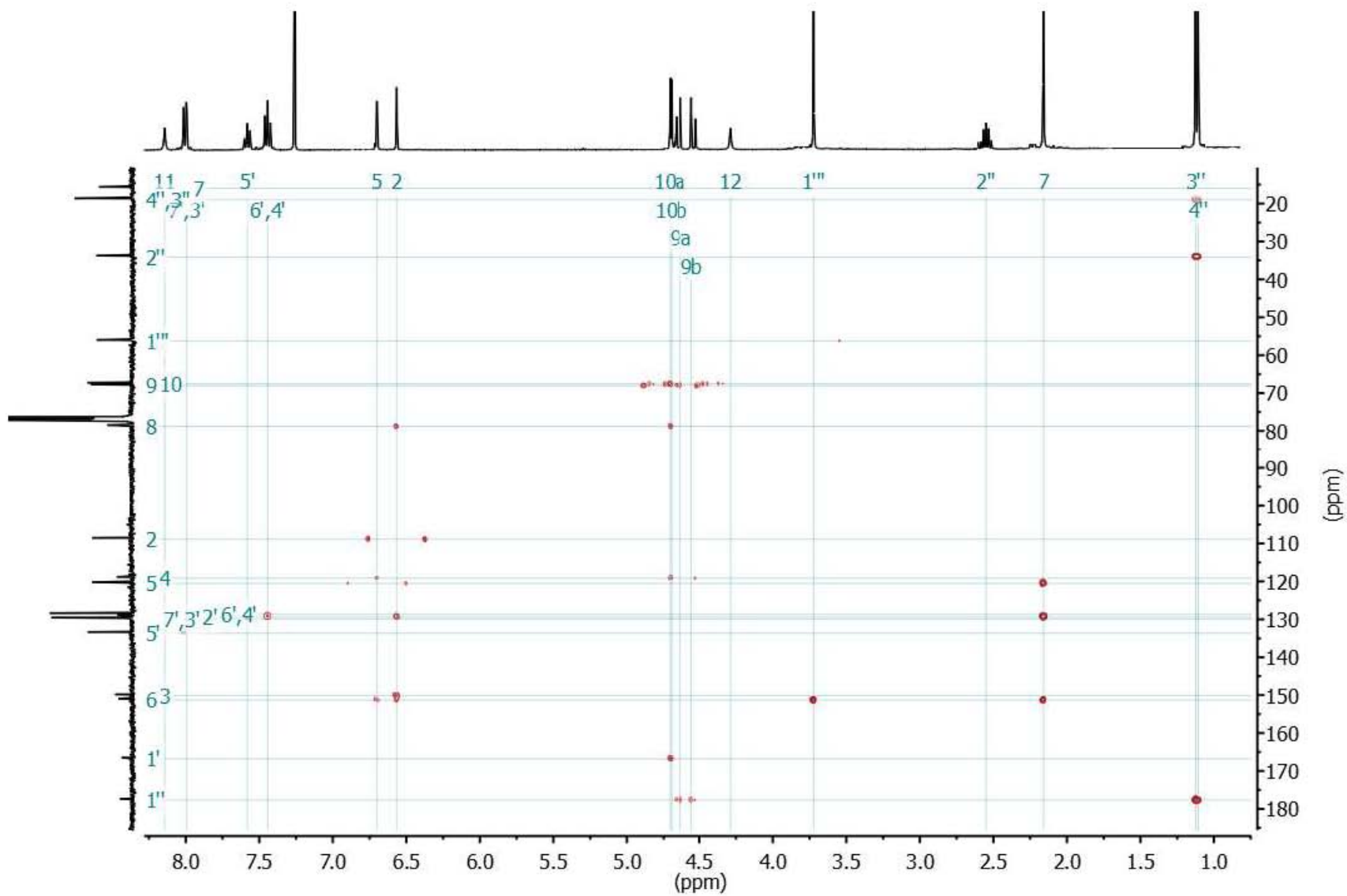
**ESPECTRO A31.** Espectro HSQC de **7a** con ampliación C-9, C-10 (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



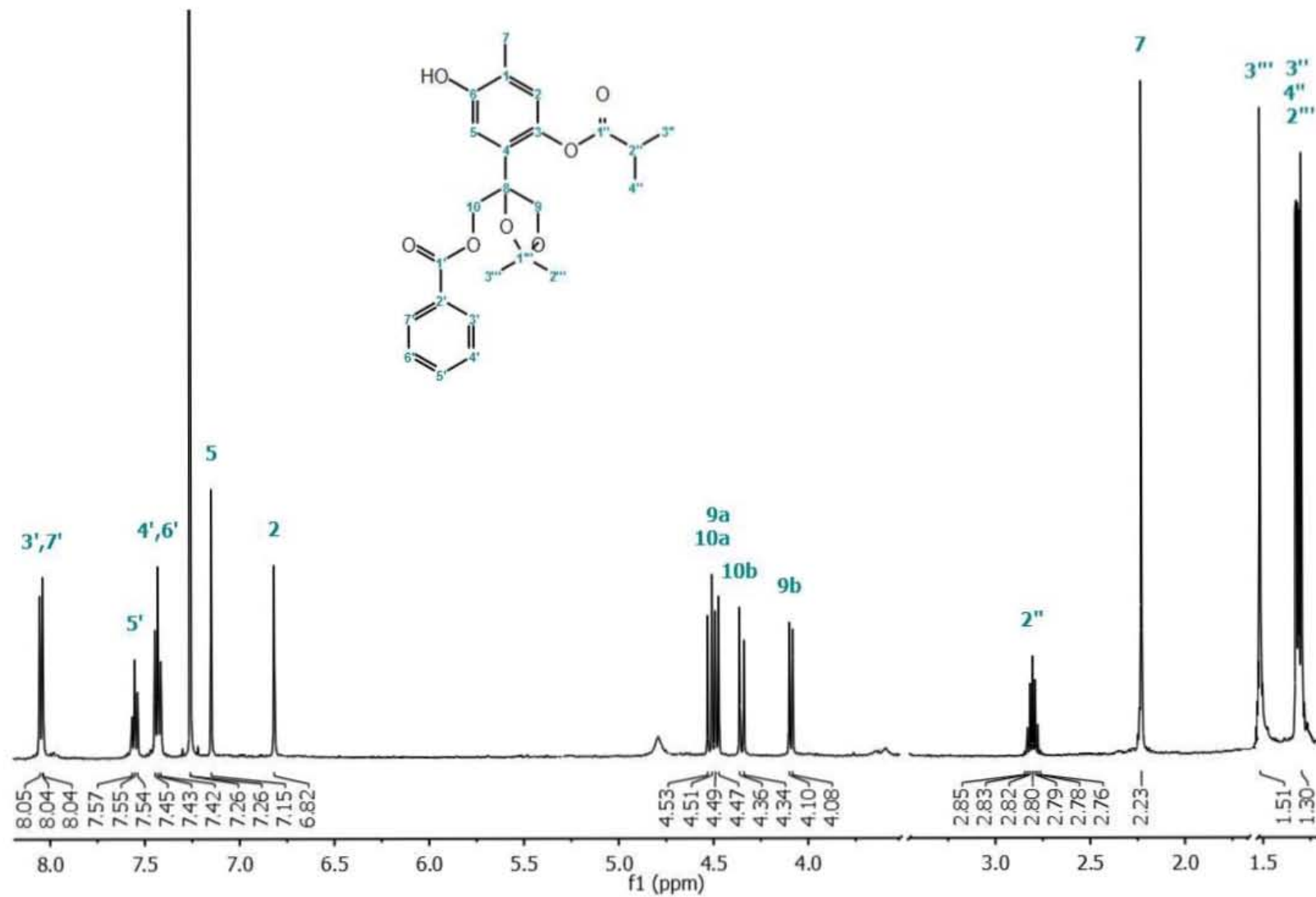
**ESPECTRO A32.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del 10-benzoiloxi-8-hidroxi-9-isobutiriloxi 6-metoxitímol **8** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



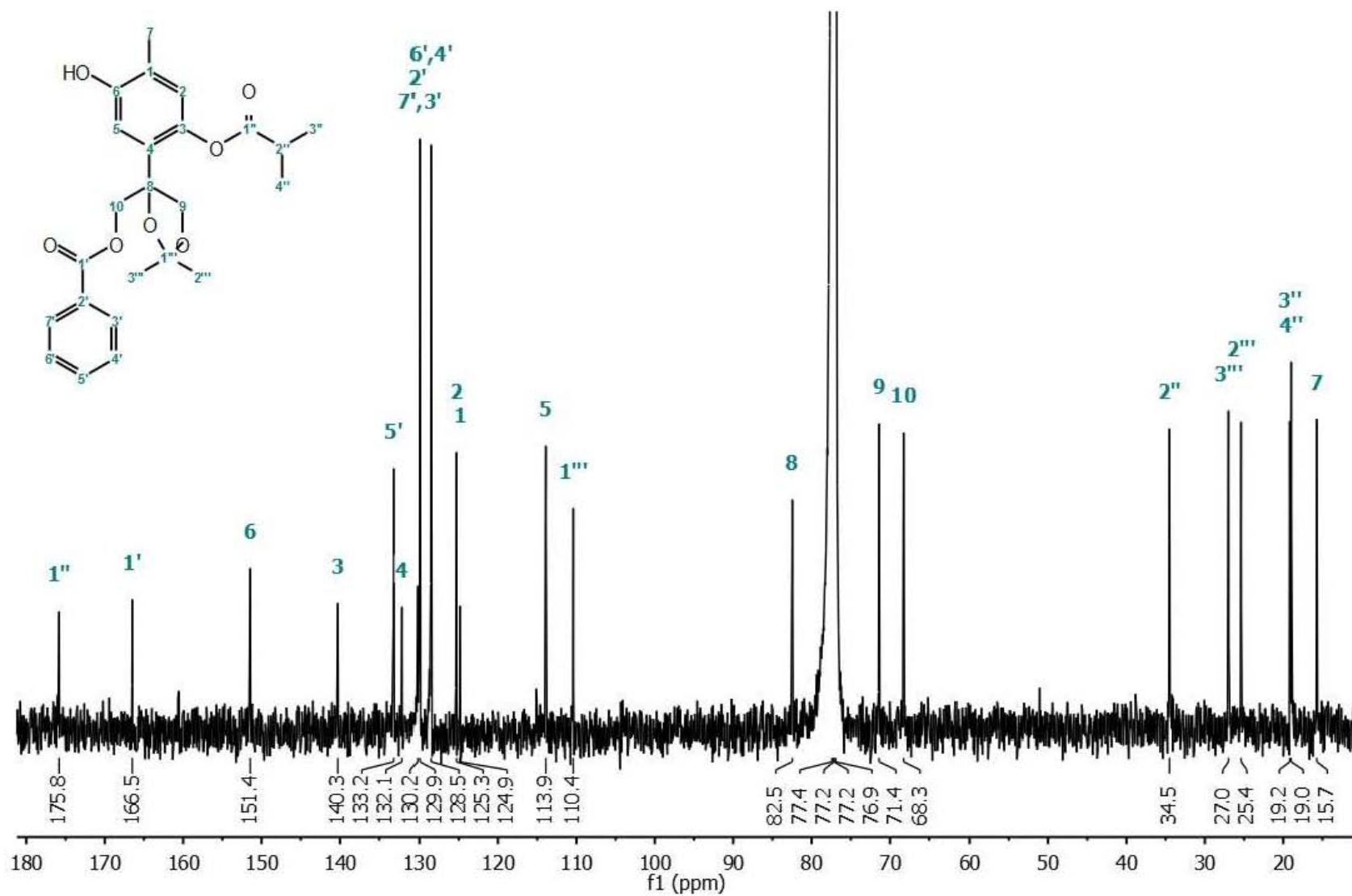
**ESPECTRO A33.** Espectro de RMN <sup>13</sup>C del 10-benzoiloxi-8-hidroxi-9-isobutiriloxi 6-metoxitimol **8** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



ESPECTRO A34. Espectro HMBC de 8 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

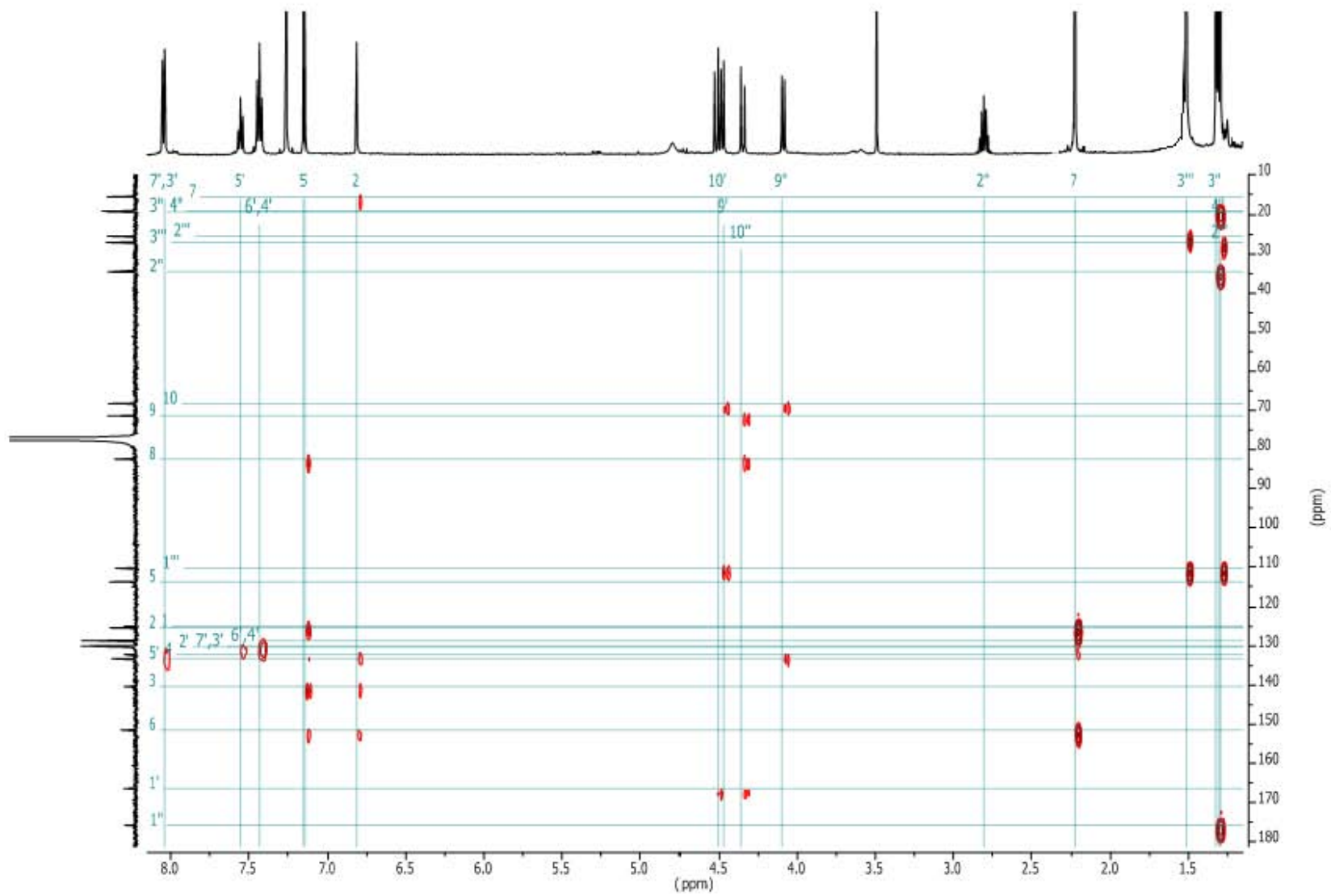


**ESPECTRO A35.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H del 8,9-aciloxi de isobutirato de 10-benzoiloxi-6,8,9-trihidroxi timol **9** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

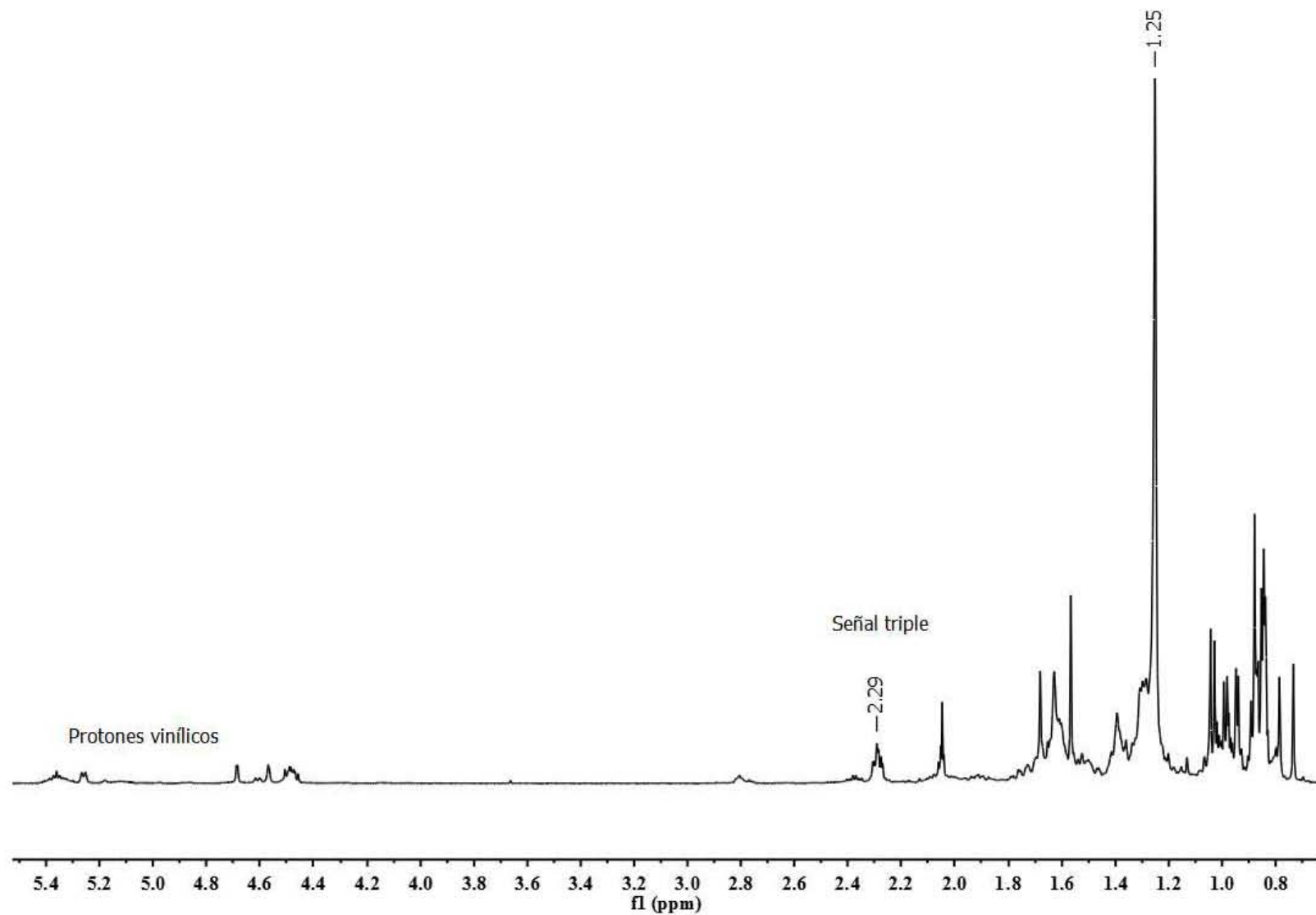


**ESPECTRO A36.** Espectro de RMN <sup>13</sup>C del 8,9-aciloxi de isobutirato de 10-benzoiloxi-6,8,9-trihidroxi timol **9** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

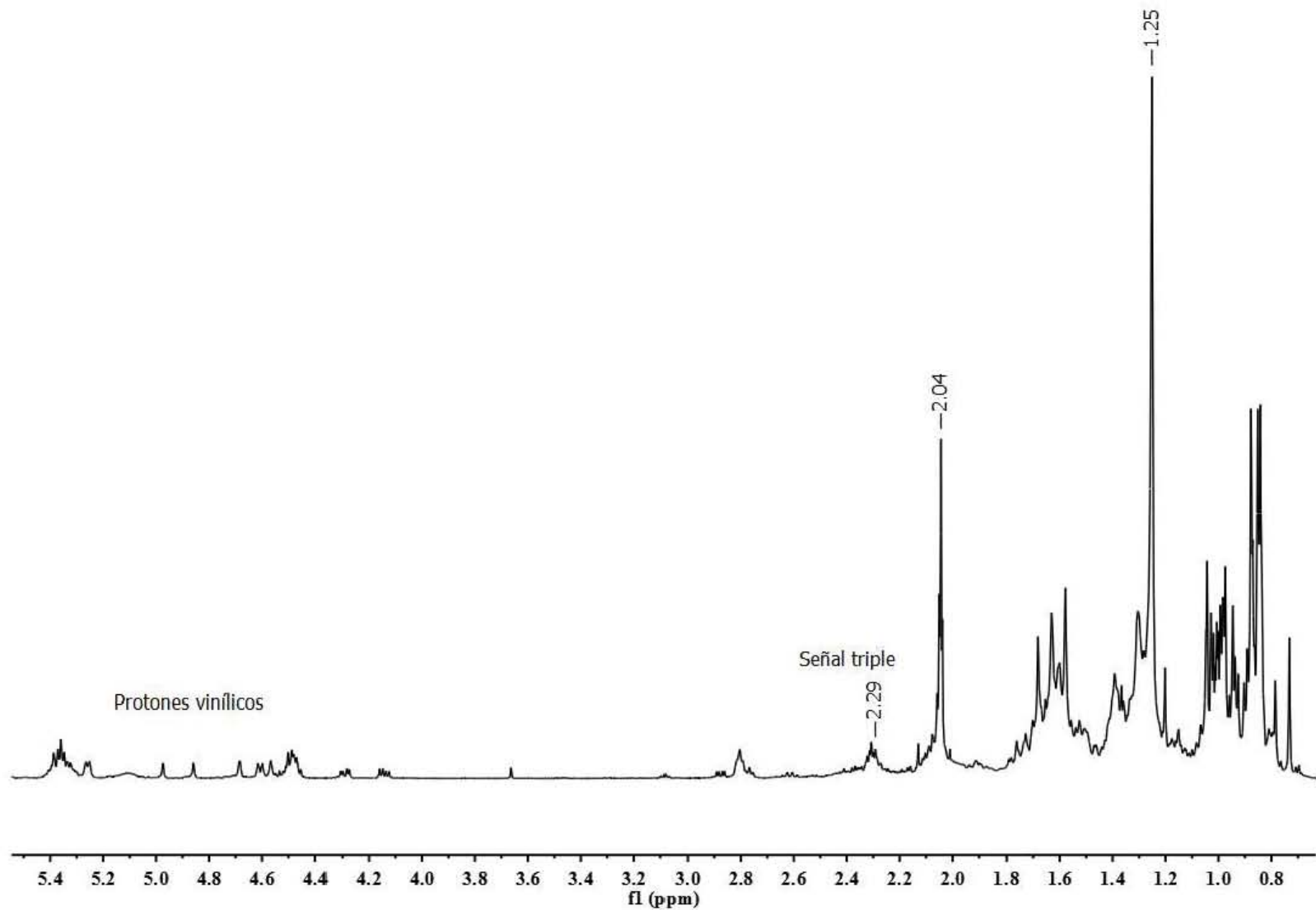




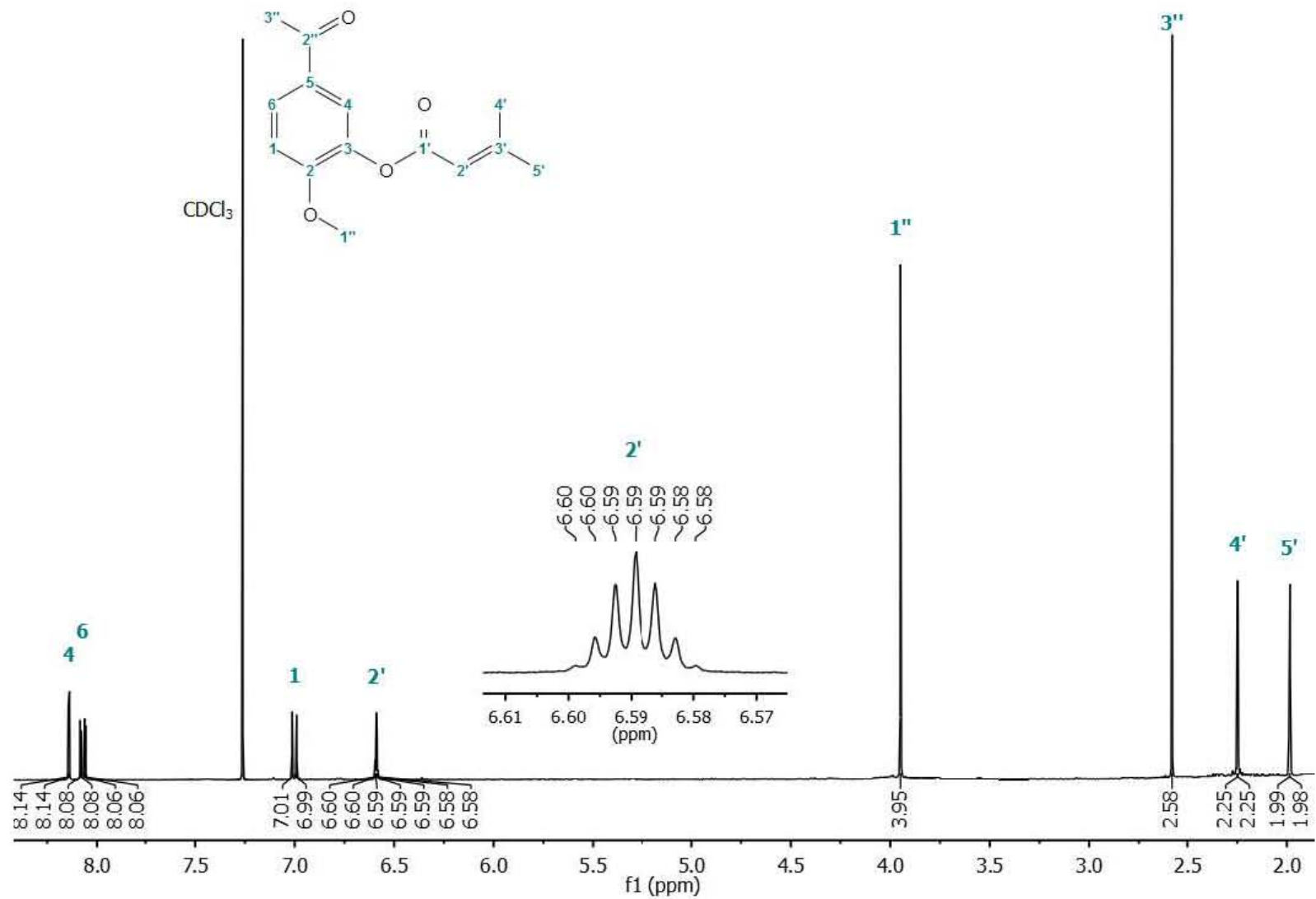
**ESPECTRO A37.** Espectro HMBC de **9** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



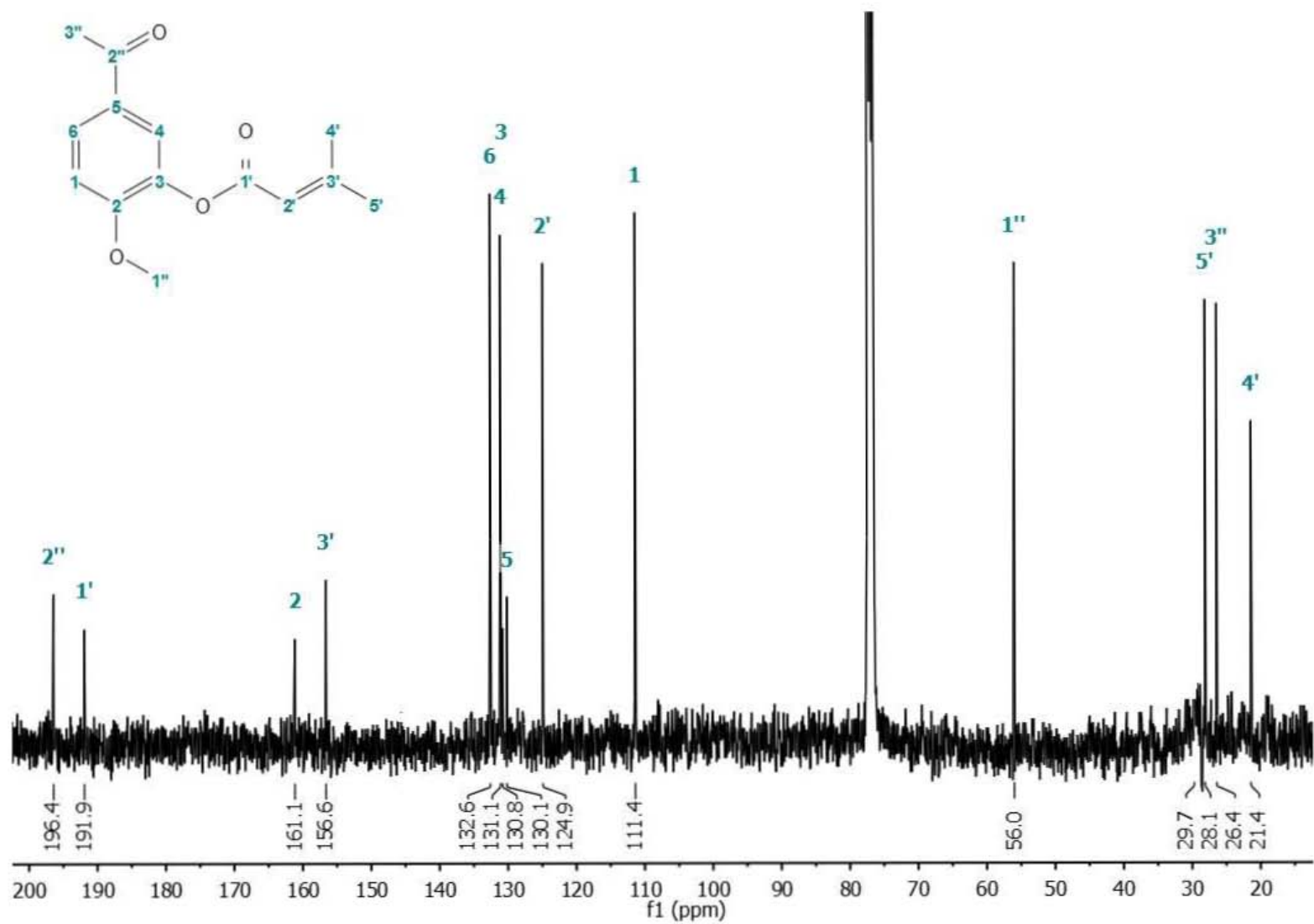
**ESPECTRO A38.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H de la fracción FC (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



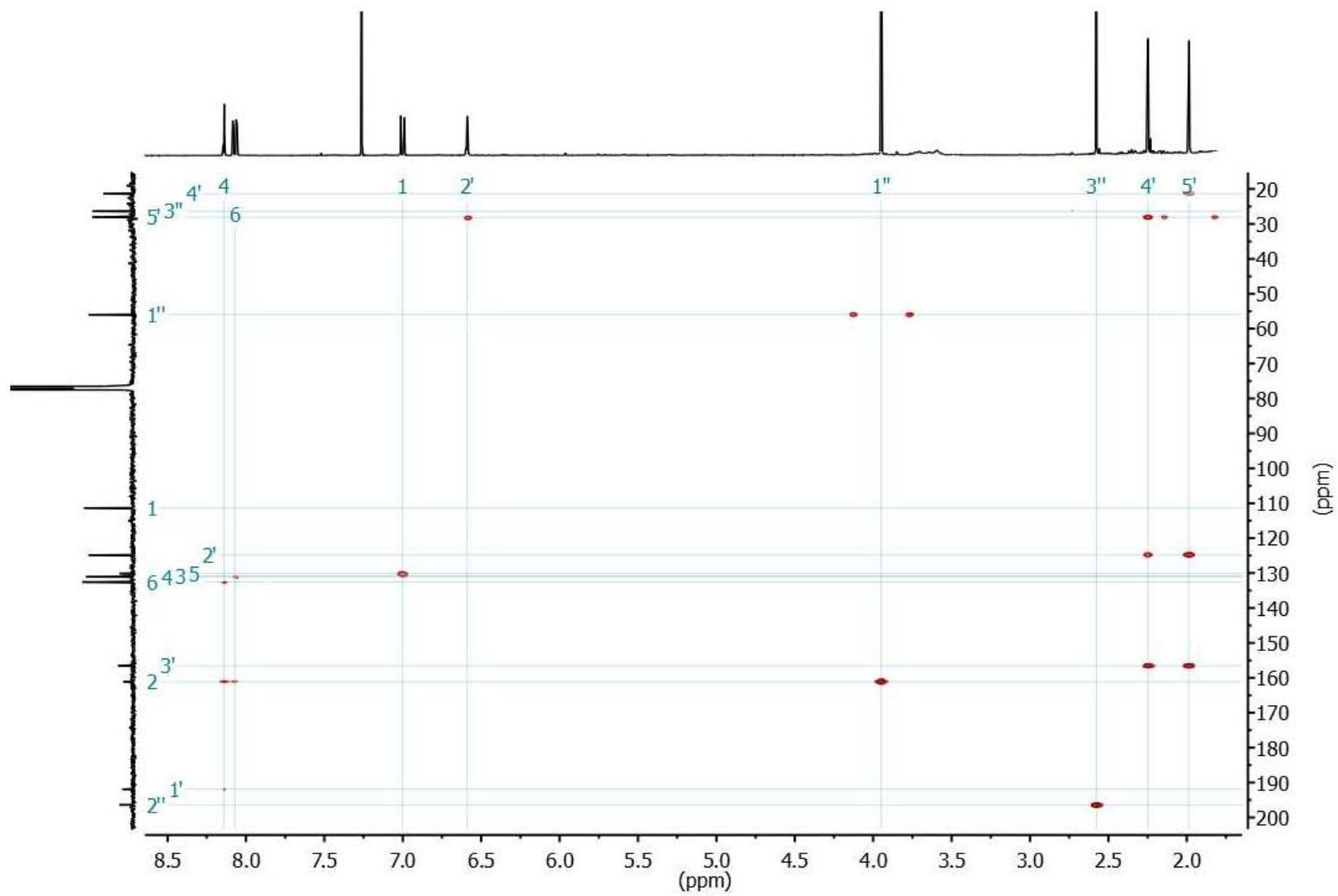
**ESPECTRO A39.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H de la fracción FD (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



ESPECTRO A40. Espectro de RMN <sup>1</sup>H de 5-acetil-2-metoxifenil- 3-metil-2-butanoato **16** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



**ESPECTRO A41.** Espectro de RMN <sup>13</sup>C de 5-acetil-2-metoxifenil- 3-metil-2-butanoato **16** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



**ESPECTRO A42.** Espectro HMBC de **16** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

Article

# Antidiarrheal Thymol Derivatives from *Ageratina glabrata*. Structure and Absolute Configuration of 10-Benzoyloxy-8,9-epoxy-6-hydroxythymol Isobutyrate

Celia Bustos-Brito <sup>1,\*</sup>, Valeria J. Vázquez-Heredia <sup>1</sup>, Fernando Calzada <sup>2</sup>, Lilian Yépez-Mulia <sup>3</sup>, José S. Calderón <sup>1</sup>, Simón Hernández-Ortega <sup>1</sup>, Baldomero Esquivel <sup>1</sup>, Normand García-Hernández <sup>4</sup> and Leovigildo Quijano <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, D.F. 04510, Mexico; la\_campanella@comunidad.unam.mx (V.J.V.-H.); uscalder@unam.mx (J.S.C.); shernandezortega@gmail.com (S.H.-O.); baldo@unam.mx (B.E.)

<sup>2</sup> UIM en Farmacología, 2o Piso CORCE, UMAE Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, Av. Cuauhtémoc 330, Col. Doctores, México, D.F. 06725, Mexico; fercalber10@gmail.com

<sup>3</sup> UIM en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, UMAE Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, Av. Cuauhtémoc 330, Col. Doctores, México, D.F. 06725, Mexico; lilianyepes@yahoo.com

<sup>4</sup> UIM en Genética Humana, UMAE Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, Av. Cuauhtémoc 330, Col. Doctores, México, D.F. 06725, Mexico; normandgarcia@gmail.com

\* Correspondence: bustosbritocelia@comunidad.unam.mx (C.B.-B.); quijano@unam.mx (L.Q.); Tel.: +52-55-5622-4411 (L.Q.)

Academic Editor: Thomas J. Schmidt

Received: 7 July 2016; Accepted: 24 August 2016; Published: 12 September 2016

**Abstract:** Chemical investigation of the leaves from *Ageratina glabrata* yielded four new thymol derivatives, namely: 10-benzoyloxy-8,9-dehydro-6-hydroxythymol isobutyrate (**4**), 10-benzoyloxy-8,9-dehydrothymol (**5**), 10-benzoyloxythymol (**6**) and 10-benzoyloxy-6,8-dihydroxy-9-isobutyryloxythymol (**7**). In addition, (8*S*)-10-benzoyloxy-8,9-epoxy-6-hydroxythymol isobutyrate (**1**), together with other two already known thymol derivatives identified as 10-benzoyloxy-8,9-epoxy-6-methoxythymol isobutyrate (**2**) and 10-benzoyloxy-8,9-epoxythymol isobutyrate (**3**) were also obtained. In this paper, we report the structures and complete assignments of the <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C-NMR data of compounds **1**–**7**, and the absolute configuration for compound **1**, unambiguously established by single crystal X-ray diffraction, and evaluation of the Flack parameter. The in vitro antiprotozoal assay showed that compound **1** and its derivative **1a** were the most potent antiamoebic and anti-giardial compounds. Both compounds showed selectivity and good antiamoebic activity comparable to emetine and metronidazole, respectively, two antiprotozoal drugs used as positive controls. In relation to anti-propulsive effect, compound **1** and **1a** showed inhibitory activity, with activities comparable to quercetin and compound **9**, two natural antipropulsive compounds used as positive controls. These data suggest that compound **1** may play an important role in antidiarrheal properties of *Ageratina glabrata*.

**Keywords:** *Ageratina glabrata*; thymol derivatives; antiprotozoal and antidiarrheal properties

## 1. Introduction

*Ageratina glabrata* (Kunth) R.M. King & H. Rob., Asteraceae, is a shrub endemic to Mexico widely distributed throughout the country. The importance of *A. glabrata* in Mexican traditional medicine is indicated by its use for treating pain and gastrointestinal disorders associated with bacterial infections.

However, chemical studies of the species are scarce. Previous phytochemical studies of *A. glabrata* show that its non-polar solvent extracts are composed mainly by thymol and eudesmane derivatives [1–3] while the essential oil is constituted mainly by monoterpenes [4]. On the other hand, evaluation for antibacterial activity of extracts of *A. glabrata* against antibiotic resistant pathogenic bacteria showed that the non-polar extract is the most active [5]. Preliminary studies on analgesic effect of extracts of *A. glabrata* in the hot plate test showed a moderate effect [6].

As part of our search for antiprotozoal and antidiarrheal compounds in *Ageratina* species, we have previously published our results on *A. cylindrica* [7,8]. The aim of this paper is to report on the isolation, structural characterization, and the antiprotozoal and antipropulsive evaluation of the thymol derivatives 1–4 and 7. Compounds 4–7 are new thymol derivatives, while compounds 1–3, have been previously reported from the same species, although their data were poorly described [3]. The chemical structures of the compounds isolated were established by spectroscopic methods, mainly MS and 1D, 2D NMR experiments (DEPT, COSY, NOESY, HSQC, HMBC), while the structure and absolute configuration of 1, were confirmed by single crystal X-ray diffraction.

## 2. Results and Discussion

Detailed investigation of a dichloromethane extract of the leaves of *A. glabrata* resulted in the isolation of seven thymol derivatives, together with the known flavonoid pectolinarigenin [9] and benzoic acid. Compound 1 (Figure 1) was isolated as colorless crystals, whose molecular composition was determined as  $C_{21}H_{22}O_6$  on the basis of its HRDARTMS molecular ion at  $m/z$  371.15003  $[M + H]^+$  (calculated for  $C_{21}H_{23}O_6$  371.14946), indicating nine degrees of unsaturation in the molecule. Its IR spectrum showed characteristic absorptions for hydroxyl ( $3599\text{ cm}^{-1}$ ) and ester groups ( $1757, 1723\text{ cm}^{-1}$ ).

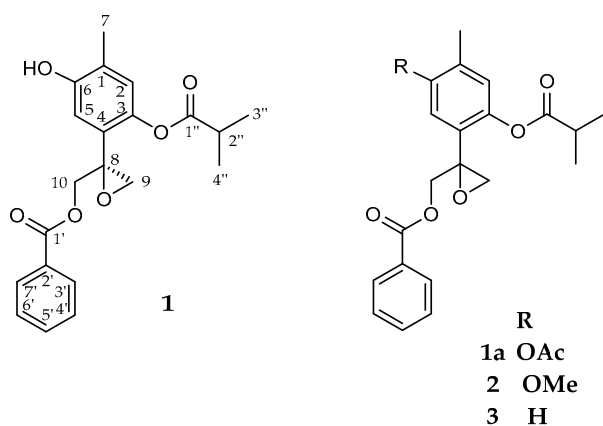


Figure 1. Chemical structure of 1–3.

The  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of 1 showed 19 resonances representing 21 carbon atoms due to three  $\text{CH}_3$ , two  $\text{CH}_2$ , eight CH groups (included two symmetric ones), and eight quaternary C atoms, according to DEPT and HSQC experiments. The  $^1\text{H}$ -NMR spectrum exhibited in the aromatic region two one-proton signals as singlets at  $\delta$  6.79 and 6.94 assigned to H-2 and H-5, respectively, indicating a tetra-substitution of the thymol ring. Characteristic resonances in the aromatic region at  $\delta$  7.97 (2H), 7.55 (1H) and 7.40 (2H), indicated the presence of a benzoate moiety, while a heptet  $\delta$  2.83 (1H,  $J = 7.2\text{ Hz}$ ) and two doublets at  $\delta$  1.312 and 1.307 (3H,  $J = 7.2\text{ Hz}$ ) revealed the presence of an isobutyrate group in the molecule. Two AB spin systems with doublets at  $\delta$  3.12, 2.86 ( $J = 5.2\text{ Hz}$ ) and 4.77, 4.48 ( $J = 12.3\text{ Hz}$ ) due to the C-9 and C-10 methylene protons supported the presence of the oxirane and the benzoate ester functionalities, respectively.

The relative position of the ester groups was established via correlations observed in the HMBC and NOESY experiments, indicating that the benzoate was attached at C-10 and isobutyrate at C-3.



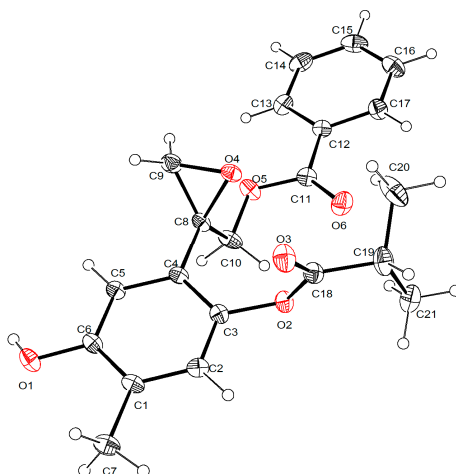
Accordingly the C-10 methylene protons at  $\delta$  4.77 and 4.48 showed a  $^3J$  correlation peak with the carbonyl carbon at  $\delta$  166.3, which in turn showed correlation peaks with the aromatic protons signal at  $\delta$  7.97 (H-3'/7') in the HMBC spectrum. On the other hand the NOESY experiment showed interactions between the isobutyrate methyl protons (H-3'', H-4'') and the methylene protons at C-9, and C-10, while the aromatic proton H-2 showed couplings with H-3'', H-4'', and the methyl protons at C-7. Therefore the isobutyrate group must be attached at C-3. Further HMBC long range couplings of the C-10 methylene protons with the quaternary carbon at  $\delta$  57.3 (C-8) and the methylene carbon at  $\delta$  51.3 (C-9), suggested the presence of the oxirane group at C-8–C-9. Acetylation of **1** with pyridine and acetic anhydride led to the acetate derivative **1a** (Figure 1). The  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra (Table 1) of **1a** displayed features similar to those of **1**, except for the presence of a sharp methyl singlet at  $\delta$  2.31 in the  $^1\text{H}$ -NMR spectrum, and two extra carbon resonances ( $\delta$  168.9 and 20.8) in the  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum, associated with the presence of the acetate group. Based on all above data, the structure of compound **1**, was established as 10-benzoyloxy-8,9-epoxy-6-hydroxythymol isobutyrate.

**Table 1.** NMR spectroscopic data ( $^1\text{H}$  400 MHz,  $^{13}\text{C}$  100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) of **1** and **1a**.

Position	<b>1</b>			<b>1a</b>	
	$\delta_{\text{C}}$ , Type	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)	HMBC	$\delta_{\text{C}}$ , Type	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)
1	126.2, C			132.2, C	
2	124.8, CH	6.79, d (0.8)	1, 3, 4, 6, 7	125.0, CH	6.96, brs
3	141.7, C			146.2, C	
4	127.2, C			127.9, C	
5	114.8, CH	6.94, s	1, 3, 6, 8	122.7, CH	7.23, s
6	152.1, C			147.0, C	
7	15.8, $\text{CH}_3$	2.18, s	1, 2, 6	16.3, $\text{CH}_3$	2.17, s
8	57.3, C			56.9, C	
9a	51.3, $\text{CH}_2$	3.12, d (5.2)	4, 8, 10	51.2, $\text{CH}_2$	3.11, d (5.2)
9b		2.86, d (5.2)	4, 8, 10		2.87, d (5.2)
10a	65.6, $\text{CH}_2$	4.77, d (12.3)	1', 4, 8, 9	65.9, $\text{CH}_2$	4.76, d (12.2)
10b		4.48, d (12.3)	1', 4, 8, 9		4.47, d (12.2)
1'	166.3, C			166.1, C	
2'	129.7, C			129.0, C	
3'	129.8, CH	7.97, m	1', 5'	129.9, CH	7.97, m
4'	128.5, CH	7.40, m	3', 5', 7'	128.5, CH	7.42, m
5'	133.4, CH	7.55, tt (7.5, 1.3)	3', 7'	133.3, CH	7.55, tt (7.4, 1.2)
6'	128.5, CH	7.40, m	3', 5', 7'	128.5, CH	7.42, m
7'	129.8, CH	7.97, m	1', 5'	129.9, CH	7.97, m
1''	176.2, C			175.3, C	
2''	34.3, CH	2.83, hep (7.2)	1'', 3'', 4''	34.3, CH	2.84, hep (7.2)
3'', 4''	19.1, 19.2, $\text{CH}_3$	1.312, 1.307 d (7.2)	1'', 2''	19.0, 19.1, $\text{CH}_3$	1.31, 1.32, d (7.2)
6-OH		5.78, brs			
$\text{COCH}_3$				20.8, $\text{CH}_3$	2.31
$\text{COCH}_3$				168.9, C	

Concerning the absolute configuration (AC) of chiral thymol derivatives, the only reported case is that of (8*S*)-8,9-epoxy-6-hydroxy-10-benzoyloxy-7-oxothymol isobutyrate (**9**), isolated from *A. cylindrica*. Its AC was established as 8*S* by vibrational circular dichroism spectroscopy in combination with density functional theory (DFT) calculations and evaluation of the Flack and Hooft X-ray parameters [7]. Evaluation of the Flack X-ray parameter for compound **1** defined its AC as 8*S*, consistent with that of compound **9**, with a similar structure. For this purpose a single crystal of **1** was mounted on an X-ray diffractometer equipped with  $\text{CuK}\alpha$  monochromated radiation and collected at 150 K. Compound **1** crystallized as two crystallographically independent molecules, in the monoclinic system, space group P2(1). The structure was solved by direct methods using a full-matrix least-squares and refined to a discrepancy index of 4.23%. The absolute configuration of **1** was determined using an anomalous dispersion effects in diffraction measurements on the crystal, the Flack parameter [10], which for

the enantiomer shown in Figure 2 was  $x = -0.03(15)$ , thus permitting confirmation of the proposed structure, and definition of the (8*S*) configuration (Figure 2). In the structure the oxirane ring forms a dihedral angle of  $56.3(2)^\circ$  and  $55.7(2)^\circ$  with the phenol group in both structures. Crystallographic data (excluding structure factors) have been deposited with the Cambridge Crystallographic Data Centre under the reference number CCDC 1490853 contains the supplementary crystallographic data for this paper. These data can be obtained free of charge via <http://www.ccdc.cam.ac.uk/conts/retrieving.html> (or from the CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK; Fax: +44 1223 336033; E-mail: [deposit@ccdc.cam.ac.uk](mailto:deposit@ccdc.cam.ac.uk)).



**Figure 2.** X-ray crystal structure of (+)-(8*S*)-10-benzoil-oxy-8,9-epoxy-6-hydroxy thymol isobutyrate (**1**).

It is necessary to point out that IR and  $^1\text{H-NMR}$  data of compound **1**, were similar to those published for eupaglabrin, a thymol derivative with an odd structure isolated from the same species [1]. Its structure was established based mainly on chemical degradation and low resolution 60 MHz  $^1\text{H-NMR}$  data. Years later, a compound with the structure **1** and similar spectroscopic data, was also published. Nonetheless, spectroscopic data were limited to incomplete  $^1\text{H-NMR}$  and some interchanged assignments [3]. In conclusion, the chemical structure and the absolute configuration of the thymol derivative previously reported from *A. glabrata* [1,3], must be represented by the stereostructure **1**.

Compound **2** (Figure 1), was isolated in minute quantities, and identified as the methyl ether derivative of **1**. Its HRDARTMS showed a pseudo-molecular ion peak at  $m/z$  385.16429  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , in agreement with a molecular formula  $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{O}_6$ . (calculated for  $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{O}_6$ , 385.16511). The NMR spectroscopic data of compound **2** (Table 2) were similar to those of **1**, except for de presence of the methoxy group with signals at  $\delta_{\text{H}}$  3.82 and  $\delta_{\text{C}}$  55.9 in its  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C-NMR}$  spectra, respectively, in addition to the downfield shift of the C6 signal from 152.1 to 155.6 ppm, indicative of the methoxy group at that position. Thus, compound **2** was identified as the methyl ether derivative of compound **1**. Methylation of **1**, using iodomethane afforded compound **2**, spectroscopically identical with the isolated compound, allowing the complete NMR assignments.

Spectroscopic data indicated that compound **3** (Figure 1) corresponded to the 6-deoxy derivative of **1**. Its molecular composition  $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_5$  was deduced on the basis of its HRDARTMS pseudo-molecular ion peak at  $m/z$  355.15516  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , (calculated for  $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{O}_5$ , 355.15455), and  $^{13}\text{C-NMR}$ , DEPT, and HSQC experiments. The  $^1\text{H-NMR}$  spectrum (Table 2), showed in the aromatic region three one-proton resonances at  $\delta$  6.88 (brd,  $J = 0.7$  Hz), 7.43 (d,  $J = 7.8$ ) and 7.07 (ddd,  $J = 7.8, 1.6, 0.7$  Hz) assigned to H-2, H-5 and H-6 of the thymol moiety, respectively, indicating a trisubstitution pattern of the thymol ring.

**Table 2.** NMR spectroscopic data ( $^1\text{H}$  400 MHz,  $^{13}\text{C}$  100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) of **2** and **3**.

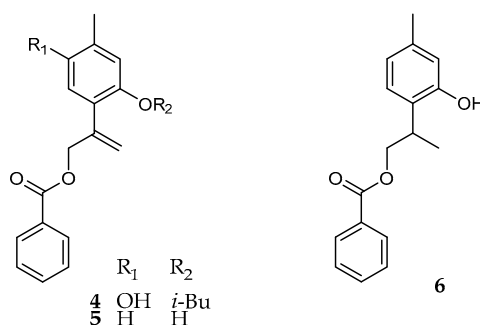
Position	2		3	
	$\delta_{\text{C}}$ , Type	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)	$\delta_{\text{C}}$ , Type	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)
1	128.6, C		140.0, C	
2	124.6, CH	6.83, brs	123.1, CH	6.88, brd (0.7)
3	141.6, C		148.7, C	
4	126.9, C		126.1, C	
5	109.9, CH	6.97, s	128.9, CH	7.43, d (7.8)
6	155.6, C		126.8, CH	7.07, ddd (7.8, 1.6, 0.7)
7	16.2, $\text{CH}_3$	2.19, brd (0.4)	21.1, $\text{CH}_3$	2.35, s
8	57.3, C		57.0, C	
9a	51.3, $\text{CH}_2$	3.13, d (5.3)	50.9, $\text{CH}_2$	3.12, d (5.3)
9b		2.87, d (5.3)		2.85, d (5.3)
10a	65.8, $\text{CH}_2$	4.79, d (12.2)	65.9, $\text{CH}_2$	4.76, d (12.2.)
10b		4.48, d (12.2)		4.47, d (12.2)
1'	166.1, C		165.9, C	
2'	129.9, C		129.72, C	
3'	129.8, CH	7.99, m	129.67, CH	7.98, m
4'	128.5, CH	7.43, m	128.4, CH	7.42, m
5'	133.3, CH	7.55, m	133.1, CH	7.55, tt (7.6, 1.3)
6'	128.5, CH	7.42, m	128.4, CH	7.42, m
7'	129.8, CH	7.99, m	129.67, CH	7.98, m
1''	175.9, C		175.3, C	
2''	34.3, CH	2.83, hep (7.2)	34.2, CH	2.85, hep (7.0)
3'', 4''	19.1, 19.2, $\text{CH}_3$	1.31, 1.32 d(7.2)	18.9, 19.0, $\text{CH}_3$	1.32, 1.33, d(7.0)
$\text{OCH}_3$	55.9, $\text{CH}_3$	3.82, s		

Careful analysis of the spectrum indicated long range  $^1\text{H}/^1\text{H}$  couplings of H-2 and H-6 with the benzylic protons of the methyl group C-7 ( $^3J = 1.6$ ,  $^4J = 0.7$  Hz). The presence of the benzoate and isobutyrate esters, were evident by the presence of characteristic benzoate signals ( $\delta_{\text{H}/\text{C}}$  7.98/129.7, 7.42/128.4 and 7.55/133.1), and the methine septet ( $\delta_{\text{H}/\text{C}}$  2.85/34.2), and methyl doublets ( $\delta_{\text{H}/\text{C}}$  1.32/18.9, 1.33/19.0) of the isobutyrate. The position of the ester moieties, was confirmed via HMBC  $^2J$  and  $^3J$  long range couplings.

Compound **4** (Figure 3) was isolated as colorless oil, whose molecular formula  $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_5$  was established according with its HRDARTMS, which shows an  $[\text{M} + \text{H}]^+$  exact mass peak at  $m/z$  355.15360 (calculated for  $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{O}_5$ , 355.15455). The  $^1\text{H}$ -NMR of compound **4** (Table 3) displayed characteristic signals for the benzoate ( $\delta_{\text{H}/\text{C}}$  8.03/130.2, 7.43/128.6 and 7.55/133.2) and the isobutyrate ( $\delta_{\text{H}/\text{C}}$  2.75/34.2, 1.27/19.1) esters. Two one-proton aromatic signals, which appeared as broadened singlets, at  $\delta$  6.81, 6.74, suggested a tetra-substituted thymol ring. The presence of two vinylic proton signals which appear as apparent quartets at  $\delta$  5.48 ( $J = 1.6$  Hz, H-9a) and 5.25 ( $J = 1.2$  Hz, H-9b), indicated that the common epoxy group at C-8–C-9 in compounds **1–3**, was replaced by an olefinic terminal methylene. The observed small  $J$  values, are due to allylic couplings with the methylene protons at C-10, which appeared as a broadened doublet of doublets at  $\delta$  5.0 ( $J = 1.6$ , 1.2 Hz). The above data, allowed the identification of compound **4** as 10-benzoyloxy-8,9-dehydro-6-hydroxy-thymol isobutyrate (**4**), which could be considered as the biosynthetic precursor of compound **1**.

A compound with the same structure as **4** was reportedly isolated from *A. glabrata* by Bohlman et al. [3], but the limited published  $^1\text{H}$ -NMR data differ completely from those of compound **4**, and are in disagreement with the structure.

Compounds **1–3** were previously isolated from *A. glabrata* [1,3,11], but as mentioned before, only limited NMR data were available. In this paper the structure and absolute configuration of compound **1**, have been unambiguously established by NMR and single crystal X-ray diffraction, as well as, the complete assignment of the  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ -NMR data for compounds **1–3**.



**Figure 3.** Chemical structures of 4–6.

**Table 3.** NMR spectroscopic data ( $^1\text{H}$  400 MHz,  $^{13}\text{C}$  100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) of 4–6.

Position	4		5		6	
	$\delta_{\text{C}}$ , Type	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)	$\delta_{\text{C}}$ , Type	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)	$\delta_{\text{C}}$ , Type	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)
1	125.0, C		140.2, C		138.0, C	
2	124.9, CH	6.80, brs	116.9, CH	6.78, d (0.7)	116.8, CH	6.68, d (0.8)
3	141.4, C		153.5, C		154.0, C	
4	130.9, C		122.6, C		125.3, C	
5	115.9, CH	6.74, s	129.3, CH	7.03, d (7.7)	127.2, CH	7.10, d (7.8)
6	151.6, C		121.2, CH	6.71, ddd (7.7, 1.7, 0.7)	121.6, C	6.74, ddd (7.6, 0.8, 0.4)
7	15.8, $\text{CH}_3$	2.22, brs	21.4, $\text{CH}_3$	2.32, s	21.1, $\text{CH}_3$	2.28, s
8	140.2, C	-	141.9, C		32.4, C	3.50, dqd (8.0, 6.8, 4.8)
9a	117.3, $\text{CH}_2$	5.48, q (1.6)	116.7, $\text{CH}_2$	5.56, q (1.6)	16.7, $\text{CH}_3$	1.42, d (6.8)
9b		5.25, q (1.2)		5.31, q (1.2)		
10a	66.7, $\text{CH}_2$	5.0, dd (1.6, 1.2)	66.6, $\text{CH}_2$	4.99, dd (1.6, 1.2)	70.2, $\text{CH}_2$	4.53, d (10.9, 4.8)
10b						4.19 dd (10.9, 8.0)
1'	166.3, C		167.2, C		167.5, C	
2'	130.2, C		129.8, C		130.3, C	
3'	129.8, CH	8.03, m	129.9, CH	8.09, m	129.8, CH	8.04, m
4'	128.6, CH	7.43, m	128.7, CH	7.47, m	128.5, CH	7.56, tt (7.2, 1.6)
5'	133.2, CH	7.55, tt (7.4, 1.4)	133.6, CH	7.60, tt (7.2, 1.3)	133.2, CH	7.44, m
6'	128.6, CH	7.43, m	128.7, CH	7.47, m	128.5, CH	7.56, tt (7.2, 1.6)
7'	129.8, CH	8.03, m	129.9, CH	8.09, m	129.8, CH	8.04, m
1''	176.1, C					
2''	34.2, CH	2.75, hep (7.0)				
3'', 4''	19.1, $\text{CH}_3$	1.27, d (7.0)				

Compounds 5 and 6 (Figure 3) are new natural thymol derivatives; they were obtained in minute amounts after repeated column chromatography and purification by thin layer chromatography. The  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of 5 (Table 3) displayed similar features than those of compound 4, except for the lack of signals ascribed to the isobutyrate moiety and the -OH group at C-6. The presence of an olefinic terminal methylene was evident from the two one-proton signals at  $\delta$  5.56 (q,  $J = 1.6$ , H-9a) and 5.31 (q,  $J = 1.2$ , H-9b), both coupled with the allylic methylene protons at C-10. Thus, the structure of compound 5 was established as 10-benzoyloxy-8,9-dehydrothymol (5).

Compound 6, was identified as the dihydroderivative of 5. Therefore, the  $^1\text{H}$ -NMR spectrum (Table 3), did not show the olefinic methylene signals, instead of that, the spectrum displayed a methyl doublet signal at  $\delta$  1.42 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H) as the part  $X_3$ , of the spin system  $\text{ABMX}_3$ , due to  $\text{H}_2$ -10, H-8 and  $\text{H}_3$ -9 protons. One methine proton signal at  $\delta$  3.50 appeared as a doublet of quartets of doublets ( $J = 8.0, 6.8, 4.8$ , Hz, 1H), coupled with the methyl doublet and the methylene protons  $\text{H}_2$ -10, according to the HSQC and HMBC experiments. The protons of the C-10 methylene bearing the benzoyloxy group appeared as the AB part of the spin system with signals at  $\delta$  4.19 (dd,  $J = 10.8, 8.0$  Hz) and 4.53 (dd,  $J = 10.8, 4.8$  Hz). Consequently, the structure of compound 6, was established as 10-benzoyloxy thymol (6), and represents a new natural thymol derivative.

Compound **7** (Figure 4) was obtained as colorless oil, whose  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra (Table 4) displayed similar spectral features as compound **1**. Two one-proton aromatic singlets at  $\delta$  6.66 and 6.60 indicating the tetrasubstitution of the thymol ring. The presence of a benzoate and an isobutyrate was evident from their characteristic signals ( $\delta_{\text{H/C}}$  7.98/129.9, 7.41/128.7, 7.55/133.6), for the benzoate and ( $\delta_{\text{H/C}}$  2.53/34.1, 1.05, 1.08/18.9, 19.0) due to the isobutyrate. The main differences between **1** and **7** were the multiplicity and chemical shifts of signals due to the methylene groups bearing the oxygen functionalities. The  $^1\text{H}$ -NMR spectrum displayed two AB spin systems with signals centered at  $\delta_{\text{H}}$  4.51, 4.58 (d,  $J = 11.6$ , C-9), and 4.64, 4.68 (d,  $J = 12.0$ , C-10), coupled with the methylene carbon signals at  $\delta_{\text{C}}$  67.5 and 68.1, according to the HSQC spectrum, respectively. In the HMBC experiment, the proton signals of both AB methylene groups, showed  $^2J$  and  $^3J$  long range couplings with the tertiary carbon signals at  $\delta_{\text{C}}$  78.3 (C-8) and 120.3 (C-4). On the other hand the AB system centered at  $\delta$  4.55 was coupled to the carbonyl at  $\delta$  177.9, which in turn, was coupled with the methine heptet and methyl doublets of the isobutyrate ( $\delta_{\text{H/C}}$  2.53/34.1, 1.05, 1.08/19.0), while the one, centered at  $\delta$  4.66 showed couplings with the carbonyl at  $\delta$  167.1, that in turn was, coupled with the benzoate protons H-3'/7' ( $\delta_{\text{H/C}}$  7.98/129.9). Thus, the isobutyrate is attached to C-9, and the benzoate at C-10. According with the above data, the structure of compound **7** was established as 10-benzoyloxy-6,8-dihydroxy-9-isobutyryloxythymol (**7**).

**Table 4.** NMR spectroscopic data ( $^1\text{H}$  400 MHz,  $^{13}\text{C}$  100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) of **7** and **7a**.

Position	7			7a	
	$\delta_{\text{C}}$ , Type	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)	HMBC	$\delta_{\text{C}}$ , Type	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)
1	126.2, C			132.3, C	
2	120.2, CH	6.66, brs	3, 4, 6, 7	126.7, CH	6.96, d (0.7)
3	149.8, C			145.3, C	
4	120.3, C			127.7, C	
5	113.0, CH	6.60, s	1, 3, 6, 8	121.8, CH	7.16, s
6	147.2, C			147.1, C	
7	15.7, $\text{CH}_3$	2.17, brs	1, 2	16.1, $\text{CH}_3$	1.63, brs
8	78.3, C			80.8, C	
9a	67.5, $\text{CH}_2$	4.58, d(11.9)	4, 8, 10, 1''	62.9, $\text{CH}_2$	4.96, d (11.4)
9b		4.51, d(11.9)	4, 8, 10, 1''		4.81, d (11.4)
10a	68.1, $\text{CH}_2$	4.68 d(12.0)	1', 4, 8, 9	63.6, $\text{CH}_2$	5.12, d (11.4)
10b		4.65, d(12.0)	1', 4, 8, 9		4.91, d (11.4)
1'	167.0, C			165.8, C	
2'	129.1, C			129.6, C	
3'	129.9, CH	7.98, m	1', 5', 7'	129.8, CH	7.95, m
4'	128.7, CH	7.41, m	3', 5', 7'	128.6, CH	7.43, m
5'	133.6, CH	7.55, tt (7.4, 1.3)	3', 7'	133.4, CH	7.55, tt (7.5, 1.3)
6'	128.7, CH	7.41, m	3', 5', 7'	128.6, CH	7.43, m
7'	129.9, CH	7.98, m	1', 5', 3'	129.8, CH	7.95, m
1''	177.9, C			176.3, C	
2''	34.1, CH	2.53, hep (7.0)	1'', 3'', 4''	34.0, CH	2.52, hep (7.0)
3'', 4''	18.9, 19.0, $\text{CH}_3$	1.05, 1.08, d (7.0)	1'', 2''	18.8, 18.9, $\text{CH}_3$	1.08, 1.10, d (7.0)
3-OCOCH <sub>3</sub>				21.3, 169.4, $\text{CH}_3$ , CO	2.38, s
6-OCOCH <sub>3</sub>				20.9, 168.8, $\text{CH}_3$ , CO	2.31, s
8-OCOCH <sub>3</sub>				21.4, 168.8, $\text{CH}_3$ , CO	2.00, s

Regarding the AC of compounds **6** and **7**, the optical rotation and ECD values of compound **6** and **7** were similar to those of compounds **1** and **9** with established 8S configuration, suggesting the same configuration for compounds **6** and **7**. Further investigation is nevertheless desirable in order to confirm the above assumption.

The HRDARTMS of **7**, did not show the  $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{O}_7$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  ion at  $m/z$  389, instead of that, it displayed the  $[\text{M} - \text{H}_2\text{O} + \text{H}]^+$ , ion peak at  $m/z$  371.14833 in agreement with a molecular formula  $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{O}_6$  (calculated 371.14946), due to the loss of water from the molecular ion. It is documented that some of these compounds are artifacts originated by the hydrolytic opening of the oxirane-ring

followed by transesterification from O-3 to O-9 during the isolation process, or after purification [12,13]. In case of compound **7**, it is indeed an artifact, since it was obtained from compound **1**, after storing at room temperature for some time.

Recently a thymol derivative isolated from *A. glabrata* has been described [14]. Its proposed structure **8**, was established on the basis of MS,  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ -NMR data. Comparison of the published data with those of compound **7**, showed to be identical. Therefore, the structure **8** must be revised, and changed to the structure **7** (Figure 4).

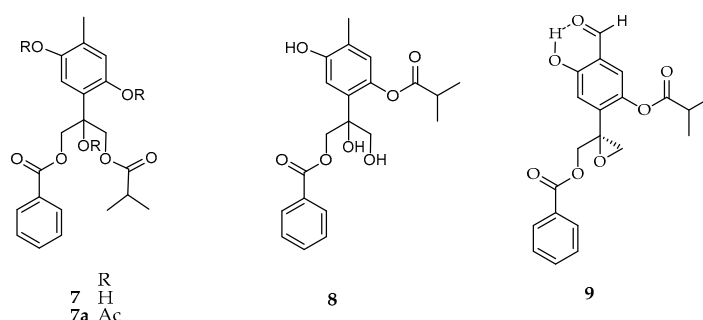


Figure 4. Chemical structures of 7–9.

Acetylation of **7** with pyridine and acetic anhydride yielded compound **7a** (Figure 4). The  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra (Table 4) of **7a** displayed features similar to those of **7**, except for the presence of three sharp methyl singlet at  $\delta$  2.00, 2.31, 2.38 in the  $^1\text{H}$ -NMR spectrum, which showed couplings with the methyl carbon signals at  $\delta$  21.4, 20.9 and 21.3 in the HSQC experiment, and with the carbonyl carbons at 168.8, 168.8 and 169.4, in the HMBC experiment, respectively. In addition, downfield shifts of the aromatic protons H-2, H-5 and the methylene protons of CH<sub>2</sub>-9 and CH<sub>2</sub>-10, inherent to the presence of the acetyl groups, were observed.

Compounds **1–4**, **7** and **1a** were investigated for antiprotozoal activity (Table 5) against *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*. Compound **1** and its derivative **1a** showed selectivity and good antiprotozoal activity on *Entamoeba histolytica* trophozoites, being their effects similar to emetine and metronidazole, two antiprotozoal drugs used as controls. In contrast, in the case of *Giardia lamblia* both compounds showed moderate anti-giardial activity. The remaining compounds **2–4**, **7**, and pectolinarigenin showed moderate antiprotozoal activity on both protozoa.

Table 5. In vitro antiprotozoal activity and inhibition of hyperperistalsis of thymol derivatives.

Compound	IC <sub>50</sub> $\mu\text{M}$ (CI) <sup>a</sup>		ID <sub>50</sub> $\mu\text{mol/kg} \pm \text{SD}$ <sup>b</sup>
	<i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Giardia lamblia</i>	Inhibition of Hyperperistalsis
<b>1</b>	1.6 (1.8–1.57)	36.9 (38.3–5.9) *	2.000 $\pm$ 0.003 **
<b>1a</b>	0.84 (0.87–0.80)	24.2 (24.7–24.0) *	0.810 $\pm$ 0.021 **
<b>2</b>	169.6 (171.3–168.9) *	191.2 (192.1–190.8) *	0.457 $\pm$ 0.004 **
<b>3</b>	25.9 (26.2–25.7) *	48.3 (48.4–45.4) *	0.740 $\pm$ 0.003 **
<b>4</b>	61.2 (62.3–59.8) *	68.0 (69.7–67.4) *	1.430 $\pm$ 0.006 **
<b>7</b>	45.6 (46.9–44.3) *	60.7 (62.3–56.9) *	0.380 $\pm$ 0.003 **
Pectolinarigenin	43.6 (44.9–41.9) *	68.7 (70.3–67.4) *	0.598 $\pm$ 0.001 **
<b>9</b> <sup>c</sup>	184.9 (186.9–180.7) *	167.4 (168.7–165.8) *	0.85 $\pm$ 0.005
Emetine <sup>d</sup>	2.18 (2.2–2.14)	0.83 (0.87–0.82)	
Metronidazole <sup>d</sup>	0.23 (0.58–0.17)	1.22 (1.57–0.81)	
Quercetin	-	-	1.1 $\pm$ 0.001
Loperamide hydrochloride <sup>d</sup>	-	-	0.2 $\pm$ 0.001

<sup>a</sup> Results are expressed as mean ( $n = 6$ ), CI = 95% confidence intervals; \*  $p < 0.05$  compared to emetine and metronidazole; <sup>b</sup> Results are expressed as mean ( $n = 6$ )  $\pm$  SD; \*\*  $p < 0.05$  compared to loperamide hydrochloride.

<sup>c</sup> See ref. 7; <sup>d</sup> Positive controls.

Compounds 1–4, 7 and 1a were also tested on the charcoal-gum acacia-induced hyperperistalsis model in rats. Compounds 1 and 4 showed moderate inhibitory activity on hyperpropulsive movement of the small intestine in rats with activities comparable to quercetin (Table 5). In addition, the remaining compounds 1a–3, 7, and pectolinarigenin showed high inhibitory activity but lower than that of loperamide hydrochloride, antidiarrheal drug used as positive control. It is important to point out that the presence of an acetate group at the C-6 position in thymol derivative 1a seems to be important for the inhibition of hyperperistalsis and antiprotozoal activity. Finally, the antidiarrheic properties reputed for *Ageratina glabrata* in Mexican traditional medicine may be due to the presence of thymol derivatives 1–4, 7 and the flavonoid, pectolinarigenin.

### 3. Materials and Methods

#### 3.1. General Procedures

Melting points were measured on a Fisher-Johns apparatus (Fisher Scientific Company, Pittsburgh, PA, USA) and are uncorrected. Optical rotations were measured on a 323 polarimeter (Perkin Elmer Inc., London, UK). Ultraviolet absorptions were recorded on a UV 160U spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan). IR spectra were obtained on a Tensor 27 spectrometer (Bruker, Ettlingen, Germany). The 1D and 2D NMR experiments were performed on a Bruker Advance III spectrometer (Bruker) at 400 MHz for  $^1\text{H}$  and 100 MHz for  $^{13}\text{C}$ . Chemical shifts were referenced to TMS and  $J$  values are given in Hz. The HRDARTMS data were recorded on an AccuTOF JMS-T100LC mass spectrometer (Jeol Ltd., Tokyo, Japan). Prep TLC was carried out on precoated Sil G/UV254 plates (Macherey Nagel, Düren, Germany) of 1.0 mm thickness. Silica gel 230–400 mesh (Macherey-Nagel), Sephadex LH-20 (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden) and octadecyl functionalized silica gel (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) were used for column chromatography. The X-ray data were collected on a D8 Venture  $\kappa$ -geometry diffractometer (Bruker).

#### 3.2. Plant Material

*Ageratina glabrata* was collected at Cuernavaca, Morelos, Mexico, in February 2015. Plant material was identified by Oscar Hinojosa Espinoza, and a voucher specimen (MEXU-1 437 258) was deposited at the National Herbarium (MEXU) of the Instituto de Biología, UNAM.

#### 3.3. Extraction, Isolation and Characterization

The air-dried and powdered leaves of *A. glabrata* (690 g) were extracted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 L  $\times$  3 times) at room temperature for 48 h. The extract was concentrated at reduced pressure to yield 18 g of residue. The crude extract was subjected to column chromatography (CC) on silica gel using gradient elution with EtOAc–hexanes (80:20) to obtain 29 eluates, 150 mL each, which were combined into 17 major fractions (A–Q) by TLC evaluation. Pectolinarigenin (50.8 mg) crystallized from fraction N. Fraction B (2.78 g) was subjected to CC on silica gel using gradient elution with EtOAc–hexanes (90:10) to obtain 55 eluates, 150 mL each, which were combined in 25 major fractions (BA–BX). Compound 1 (450 mg) crystallized from fractions BG to BJ. Fraction BD (725 mg) was further fractionated over silica gel using dichloromethane as eluent to obtain six major fractions (BDA–BDF), fraction BDD (64.5 mg) was subjected to silica gel TLC eluting with hexanes–EtOAc (70:30) to give compound 2 (17.9 mg). Fraction BG (261.6 mg) was subjected to silica gel CC eluting with dichloromethane:acetone (95:5) to give six major fractions (BGA–BGF). Fraction BGB was subjected to silica gel TLC eluting with dichloromethane–acetone (99:1) to give compound 3 (4.8 mg). Fraction C (120 mg) was separated by CC on silica gel eluted with dichloromethane–acetone (0:100–100:0) to obtain seven fractions (CA–CG). Compound 5 (5.0 mg) was identified in fraction CA. Fraction B was subjected to silica gel TLC eluting with dichloromethane to obtain compound 6 (9.8 mg). Pure 4 (13.3 mg) was obtained from fraction CE. Fraction G (889 mg) was subfractionated over a Sephadex LH-20 column, using MeOH as eluent to give five fractions (GA–GE). Benzoic acid (50.6 mg) crystallized from fraction GA. Illicic acid was obtained

as pure compound from fraction GB. Fraction GC was subjected to silica gel CC using  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  as eluent to obtain seven fractions (GCA–GCG). Pure compound **7** (24.3 mg) was obtained from fraction GCD.

(8*S*)-10-Benzoyloxy-8,9-epoxy-6-hydroxythymol isobutyrate (**1**). Colorless crystals ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -hexane); m.p. 110–112 °C;  $[\alpha]_{589} +14.5$  (c 0.001, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ) 204 (4.71), 225 (4.52), 280 (3.30) nm; ECD (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\Delta\epsilon$ ): 204 (−3.2), 209 (0.2), 226 (−1.4), 253 (0.3); IR ( $\text{CHCl}_3$ )  $\nu_{\text{max}}$  3599, 2980, 1752, 1722, 1273  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) see Table 1; HRDARTMS  $m/z$  371.15003 (calculated for  $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_6 + \text{H}$ , 471.14946).

10-Benzoyloxy-8,9-epoxy-6-acetyloxythymol isobutyrate (**1a**). Colorless oil;  $[\alpha]_{589} +14.7$  (c 0.002, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ) 203 (4.47), 252 (4.52), 273 (4.51) nm; ECD (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\Delta\epsilon$ ): 202 (−10.5), 224 (−2.9), 244 (0.4); IR ( $\text{CHCl}_3$ )  $\nu_{\text{max}}$  2979, 2937, 1757, 1721, 1270  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) see Table 1; HRDARTMS  $m/z$  413.16040 (calculated for  $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{O}_7 + \text{H}$ , 413.16003).

10-Benzoyloxy-8,9-epoxy-6-methoxythymol isobutyrate (**2**). Colorless oil;  $[\alpha]_{589} +14.6$  (c 0.0015,  $\text{CHCl}_3$ ); UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ) 204 (4.54), 225 (4.34), 276 (3.70) nm; ECD (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\Delta\epsilon$ ): 204 (−6.3), 230 (−1.1), 250 (0.2); IR ( $\text{CHCl}_3$ )  $\nu_{\text{max}}$  2979, 2938, 1751, 1722, 1272  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) see Table 2; HRDARTMS  $m/z$  385.16429 (calculated for  $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{O}_6 + \text{H}$ , 385.16511).

10-Benzoyloxy-8,9-epoxythymol isobutyrate (**3**). Colorless oil;  $[\alpha]_{589} -3.9$  (c 0.002,  $\text{CHCl}_3$ ); UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ) 203 (4.27), 221 (4.16), nm; ECD (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\Delta\epsilon$ ): 205 (1.1), 215 (−0.5); IR ( $\text{CHCl}_3$ )  $\nu_{\text{max}}$  2976, 2938, 1757, 1723, 1271  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) see Table 2; HRDARTMS  $m/z$  355.15516 (calculated for  $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_5 + \text{H}$ , 355.15455).

10-Benzoyloxy-8,9-dehydro-6-hydroxythymol isobutyrate (**4**). Colorless oil; UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ) 204 (4.31), 225 (4.23), 276 (3.58) nm; IR ( $\text{CHCl}_3$ )  $\nu_{\text{max}}$  3522, 2953, 2927, 1757, 1713, 1291  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) see Table 3; HRDARTMS  $m/z$  355.15360 (calculated for  $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_5 + \text{H}$ , 355.15455).

10-Benzoyloxy-8,9-dehydrothymol isobutyrate (**5**). Colorless oil;  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) see Table 3.

10-Benzoyloxythymol isobutyrate (**6**). white powder; m.p. 94–97 °C  $[\alpha]_{589} +12.27$  (c 0.002,  $\text{CHCl}_3$ ); UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ) 205 (3.87), 224 (3.80), 275 (3.21) nm; ECD (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\Delta\epsilon$ ): 203 (−4.3), 217 (0.5), 238 (−0.7), 277 (1.6); IR ( $\text{CHCl}_3$ )  $\nu_{\text{max}}$  3599, 3400, 2970, 2928, 1752, 1714, 1279  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) see Table 3.

10-Benzoyloxy-6,8-dihydroxy-9-isobutyryloxythymol (**7**). Colorless oil;  $[\alpha]_{589} 0.00$  (c 0.001,  $\text{CHCl}_3$ ); UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ) 205 (4.96), 228 (4.89), 293 (4.40) nm; ECD (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\Delta\epsilon$ ): 202 (−9.3), 208 (2.0), 213 (1.2), 221 (0.5); IR ( $\text{CHCl}_3$ )  $\nu_{\text{max}}$  3603, 3398, 2979, 2936, 1724, 1291  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) see Table 4; HRDARTMS  $m/z$  371.14933  $[\text{M} - \text{H}_2\text{O}]^+$  (calculated for  $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{O}_6$ , 371.149646). ESIMS  $m/z$  411.

10-Benzoyloxy-6,8-diacetyloxy-9-isobutyryloxythymol acetate (**7a**). Colorless oil;  $[\alpha]_{589} +3.60$  (c 0.001,  $\text{CHCl}_3$ ); UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ) 203 (6.32), 223 (6.16), 274 (5.27) nm; ECD (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\Delta\epsilon$ ): 202 (−6.9), 208 (0.4), 216 (−0.6), 226 (−0.5), 241 (0.2); IR ( $\text{CHCl}_3$ )  $\nu_{\text{max}}$  2978, 2936, 1759, 1370, 1271  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) see Table 4; DARTMS  $m/z$  546  $[\text{M} - \text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2]^+$ .

### 3.4. X-ray Crystallography of Compound **1**

Colorless crystals of  $0.376 \times 0.188 \times 0.098 \text{ mm}^3$ , with empirical formula  $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_6$ , and  $M_r = 370.39$ , crystallized in a Monoclinic crystal system,  $P2_1$ , with cell parameters  $a = 10.0148(8) \text{ \AA}$ ,  $b = 7.6733(6) \text{ \AA}$ , and  $c = 24.814(2) \text{ \AA}$ .  $V = 1872.2(3) \text{ \AA}^3$ ,  $Z = 4$ ,  $D_{\text{calcd}} = 1.314 \text{ Mg/m}^3$ ,  $m\mu = 0.796 \text{ mm}^{-1}$ ,  $F(000) = 784.0$ . Compound **1** was irradiated with  $\text{CuK}\alpha$  radiation ( $\lambda = 1.54178 \text{ \AA}$ ) on the Bruker D8 Venture  $\kappa$ -geometry diffractometer with microfocus X-ray source and Helios multilayer mirror as monochromator, using an APEX 3 program [15] at 150(2) K. Data reduction was achieved using the SAINT program [15] Totals of 23784 reflections were collected, from which 6748 ( $R_{\text{int}} = 0.0767$ ) reflections were independent. Structure was solved using direct methods and then refined with the



SHELXS and SHELXL programs [16] with full-matrix least-squares on F<sub>2</sub>, respectively. ORTEP-3 software [17] was used for the figures.

The final values  $S = 1.064$ ,  $R_1 = 0.0479$ , and  $wR_2 = 0.1092$  were based on 6748 reflections observed, 499 parameters. The largest different peak and hole for **1** was 0.196 and  $-0.161 \text{ e} \cdot \text{\AA}^{-3}$ .

### 3.5. Antiprotozoal Assays

*Entamoeba histolytica* strain HM1-IMSS used in all experiments was grown axenically at 37 °C in TYI-S-33 medium supplemented with 10% heat inactivated bovine serum. In the case of *Giardia lamblia*, strain IMSS: 8909:1 was grown in TYI-S-33 modified medium supplemented with 10% calf serum and bovine bile. The trophozoites were axenically maintained and for assays were employed in the log phase of growth. In vitro susceptibility tests were performed using a subculture method previously described [18]. Briefly, *E. histolytica* ( $6 \times 10^3$ ) or *G. lamblia* ( $5 \times 10^4$ ) trophozoites were incubated for 48 h at 37 °C in the presence of different concentrations (2.5–200 µg/mL) of the crude extract or pure compounds in dimethyl sulfoxide (DMSO). Each test included metronidazole (Sigma) as standard amoebicidal and giardicidal drugs, a control (culture medium plus trophozoites and DMSO), and a blank (culture medium). After incubation, the trophozoites were detached by chilling and 50 µL samples of each tube were subcultured in fresh medium for another 48 h, without antiprotozoal samples. The final number of parasites was determined with a haemocytometer and the percentages of trophozoites growth inhibition were calculated by comparison with the control culture. The results were confirmed by a colorimetric method: the trophozoites, were washed and incubated for 45 min at 37 °C in phosphate buffer saline with MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) and phenazine methosulfate. The dye produced (formazan) was extracted and the absorbance was determined at 570 nm. The experiments were performed in duplicate for each protozoan and repeated at least three times. The in vitro results were classified as follows: if the samples displayed an IC<sub>50</sub> less than 20 µM, the antiprotozoal activity was considered good, from 21 to 160 µM the antiprotozoal activity was considered moderate, from 161 to 200 µM the antiprotozoal activity was considered weak and over 200 µM/mL the samples were considered inactive. Data were analyzed using probit analysis. The percentage of trophozoites surviving was calculated by comparison with the growth in the control group. The plot of probit against log concentration was made; the best straight line was determined by regression analysis and the 50% inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) values were calculated. The regression coefficient, its level of significance ( $p < 0.05$  indicates significant difference between group) and correlation coefficient were calculated and 95% CI values determined.

### 3.6. Animals

Male Sprague-Dawley rats (200–250 g) were obtained from the animal house of the IMSS. These studies were conducted with the approval of the Specialty Hospital Bio-Ethical Committee of the National Medical Center “Siglo XXI” from IMSS (Approval No.: R-2012-3601-182). Investigation using experimental animals was conducted in accordance with the official Mexican norm NOM 0062-ZOO-1999 entitled Technical specifications for the production, care and use of laboratory animals [19]. They were fasted overnight but tap water was available ad libitum until the start of the experiments.

### 3.7. Effect on Charcoal-Gum Acacia-Induced Hyperperistalsis

The method, described by Williamson et al. [20] was adopted to study the effect of the compounds on hyperperistalsis in rats. The test animals were divided into control group and test groups containing six rats in each group. Rats were treated orally with each compound (0.01, 0.1, 1.0, 10, 20, 40 mg/kg in 1 mL of a 2% dimethyl sulfoxide (DMSO) solution in water), or vehicle (1 mL of a 2% DMSO solution in water) or loperamide hydrochloride (Sigma) (0.1, 1.0, 10, 20, 40 mg/kg in 1 mL of a 2% DMSO solution in water). After 20 min, each of these animals was given 1 mL of charcoal meal (10% charcoal suspension in 5% aqueous arabic gum) by oral route. All animals were sacrificed

after 30 min, the stomach and small intestine were removed and extended on a clean glass surface. The distance moved by the charcoal meal from the pylorus was measured and then expressed as a percentage of the distance from the pylorus to the caecum. After, the plot of percentage of inhibition against concentration was made; the best straight line was determined by regression analysis and the 50% inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) values were calculated. The regression coefficient, its level of significance (*p*) and correlation coefficient were calculated. The experiments were performed six times for each concentration. IC<sub>50</sub> values are mean ± S.E.M. *p* < 0.05 (1-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test), GraphPad Prism Version 5.03 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) was used.

**Supplementary Materials:** Supplementary materials can be accessed at: <http://www.mdpi.com/1420-3049/21/9/1132/s1>.

**Acknowledgments:** The authors acknowledge H. Rios, I. Chávez, B. Quiroz, E. Huerta, A. Peña, R. Patiño, L. Velasco, J. Pérez and C. García for collecting NMR, UV, IR, and MS data.

**Author Contributions:** Valeria J. Vázquez-Heredia, Celia Bustos-Brito, José S. Calderón, Baldomero Esquivel and Leovigildo Quijano, participated in the isolation and structure elucidation, preparation and revision of the manuscript. Simon Hernández-Ortega participated in the collection of X ray data. Fernando Calzada and Lilian Yépez-Mulia, participated in the performance of anti-protozoan assays and their data statistic treatment. Fernando Calzada and Normand Garcia-Hernandez participated in the performance of antipropulsive assays and their data statistic treatment. All co-authors participated equally and substantially to the paper.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. De Vivar, A.R.; Cuevas, L.A.; Guerrero, C. Eupaglabrina, un nuevo terpeno aislado de *Eupatorium glabratum*. *Rev. Latinoam. Chem.* **1971**, *2*, 32–34.
2. Guerrero, C.; Silva, M.; Maldonado, E.; Martinez, M. Acido eupaglabrico un Nuevo compuesto aislado de *Eupatorium glabratum* H.B.K. *Rev. Latinoam. Chem.* **1978**, *9*, 71–75.
3. Bohlmann, F.; Jakupovic, J.; Lonitz, M. Naturally Occurring Terpene Derivatives, 76, On Constituents of the *Eupatorium* group. *Chem. Ber.* **1977**, *110*, 301–314. [[CrossRef](#)]
4. Pimienta-Rámirez, L.; García-Rodríguez, Y.M.; Rios-Ramirez, E.M.; Linding-Cisneros, R.; Espinoza-Garcia, F.J. Chemical composition and evaluation of the essential oil from *Eupatorium glabratum* as biopesticide against *Sitophilus zeamais* and several stored maize fungi. *J. Essent. Oil Res.* **2016**, *28*, 113–120. [[CrossRef](#)]
5. García-Sánchez, E.; Ramírez-López, C.B.; Martínez-Muñoz, R.E.; Flores-García, A.; del Río, R.E.; Martínez-Pacheco, M.M. Antibacterial activity of some medicinal *Eupatorium* species against antibiotic resistant pathogenic bacteria. *Polibotánica* **2015**, *39*, 91–101. [[CrossRef](#)]
6. García, P.G.; del Río, R.E.; Guzmán, M.R.; Martínez, G.M.I.; Scior, T.R.F. Preliminary studies on the analgesic effect of leaf extract from *Ageratina glabrata* in two thermal models of acute pain. *Rev. Mex. Cienc. Farm.* **2011**, *42*, 45–51.
7. Bustos-Brito, C.; Sánchez-Castellanos, M.; Esquivel, B.; Calderón, J.S.; Calzada, F.; Yépez-Mulia, L.; Hernández, A.B.; Joseph-Nathan, P.; Cuevas, G.; Quijano, L. Structure, absolute configuration, and antidiarrheal activity of a thymol derivative from *Ageratina cylindrica*. *J. Nat. Prod.* **2014**, *77*, 358–363. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Bustos-Brito, C.; Sánchez-Castellanos, M.; Esquivel, B.; Calderón, J.S.; Calzada, F.; Yépez-Mulia, L.; Joseph-Nathan, P.; Cuevas, G.; Quijano, L. ent-Kaurene Glycosides from *Ageratina cylindrica*. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 2580–2587. [[PubMed](#)]
9. Deng, Y.R.; Song, A.X.; Wang, H.Q. Chemical Components of *Seriphidium santolium* Poljak. *J. Chin. Chem. Soc.* **2004**, *51*, 629–636. [[CrossRef](#)]
10. Flack, H.D.; Bernardinelli, G. The use of X-ray chrystallography to determine absolute configuration. *Chirality* **2008**, *20*, 681–690. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Tamayo-Castillo, G.; Jakupovic, J.; Bohlmann, F.; Rojas, A.; Castro, V.; King, R.M. Germacranolides and other constituents from *Ageratina* species. *Phytochemistry* **1988**, *27*, 2893–2897. [[CrossRef](#)]
12. Maldonado, E.; Marquez, L.C.; Ortega, A. A thymol derivative from *Calea nelsonii*. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 2527–2528. [[CrossRef](#)]

13. Bohlmann, F.; Nuedballa, U.; Schulz, J. Über einige thymolderivate aus *Gaillardia*-und *Helenium*-arten. *Chem. Ber.* **1969**, *102*, 864–871. [[CrossRef](#)]
14. García, P.G.; García, S.E.; Martínez, G.I.; Scior, T.R.F.; Salvador, J.L.; Martínez, P.M.M.; del Río, R.E. Analgesic effect of leaf extract from *Ageratina glabrata* in the hot plate test. *Braz. J. Pharmacog.* **2011**, *21*, 928–935.
15. Bruker. *SAINT & APEX-2 Programs*; Bruker AXS Inc.: Madison, WI, USA, 2012.
16. Sheldrick, G.M. Crystal structure refinement with SHELXL. *Acta Crystallogr. Sect. C Struct. Chem.* **2015**, *C71*, 3–8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Farrugia, L.J. WinGX and ORTEP for Windows: An update. *J. Appl. Crystallogr.* **2012**, *45*, 849–854. [[CrossRef](#)]
18. Calzada, F.; Meckes, M.; Cedillo-Rivera, R.; Tapia-Contreras, A.; Mata, R. Screening of Mexican medicinal plants from antiprotozoal activity. *Pharm. Biol.* **1998**, *36*, 305–309. [[CrossRef](#)]
19. *Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones Técnicas Para la Producción, Cuidado y Uso de Los Animales de Laboratorio*; Diario Oficial de la Federación: México City, México, 2001.
20. Williamson, E.M.; Okpako, D.T.; Evans, F.J. *Pharmacological Methods in Phytotherapy Research: Selection, Preparation and Pharmacological Evaluation of Plant Material*, 1st ed.; John Wiley & Sons: Chichester, UK, 1996; Volume 1, p. 28.

**Sample Availability:** Samples of the compounds **1**, **1a**, **2**, **3** and **7** are available from the authors.



© 2016 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC-BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).